



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

*"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"*

Trabajo de Tesis

Aplicación de tres técnicas tintoriales de diagnóstico para la identificación de Hemopatógenos en equinos de adiestramiento en la región 3 de Managua, 2020.

Autores:

Br. Adriel Obed Palacio González

Br. Hilton Ismet Marín Hernández

Asesores:

Dr. Omar Navarro Reyes

Dra. Karla Marina Ríos Reyes

Managua, Nicaragua

Abril, 2020



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo de Tesis

Aplicación de tres técnicas tintoriales de diagnóstico para la identificación de Hemopatógenos en equinos de adiestramiento en la región 3 de Managua, 2020.

Autores:

Br. Adriel Obed Palacio González

Br. Hilton Ismet Marín Hernández

Asesores:

Dr. Omar Navarro Reyes

Dra. Karla Marina Ríos Reyes

Managua, Nicaragua

Abril, 2020

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Ciencia Animal como requisito parcial para optar al título profesional de:

Médico Veterinario
En el grado de Licenciatura

Miembros del Honorable Comité Evaluador

MSc. José Antonio Vivas Garay

Presidente

MV. Fredda Ramírez Gutiérrez

Secretaria

MSc. Mauricio Silva Torres

Vocal

Managua, Nicaragua, fecha (26/Mayo/2020).

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1. Introducción de los caballos de doma a Nicaragua	4
3.2. Razas que predominan en Nicaragua	4
3.2.1. Raza Iberoamericana	4
3.2.2. Raza Andaluz (española)	5
3.3. Enfermedades más comunes en los equinos de Nicaragua	6
3.3.1. <i>Babesia caballi</i>	6
3.3.2. <i>Trypanosoma evansi</i>	8
3.3.3. <i>Theileria equi</i>	.9
3.3.4. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	.10
3.4. Importancia epidemiológica	11
3.5. Importancia diagnóstica	11
3.6. Técnicas de diagnóstico de hemopatógenos en estudio (tinciones)	11
3.6.1. Tinción Giemsa	.12
3.6.2. Tinción Wright	.12
3.6.3. Tinción Diff – Quick ®	12
3.7. Bienestar animal	12
IV. METODOLOGÍA	13

4.1.	Ubicación del área de estudio	13
4.2.	Diseño metodológico	14
4.3.	Manejo del ensayo	14
4.3.1.	Entrevista	14
4.3.2.	Ficha clínica	.15
4.3.3.	Hoja de reporte post análisis	.15
4.4.	Variables	15
4.4.1.	Identificación de hemopatógenos	15
4.4.2.	Comparación de técnicas	16
4.4.3.	Aplicación de medidas preventivas	16
4.5.	Recolección de los datos	16
4.5.1.	Fase de campo	.16
4.5.2.	Fase de laboratorio	.17
4.6.	Análisis de datos	20
4.7.	Materiales y equipos	20
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1.	Identificación de hemopatógenos	21
5.2.	Comparación de resultados entre las técnicas de tinción	.22
5.3.	Aplicación de medidas preventivas en las caballerizas	25
VI.	CONCLUSIONES	27
VII.	RECOMENDACIONES	28
VIII.	LITERATURA CITADA	29
IX.	ANEXOS	34

DEDICATORIA

A nuestro creador dedicamos en gran estima esta culminación, por las debilidades y fortalezas en las que Dios nos ilumino y obstáculos que nos ayudó a superar, por la salud, la vida y la familia.

A nuestros familiares que reciben con gran alegría, orgullo y satisfacción este merecido logro; tras concluir una etapa muy valiosa en el área profesional, a todos los docentes que en toda la vida de estudiantes nos enseñaron la luz del conocimiento, ganando así mismo su amistad y confianza que perdurarán toda la vida, gesto que no quedará sin recompensa por Dios.

A nuestros progenitores de manera especial quienes se sacrificaron y lucharon para que pudiéramos lograr, superar y haber cumplido este hermoso sueño, Dios les bendiga en gran manera y derrame abundantes riquezas sobre sus vidas y que este sea solo el inicio de un futuro muy prodigioso.

Adriel Obed Palacio González

Hilton Ismet Marín Hernández

AGRADECIMIENTO

Le damos primeramente gracias a Dios todo poderoso; que nos proveo todo lo necesario para escalar un peldaño más en nuestras vidas como profesional y haber llegado a este momento de gran importancia; así mismo a todas las personas que son parte de este sueño hecho realidad; tales como nuestros asesores Dra. Karla Ríos Reyes y Dr. Omar Navarro Reyes por compartir sus conocimientos, tiempo y experiencia en su profesión como Médicos Veterinarios.

A nuestros familiares y amigos que nos brindaron su apoyo espiritual, emocional y de recursos para poder culminar esta etapa como profesionales.

A la Universidad Nacional Agraria (UNA), Facultad de Ciencia Animal (FACA); por habernos abierto las puertas, ser parte de ella y brindarnos los conocimientos para formarnos como profesionales del campo de la Medicina Veterinaria.

Por último, agradecer a los criadores y propietarios ecuestres, que nos facilitaron sus equinos para llevar a cabo nuestra investigación, de igual manera a todas las personas que estuvieron involucradas a lo largo de este proceso.

Adriel Obed Palacio González

Hilton Ismet Marín Hernández

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Identificación de Hemopatógenos	15
2. Comparación de técnicas	16
3. Aplicación de medidas preventivas	16

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Yegua iberoamericana	4
2. Yegua andaluz	5
3. <i>Babesia caballi</i>	7
4. <i>Trypanosoma spp</i>	8
5. <i>Theileria equi</i>	9
6. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10
7. Ubicación de la investigación	13
8. Diagnóstico Diff-Quick ®	21
9. Diagnóstico Giemsa	21
10. Diagnóstico Wright	21
11. Comparación entre las técnicas de tinción	22
12. Comparación de la presencia de Hemopatógenos en las caballerizas	24
13. Aplicación de medidas preventivas en las caballerizas	25

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Formato de entrevista	35
2. Ficha clínica	36
3. Reporte post análisis	37
4. Recolección de datos de paciente y entrevista	38
5. Inspección clínica	39
6. Extracción de muestra	40
7. Almacenamiento y transporte de las muestras	41
8. Procesamiento de muestras en laboratorio	42

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en 3 caballerizas ubicadas en la región tres del mapa epidemiológico del IPSA (Nejapa, Ciudad Sandino y Los Brasiles), con el objetivo de comparar la capacidad diagnóstica o sensibilidad en la detección de hemopatógenos con técnicas de tinción Giemsa, Wright y Diff-Quick®. Se realizó un estudio experimental de tipo descriptivo en el periodo de febrero a mayo del 2020, se diseñaron tres instrumentos para la recolección de los datos (entrevista, ficha clínica, hoja de reporte post análisis), posteriormente se efectuó una visita a cada una de las caballerizas en la cual se llevó a cabo la entrevista con el responsable de área o encargado de estas, además del chequeo completo de los pacientes, tomas de muestras que fueron remitidas a laboratorio y se realizaron las pruebas de tinción (Giemsa, Wright, Diff – Quick ®). La cantidad de equinos en estudio fue de 60 caballos de distintas edades, entre hembras y machos. Se obtuvo de los 60 caballos muestreados en las tres caballerizas del estudio, 15 individuos con *Anaplasma phagocytophilum* correspondiente al 25% de equinos positivos y el 75% negativos. De 60 equinos muestreados, 15 caballos dieron positivo a *Anaplasma phagocytophilum* entre las tres técnicas, la tinción Giemsa diagnosticó 14 animales con *Anaplasma phagocytophilum*, mientras que la tinción de Wright diagnosticó 13 animales positivos a este mismo hemopatógeno y Diff-Quick diagnosticó 12 animales positivos a *Anaplasma phagocytophilum*. 7 equinos fueron diagnosticados con *Anaplasma phagocytophilum* en la caballeriza 1, mientras que en la caballeriza 2 se diagnosticó a 2 caballos con el mismo agente y en la caballeriza 3 se encontró 6 individuos positivos al hemopatógeno. La aplicación de las medidas preventivas en las tres caballerizas se basa en la administración de antiparasitarios, ivermectina en pasta y el control de vectores (fumigaciones, limpieza y chapoda de los alrededores de los establos), la caballeriza 1 y 3 solo ponen en práctica la administración de antiparasitarios a base de ivermectina, mientras que la caballeriza 2 practica el control de vectores y aplica de antiparasitarios a base de ivermectina. Las tres técnicas utilizadas para el diagnóstico de hemopatógenos fueron efectivas con un grado de sensibilidad diferente entre tinciones, obteniendo como resultado la técnica de tinción Giemsa con el mayor grado de sensibilidad donde se pudo observar 14 de 15 animales positivos a hemopatógenos. Se recomienda utilizar la tinción Giemsa con mayor frecuencia para obtener mejores resultados en cuanto a sensibilidad diagnóstica y con menores gastos económicos. Tomando en cuenta como Médicos Veterinarios que los resultados de la tinción Wright nos dejan observar mejor la morfología celular y así podemos apreciar otros trastornos hematológicos como hipocromía, hipercromía, microcitosis, entre otros.

