

**DETECCIÓN COPROLÓGICA Y MOLECULAR DE *Anoplocephala perfoliata*,
EN EQUINOS DEL DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA**

LUZ MARINA BARRERA VANEGAS

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS
PALMIRA
2011**

**DETECCIÓN COPROLÓGICA Y MOLECULAR DE *Anoplocephala perfoliata*,
EN EQUINOS DEL DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA**

LUZ MARINA BARRERA VANEGAS

**Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias con
Énfasis en Producción Animal Tropical**

DIRIGIDO POR:

JAIME EDUARDO MUÑOZ I. A. Esp. Ph.D.

CO-DIRECTORA: DRA. LUZ ÁNGELA ÁLVAREZ, Zoot. Ph.D.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS
PALMIRA
2011**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 15 días del mes de Diciembre de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores HERNANDO GUZMAN CAICEDO y ROMULO CAMPOS GAONA

Para calificar la Tesis de Grado de:

LUZ MARINA BARRERA VANEGAS

Titulada:

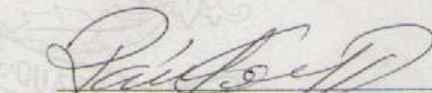
DETECCIÓN COPROLOGICA Y MOLECULAR DE *Anoplocephala perfoliata* EN EQUINOS DEL DEPARTAMENTO DEL VALLE DEL CAUCA" bajo la dirección de Jaime Eduardo Muñoz Flórez y Luz Ángela Álvarez Franco.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes doctores HERNANDO GUZMAN CAICEDO y ROMULO CAMPOS GAONA, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA


HERNANDO GUZMAN C.


ROMULO CAMPOS G.

DEDICATORIA

A mis padres (Q.E.P.D)

A mi hijo Lautaro

A mi nieta Karla Sophia

A mis hermanos

Motivos para continuar aprendiendo

Y

En especial a los caballos que han significado tanto
para la historia de la humanidad y de los cuales he
aprendido mucho.

A ellos que han sido una parte importante de mi
vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, por permitirme cumplir con mi sueño a través del apoyo que me brindaron durante la Maestría, especialmente, frente al desarrollo de la investigación que se llevó a cabo para optar el título de Magister en Ciencias Agrarias con Énfasis en Producción Animal Tropical.

A mi Director de tesis, Doctor Jaime Eduardo Muñoz y a los doctores Luz Ángela Álvarez y Javier Benavidez, por el constante apoyo y aliento que recibí durante mi proceso como investigadora en la escuela de posgrado. Su conocimiento, comprensión y orientación me han ayudado a evolucionar como ser humano, como un Sujeto activo de aprendizaje.

Al personal de los laboratorios de Biología Molecular, de Microbiología y Genética por facilitarme el espacio, los suministros y su conocimiento técnico; sin su continua asistencia y orientación mi investigación no hubiera sido posible.

Al doctor Irenarco Casas Amorocho, quien siempre estuvo orientándome en el desarrollo de este proyecto.

A la doctora Nancy Barrera Marín, quien ha sido el motor de todo este proceso para mi vida, sin su apoyo no lo hubiera logrado.

Al doctor Álvaro Barrera Marín, quien ha sido mi soporte, alentándome siempre a continuar con mi proyecto de vida.

A todos los que permitieron que sus equinos formaran parte de este estudio.

CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN.....	13
1. OBJETIVOS.....	17
1.1. Objetivo general.....	17
1.2. Objetivos específicos	17
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
2.1 EQUINOS EN COLOMBIA	18
2.2 CÉSTODOS	19
2.3 PREVALENCIA Y PATOLOGÍA	22
2.4 CÓLICO.....	23
2.5 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN DE <i>A. PERFOLIATA</i>	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 LOCALIZACIÓN	38
3.2 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE HECES	41
3.3 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DEL CÉSTODO	41
3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR	42
3.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	44
3.6 MÉTODO ESTADÍSTICO.....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1 MÉTODO COPROLÓGICO	45
4.2 MÉTODO MOLECULAR.....	46
4.3 COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA COPROLÓGICA Y MOLECULAR	47
4.4 RELACIÓN ENTRE SEXO E INFESTACIÓN.....	51
4.4 RELACIÓN ENTRE APTITUD E INFESTACIÓN	52
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS.....	63

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Ubicación Geográfica de los Sitios de Muestreo	38
Tabla 2. Sexo y Aptitud en los animales muestreados	39
Tabla 3. Edad de los Equinos.....	39
Tabla 4. Tipo de Equidos	45
Tabla 5. Chi cuadrado para la Independencia entre Sexo y Presentación de la Parasitosis.....	51
Tabla 6. Chi cuadrado para la independencia entre Aptitud y presentación de la parasitosis	52
Tabla 7. Chi cuadrado para la independencia entre Edad y presentación de la parasitosis.....	52
Tabla 8. Formulario de Registro de Información	63
Tabla 9. Presupuesto para 96 Muestras	64
Tabla 10. Datos Generales de las 112 Muestras	68
Tabla 11. Datos Específicos de las 112 Muestras.....	70
Tabla 12. Resultado de las 112 Muestras	72

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Vista Lateral de Escólex de <i>A. Perfoliata</i> (Lyons, et al, 1999).....	20
Figura 2. Huevo de <i>Anoplocephala perfoliata</i> (40x). Foto Luz Marina Barrera ©.....	20
Figura 3. Familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr). A) Diagrama esquemático de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr) (Modificado de: Jobes y Thien, 1997). B) Diagrama esquemático del ADNr, mostrando el gen 5S dentro de la región IGS (Wishart et al, 2002)	36
Figura 4. Ubicación de los sitios de muestreo en el Departamento del Valle del Cauca. Fuente: IGAC, 2011. Elaboró Ing. Adriana Martínez Arias ©.....	40
Figura 6. PCR muestras Florida y Villagorgona. Carril 1 Mp. Carril 2 Control negativo, Carril 3 Equino N°1 Florida, Carril 4 equino N°2 Florida, carril 5 equino N°3 Florida; carril 6,7,8, equinos 1,2,3 de Villagorgona, carril 9 y 10 muestras positivas de la <i>A. perfoliata</i>	50
Figura 7. PCR muestras Jamundí. Parte superior: Carril 1 Mp. Carril 1 Control negativo, carriles 2 y 3 Positivos, carriles 8 y 9 muestras positivas. Parte inferior: Carril 2 diagnostico positivo, Carril 4 y 5 muestras positivas de <i>A. perfoliata</i>	50

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la detección coprológica y molecular del céstodo *Anoplocephala perfoliata*, parásito de equinos, a partir de heces extraídas directamente del recto de 112 caballos del Departamento del Valle del Cauca.

Para aislar huevos del céstodo en las muestras de heces se usó el método reportado por Proudman y Edwards (1992)

Se utilizó un kit para extraer ADN de un ejemplar de la *A. perfoliata*, como control positivo.

Para la extracción del ADN fecal se utilizó el método fenol-cloroformo descrito por Menghi *et al.*, 2006.

Debido a su alta tasa de sustitución de nucleótidos, los espaciadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) del ADN ribosomal (ADNr) se han convertido en regiones muy populares en la investigación de la variación inter e intraespecífica de los diferentes grupos de céstodos. Se amplificaron las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN de *Anoplocephala perfoliata* para todas las muestras extraídas basados en el protocolo de la PCR anidada (Drogemuller *et al.*, 2004).

En la primera PCR se utilizaron cebadores que amplifican regiones parciales como la: 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, y 28S del ADNr de *A. perfoliata*. (Jousson *et al.*, 1999).