Palabras claves: *Anaplasma phagocytophilum*, Giemsa, Wright, Diff-Quick®.

ABSTRACT

This research work was carried out in 3 stables located in region three of the IPSA epidemiological map (Nejapa, Ciudad Sandino and Los Brasiles), with the aim of comparing the diagnostic capacity or sensitivity in the detection of hemopathogens with techniques of Giemsa, Wright and Diff-Quick® staining. A descriptive experimental study was carried out in the period from February to May 2020, three instruments were designed to collect the data (interview, clinical file, post-analysis report sheet), then a visit was made to each of the stables in which the interview with the person in charge of the area was carried out, in addition to the complete check-up of the patients, taking samples that were sent to the laboratory and staining tests were carried out (Giemsa, Wright, Diff - Quick ®). The number of equines under study was 60 horses of different ages, between females and males. From the 60 horses sampled in the three stables of the study, 15 individuals with *Anaplasma phagocytophilum* corresponding to 25% of positive equines and 75% of negative equines were obtained. Out of 60 horses sampled, 15 horses tested positive for *Anaplasma phagocytophilum* among the three techniques, the Giemsa stain diagnosed 14 animals with *Anaplasma phagocytophilum*, while the Wright stain diagnosed 13 animals positive for this same hemopathogen and Diff-Quick diagnosed 12 animals positive for *Anaplasma phagocytophilum*. 7 horses were diagnosed with *Anaplasma phagocytophilum* in stable 1, while in stable 2, 2 horses were diagnosed with the same agent and in stable 3 there were 6 individuals positive for hemopathogen. The application of preventive measures in the three stables is based on the administration of antiparasitics, ivermectin paste and vector control (fumigations, cleaning and chapoda around the stables), stables 1 and 3 only implement the administration of ivermectin-based dewormers, while stud farm 2 practices vector control and applies ivermectin-based dewormers. The three techniques used to diagnose hemopathogens were effective with a different degree of sensitivity between stains, resulting in the Giemsa staining technique with the highest degree of sensitivity, where 14 of 15 hemopathogen-positive animals could be observed. It is recommended to use the Giemsa stain more frequently to obtain better results in terms of diagnostic sensitivity and with lower financial costs. Taking into account as Veterinary Doctors that the results of the Wright stain allow us to better observe cell morphology and thus we can appreciate other hematological disorders such as hypochromia, hyperchromia, microcytosis, among others.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, Giemsa, Wright, Diff-Quick®.

I. INTRODUCCIÓN

Los equinos en Nicaragua y el resto del mundo son susceptibles a enfermedades infecciosas y parasitarias que conducen a alteraciones hematológicas, entre las cuales se encuentran las enfermedades hemoparasitarias, calificadas como problemas graves en más del 70% de países en vías de desarrollo. (Castellanos, Canelón, López y Montesinos, 2010)

Muchos de los criadores de caballos en Nicaragua tienen conocimiento de las enfermedades que pueden afectar a los equinos, por lo general manejan su propio plan sanitario evitando el contagio de enfermedades hemoparasitarias, pero existe deficiencia en el actuar de los criadores cuando se manifiestan sintomatología asociada a estos agentes por medio de automedicación con fármacos inapropiados. (Alemán, M. comunicación personal, 29 enero 2020)

Pero en los últimos años ha venido creciendo el uso del laboratorio clínico, como una herramienta de diagnóstico para auxilio al clínico. La correlación de los resultados de laboratorio, junto con los del historial clínico del paciente permiten al clínico llegar a un diagnóstico más acertado, y tomar en cuenta las diferentes variables, para adoptar la mejor terapia de respuesta a lo que afecta a nuestros pacientes. (Gallo, 2014 cita a Messeguer, 1992)

El control de una enfermedad es satisfactorio solamente cuando va precedido por un diagnóstico preciso. Los métodos básicos de diagnóstico incluyen: historia, síntomas, lesiones macroscópicas, y procedimientos de laboratorio. Si no es posible llegar a un diagnóstico exacto utilizando los tres primeros métodos, se emplean los procedimientos de laboratorio (pruebas sanguíneas) para aprovechar los datos que de ellos pueden derivarse. (Benbrook y Sloss, 1965)

Existen diferentes técnicas laboratoriales que pueden emplearse para la identificación de hemopatógenos, entre ellas tenemos las tinciones de Romanowsky, son preparaciones policromáticas, que tiñen ciertos grupos ácidos de azules a púrpura (Gallo, C. 2014 cita a Duncan y Prasse 2005) tales son Wright, Giemsa, Leishman, Wright – Giemsa, Field, Diff – Quick entre otras. (Benjamin, 1990)

Las tinciones de Romanowsky son de gran trascendencia clínica ya que gracias a ella es capaz de identificarse diversas estructuras en una célula, así como la morfología y en su caso patología celular no solo de las células del sistema inmunológico sino de todas aquellas que componen la sangre ya sea en un paciente sano o con un estado patológico. (Palomino, 2013)

De esta manera nace la idea de realizar esta investigación, para brindar una herramienta a las futuras generaciones de médicos veterinarios de nuestra universidad, también servirá como apoyo de nuevos conocimientos al sector ecuestre del país, brindándoles información sobre la situación sanitaria actual.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la efectividad de tres técnicas tintoriales diagnósticas para la identificación de hemopatógenos en equinos en la región tres de Managua.

2.2. Objetivos Específicos

Identificar hemopatógenos en equinos de adiestramiento a través del empleo de tres técnicas diagnósticas (Giemsa, Wright y Diff-Quick ®).

Comparar capacidad diagnóstica de las tres técnicas de tinción empleadas para identificación de hemopatógenos.

Analizar las medidas preventivas implementadas en las caballerizas en el control de hemopatógenos.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1. Introducción de los caballos de doma a Nicaragua

El caballo iberoamericano en Nicaragua se origina para la década de 1960, con la primera importación de caballos PRE (pura raza español). En 1972, se importan de Perú 100 ejemplares hembras y 20 machos peruanos, del cruce de ambas razas dio como resultado el encaste de lo que hoy se conoce como raza Iberoamericana. (Iberonic, 2009)

3.2. Razas que predominan en Nicaragua

3.2.1. Raza Iberoamericana

Se caracteriza por tener Cabeza de mediana longitud, rectangular, fina, descarnada y de perfil rectilíneo. Cuello arqueado, longitud media, ligeramente largo, de forma piramidal, musculoso principalmente en los machos. Grupa de longitud y amplitud media, redondeada, de inclinación leve, musculatura firme y densa. (Sáenz, 2008)



Figura 1. Yegua Iberoamericana, capa torda.

Fuente: Meléndez, 2019.

3.2.2. Raza Andaluz (española)

Originario de España. Peso promedio: 400-500kg. Alzada: 1.6m. Capa: generalmente son blancos. Esta raza presenta grupa musculosa, cola de alta implantación. Normalmente se utilizan para equitación, paseo y exposición. (Sáenz, 2008)



**Figura 2. Yegua Andaluz, capa colorada.
Fuente: Meléndez, 2019.**

3.3. Enfermedades más comunes en los equinos de Nicaragua

Las enfermedades que se encuentran frecuentemente en los caballos son: tétano (*C. tetanium*), enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias, protozoos, endoparásitos y ectoparásitos. Los caballos tienen padecimientos comunes como el cólico provocado por distintas causas (torsión intestinal, acumulación de gases, mala suplementación y algunos parásitos intestinales). (Cruz, 2016)

La incidencia económica de los hemoparásitos ocurre no solo por la mortalidad sino también por abortos, tratamiento de la afectación, pérdida en el manejo o desempeño y valor del animal mismo. (Solari, 2006)

La sangre de los animales domésticos puede ser invadida por diversos microorganismos patógenos y saprofitos, tales como bacterias, virus, rickettsias y levaduras. (Benbrook y Sloss, 1965)

Los hemopatógenos son organismos que pueden ser transmitidos a los animales domésticos por vectores mecánicos y biológicos. Su presencia en los animales domésticos produce cuadros hemáticos que afectan su salud. (Rodríguez y Domínguez, 2000)

3.3.1. *Babesia caballi*

Son causantes de la enfermedad conocida como piroplasmosis equina, son dos especies de hemoprotozoarios. Estos parásitos intraeritrocitos son transmitidos por garrapatas vectores. En el transcurso de cuatro semanas después de la primera exposición los caballos presentan signos de fiebre, depresión o disnea, ictericia de membranas mucosas, cólico y edema de partes péndulas. (Savage, 2000)

Las infecciones masivas ocasionan signos clásicos de hemólisis intravascular: ictericia, hemoglobinemia, anemia, hemoglobinuria. En animales infectados *B. caballi* los signos clínicos duran de unos días a unas pocas semanas; la mortalidad es baja. (Savage, 2000)

Ciclo biológico: la primera posee una fase de infección pre-eritrocítica con multiplicación de tipo merogónico en células linfocitarias, además de que su tamaño es menor, de 1 a 2 μm , con una disposición de cuatro merozoítos formando la llamada Cruz de Malta, considerada una característica de diagnóstico. Además *T. equi* se transmite de manera transestadial, es decir, que la garrapata se infecta en estado de larva, y éstas a su vez infectan al équido hospedador en su estado de ninfa o adulto. (Lapo, 2019 cita a Canto, 2018)

Las vernículas invaden muchos de los órganos de las garrapatas incluidos los ovarios, la especie *Babesia* pasa fácilmente a la siguiente generación de garrapatas en el huevo (transmisión transovárica). (Espinoza y Vanegas, 2014 cita a CFSPH, 2008)

Diagnóstico: la babesiosis suele diagnosticarse en base a hallazgos de la *Babesia* en frotis de sangre, la tinción con Giemsa revela los parásitos en los glóbulos rojos. (Pearson, 2017)

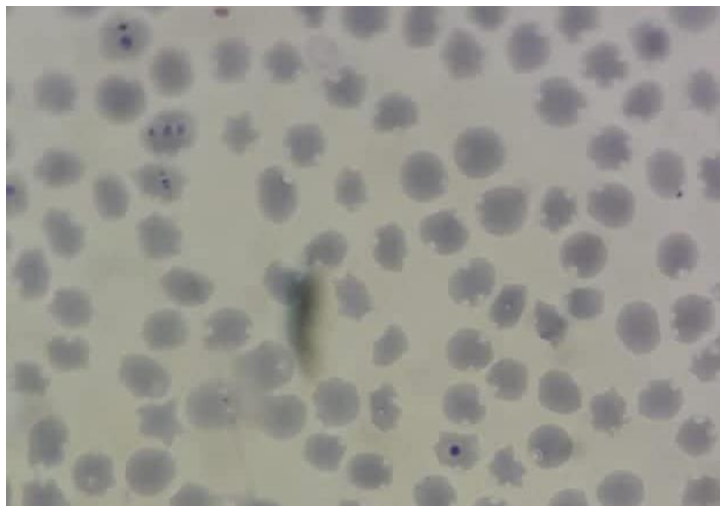


Figura 3. *Babesia caballi* parasitando eritrocitos de equino.
Fuente: Navarro 2020.

3.3.2. *Trypanosoma evansi*

Es el causante de la enfermedad de tripanosomiasis, es un protozoo flagelado, posee un ciclo de vida monoxénico con un rango amplio de hospederos siendo los équidos unos de los animales más comúnmente afectados en América del sur y América central. En el caballo se transmite mecánicamente por la picadura de un vector (garrapatas, moscas del género *tabanus* y vampiros). (Visavet, 2020, b)

Los signos clínicos comunes en el caballo incluyen fiebre, pérdida de peso, letargo, signos de anemia, dilatación de los ganglios linfáticos. (Rossdale, 1976) También se observa urticaria, ictericia, hemorragias en petequias en las mucosas. Los signos neurológicos en etapa final de la enfermedad son la ataxia, con paresia gradualmente progresiva de los cuartos traseros, acompañada con atrofia muscular, ceguera, infertilidad y abortos. (Visavet, 2020, b)

Diagnóstico: Reacciones serológicas e identificación en frotis sanguíneo con tinciones. (Rossdale, 1976)

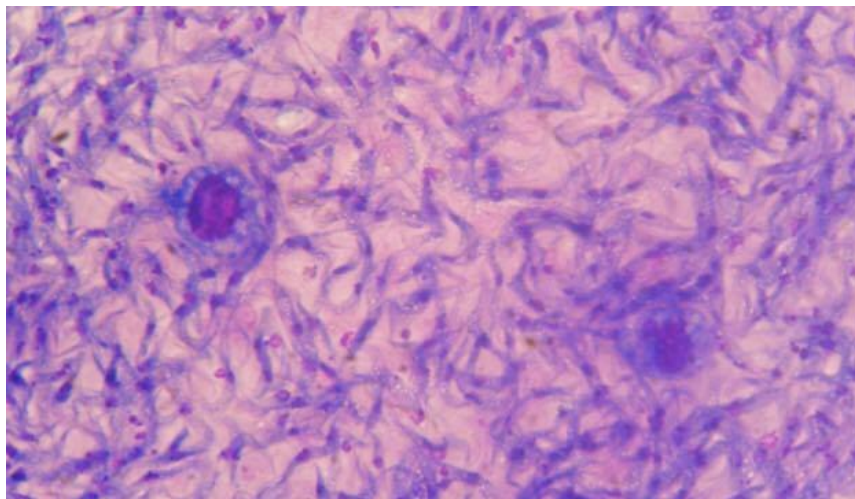


Figura 4. *Trypanosoma spp.* Rodeando dos células de hemolinfas
Fuente: De la Fournière, 2018.

3.3.3. *Theileria equi*

Fue reclasificada como *Theileria equi* en 1998. A través de varios estudios se demostró la diferencia en cuanto al ciclo de vida, proteínas superficiales y el ADN de este parásito al de los de la familia Babesidae y la similitud con los de la familia Theileridae. (Ortiz, 2016 cita a Peña, 2009).

Los síntomas de esta enfermedad varían desde fiebre aguda, inapetencia y malestar hasta anemia, ictericia, muerte súbita, o pérdida de peso crónica y poca tolerancia al ejercicio. (Iowa State University, 2008)

Ciclo biológico: inicia con el contacto del équido susceptible con la saliva de la garrapata infectada al momento de la mordedura de esta durante su alimentación. Ambos hemoparásitos poseen un ciclo biológico similar con tres etapas de desarrollo. La primera etapa o esquizogonia es asexual, con producción de merozoítos, y es llevada a cabo en el équido hospedador; la segunda etapa o gametogonia es sexual, con producción de gametocitos, y la tercera etapa o esporogonia es asexual, con producción de esporozoítos. (Ortiz, 2016)

Diagnóstico: Los équidos infectados se pueden identificar mediante la demostración de los hemoparásitos en sangre teñida o en frotis de sangre con tinción Giemsa o frotis de órganos. (Ortiz, 2016)

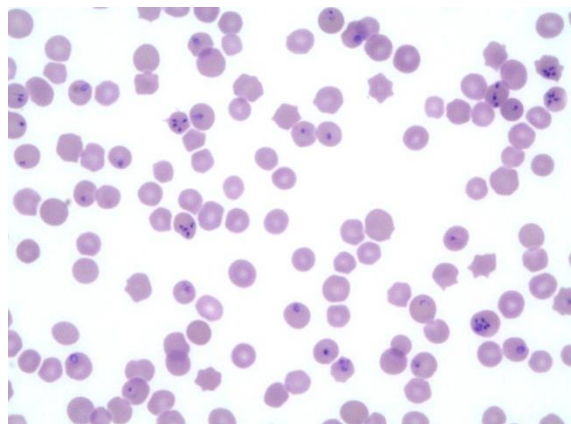


Figura 5. *Theileria equi* vista por microscopio en 100X.
Fuente: Camino y Cruz, 2017.

3.3.4. *Anaplasma phagocytophilum*

El agente etiológico, antes denominado *Ehrlichia equi*, se considera en la actualidad una cepa de *Anaplasma phagocytophilum* debido a su homología del 99.1% en la secuencia 16S de su ANR ribosómico. Cocobacilo, Gram negativo, con tropismo por granulocitos, suele agregarse en vacuolas intracitoplasmáticas de 1.5 a 5 µm de diámetro, formando mórulas. (Visavet, 2020, a)

Los signos clínicos generales incluyen fiebre, depresión, inapetencia parcial, leves petequias, ictericia, ataxia, edema de las extremidades en su porción distal muchas veces asociado a vasculitis. A su vez, la urticaria extensa puede estar asociada con anaplasmosis equina (Masgo, 2018 cita a Gribble, 1969).

Ciclo biológico: infección transovarica en la garrapata, su descendencia se desarrolla infectada de anaplasma, luego se trasmite al hospedero para penetrar los glóbulos rojos y formar cuerpos de inclusión que provoca una parasitemia y anemia severa. (Donaire y Hurtado, 2013)

Diagnóstico: a través de tinción de frotis sanguíneo se da la demostración del anaplasma. (Agromeat, 2014)

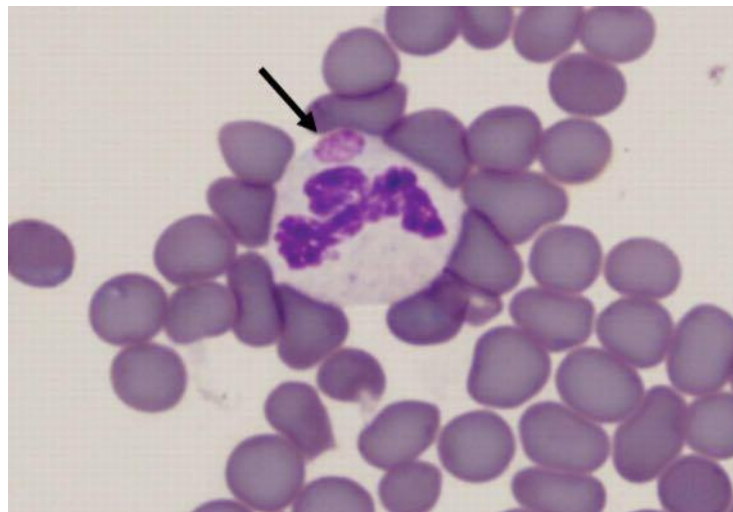


Figura 6. *Anaplasma phagocytophilum*, Inclusión intraplasmática en neutrófilos de equino.