1. S18 (5'-TAACAGGTCTGTGATGCC-3')

2. L3T (5'-CAACTTTCCTCACGGTACTTG-3') (conservada en el céstodo).

Basados en las secuencias obtenidas de *A. perfoliata*, se utilizaron para la PCR anidada dos cebadores que amplifican la región ITS-2, estos cebadores amplifican un fragmento de 254pb:

1. Set AP-ITS-2-3F (5'-AATTGTGGGGGCTTCTCTTA-3')

2. AP-ITS-2-2R (5'-ACCTCGTGCCTTTCTTTAT-3') (Drogemuller *et al.*, 2004).

Con la técnica coprológica se detectó 16.96% de animales positivos al parásito y con la molecular 20.53%. De los 23 positivos, solo 10 fueron detectados con el método coprológico, lo cual representa una eficiencia del 43.75%, encontrándose además 9 falsos positivos con el método coprológico debido a la dificultad para diferenciar claramente los huevos de *Anoplocephala perfoliata* con huevos de otros géneros de cestodos como *Moniezia sp* o *Anoplocephala magna*.

La sensibilidad y especificidad de la técnica coprológica fueron 63.98% y 91.96% respectivamente.

Con la técnica molecular se logro una sensibilidad y especificidad del 100%.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba chi- cuadrado para evaluar la independencia de la parasitosis con las variables sexo, edad, aptitud, no encontrándose ninguna relación de dependencia entre estas variables con la infestación

Palabras claves: *Anoplocephala perfoliata*, Caballos, Cestodos, Parasitismo, PCR anidada.

SUMMARY

The aim of this study was the detection of tapeworm stool and molecular *Anoplocephala perfoliata*, a parasite of horses, from faeces taken directly from the rectum of 112 hp from the Department of Valle del Cauca.

To isolate tapeworm eggs in stool samples was used the method reported by Proudman and Edwards 1992.

Kit was used to extract DNA from a specimen of *A. perfoliata* as a positive control.

For fecal DNA extraction method was used described by phenol-chloroform Menghi et al., 2006.

Due to its high rate of nucleotide substitution, internal transcribed spacers (ITS-1 and ITS-2) of ribosomal DNA (rDNA) regions have become very popular in the investigation of inter-and intraspecific variation of the different groups cestodes. Regions were amplified ITS (Internal Transcribed Spacer) *Anoplocephala perfoliata* DNA for all samples taken based on the nested PCR protocol (Drogemuller et al., 2004).

In the first PCR primers were used to amplify partial regions as: 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, and 28S rDNA of *A. perfoliata*. (Jousson et al. 1999).

1. S18 (5'-TAACAGGTCTGTGATGCC-3')

2. L3T (5'-CAACTTCCCTCACGGTACTTG-3') (kept in the tapeworm).

Based on the sequences obtained from *A. perfoliata* were used for nested PCR two primers that amplify the ITS-2 region, these primers amplify a 254pb fragment:

- 1. Set AP-ITS-2-3F (5´-AATTGTGGGGGCTTCTCTTA-3´)**
- 2. AP-ITS-2-2R (5´-ACCTCGTGCCTTTCTTTAT-3´)** (Drogemuller *et al.*, 2004).

With the technique stool was detected 16.96% of positive animals to the parasite and the molecular 20.53% of the 23 positive, only 10 were detected with the method stool, which represents an efficiency of 43.75%, found 9 false positive addition to the method stool due to the difficulty of clearly differentiating *Anoplocephala perfoliata* eggs with eggs of other genres such as *Moniezia cestodes* or *Anoplocephala magna*.

The sensitivity and specificity of the technique were 63.98% and stool 91.96% respectively. With molecular techniques achieved a sensitivity and specificity of 100%. he results were analyzed by chi-square test to assess the independence of the parasite with the variables sex, age, ability, found no relationship of dependency between these variables and infestation

Keywords: *Anoplocephala perfoliata*, Horses, Cestodes, Parasitism, nested PCR.

INTRODUCCIÓN

La tenia *Anoplocephala perfoliata* es el parásito más común de los caballos (Matthews, 2004). Su ciclo de vida es indirecto transmitiéndose a través de ácaros oribátidos que habitan los pastizales. Actualmente se reconocen tres especies de tenia en el caballo *A. perfoliata*, *A. magna* y *Paranoplocephala. mamillana*. (Proudman, 2003).

Hasta hace poco una infección por *A. perfoliata* era considerada sin importancia clínica para el caballo, posiblemente por la dificultad para su detección. En la década de 1980, el interés por esta infección cobró importancia porque la tenia se asociaba con determinados tipos de "accidentes intestinales", que implicaban invaginación intestinal y la ruptura del ciego. Estas observaciones clínicas condujeron a renovar el interés para establecer su posible relación con el cólico equino (Proudman, 2003).

Existe una fuerte relación entre la infestación de *Anoplocephala perfoliata* con severas enfermedades intestinales asociadas a la presentación de cólico como: impactación ileal, intususcepción ileal general, ruptura del ciego y cólico espasmódico (Proudman, 1998).

A nivel mundial, *A. perfoliata* está distribuida con tasas de prevalencia que varían del 13 al 82%, dependiendo del lugar y del método de diagnóstico (Williamson *et al.*, 1997). Brasil presenta prevalencias de 21,2% y 85% (Sangioni *et al.*, 2000, Pereira y Vianna 2006). También mencionan que el 58% presentó cargas parasitarias leves (menos de 20 céstodos); 27% moderado (21-100 céstodos) y 72.8% alta (más de 100 parásitos). En Australia se revelan prevalencias de 4,9%, 29% y 32% de *A. perfoliata* y 2% de *A. magna* (Bucknell *et al.*, 1995).

Anoplocephala perfoliata causa considerables pérdidas económicas para la industria equina, debido principalmente a los problemas intestinales que desencadena (cólico). En Estados Unidos de América, las pérdidas monetarias generadas por cólicos exceden los 35 millones de dólares anuales (Seitzinger, 2001).

Las técnicas de diagnóstico usadas para la detección de este parásito son: coprológicas, serológicas y moleculares. La técnica coprológica reportada por Proudman y Edwards (1992), presentó una sensibilidad de 61%, aunque parece ser baja para los valores que requiere la prueba de diagnóstico, es particularmente útil para detectar caballos con altas cargas parasitarias (Matthews, 2004).

Los métodos diagnósticos frecuentemente empleados en animales vivos se basan en análisis coprológicos y se usan técnicas de sedimentación y flotación de huevos. Meana (1998) y Proudman (1999) identificaron el céstodo en la necropsia según Gasser (2005) y Slocombe (2007). De modo, que la técnica de inmunoensayo y la de diagnóstico molecular muestran una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico en vivo (Gasser, 2005).

El diagnóstico serológico utiliza metodologías como el ensayo por inmunabsorción ligado a enzimas (ELISAs) basado en excreción/secreción de antígenos; esta técnica tiene alta capacidad para detectar niveles de anticuerpos circulantes de inmunoglobulina G (IgG), los cuales están correlacionados con el número de parásitos y por lo tanto con el riesgo de adquirir severas lesiones patológicas (Hoglund *et al.*, 1995). Esta técnica ha tenido sensibilidad y especificidad entre 70 y 95% respectivamente (Proudman, 1996b, Matthews, 2004). Su desventaja se debe a la variabilidad de la respuesta de anticuerpos a la infección de parásitos, y al desconocimiento que se tiene sobre el tiempo que persisten los anticuerpos en

el animal después de que la tenia no esté presente, lo que podría afectar la sensibilidad de este método serológico; en algunos casos no es posible discriminar entre falsos positivos por reacciones cruzadas y positivos verdaderos. (Hoglund, 1995), (Proudman y Tress 1996a). También su uso se ha limitado a estudios epidemiológicos únicamente (Little, 1999).