Fuente: Everton, 2014.

3.4.Importancia epidemiológica

La importancia de una enfermedad en un establecimiento radica en que desestabiliza el manejo diario del mismo y afecta la producción. (Solari, 2006)

Estas enfermedades originadas por microorganismos que invaden el cuerpo y dañan estructuras y funciones normales que pueden ser transmitidas de un ser humano a otro, o de un animal a otro por contacto directo o indirecto. (Espinoza y Vanegas, 2014 cita a Villanueva, 2000)

3.5.Importancia diagnóstica

Muchos parásitos son tan pequeños que tan solo se les puede ver con la ayuda del microscopio, pero, para reconocer estructuras específicas es necesaria la ayuda de técnicas diagnósticas de laboratorio veterinario. (Price y Reed, 1973) Por lo cual el diagnóstico laboratorial es de vital importancia para el médico veterinario para las estrategias a tomar sobre acciones terapéuticas y del manejo del paciente y su evolución.

El extendido periférico es el primer método quizás más adecuado a la medicina veterinaria que se practica en animales grandes, cuando los frotis sanguíneos han de prepararse en la granja o en el laboratorio. (Schaml, 1964)

3.6.Técnicas de diagnóstico de hemopatógenos en estudio (tinciones)

Las coloraciones de Romanowsky son técnicas de laboratorio hematológicas que consisten en distintos tipos de tinciones para realizar recuento de leucocitos con el fin de determinar las proporciones de los diferentes tipos de células que están presentes (es decir, neutrófilos, eosinófilos, basófilos). Las proporciones cambian en diversas enfermedades y proporcionan en ello un significado diagnóstico. (Bush, 1982)

3.6.1. Tinción Giemsa

El colorante Giemsa es una mezcla de azul de metileno, eosina y azul de metileno, glicerol y alcohol metílico. (Price y Reed. 1973), es la más usada en hematología veterinaria, es muy buena para valorar morfología celular y permite la identificación de ciertos hemopatógenos como *Babesia spp.* (Pérez, Estepa y Mendoza, 2011)

3.6.2. Tinción Wright

Es ideal para evaluar la morfología celular y muy buena para identificar los gránulos citoplasmáticos. (Pérez, Estepa y Mendoza, 2011)

3.6.3. Tinción Diff – Quick ®

Es una técnica de 15 segundos, que emplea una caja comercial con tres soluciones. Se afirma que da resultados similares a la tinción Wright – Giemsa. (Bush, 1982)

3.7. Bienestar animal

Según la Norma Jurídica, ley 747, capítulo II, art. 10. (2011), define los conceptos de siguiente manera.

Animales domesticados: se considera domesticado cuando se reproduce bajo la dirección del ser humano y da origen a una progenie que sigue bajo la tutela de éste, quien la aprovecha para su beneficio.

Domar: indica amansar y hacer dócil a un animal mediante ejercicios y enseñanzas, sean estos silvestres o domésticos.

Trato digno y respetuoso: medidas que se aplican para evitar a los animales, dolor innecesario o angustia durante su crianza, captura, traslado, exhibición, cuarentena, comercialización, aprovechamiento, adiestramiento o sacrificio.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Ubicación del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en tres unidades de crianza y manejo de equinos, este se realizó en la región 3, de acuerdo al mapa de vigilancia epidemiológica del IPSA, departamento de Managua, comarca Nejapa y comarca Los Brasiles (municipio de Mateares). Las caballerizas serán codificadas de la siguiente manera:

Caballeriza (C1)

Caballeriza (C2)

Caballeriza (C3)



Figura 7. Ubicación de las caballerizas

Fuente: World Maps, 2020.

Descripción de la región en estudio

La región 3 de Managua temporada de lluvia es opresiva y nublada, la temporada seca es ventosa y parcialmente nublada y es muy caliente durante todo el año. Temperatura general varía entre 21° C a 35° C. (Weather Sparck, 2020).

4.2. Diseño metodológico

Se realizó un estudio experimental de tipo descriptivo en el periodo de febrero a mayo del 2020. Se llevó a cabo en 3 caballerizas ubicadas en la zona 3 de Managua, se diseñó tres instrumentos para la recolección de los datos (entrevista, ficha clínica, hoja de reporte post análisis), posteriormente se efectuó una visita a cada una de las caballerizas en la cual se llevó a cabo la entrevista con el responsable de área o encargado de estas, además del llenado de la ficha clínica de los pacientes , tomas de muestras que fueron remitidas al laboratorio y se realizaron las pruebas de tinción (Giemsa, Wright, Diff – Quick ®). La cantidad de equinos en estudio fue de 60 caballos de distintas edades, entre hembras y machos.

4.3. Manejo del ensayo

Se diseñaron tres instrumentos para la recolección de datos en cada una de las caballerizas:

4.3.1. Entrevista

Se le realizó una entrevista (cualitativa, abierta) al responsable de cada unidad de explotación para obtener información acerca del manejo sanitario (plan sanitario) que practican en los establecimientos

4.3.2. Ficha clínica

Se recolectaron datos individuales como la raza, sexo, edad e identificación por cada uno de los ejemplares; Esta herramienta fue diseñada para hacer apuntes de las constantes fisiológicas del animal, aspectos generales (mucosas, piel, etc.), condición corporal, últimos antiparasitarios aplicados al igual de vacunas. El objetivo de esta ficha clínica es como respaldo de registro de los caballos que fueron parte de nuestro estudio.

4.3.3. Hoja de reporte post análisis

Esta tiene los datos de cada una de las muestras ya procesadas con su respectivo diagnóstico por cada una de las tres técnicas de tinción, si hay presencia de algún agente hemopatógeno o viceversa; la hoja está debidamente identificada con los datos de cada uno de los pacientes por caballeriza.

Se realizó una visita a cada una de los establecimientos en la que llevamos a cabo la ejecución de los dos primeros instrumentos de recolección de datos; la entrevista con el encargado de la unidad equina, el llenado de la ficha clínica de cada uno de los animales que fue acompañada con el chequeo general de los pacientes, posteriormente se extrajo las muestras de sangre que fue transportadas hacia el laboratorio veterinario para el procesamiento de estas con las tres técnicas (Giemsa, Wright y Diff-Quick ®), los resultados fueron plasmados en la ficha de laboratorio.

4.4. Variables

4.4.1. Identificación de hemopatógenos

Cuadro 1. Identificación de hemopatógenos

Caballeriza	Paciente	Agente encontrado
C1		
C2		
C3		

4.4.2. Comparación de técnicas

Cuadro 2. Comparación entre técnicas

Pacientes	Wright		Giemsa		Diff-Quick®	
	+	-	+	-	+	-
Código 1						
Código 2						
Código 3						
Código 4						
...						

4.4.3. Aplicación de medidas preventivas

Cuadro 3. Aplicación de medidas preventivas

Caballerizas	Administración Ivermectina	Control vectores
C1		
C2		
C3		

4.5.Recolección de los datos

4.5.1. Fase de campo

La fase de campo dio inicio con la entrevista dirigida a los responsables de cada unidad equina, donde obtuvimos la información general del manejo de esta, estos datos fueron recogidos en escrito como respaldo de nuestra investigación.

Una vez por dada la entrevista pasamos al siguiente punto de esta fase de campo la exploración clínica que consistió en la toma de frecuencias cardiacas y respiratorias; valoración de las mucosas, piel, pelo, ojos, temperatura y la captación de datos de las últimas vacunas aplicadas al igual que los antiparasitarios. Estos datos fueron los conformantes de la ficha clínica.

Para realizar todo el procedimiento de valoración clínica, los equinos fueron sometidos a medidas de sujeción para seguridad del paciente como del clínico; los animales fueron tomados por el cuello con una soga para asegurar la cabeza, luego se llevaron a una manga o cepo para inmovilizar al animal y por último se utilizó una mordaza de labio superior. (Rimbaud, Morales, Soto, Caballero, Zepeda, Lacayo y Treminio, 2007)

Con el animal inmovilizado por completo procedimos a la extracción de la muestra de sangre de la vena yugular externa por ser la más accesible y fácil localización. (Orsini y Divers. 2000) Por medio de una venopunción con aguja desechable calibre 18, en dirección primero longitudinal y luego perpendicular al vaso. Una vez tomada la muestra, se procedió a vaciarla en tubos EDTA de 2 ml, se homogenizó y se procedió a ser depositados en un termo con temperatura menor a los 4 °C para su transporte hacia el laboratorio (Membreño y Soto, 2005)

4.5.2. Fase de laboratorio

Cada una de las muestras se sometieron a las tres técnicas de tinción (Giemsa, Wright y Diff – Quick) para diagnóstico de hemopatógenos. Para poder realizar las tres pruebas diagnósticas primero se debe realizar un Frotis sanguíneo.

Frotis de sangre según Price y Reed (1973):

1. Se limpia el lugar de la vena para eliminar contaminantes. Puede emplearse algodón hidrófilo que no sea esponjoso y alcohol. Deje secar el alcohol.
1. Se pincha la vena usando para ella una aguja hipodérmica estéril.
2. Se pone una gota de sangre en el extremo de un portaobjeto estéril.

2. Se sujeta firmemente el portaobjetos por su otro extremo teniéndolo bien apoyado en una superficie plana.
3. Se pone otro portaobjeto (porta esparcidor) con su borde aplicado transversalmente en el centro del portaobjeto del examen. El borde inferior del portaobjeto esparcidor se sostiene formando un ángulo de 30 grados y se desliza hasta que se pone en contacto con la sangre del portaobjeto inferior. Entonces la sangre corre a lo largo de este, que forma el vértice del ángulo agudo entre dos portas.
4. Se empuja el portaobjeto esparcidor de modo firme e ininterrumpido hasta el extremo opuesto del portaobjeto inferior, dejando un frotis delgado.

Tinción Giemsa:

El procedimiento según Price y Reed (1973) consiste en:

1. Hacer un frotis y dejar que se seque completamente.
2. Fijar con alcohol metileno durante dos minutos.
3. Mezclar en una caja de Petri, un ml de colorante Giemsa con 9 ml de agua destilada ligeramente alcalina (pH 7.0 a 7.2).
4. Dejar en la caja de Petri, sobre dos mitades de porta, la preparación invertida para que se tiña durante 15 o 30 minutos.
5. Lavar la preparación con abundante agua destilada hasta que el frotis comienza a verse rosa; generalmente en más o menos un minuto.
6. Dejar que se seque.
7. Examinar al microscopio la preparación seca, sin cubreobjetos.

Tinción Wright:

Los pasos para realizar la tinción según Bush (1982) son:

1. Colocar el portaobjeto sobre el soporte de tinción, asegurándose de que la tinción se halla en la cara superior (si hay alguna duda, se trata de raspar la cabeza de la extensión con un lápiz o una aguja enmangada).
2. Se cubre la extensión completamente, es decir, se inunda el portaobjeto, con el colorante utilizando un frasco cuenta gotas y se deja actuar, de esta forma se fija la extensión.
3. Se añade al portaobjeto un volumen de agua destilada tamponada que sea aproximadamente el doble de colorante ya presente. Se mezclan uniformemente el colorante y el agua destilada tamponada haciendo oscilar suavemente el soporte de tinción. Se deja actuar la mezcla durante 5 minutos.
4. Se arrastra la mezcla del portaobjeto lavando el portaobjetos mientras está en posición horizontal, ya que en otros casos los precipitados formados se fijan a la extensión y hacen difícil e incluso imposible el examen. Se inunda el portaobjeto con agua destilada tamponada y se deja en reposo sobre el portaobjetos durante 1 minuto aproximadamente hasta que la extensión adquiera un tinte rojizo.
5. Se vierte el agua. Se enjuaga la cara opuesta del portaobjeto (porque el colorante tiende a depositarse en ella) y se seca seguidamente la extensión colocando el portaobjeto verticalmente sobre un trozo de papel de filtro, apoyando sobre una cubeta de tinción u otro objeto, por ejemplo, un frasco. Es aconsejable que el portaobjeto no se seque mediante papel de filtro aplicado suavemente, ni mediante movimientos de agitación de la mano en el aire, ya que de esta manera existe el peligro de hacer saltar la extensión.
6. Examinar al microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

Tinción Diff – Quick ®:

Según Benjamin (1990)

1. Se sumerge la laminilla en una solución fijadora por 5 minutos (5 inmersiones de un segundo cada una). Se deja escurrir el fijador.
2. Se sumerge la laminilla en la solución I por 5 segundos (5 inmersiones de 1 segundo cada una). Se deja que se escurra el exceso de colorante.
3. Se sumerge la laminilla en la solución II por 5 segundos (5 inmersiones de 1 segundo cada una). Se deja que escurra el exceso de colorante.
4. Se enjuaga la laminilla con agua destilada.
5. Se deja secar y se examina.

4.6. Análisis de datos

Los datos recolectados fueron procesados en hoja electrónica Excel para su posterior análisis descriptivo de los resultados obtenidos durante la investigación.

4.7. Materiales y equipos

Formato de entrevista a responsables de las unidades de explotación, ficha clínica, termómetro, estetoscopio, jeringa desechable de 3 ml, aguja desechable calibre 21 X 1-1/2”, alcohol al 70%, gradillas, guantes de látex, termo contenedor de muestras, tubos de ensayo 2 ml EDTA, tabla de campo, mesa plástica, portaobjetos esterilizados, punta de pipeta, pipeta automática 10 u – 100 u, Giemsa stain, Diff – Quick, Wright stain, agua destilada, guantes mixilor, microscopio óptico, aceite de inmersión, metanol, hoja post análisis.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación de hemopatógenos

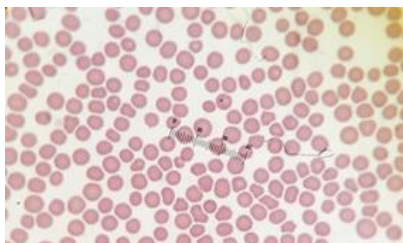


Figura 8. Diagnóstico de *Anaplasma phagocytophilum* con tinción Diff-Quick ®

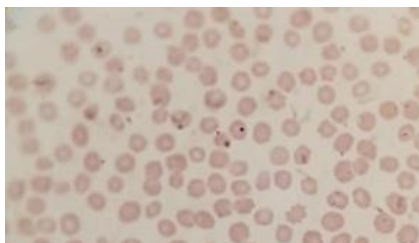


Figura 9. Diagnóstico de *Anaplasma phagocytophilum* con tinción Giemsa

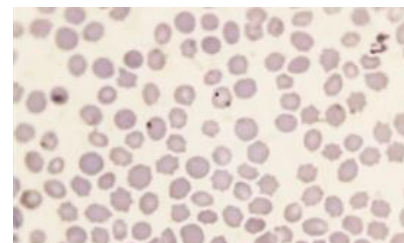


Figura 10. Diagnóstico de *Anaplasma phagocytophilum* con tinción Wright.

De los 60 caballos muestreados en las tres caballerizas del estudio, 15 individuos con *Anaplasma phagocytophilum* correspondiente al 25% de equinos positivos y el 75% negativos.

La característica principal para la identificación del *Anaplasma phagocytophilum* en las técnicas de tinción es la ubicación de la mórula granulocítica en el interior del neutrófilo. (Domínguez, 2011), También se identifica a través de la observación de cuerpos iniciales mórulas intracitoplasmáticas de los eosinófilos en frotis teñidos. (Parraga, Gonzatti y Aso, 2016)

Es un hemopatógeno que afecta a equinos cuya transmisión es de tipo mecánica o biológica producto de vectores artrópodos. (OIE, 2015) En regiones tropicales y subtropicales suele haber más garrapata en zonas rurales con abundante ganadería y están activas durante todo el año. (Junquera, 2018)

Estudio realizado en Perú arrojó resultados del 9% de casos positivos a *Anaplasma phagocytophilum* en 100 caballos muestreados y aplicando la tinción de Wright (Masgo, 2018), En Viña del mar, Chile se obtuvo resultados de 8 % de los equinos positivos a *Anaplasma phagocytophilum* de 50 muestreados (Rodríguez y Conejeros, 2012) y en el municipio de Arauca, Colombia se observó la presencia del hemopatógeno en el 10% de 30 caballos muestreados. (Medina, Alexander y Colina, 2016), resultados de prevalencia son menores en cuanto al porcentaje de prevalencia de nuestra investigación donde se obtuvo un 25% de los animales positivos a este hemopatógeno.