Aunque Colombia se describe como una zona positiva para la presencia de *A. perfoliata* (Benavides *et al.*, 2008) existen escasos trabajos de investigación sobre el tema. Usando métodos coprológicos, se estimaron prevalencias del 13.97% en los municipios de Manizales, Villamaría, Chinchiná y Palestina (Aristizábal *et al.*, 1981). En el departamento de Caldas se evaluaron 135 équidos (distribuidos en 105 equinos, 2 asnales y 28 mulares) el 31.7% resultaron positivos para el parásito (Benavides *et al.*, 2008). En un estudio realizado en Medellín, se encontró presencia de *Anoplocephala sp* en un 22.2% (Cardona, 2005). En la Sabana de Bogotá se presentó una prevalencia del 60% (Mateus, 1976).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Anidada se ha propuesto para el diagnóstico molecular de la infestación de céstodos en equinos (Drogemuller, 2004). Su ventaja frente a las otras técnicas es su alta sensibilidad y especificidad.

Las metodologías diagnósticas han sido una limitante para el manejo del *A. perfoliata*; por lo tanto, se hace necesario utilizar técnicas moleculares como la PCR anidada, en países como Colombia y departamentos como el Valle del Cauca.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede constituir una herramienta valiosa para el análisis de infección causada por *Anoplocephala perfoliata* y así superar las limitaciones de los actuales métodos de diagnóstico; ya que es una

técnica altamente específica, rápida y sensible para la identificación del ADN de la tenia en el ADN de la excreta de equinos.

En el Departamento del Valle del Cauca no se conoce la prevalencia de *Anoplocephala perfoliata*, debido a que el diagnóstico de infestación por céstodos en equinos con métodos coprológicos tiene una limitada sensibilidad para la determinación exacta de la prevalencia (Benavides *et al.*, 2008). El desarrollo de pruebas serológicas mejora ligeramente la detección de infecciones por céstodos, aunque se requieren métodos más sensibles (Drogemuller, 2004). De allí, la importancia de este trabajo que permitió conocer cuál es la situación de esta enfermedad en la población equina del Departamento.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Detectar *Anoplocephala perfoliata* en equinos del Valle del Cauca mediante técnicas coprológicas y moleculares.

1.2. ESPECÍFICOS

- Detectar *Anoplocephala perfoliata* por diagnóstico de sedimentación - flotación de huevos en equinos del Valle del Cauca.
- Validar el método de la PCR Anidada para detectar *Anoplocephala perfoliata* en materia fecal en equinos y comparar los resultados con el método de sedimentación/flotación.
- Evaluar la relación entre sexo, aptitud para el trabajo y la infestación con *A. perfoliata*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Este capítulo trata sobre la importancia de los equinos en Colombia y su relación con los parásitos que más les afecta; también se hace alusión a los ácaros oribátidos que son los huéspedes intermediarios de *Anoplocephala perfoliata* y causantes del cólico de los caballos. Para su detección se describen los métodos de diagnóstico.

2.1 EQUINOS EN COLOMBIA

Colombia tiene reconocimiento internacional por sus especies caballar, mular y asnal, de exposición, deporte y trabajo, equinos de paso fino, trote, trocha y galope, ejemplares de coleo, carreras o tiro, mulares y asnales de labor, suman una población de 2.505.579 equinos, 220.847 asnos y 432.977 mulas ubicados principalmente en los departamentos de Córdoba, Antioquia, Casanare, Tolima y Cundinamarca regiones en donde se concentra el 42% del censo équido nacional. El Valle del Cauca cuenta con 32625 equinos, 3538 mulares y 265 asnos. (Corporación Colombia Internacional, ENA, 2009) Anexo 3.

Los caballos son susceptibles a contraer enfermedades parasitarias. Los céstodos que afectan a los equinos son *Anoplocephala perfoliata*, *A. magna* y *Paranoplocephala mamillana*. *A. perfoliata* es la especie más frecuentemente hallada en las necropsias. El ciclo de vida es indirecto y requiere de la presencia

de huéspedes intermediarios como los ácaros de vida libre de la familia *Oribatidae* (Castaño, 2005).

2.2 CÉSTODOS

Los céstodos son característicos por su cuerpo plano y segmentado a intervalos regulares, Cada cuerpo segmentado (denominado proglótido) es una unidad separada, un solo proglótido o varios unidos pueden desprenderse del cuerpo de la tenia sin afectarla. Debido a que los proglótidos se desintegran en el intestino grueso, es raro verlos intactos en las heces (Lyons, *et al.*, 1999)

Anoplocephala perfoliata, *A. magna* y *Paranoplocephala mamillana*, son los únicos céstodos adultos que parasitan a los caballos. *A. perfoliata*, es uno de los céstodos más comunes de los equinos, se encuentra comúnmente en la unión del intestino delgado y grueso, tiene una longitud aproximada de una pulgada pero logra alcanzar 8 cm (Proudman 1999) y puede acumularse en grandes cantidades, presenta un escólex redondeado con una lengüeta detrás de cada una de las cuatro ventosas, su cuello es muy corto y el estróbilo se ensancha bruscamente con proglotis cuya anchura es muy superior a su longitud (Figura 1). (Lyons, *et al.*, 1999)

Los huevos son irregularmente esféricos o triangulares y su diámetro oscila entre 50 y 80µm; la oncósfera está unida a un par de proyecciones denominadas aparato piriforme (Urquhart, 2001). La clasificación taxonómica de la familia Anoplocephalidae es: Dominio Eucarya, Reino Animal, Phylum Platyherminthes (gusanos planos), Clase Cestoda, Orden Cyclophyllidea, Familia Taeniidae, Genero Anoplocephala, Especie *Anoplocephala perfoliata*. (Figura 2)

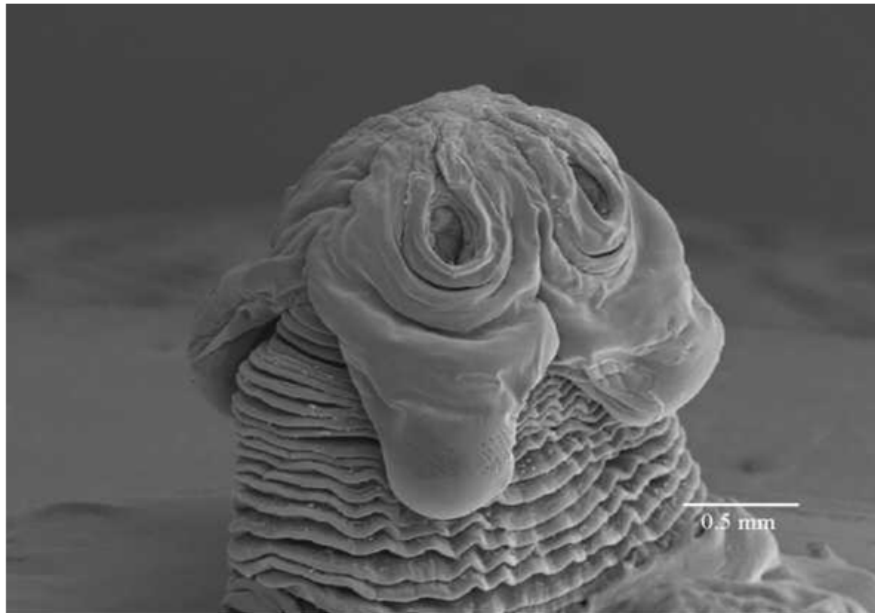


Figura 1. Vista Lateral de Escólex de *A. Perfoliata* (Lyons, et al, 1999)



Figura 2. Huevo de *Anoplocephala perfoliata* (40x). Foto Luz Marina Barrera ©

Su ciclo de vida es indirecto y requiere la presencia de huéspedes intermediarios (ácaros de vida libre de la familia *Oribatidae*). Las formas adultas eliminan proglótidos grávidos al medio ambiente junto con la materia fecal, en la cual pueden permanecer como tal o degradarse, liberando los huevos contenidos en su

interior. Los huevos son ingeridos por varios géneros de ácaros oribátidos en los cuales desarrollan la forma juvenil cisticercoide. Los equinos adquieren la parasitosis al alimentarse de las pasturas de las cuales ingieren los ácaros con el cisticercoide en su interior. El parásito se sujeta por medio de su escólex a la mucosa intestinal en la unión de la válvula ileocecal. Entre las 6-10 semanas son adultos y logran tener un tamaño final de 5 a 8 cms de longitud y 1,2 cm de ancho. El parásito adulto desprende proglótidos grávidos que se rompen durante su pasaje a través del intestino delgado del caballo en un periodo de 48 horas. (Proudman 1999).