5.2. Comparación de resultados entre las técnicas de tinción

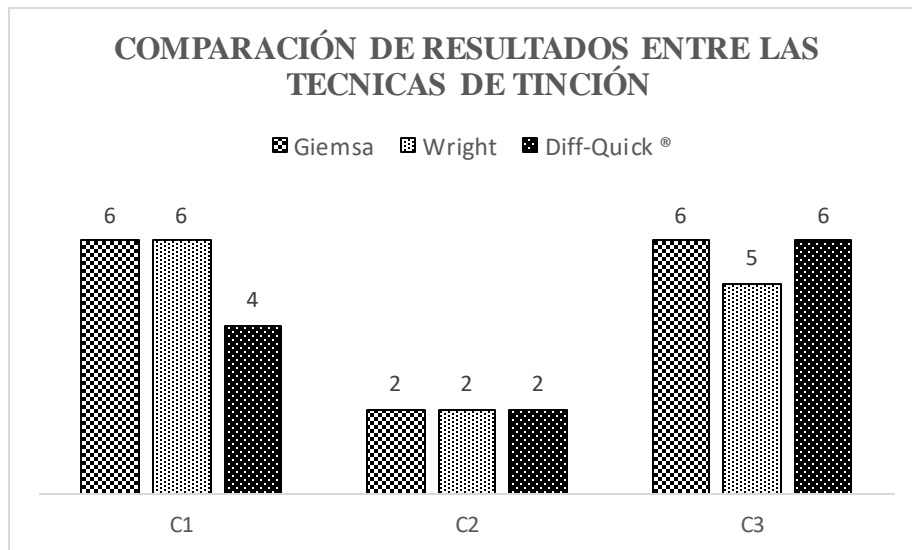


Figura 11. Comparación de resultados entre técnicas de tinción

Los animales encontrados positivos en las tres unidades equinas fueron 15 caballos a *Anaplasma phagocytophilum*. Estos 15 caballos es el resultado de la suma de diagnósticos confirmados entre las tres técnicas de tinción, la tinción Giemsa solo obtuvo un falso negativo ya que de los 15 animales positivos solo se observó 14 confirmados con esta tinción, Wright diagnóstico 13 de los 15 animales antes mencionados, mientras que Diff-Quick® diagnóstico 12 animales positivos.

La coloración Giemsa es la más sensible de las técnicas para la identificación de hemopatógenos, así también lo describe (Benavidez, 2014), Giemsa también es la coloración más utilizada en hematología veterinaria según (Pérez, Estepa y Mendoza, 2011), esta técnica se puede usar tanto en frotis delgados como los de gota gruesa; los frotis teñidos delgados sirven para identificar diferencias morfológicas de protozoarios en células sanguíneas, mientras que la gota gruesa es utilizada cuando escasean los parásitos o cuando en frotis delgados los resultados son negativos. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2017)

La coloración Wright tiene resultados de imagen más claras en la lectura de morfología celular así también lo describe Tarqui (2013) estudio realizado en La Paz, Bolivia. Tiene alta sensibilidad en la observación de hemopatógenos y es la mejor para la clasificación de los hemopatógenos, debido a las propiedades químicas de esta combinación de colorantes las estructuras celulares pueden ser fácilmente reconocidas, pudiéndose distinguir los diferentes tipos de células presentes así mismo se refiere (Gil, 2020)

La tinción Diff-Quick®, cuya ventaja entre otras tinciones es la rapidez y sencillez en su utilización. Se obtiene una ligera inferioridad en calidad comparado a otras tinciones como Giemsa o Wright, los resultados de nuestra investigación comprueban lo descrito por Sanilaboshop (2015), la tinción de Diff-Quick tiene inferioridad para diagnóstico de hemopatógenos según Benavidez, (2014).

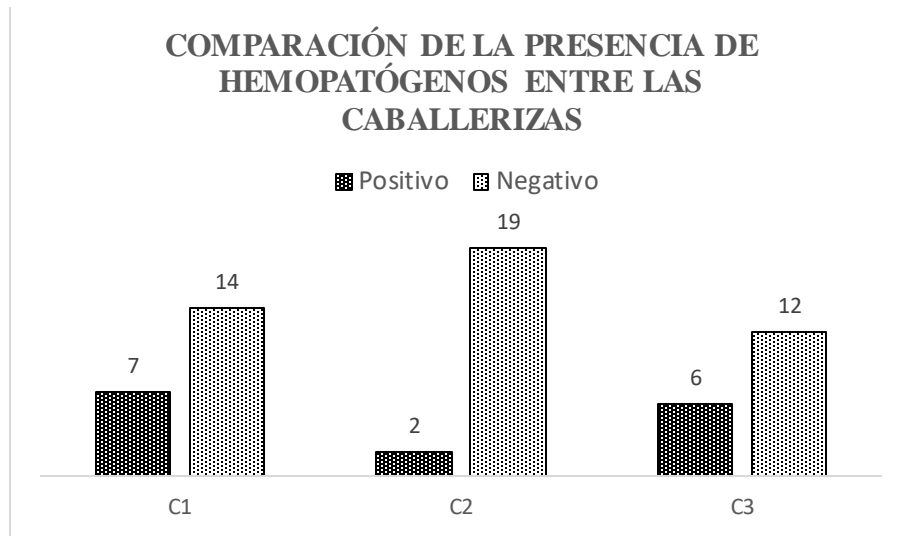


Figura 12. Comparación de la presencia de hemopatógenos entre las caballerizas

7 equinos fueron diagnosticados con *Anaplasma phagocytophilum* en la caballeriza 1, mientras que en la caballeriza 2 se diagnosticó a 2 caballos con el mismo agente y en la caballeriza 3 se encontró 6 individuos positivos al hemopatógeno.

La caballeriza 1 y 3 tiene desventajas en el ámbito sanitario, ya que estas dos unidades equinas prestan el servicio de renta de establos para público general, por lo tanto, no tienen un plan sanitario establecido al ser equinos de distintos propietarios, también no cuentan con visitas de un doctor veterinario para todos los animales sino una visita específica por animal que presenta sintomatología de cualquier patología.

La caballeriza 2 es totalmente diferente a las unidades equinas 1 y 3, cuenta con servicio veterinario para todos los animales, aplicación de antiparasitarios a base de ivermectina periódicamente (cada 3 meses) a todos los individuos de la caballeriza, fumigación y chapoda de los alrededores para el control de vectores, esto se basa a que todos los caballos son de un solo propietario.

Según (Ramírez, 2007), la aplicación de baños químicos a los equinos, de igual manera el manejo limpio de los establos o lugar donde se alojan los animales y el requerimiento de chequeos periódico en las instalaciones evitará la presencia de las enfermedades producidas por hemopatógenos debido al control del vector como es la garrapata, situación similar a las prácticas que se llevan a cabo en la caballeriza 2 del estudio, los cuales presentan un 9% de los caballos portadores de la agente.

Con el propósito de minimizar el riesgo de diseminación de enfermedades, se debe cumplir con un plan de manejo sanitario, bioseguridad, asistencia técnica de un médico veterinario y contar con un control de ingreso y salida de animales (Fuentes y Díaz, 2012). Las caballerizas 1 y 3 no cumplen con prácticas de medidas preventivas en los animales e instalaciones mencionadas por Fuentes, debido a su situación actual presentan el 34% de sus equinos portadores del agente.

5.3. Aplicación de medidas preventivas en las caballerizas

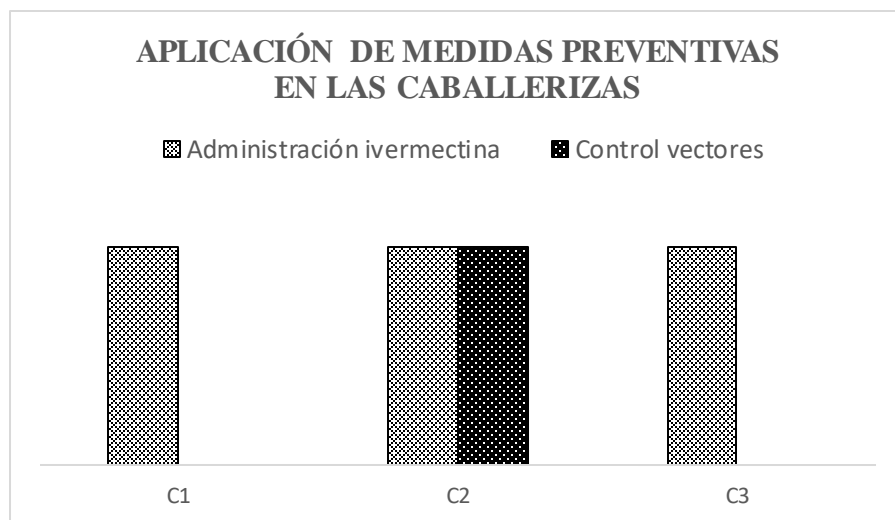


Figura 13. Aplicación de medidas preventivas en las caballerizas

La aplicación de las medidas preventivas en las tres caballerizas se basa en la administración de antiparasitarios a base de ivermectina en pasta y el control de vectores (fumigaciones, limpieza y chapoda de los alrededores de los establos), la caballeriza 1 y 3 solo ponen en práctica la administración de antiparasitarios a base de ivermectina, mientras que la caballeriza 2 practica el control de vectores y aplica de antiparasitarios a base de ivermectina.

La caballeriza 1 (C1) fue la unidad equina con más casos positivos de hemopatógenos (7), estos resultados son relacionados a la deficiencia en el manejo de los animales y de las instalaciones, al no practicar el control de vectores (garrapatas) como la fumigación y chapoda de los alrededores de las cuadras.

La caballeriza 2 (C2) es la unidad equina con menor cantidad (2) de animales positivos hemopatógenos, los resultados se relacionan al buen manejo sanitario de las instalaciones y sus animales (limpieza de cuadras y sus alrededores, fumigaciones para el control de vectores, control y prevención de enfermedades y atenciones constantes del propietario).