Los resultados quirúrgicos han confirmado que el 52% de los caballos en los que el lumen intestinal fue expuesto han tenido infecciones por tenia. De los infestados, el 63% son de tres años de edad o menos. En un estudio retrospectivo en el centro de Kentucky que abarca más de 23 años (1974-1997), se practicó necropsia a 174 equinos para remover las tenias. De éstos, 45.4% estaban infestados con *Anoplocephala perfoliata* y 6.9% con *A. magna*. La gran mayoría de las muestras de heces de animales infestados fueron negativas, mediante técnicas de flotación-centrifugación (Bello y Abell, 1999).

En el Reino Unido, se desarrolló una prueba serológica utilizando antígeno excretor/secretor de *A. perfoliata* contra anti-12/13 kDa de IgG (T); los caballos infestados fueron utilizados para la evaluación de la intensidad de la infección, estudios epidemiológicos y ensayos de quimioterapia (Bello y Abell, 1999).

En Victoria, Australia se examinaron en la necropsia 130 caballos para determinar la infestación con *A. perfoliata*, 50 caballos (38.5%) tenían la tenia, de éstas el 17% se encontraron en la unión ileocecal, el 81% en la pared cecal, el 1.7% en el íleon terminal y el 0.2% en el colon ventral. La gravedad de las lesiones producidas en los sitios se relacionó con el número de tenias. Debido a la pequeña

área de la unión ileocecal, las tenias en este sitio ocasionaron lesiones más graves, siendo éstas: úlceras, membranas diftericas, engrosamiento de la mucosas y submucosas; también se observó aumento en el número de eosinófilos y disminución de los linfocitos presentes en los sitios relacionados (Williamson *et al.*, 1997).

2.3 PREVALENCIA Y PATOLOGÍA

Los datos de prevalencia de endoparásitos de las poblaciones equinas, en particular los que podrían reflejar el impacto de la quimioterapia en las poblaciones de parásitos, son difíciles de obtener. Los informes sobre la presencia de parásitos internos en los équidos en la necropsia varían de animales seleccionados para probar la eficacia de antiparasitarios y probablemente, con poco o sin tratamiento previo, a los animales con medidas de control (Lyons *et al.*, 1999).

Los estudios en el mundo indican una prevalencia que varía entre 7 y 81%. Algunas investigaciones han reportado que el parásito se fija con preferencia alrededor de la válvula ileocecal. La ulceración de la mucosa, edema, hipertrofia del íleon distal y decremento de la distensión de la válvula ileocecal y la severidad de la patología es directamente proporcional a la intensidad de la infestación (Proudman 1999).

En la zona de exclusión de Chernóbil, Ucrania, con caballos Przewalski, las prevalencias fueron de 14.3% (Slivinska *et al.*, 2006). En Victoria, Australia en un estudio con 150 caballos examinados post mortem, se determinó la prevalencia y epidemiología de parásitos gastrointestinales, encontrándose *Anoplocephala perfoliata* en un 29% (Bucknell, 1995).

Para determinar la prevalencia de varias especies de endoparásitos en équidos se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades de Ganadería en Kentucky (1995-1999) un estudio con 350 caballos, los cuales se examinaron en la necropsia encontrándose entre otros parásitos *Anoplocephala perfoliata* con prevalencia del 52% (Lyons *et al.*, 1999)

Para el control de parásitos internos de los équidos se ha utilizado variedad de compuestos antiparasitarios durante los últimos 60 años. Los primeros en aparecer en el mercado fueron las difenilaminas (fenotiazina) en la década de 1940, seguido por piperazinas en la década de 1950, y benzimidazoles (tiabendazol), organofosforados (diclorvos y triclorfón), imidothiazole (levamisol), y pirimidinas (por ejemplo, tartrato de pirantel y el pirantel pamoato) en los años 1960 y 1970. La primera lactona macrocíclica comercializada fue la ivermectina en 1983 y la segunda fue moxidectina en la década de 1990. Estos últimos compuestos son activos en los artrópodos y nematodos parásitos y se denominan comúnmente endectocidas (Lyons *et al.*, 1999)

2.4 CÓLICO

El cólico es un término para cualquier enfermedad intestinal que resulta en dolor abdominal. Muchos episodios de cólico en equinos se resuelven espontáneamente o con tratamiento médico, pero del 5 al 10% ocasionan la muerte del animal a menos que se realice tratamiento quirúrgico. Es la causa más importante de mortalidad y pérdidas económicas en la industria equina. Causa lesiones en la región ileocecal del tracto gastrointestinal, representa 15% de los casos quirúrgicos, los cuales son de pobre pronóstico por el poco éxito, debido a la inaccesibilidad a esta región y su importancia en la regulación de la motilidad intestinal (White, 1990). El cólico es un problema de salud para la industria equina.

Los estudios indican que aproximadamente el 10 % de la población de caballos van a sufrir un episodio de cólico cada año y que aproximadamente el 0,7 % morirán a causa de los cólicos. Con base en la población estimada del Caballo Americano de 9,2 millones de los Estados Unidos, aproximadamente 920.000 casos de cólicos se producen cada año, y más de 64.000 caballos pueden morir, generando una gran pérdida económica, si se tiene en cuenta la estimación de la American Horse de que la industria del caballo genera 102 mil millones de dólares hacia los EE.UU. La pérdida anual monetaria por los cólicos exceden los 35 millones de dólares (Seitzinger, 2001).

Desde la década de los 80s, se presenta un aumento en la prevalencia de casos clínicos que describen una estrecha relación entre las causas específicas del cólico equino, rotura intestinal, invaginación, vólvulo, obstrucción intestinal, grandes y graves infestaciones de *Anoplocephala perfoliata*, lo cual ha aumentado el interés por los efectos patológicos de este parásito. Se investigaron los cambios en el intestino equino, relacionados con la tenia, en la unión entre la última parte del intestino delgado (íleon) y la primera parte del intestino grueso (ciego), conocido como la unión ileocecal. Se seleccionaron 31 caballos al azar (11 libres de parásitos y 20 caballos con infecciones espontáneas de *A. perfoliata*) y se evaluaron las uniones ileocecales. Se detectó una significativa relación entre la carga de parásitos y el grado de daño microscópico de las múltiples capas del intestino (mucosa y submucosa), y la hipertrofia (agrandamiento anormal) de la capa muscular circular del intestino. Se observaron lesiones de los elementos nerviosos intestinales, conocidos como el sistema nervioso entérico, en caballos con moderada a alta carga de parasitismo (Bucknell *et al* 1995).

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Perugia, Italia, se estudiaron los cambios patológicos causados por *A. Perfoliata* en la unión ileocecal en relación con la carga de parásitos en los caballos, para determinar el

grado de las lesiones en la mucosa y submucosa. Y los cambios que ocurren en el sistema nervioso entérico (SNE) del intestino, dada su importancia en la actividad motora.