La caballeriza 3 (C3) es la unidad equina en la que se observó 6 caballos con presencia de hemopatógenos, los resultados son similares a los de la caballeriza 1, el motivo del alto número de casos positivos a *Anaplasma phagocytophilum* se relaciona a la deficiencia en la práctica de medidas preventivas.

Según (EcuRed, 2020) La prevención de la anaplasmosis a través del control de vectores es posible, también es posible realizar prácticas rurales con una higiene controlada que evitará la diseminación de Anaplasma por jeringas, agujas, mocheta, etc. Combatir a los vectores, acaricidas, control de moscas, realizar baños garrapaticidas de manera periódica evitará la infección de hemopatógenos en las finca y caballerizas. (Olguín, 2013)

El resultado de la caballeriza 2, son similares a los del estudio realizado en Arauca, Colombia donde se comprobó que, en el estudio de tres caballerizas la que tuvo menos animales positivos a *Anaplasma phagocytophilum* fue la que tenía mejores prácticas sanitarias con los animales y las instalaciones. (Medina, Alexander y Colina, 2016)

VI. CONCLUSIONES

Las tres técnicas utilizadas para el diagnóstico de hemopatógenos fueron efectivas con un grado de sensibilidad diferente entre tinciones, obteniendo como resultado la técnica de tinción Giemsa con el mayor grado de sensibilidad donde se pudo observar 14 de 15 animales positivos a hemopatógenos.

El hemopatógeno identificado durante el estudio a través de las técnicas de tinción Giemsa, Wright y Diff-Quick® fue *Anaplasma phagocytophilum* perteneciente al Sub Reino: Bacteria, clase: Proteobacteria, subclase: Alfa, orden: Rickettsiales, familia: Anaplasmataceae, genero: Anaplasma, especie: A. Phagocytophilum.

Las tres técnicas de tinción tienen capacidad diagnóstica ante los hemopatógenos, pero con diferentes grados de sensibilidad, existen ventajas y desventajas por cada una de las técnicas:

- Giemsa es la que presento mayor sensibilidad para el diagnóstico de hemopatógenos y de menor costo en el mercado, su desventaja es el tiempo que se requiere para poder llevarla a cabo que aproximadamente es de 15 a 30 minutos.
- Wright es la que presenta los mejores resultados en imagen en el microscopio, es esencial para identificación de morfología celular y también para la clasificación del hemopatógeno, tiene el mismo costo de Giemsa y su rapidez está por encima de Giemsa, pero con un grado de sensibilidad más bajo que el de la técnica ya antes mencionada.
- Diff-Quick® es la técnica de mayor costo en el mercado, la observación en el microscopio se verán resultados similares, pero no iguales a los de Wright, es la de menor sensibilidad para diagnóstico de hemopatógenos. La ventaja que tiene ante las dos técnicas antes mencionadas es su rapidez para llevarla a cabo que es de 3 minutos.

Evaluando el comportamiento del hemopatógeno (*A. Phagocytophilum*) encontrado en las caballerizas de nuestro estudio, la caballeriza 2 quien es la que pone en práctica las medidas preventivas tanto en las instalaciones como en los animales es la que presentó la menor presencia de animales positivos a *Anaplasma phagocytophilum*, a diferencia de la caballeriza 1 y 3, que cuentan con un número alto de casos positivos a hemopatógenos debido a la desventaja de entrada y salida de animales sin antecedentes médicos.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar la tinción Giemsa con mayor frecuencia para obtener mejores resultados en cuanto a sensibilidad diagnóstica y con menores gastos económicos. Tomando en cuenta como Médicos Veterinarios que los resultados de la tinción Wright nos dejan observar mejor la morfología celular y así podemos apreciar otros trastornos hematológicos como hipocromía, hipercromía, microcitos, entre otros.

Se recomienda realizar al menos una vez por año exámenes complementarios para el diagnóstico de hemopatógenos en todos los equinos de la unidad de explotación, de tal manera que los animales que presenten la enfermedad puedan ser tratados adecuadamente.

Para mantener control del agente vector transmisor se deben tomar en cuenta las siguientes medidas:

- Mantener los establos o cuadras y sus alrededores en condiciones adecuadas de limpieza, desinfección y manejo de desechos orgánicos. Mantener programa de control de garrapatas, tanto en las instalaciones como alrededor del predio donde se alojan los equinos.
- De igual manera establecer un periodo de cuarentena interna en las caballerizas que tienen un alto movimiento de animales, principalmente el ingreso de nuevos equinos; estos caballos deben presentar un examen de diagnóstico de hemopatógenos para poder ingresar a las instalaciones.
- Implementar un plan sanitario donde se estipule la administración de fármacos controladores de hemopatógenos en tiempo y forma adecuada, contratar servicios veterinarios al menos cada 6 meses para chequeo de todos los animales presentes en la caballeriza.
- Utilizar jeringas, agujas hipodérmicas, guantes y cualquier otro tipo de material de uso individual que sea desechable.

Por último, se recomienda llevar a cabo estudios de mayor sensibilidad diagnóstica de hemopatógenos como PCR, ELISA e IFI.

VIII. LITERATURA CITADA

- Agromeat. (2014). *Anaplasmosis y piroplasmosis*. Recuperado el 12 febrero de 2020 de <https://www.agromeat.com/152788/anaplasmosis-y-piroplasmosis>
- Benavidez, E. (2014). *Abordaje laboratorial y epidemiológico para el diagnóstico de holoparásitos de importancia veterinaria*. Recuperado el día 30 de marzo de 2020 de <https://es.slideshare.net/EVBenavides/hemox-dxbveqcn>
- Benbrook y Sloss. (1965). *Parasitología clínica veterinaria*. La Habana, Cuba: Edición Revolucionaria.
- Benjamin, M. (1990). *Manual de patología clínica veterinaria*. D.F., México: EDITORIAL LUMUSA.
- Bush, B. (1982). *Manual de laboratorio veterinario de análisis clínico*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA.
- Camino y Cruz. (2017). *Piroplasmosis equina* recuperado el 12 de febrero de 2020 de <https://www.visavet.es/es/articulos/piroplasmosis-equina.php>
- Castellanos, Canelón, López y Montesinos. (2010). *Estudio hematológico y detección de hemoparásitos en caballos criollos venezolanos de dos hatos del estado de Apure, Venezuela*. [Versión electrónica]. Revista científica Maracaibo, <http://vescielo.org>
- Cruz, F. (2016). *Muestras más apropiadas ante una sospecha de enfermedad infecciosa en caballos*. Recuperado el 3 de febrero del 2020 de <https://www.visavet.es/es/articulos/muestras-diagnostico-enfermedad-infecciosa-caballos.php>.
- De la Fournière, S. (2018). *Análisis de transmisibilidad y diversidad de especies de hemoparásitos en bovinos y garrapatas Ixodidae en la región del NEA*. Tesis para optar título de doctor de la Universidad de Buenos Aires: Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires-Argentina.
- Domínguez, G. (2011). *“PREVALENCIA E IDENTIFICACIÓN DE HEMOPARÁSITOS (Ehrlichia canis, Babesia canis y Anaplasma phagocytophilum) EN PERROS DE LA CIUDAD DE CUENCA”*. Tesis de Grado previa a la obtención del Título de Médica Veterinaria Zootecnista. UNIVERSIDAD DE CUENCA- ECUADOR.

- Donaire, J., y Hurtado, G. (2013). *Hemoparásitos en bovinos de engorde en las fincas Cañas gordas y Las Alturas, comarca San Agustín, Acoyapa, Chontales, en los meses de agosto-octubre 2012*. Trabajo de graduación médico veterinario. Universidad Nacional Agraria-Nicaragua.
- EcuRed. (2020). *Anaplasmosis*. Recuperado el día 30 de marzo de 2020 de <https://www.ecured.cu/Anaplasmosis>
- EcuRed. (2020). *Ehrlichiosis monocítica equina*. Recuperado el 30 de enero del 2020 de https://www.ecured.cu/Ehrlichiosis_mono%C3%ADtica_equina#Biolog.C3.ADa_de_Ehrlichia.
- Equisan (2020). *Babesiosis equina*, también conocida como piroplasmosis. Recuperado 12 de febrero de 2020 de <https://www.equisan.com/images/pdf/babe.pdf>
- Espinoza, A., y Vanegas. (2014). *Manual sanitario para equinos de Nicaragua*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Everton, E. (2014). *DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA ANAPLASMOSE E THEILERIOSE EQUINA NO ESTADO DO PARÁ*. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará. Pará-Brasil.
- Fuentes y Díaz. (2012). *Protocolo zosanitario ideal de buenas prácticas de manejo (BPM) aplicado a las pesebreras del municipio de Pasto para conocer su condición actual*. Trabajo de grado para optar al título de Médico Veterinario. Universidad de Nariño. Pasto-Colombia.
- Gallo, A. (2014). *Manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Gil, M. (2020). *Tinción de Wright: fundamento, materiales, técnica y usos*. Recuperado el día 26 de marzo de 2020 de <https://www.lifeder.com/tincion-de-wright/>
- Iberonic. (2009). *Caballo iberamericano*. [Versión electrónica]. Revista del caballo iberamericano en Nicaragua. <https://pdfslide.net/documents/revista-del-caballo-iberoamericano-en-nicaragua-edicion-4.html>
- Instituto Nacional de Medicina Veterinaria, Ministerio de la Agricultura. (1984). *Los hemoparásitos como causa de abortos*. Ciencia y técnica en la agricultura.
- Iowa State University. (2008). *Piroplasmosis equina*. Recuperado 12 de febrero de 2020 de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/equine_piroplasmosis-es.pdf