Se utilizaron treinta y un caballos de ambos sexos, de dos (2) a ocho (8) años de edad, sacrificados regularmente entre mayo y julio de 2007. El tracto intestinal correspondiente a la unión ileocecal, se inspeccionó dentro de los 30 minutos después de la muerte. Posteriormente, se hizo una incisión a lo largo de toda la muestra intestinal para exponer el orificio ileocecal. El contenido intestinal y las paredes fueron examinados para las tenias contando sólo las adultas. Las tenias recogidas fueron lavadas en agua corriente y conservados en formol al 10% para identificación morfológica de acuerdo con la descripción (Soulsby 1968). Se lavó el tracto intestinal en agua corriente y se colocó inmediatamente en formalina neutra al 10%. En los caballos parasitados con graves lesiones intestinales, las muestras de tejido fueron elegidas de las regiones que mostraron los cambios macroscópicos más marcados. Cada muestra se tiñó con hematoxilina-eosina (HE) para la evaluación histológica. Se utilizó la tinción Cresol violeta para evaluar los cambios en las células neuronales de los ganglios del Sistema Nervioso entérico (SNE) asociados con la infección por *A. perfoliata*. Las lesiones ulcerosas, inflamación, atrofia, fusión de las vellosidades intestinales y los cambios de la flora intestinal se evaluaron de forma independiente; fueron clasificados por dos histólogos que usaron un rango de lesiones definidas de la siguiente manera: 0 puntos ausencia de lesiones, 1 punto para lesiones leves, 2 puntos para lesiones moderadas y 3 puntos para las lesiones marcadas (Pavone *et al* 2011)

Los caballos se dividieron en tres grupos de acuerdo al número de tenias encontradas: grupo N sin tenias, grupo A de 20 a 100 tenias, grupo B más de 100 tenias. *A. Perfoliata* se encontró en 20 caballos (64,5%). Once caballos fueron negativos, 15 caballos tenían entre 20 y 100 tenias, y en cinco caballos se

encontraron más de 100 tenias. Las muestras intestinales de los caballos negativos mostraron la mucosa rosa brillante, mientras que los otros presentaron edema, hiperemia y lesiones hemorrágicas.

En los caballos gravemente parasitados se vieron múltiples áreas ulceradas. Por otra parte, hubo aumento en el diámetro de la papila ileal correspondiente a una reducción en el tamaño del orificio de la válvula íleo-cecal. En dos casos, había prolapso leve del íleon terminal en la luz de la unión ileocecal.

El análisis estadístico confirmó la correlación significativa entre la carga parasitaria y la clasificación histopatológica de lesiones ($p \leq 0.05$) (Pavone *et al.*, 2011)

La asociación entre los cólicos espasmódicos y la infección por *A. perfoliata* (Proudman *et al.* 1998), ha dado lugar a especulaciones sobre los trastornos de la motilidad vinculados con estos parásitos. De acuerdo con Lee y Tatchell (1964), la alteración de la motilidad intestinal puede resultar de la interferencia con la transmisión nerviosa parasimpática por la gran cantidad de acetilcolinesterasa en los parásitos, aunque no se han producido datos experimentales para apoyar esta hipótesis.

Se conoce que el SNE, actúa en la transición inmunológica y endocrina, en las funciones del flujo de sangre, en el transporte y las secreciones mucosas, y en las funciones motoras). (Costa *et al.*, 2000) Sin embargo, la exacta patogénesis del daño en el SNE durante la infección por *A. perfoliata* queda por aclarar (Pavone *et al.*, 2011).

Las lesiones del sistema nervioso entérico sugieren que el uso de oportunas pruebas de diagnóstico y un programa de prevención ordenado de tratamiento antiparasitario son indicados en los caballos con infestaciones moderadas para

prevenir o reducir al mínimo el riesgo de cólicos causados por *A. perfoliata* (Campbell, 2010).

2.5 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN DE *A. PERFOLIATA*

2.5.1 Diagnóstico coprológico

El diagnóstico coprológico de la *A. perfoliata* es muy específico debido a la apariencia característica de los huevos, pero en caballos infestados con poco número de huevos de céstodos, hay poca sensibilidad. Estudios de validación reportan sensibilidades de 11–61%, lo que indica que la técnica convencional centrifugación/flotación es inadecuada para el diagnóstico de cestodiasis equina (Proudman y Edwards 1992).

Para obtener un método coprológico efectivo para detectar *Anoplocephala perfoliata* en materia fecal, se recolectaron muestras de 107 equinos en el área central de España y se examinaron por los siguientes métodos:

1. **Método A:** basado en la técnica convencional de McMaster, se mezclan 5 gr. de heces con 40 ml de agua, se homogenizan y se vierten a través de una malla de 150 μm . 10 ml de la muestra se centrifugan por 3 minutos a 1500 r.p.m. El sedimento se resuspende con solución al 40% de Sulfato de Zinc y 1 ml se introduce en la cámara McMaster para contar los huevos del céstodo.
2. **Método B:** basado en Proudman y Edwards 1992: 40 grs de heces se mezclan en 500 ml de agua, se cuelan en un tamiz de malla 300 μm y el homogenizado se sedimenta por lo menos durante 24 horas en un decantador; después el sobrenadante se resuspende en 50 ml de agua y se centrifuga por 10 minutos

a 1500 r.p.m. Se repite en 2 tubos de 10 ml. El sobrenadante de uno de los tubos se sustituye por solución de sulfato de zinc al 40%, luego se lleva a la cámara McMaster para buscar los huevos.

- 3. Método C:** el sedimento del segundo tubo de 10 ml proveniente del método B se resuspende con solución saturada de sacarosa ($d = 1.3$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) se tapa con cubreobjetos dejándolo reposar por 30 minutos. Luego se coloca en un portaobjetos en el microscopio para observar los huevos de las tenias a 10 y 40 X.

La presencia de tenias se confirmó post mortem en 24 (22%) animales con cargas que fueron desde uno (1) hasta 248 gusanos, la mayoría de ellos (71%) con menos de 100 parásitos. El número de huevos varió de 1 a 20 huevos por gramo (hpg) de heces. No se encontró relación entre la carga parasitaria y el número de huevos detectados: una alta intensidad de huevos (20 hpg) fue detectada en una muestra fecal de un caballo con 23 tenias, mientras que animales con altas cargas (161 – 223 tenias) se detectó solo un huevo por gramo. Los resultados indican que los métodos coprológicos tienen una menor probabilidad de detección de la infestación por céstodos cuando los caballos tienen menos de 100 tenias.

Como no hay diferencias esenciales entre huevos de *Anoplocephala perfoliata* y huevos de cestodos de género similar como *Moniezia*, la gran dificultad para el diagnóstico de *A. perfoliata* puede ser atribuido a alguna característica particular de ésta tenia para su diseminación antes que a alguna cualidad específica de los huevos (Meana, 1998).

En un estudio reportado por Proudán y Edwards, 1992 utilizando la técnica de centrifugación/flotación usaron muestras fecales de 80 caballos se evaluó la cantidad de huevos por gramo y la presencia de tenias en la necropsia

encontrando un coeficiente de correlación de 0.023 lo que indica que el conteo de huevos por gramo no debe ser utilizado como guía para determinar la carga parasitaria.

2.5.2 Diagnóstico serológico

La técnica **ELISA** (ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas), se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

Proudman y Trees 1996b, realizaron la primera caracterización de un antígeno crudo excreción/secreción (E/S) de *Anoplocephala magna* y se evaluó la eficacia de un ELISA descrito para la detección de anticuerpos específicos frente a *Anoplocephala perfoliata*, en el diagnóstico serológico diferencial entre las dos principales especies causantes de cestodosis equinas en la Península Ibérica:

1. *Anoplocephala perfoliata* y *A. magna*. Los sueros utilizados en el estudio se obtuvieron por venopunción cecal post-mortem de équidos sacrificados en mataderos del área central de España.
2. Se realizó en cada animal la inspección completa del tracto gastrointestinal para la detección de parásitos.
3. Seleccionaron 23 animales: ocho parasitados por *A. perfoliata*, siete por *A. magna* y ocho animales negativos a *Anoplocephala* spp. por examen postmortem.

4. En todos los animales se realizaron la recogida y recuento de céstodos, así como la cuantificación del resto de parásitos gastrointestinales.
5. Los respectivos antígenos E/S de las dos especies de *Anoplocephala* a evaluar los obtuvieron a partir de céstodos recogidos de los animales con mayores cargas parasitarias.
6. Las proteínas obtenidas en cada caso fueron cuantificadas y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los 23 sueros fueron analizados por ELISA frente a los antígenos de E/S de las dos especies de *Anoplocephala*. Siete de los sueros analizados por ELISA (2 positivos a la *A. perfoliata*, 3 positivos a la *A. magna* y 2 negativos) fueron analizados también por inmunotransferencia con membranas de PVDF (Polivinil difluoruro) de 0,2 μm de tamaño de poro, frente a los dos antígenos.

Por análisis electroforético, la caracterización de *A. magna* reveló la ausencia aparente de tres fracciones proteicas presentes en el antígeno de *A. perfoliata* de aproximadamente < 75, 45 y 12 kDa. Los resultados del análisis por ELISA fueron los siguientes:

- a. Seis de los ocho sueros positivos a la *A. perfoliata* mostraron densidades ópticas (D.O.) superiores al punto de corte para dicha especie, siendo todas las D.O. inferiores al umbral de positividad calculado para *A. magna* en los animales de este grupo.
- b. En el grupo de animales positivos a la *A. magna*, tres de los siete sueros mostraron D.O. superiores a los respectivos umbrales de *A. magna* y *A. perfoliata*, y en el de animales negativos, todos los sueros mostraron valores

inferiores al umbral de positividad frente a la *A. magna* pero tres de los sueros sobrepasaron el umbral de positividad frente a la *A. perfoliata*.

- c. Se obtuvo una sensibilidad del 75% y una especificidad del 60% para la detección de la *A. perfoliata*, y una sensibilidad del 42,8% y especificidad del 100% para la detección de la *A. magna*.
- d. Por análisis de regresión lineal, en el grupo de animales positivos por la *A. perfoliata* se halló en la necropsia una relación estadísticamente significativa entre el número de céstodos y la absorbancia (Coeficiente de correlación = 0,8102; $p < 0,05$).
- e. El electroinmunoensayo reveló para el antígeno de la *A. perfoliata* la existencia de inmunoreactividad homóloga (fracción próxima a 10 kDa) y heteróloga (fracciones próximas a 10 y 15 kDa), y para el antígeno de la *A. magna*, sólo reactividad homóloga (fracciones próximas a 10 y 15 kDa). Para ambos antígenos, la reactividad sólo se puso de manifiesto frente a sueros procedentes de animales con elevadas cargas parasitarias. (Proudman and Trees, 1996b).

En una investigación realizada en Alberta, Canadá, se encontraron tenias en la unión íleo-cecal y el ciego de 7% (31/434) de los caballos infestados. La intensidad de la infestación varió de uno (1) a más de 1.000 céstodos por caballo. La intensidad media fue de 41 con desviación estándar ± 179 . La sensibilidad del análisis coprológico fue del 54%, mientras que la especificidad fue del 100%.

El análisis con los sueros positivos de la necropsia mostró que todos fueron positivos para anticuerpos, en especial el antígeno 12/13 kDa. La sensibilidad del análisis de Western blot fue del 100% y la especificidad fue del 87%, mientras que

12 falsos positivos fueron encontrados. De una muestra de caballos negativos en la necropsia seleccionada se encontró que 15% tenían anticuerpos contra el antígeno 12/13 KDa. (Skotarek *et al* 2010).

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Teramo, Italia se realizó un estudio para comparar la confiabilidad de los métodos coprológico, serológico y molecular para la detección de *Anoplocephala perfoliata* en caballos naturalmente infectados y en caballos que habían sido tratados con una combinación de Ivermectina y Prazicuantel. De 42 caballos sometidos a examen coprológico:

- a. 16 resultaron negativos y 26 positivos para la presencia de huevos de *A. Perfoliata*.
- b. Los positivos también lo fueron en la PCR anidada.
- c. 15 de los 16 negativos coprológicamente, también resultaron negativos a nivel molecular, mientras que uno resultó positivo por PCR.
- d. 18 de los 26 caballos positivos fueron tratados con una combinación de Ivermectina 18.7 mg/g y Prazicuantel 140.3 mg/g y posteriormente resultaron negativos por coprológico y uno resultado positivo por PCR anidada realizada dos semanas después del tratamiento.
- e. Todos los animales infestados y no tratados se sometieron a pruebas serológicas (ELISA) y se encontró una alta densidad óptica asociada con riesgo de cólico. Sin embargo, también se obtuvieron altos valores de densidad óptica en cuatro caballos después del tratamiento y en tres caballos que habían sido negativos en el análisis molecular y coprológico (Traversa 2008).

2.5.3 Diagnóstico molecular

2.5.3.1 La Reacción en Cadena de la Polimerasa

Conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo. Se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. (Bartlett y Stirling. 2003)

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son:

Thermus aquaticus (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth) (Bartlett y Stirling, 2003).

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura y los tiempos necesarios para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Los más antiguos, carentes de este sistema, solucionaban el problema de la condensación con una capa de aceite en la parte superior de la mezcla de reacción o con un poco de cera dentro de los tubos. (Sambrook 2001).

2.5.3.2 PCR Anidada

En los ensayos de la PCR anidada se utilizan dos ciclos de amplificación con cuatro cebadores, denominados cebadores externos e internos. En general, los ensayos de la PCR anidada proporcionan una sensibilidad y especificidad analíticas superiores si se comparan con las pruebas de PCR convencionales. La sensibilidad analítica es típicamente <10 copias de genoma del agente infeccioso, y la especificidad analítica también aumenta porque, en la PCR anidada, cuatro oligonucleótidos tienen que unirse específicamente al ADN molde seleccionado para producir una reacción positiva (Belak, 2001).

2.5.3.3. Región Espaciadora ITS

El estudio de regiones específicas del genoma es muy útil para la realización de análisis moleculares. Una de estas regiones es la de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr), la cual está conformada por muchas copias de genes que codifican para tres componentes ribosomales: 28S, 5.8S y 18S. En la mayoría de los eucariotas, la organización 5' a 3' de esta familia de genes consiste en un espaciador transcrito externo (ETS), el gen 18S (SSU), un espaciador transcrito interno (ITS1), el gen 5.8S, un ITS2, el gen 28S (LSU) y el espaciador intergénico (IGS), la cual se puede observar en la Figura 3. La región IGS es seguida por otra copia de la familia génica (Devran *et al.*, 2002; UNL, sf).

El gen 18S consiste en la subunidad ribosomal pequeña (SSU), mientras que el gen 28S consiste en la subunidad ribosomal grande (LSU). La SSU nuclear del ADNr es una de las regiones de ADN más conservadas, por lo cual han resultado útiles en la reconstrucción de ramas filogenéticas, incluyendo reinos, filos, clases y órdenes. El grado de conservación nucleotídica del gen 5.8S, el más pequeño de la familia de ADNr, es similar al de la SSU, pero su tamaño es muy pequeño como para contener información filogenética de peso. Por esta razón no es recomendable utilizar este gen para análisis moleculares. La LSU nuclear del ADNr es mucho más larga y muestra más variación, comparándola con el gen 18S, sin embargo, ha demostrado ser útil en el estudio de relaciones filogenéticas en niveles bajos de categoría, como órdenes o familias (Powers, 2004; Hwang y Kim, 1999).