- Junquera, P. (2018). *Garrapatas en caballos y otros equinos: biología, prevención y control*. Recuperado el 18 de abril del 2020 de https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=1449&Itemid=316
- Lapo, S. (2019). *Determinación de la frecuencia de piroplasmosis equina y de los vectores implicados en la transmisión, en el Cantón Catamayo, provincia de Loja*. Trabajo de tesis previo a la obtención del título de medica veterinaria zootecnista. Universidad nacional de Loja-Ecuador.
- Masgo, D. (2018). *Detección hematológica de Anaplasma phagocytophilum en caballos de la provincia de Chiclayo (departamento de Lambayeque, Perú)*. Tesis para optar al título profesional de médico veterinario. Universidad nacional mayor de San Marcos-Perú.
- Medina, Alexander y Colina. (2016). *DETERMINACIÓN DE HEMOPARÁSITOS EN EQUINOS DE COLEO EN TRES PREDIOS DEL MUNICIPIO DE ARAUCA*. Trabajo de grado – pregrado en Medicina Veterinaria Zootecnia. Universidad Cooperativa de Colombia sede Arauca, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Membreño y Soto. (2005). *Determinación de valores hematológicos en caballos de tracción en la ciudad de León en el periodo noviembre 2004 – mayo 2005*. Tesis licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León.
- OIE. (2015). *ANAPLASMOSIS BOVINA*. Recuperado el día 30 de marzo de 2020 de https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.01_Anaplasmosis_bovina.pdf
- Olgún, A. (2013). *Anaplasmosis*. Recuperado el día 30 de marzo de 2020 de <https://www.ammvweb.net/clinica/anaplasmosis.pdf>
- Ortiz, I. (2016). *Manual de procedimientos para la prevención y control de piroplasmosis en Ecuador*. Recuperado 12 febrero de 2020 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dcz/DAJ-2016398-0201.0219-reso-piroplasmosis.pdf>
- Osirini y Divers. (2000). *Manual de urgencias en clínica equina tratamiento y técnicas*. Madrid, España: Ediciones Harcour, S.A.
- Palomino, J. (2013). *Manual de tinciones hematológico*. Recuperado el día 31 de marzo del 2020 de <https://baixardoc.com/preview/manual-de-tincionesdocx-5c50b7d22e6f9>
- Parraga, Gonzatti y Aso. (2016). *Diagnóstico de anaplasmosis equina venezolana mediante la prueba de reacción en cadena de polimerasa*. Recuperado el día 31 de marzo del 2020 de <https://www.redalyc.org/pdf/959/95949934004.pdf>

- Pearson, R. (2017). *Babesiosis*. Recuperado el 30 de enero de <https://www.MSDManuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-Extraintestinas/babesiosis>.
- Pérez, Estepa y Mendoza. (2011). *Análisis y Estudio de Frotis Sanguíneo*. Recuperado el 3 de febrero del 2020 de <https://www.portalveterinario.com/animales-de-compañia/articulos/21842/analisis-y-estudio-del-frotis-sanguineo.html>
- Price y Reed. (1973). *Parasitología práctica técnicas generales de laboratorio y protozoarios parásitos*. México: Herrero Hermanos, sucs, S.A.
- Ramírez, F. (2007). *Diagnóstico de hemoparásitos en equinos en la región del pacífico de Nicaragua utilizando frotis sanguíneo*. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Agraria. Managua-Nicaragua.
- Rimbaud, Morales, Soto, Caballero, Zepeda, Lacayo y Treminio. (2007). *Métodos de sujeción, contención, derribo, y vías de aplicación de medicamentos en animales domésticos*. Managua, Nicaragua: Universidad de Ciencias Comerciales.
- Rodríguez y Conejeros. (2012). *Diagnóstico serológico de Anaplasma phagocytophilum en caballos Fina Sangre de Carrera pertenecientes al Valparaíso Sporting Club Viña del Mar*. Recuperado el día 30 de marzo de 2020 de <https://core.ac.uk/download/pdf/46531572.pdf>
- Rodríguez y Domínguez. (2000). *Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán*. Biomed. <https://www.researchgate.net>
- Rossdale, P. (1976). *Prontuario de clínica caballar*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA.
- Sáenz, A. (2008). *Zootecnia equina*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Sanilaboshop. (2015). *Diff-Quick Tinción rápida (3x500 ml)*. Recuperado el día 26 de marzo de 2020 de <https://www.sanilaboshop.es/Diff-Quick-Tincion-rapida-3x500-ml>
- Savage, C. (2000). *Secretos de la medicina de equinos*. D.F., México: McGraw-Hill INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Schalm, O. (1964). *Hematología veterinaria*. México, D.F.: Unión Tipográfica Editorial Hispano – Americana.

- Solari, M. (2006). *Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos*. Recuperado el día 30 de enero del 2020 de <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/descarga/epidemiologia-y-perspectivas-en-el-control-de-hemoparasitos>.
- Tarqui, B. (2013). *CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE GLOBULOS ROJOS EN IMÁGENES DIGITALES MICROSCÓPICAS*. Tesis de grado para optar al título de licenciatura en informática mención: ingeniería de sistemas informáticos. Universidad Mayor de San Andrés La Paz – Bolivia.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2017). *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA GENERAL II*. Recuperado el día 27 de marzo de 2020 de https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/PortaI2015/Licenciaturas/qfb/manuales/20Manual_Micobiologia_General2.pdf
- Visavet. (2020) a. *Anaplasmosis granulocítica equina*. Recuperado el día 30 de enero del 2020 de <https://www.visavet.es/infequus/anaplasmosis-granulocitica-equi.php>.
- Visavet. (2020) b. *Surra*. Recuperado el 30 de enero del 2020 de <https://www.visavet.es/infequus/surra.php>.
- Weather Spark. (2020). *Clima promedio en Managua, Nicaragua*. Recuperado el día 9 de marzo de 2020 de <https://es.weatherspark.com/y/14372/Clima-promedio-en-Managua-Nicaragua-durante-todo-el-a%C3%B1o>
- World Maps. (2020). *Vista satelital de Managua*. Recuperado el día 1 de abril de 2020 de https://satellites.pro/mapa_de_Managua.Republica_de_Nicaragua

IX. ANEXOS

Anexo 1. Formato de entrevista

Objetivo:

Datos del encuestado

Establecimiento: _____

Nombre: _____

Cargo: _____

Preguntas:

1. ¿Con qué frecuencia realiza la limpieza de las cuadras?

2. ¿Qué técnicas pone en práctica para el control de vectores (moscas, garrapatas, pulgas, ratas)?

3. ¿Qué químicos utiliza para el control de vectores?

4. ¿Con qué frecuencia aplica antiparasitario?

5. ¿Qué antiparasitarios utiliza?

Anexo 2. Ficha clínica

Ficha clínica N° _____

Fecha de ingreso _____

Caballeriza: _____

DATOS PERSONALES:

Nombre: _____

Especie: _____

Raza: _____

Edad: _____

Sexo: _____

Color: _____

Vacunas aplicadas

Antiparasitarios aplicados

Aspectos generales: _____

F. cardiaca: _____ F. respiratoria: _____

Piel y mucosas: _____

Ojos: _____ Oídos: _____

Temperatura: _____

Anexo 3. Reporte post análisis

Código Px	Prueba Giemsa	Prueba Wright	Prueba Diff - Quick
------------------	----------------------	----------------------	--------------------------------

NSO: No se observó (negativo)

Agente encontrado (positivo)

Anexo 4. Recolección de datos del paciente y entrevista



Recolección de datos del paciente



Entrevista con el responsable de la caballeriza

Anexo 5. Inspección clínica



Toma de temperatura



Mediendo la Frecuencia cardiaca

Anexo 6. Extracción de la muestra



Extracción de sangre de la vena yugular



Extracción de sangre de la vena yugular

Anexo 7. Almacenamiento y transporte de la muestra



Almacenamiento de la muestra identificada



Termo contenedor de las muestras

Anexo 8. Procesamiento de muestras en laboratorio



Kit Tinción Diff-Quick®



Solución madre Tinción Giemsa



Solución tinción Wright



Sumersión en tinción Diff-Quick®



Aplicación de tinción Wright en frotis



Secado de frotis en tinción Wright



Observación al microscopio en 100X