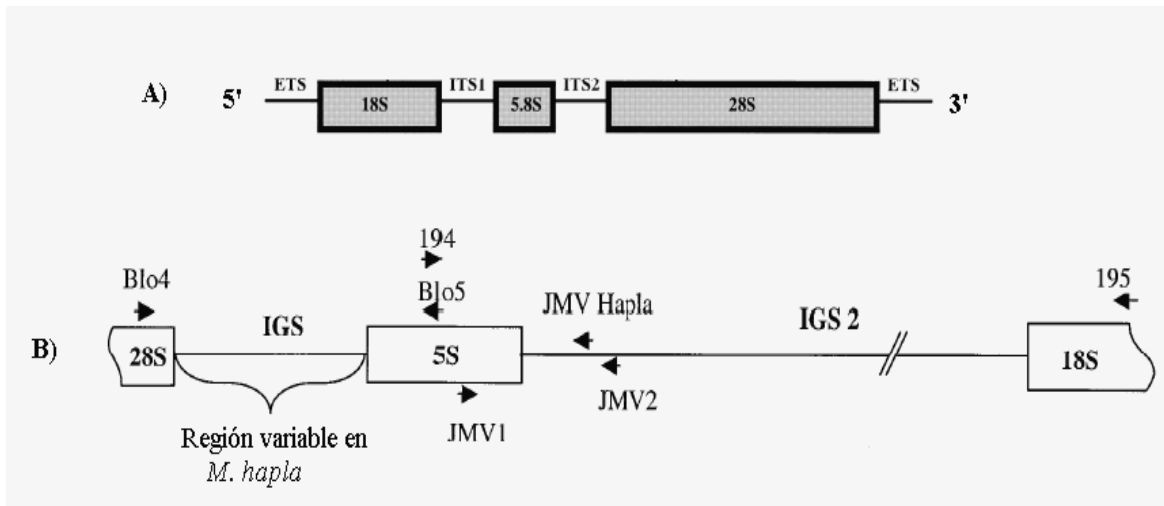


Figura 3. Familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr). A) Diagrama esquemático de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr) (Modificado de: Jobs y Thien, 1997). B) Diagrama esquemático del ADNr, mostrando el gen 5S dentro de la región IGS (Wishart et al, 2002)

Las regiones espaciadoras del ADNr nuclear evolucionan mucho más rápido que las regiones codificantes, ya que las sustituciones en las regiones espaciadoras no muestran efectos letales para los organismos. Por otro lado, las variaciones en las regiones codificantes del ARNr son mucho más conservadas, ya que una mutación en alguna de estas regiones podría evitar la construcción efectiva de los ribosomas, lo cual afectaría de forma negativa la maquinaria de la síntesis proteica (Subbotin *et al.*, 2005; Hwang y Kim, 1999).

Este arreglo de genes muy conservados y regiones espaciadoras menos conservadas es lo que ha hecho de estos genes un objetivo muy popular, ya que permite el diseño de cebadores universales en secciones de secuencias conservadas, y estos pueden utilizarse para amplificar fragmentos homólogos, tanto de especies distantes como de especies estrechamente relacionadas. La utilización de la técnica de PCR para el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de la región ITS, ha permitido distinguir diferentes especies de nematodos (Wang *et al.*, 2003).

Las copias adyacentes de la unidad repetitiva ADN_r se encuentran separadas por la región IGS, la cual generalmente es más variable que la ITS y contiene a menudo elementos subrepetitivos, los cuales se piensa que funcionan como aumentadores de la transcripción (Wishart *et al*, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo de detección coprológica y extracción de ADN se realizó en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular, pertenecientes a la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. En la Tabla 1 se muestra la ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el Departamento del Valle del Cauca donde se realizó la colecta de heces, con el número de muestras, geo-referenciación y la altura sobre el nivel del mar. Para determinar el número de muestras se utilizó la fórmula:

$$n = \frac{Z^2 NPQ}{E^2 (N - 1) + Z^2 PQ}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 * 36428 * 0.5 * 0.5}{0.1^2 (36427) + (1.96)^2 * 0.5 * 0.5} = 96 \text{ Muestras.}$$

Tabla 1. Ubicación Geográfica de los Sitios de Muestreo

LOCALIDAD	NÚMERO DE MUESTRAS	COORDENADAS	TEMPERATURA PROMEDIO	ALTURA m.s.n.m.
SEVILLA	17	4°16'08" N, 75°56'10" W	18° C	1612
DAGUA	15	3°38'45" N 76°41'30" W	18° C	1600
PALMIRA	21	3°31'48" N 76°81'13" W	23° C	1.001
FLORIDA	9	03°19' 39" N, 76° 14' 19" W	23° C	1038
CANDELARIA	18	3° 24' 43" N 76° 20' 1" W	24° C	975
EL CERRITO	12	1° 13' A 2° W 4° A 5° N	25° C	987
JAMUNDÍ	20	3°17' 0" N 76° 32' 0" W	23° C	975
TOTAL	112			

En las tablas 2 y 3 se muestran las características de los animales muestreados:

Tabla 2. Sexo y Aptitud en los animales muestreados

APTITUD	HEMBRAS	MACHOS	TOTAL
Trabajo	31	30	61
Silla	17	24	41
Receptoras	10	0	10
TOTAL	58	54	112

Tabla 3. Edad de los Equinos

EDAD (AÑOS)			
HASTA 3	3 a 10	> 10	TOTAL
8	55	49	112
7.15%	49.10%	43.75%	100%

Tabla 4. Tipo de Equidos

TIPO DE EQUIIDO	CANTIDAD
EQUINOS	110
MULAR	1
ASNAL	1
Total	112

El trabajo que realizan los animales consiste en transportar materiales y personas que los utilizan para recreación en cabalgatas. Son alimentados con mogolla, caña picada, pasto de corte *Pennisetum purpureum x Pennisetum typhoides* y *Axonopus scoparius*, pastos de pastoreo y concentrados comerciales de diferentes marcas. Los propietarios de los caballos no realizan exámenes coprológicos.

Las muestras se tomaron directamente del recto de los animales y se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas. El material recolectado se transportó en refrigeración al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, donde se realizó el análisis coprológico.

Se registró la información de cada animal, consignando datos de peso calculado con cinta, edad por observación de los dientes, tipo de équidos (equino, asnal, mular), Tabla 4, aptitud (silla, trabajo), manejo (estabulación, pastoreo, mixto), alimentación (pasto, concentrado, mixto) vermifugaciones anteriores, realización de exámenes coprológicos, antecedentes de cólico, condición del animal (entero, castrado), sexo y color, datos que pueden servir como referencia para posteriores trabajos con equinos. (Ver Anexo 1).

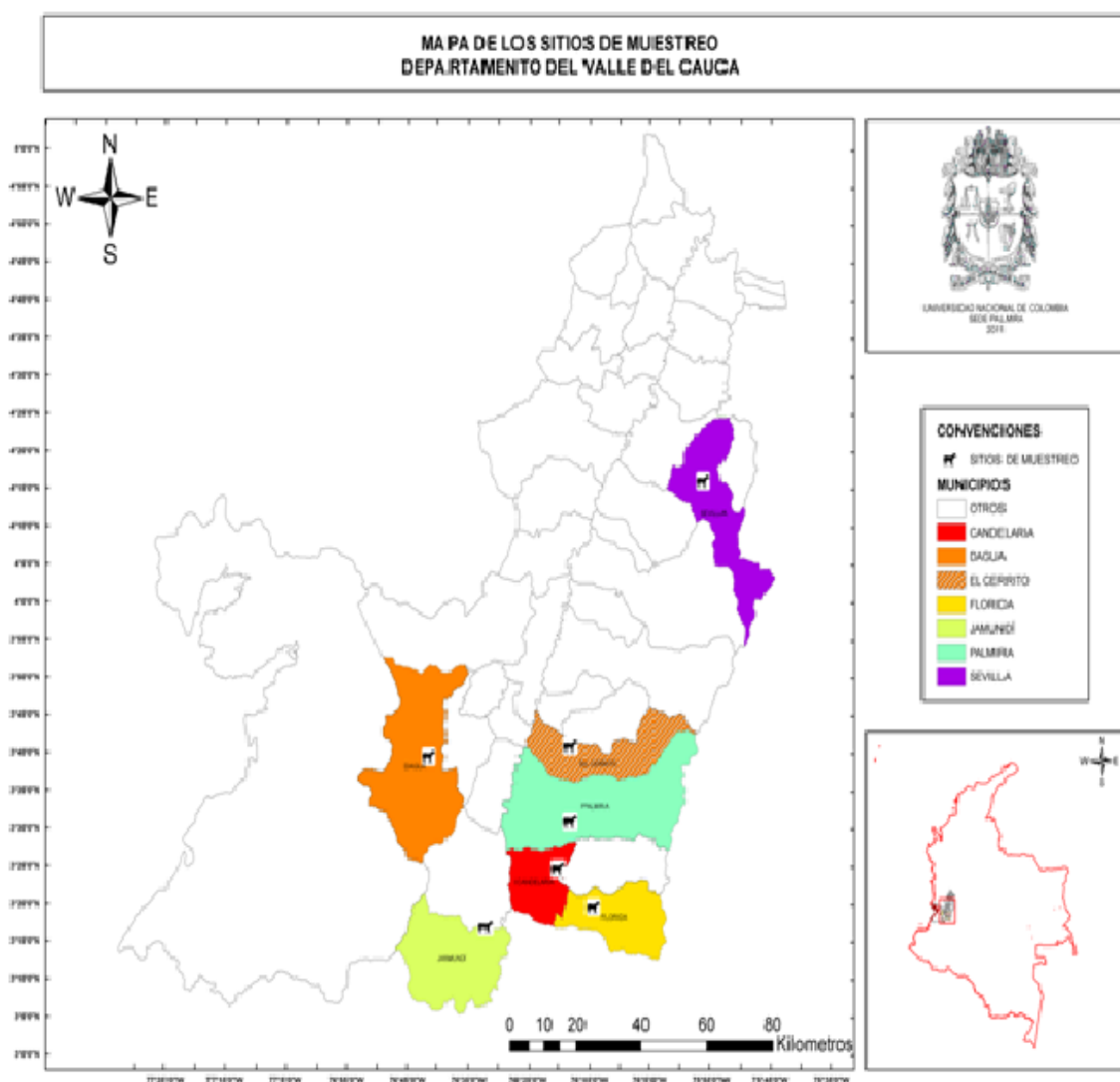


Figura 4. Ubicación de los sitios de muestreo en el Departamento del Valle del Cauca.

Fuente: IGAC, 2011. Elaboró Ing. Adriana Martínez Arias ©

3.2 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE HECES

De cada muestra recolectada, se pesaron 40g y se diluyeron en 10 ml de agua, se filtró la mezcla a través de una gasa doble de tamaño de poro 0.2 x 0.1 cm, se vierten en dos tubos de ensayo 15 ml, se centrifugó por 10 minutos a 2700 rpm para eliminar el sobrenadante se realiza una segunda centrifugación; se eliminó nuevamente el sobrenadante y se agregó solución de Sheater (450 g de sacarosa + 350 ml de agua), se mantuvo en reposo por dos horas con cubreobjetos. Pasado este tiempo el cubreobjetos se colocó en el portaobjetos. Los huevos del céstodo fueron observados con objetivos 10X y 40X (Proudman y Edwards, 1992).

3.3 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DEL CÉSTODO

Se utilizó el kit “DNEASY blood and tissue” de QIAGEN, para extraer ADN de un ejemplar de la *A. perfoliata*, como control positivo.

Para la extracción del ADN fecal se utilizó el método fenol-cloroformo descrito por Menghi *et al.*, 2006

Aproximadamente 200 µl, de heces se suspendieron en 200 µl de Tris- HCl 100 mM pH 7,5 que contenía bromuro decetil-trimetil-amonio al 2% (CTAB), NaCl 1,4 M, 2-mercaptoetanol al 0,2% y EDTA 20 mM.

Se agitó haciendo “vórtex”, se agregaron 400 µl de fenol saturado con agua cuyo pH se equilibró con 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 y se agregaron 100 µl de

cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente, la mezcla se agitó durante 2 minutos, y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, se colocó en un tubo nuevo, y se agregó un volumen igual de alcohol isopropílico frío. Se conservó a -20° C durante una hora. El DNA se concentró por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos, se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 50 µl de Tris-HCl 100 mM pH 7,5, almacenándose a -20° C.

Para la cuantificación del ADN se usó el bacteriófago lambda de concentración conocida (30, 60, 90, ng/µl) encontrándose entre 20 y 30 ng/µl de ADN, cantidad suficiente para la amplificación por PCR.

Para la determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas se usaron las siguientes formulas:

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \quad E = \frac{VN}{VN + FP} \quad (\text{Colwell y Baron, 1990})$$

VP = verdaderos positivos
FN = falsos negativos
VN = verdaderos negativos
FP = falsos positivos

3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR

Debido a su alta tasa de sustitución de nucleótidos, los espaciadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) del ADN ribosomal (ADNr) se han convertido en regiones muy populares en la investigación de la variación inter e intraespecífica de los diferentes grupos de céstodos. Se amplificaron las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN de *Anoplocephala perfoliata* para todas las muestras extraídas basados en el protocolo de la PCR anidada (Drogemuller *et al.*, 2004).

En la primera PCR se utilizaron cebadores que amplifican regiones parciales como la: 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, y 28S del ADNr de *A. perfoliata*. (Jousson et al., 1999).

3. S18 (5'-TAACAGGTCTGTGATGCC-3')

4. L3T (5'-CAACTTCCCTCACGGTACTTG-3') (conservada en el céstodo).

Basados en las secuencias obtenidas de *A. perfoliata*, se utilizaron para la PCR anidada dos cebadores que amplifican la región ITS-2, estos cebadores amplifican un fragmento de 254pb:

3. Set AP-ITS-2-3F (5'-AATTGTGGGGGCTTCTCTTA-3')

4. AP-ITS-2-2R (5'-ACCTCGTGCCTTTCTTTAT-3') (Drogemuller *et al.*, 2004).

Las condiciones para ambas PCR fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial a 94°C por 7 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturalización) 50°C por 30 segundos (hibridación) y 72°C por 2 minutos, (extensión) y una extensión final a 72°C por 12 minutos. Muestras control (sin ADN) y un control positivo (ADN extraído de *Anoplocephala perfoliata*) se incluyeron en cada amplificación.
2. La PCR se realizó en un volumen de 25 µl, con 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de DNTPs, 50 pmol de cada cebador, 1µ de Taq Polimerasa, Tampón de taq 1X.
3. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de Etidio.

3.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN se realizaron geles de agarosa al 0.8% y para productos de la amplificación por PCR se elaboró al 1.2%, la agarosa fue disuelta en tampón TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio corridos a 60 voltios por 50 minutos.

3.6 MÉTODO ESTADÍSTICO

La prueba estadística utilizada fue la distribución Chi-cuadrado para evaluar la independencia entre sexo, edad y aptitud con la presencia del parásito en el Valle del Cauca.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MÉTODO COPROLÓGICO

De la evaluación de las 112 muestras de heces equinas se encontraron 19 animales positivos (16.96%) a *Anoplocephala perfoliata* mediante esta técnica. Tabla 4.

Estudios anteriores realizados en la Sabana de Bogotá reportaron prevalencias del 60% (Mateus, 1976). Posteriormente para los municipios de Manizales, Villamaría, Chinchiná y Palestina obtuvieron prevalencias del 13.97% (Aristizábal, 1981). En un estudio realizado en Medellín, se encontró presencia de *Anoplocephala sp* en un 22.2% (Cardona, 2005). En el departamento de Caldas se evaluaron 135 équidos encontrándose un 31.7% de animales positivos para el parásito (Benavides *et al.*, 2008).

Los datos encontrados en éste estudio son similares a los obtenidos por Aristizábal (1981) e inferiores a los de Cardona (2005) y (Benavides *et al.*, 2008).

La técnica coprológica basada en la visualización de huevos de *Anoplocephala perfoliata*, en la excreta es fácil y económica, no requiere equipos costosos ni reactivos, sin embargo, como ha sido reportado por Proudman y Edwards (1992); (Matthews *et al.*, 2004) no es lo suficientemente sensible debido al tiempo que transcurre desde que el caballo ingiere la forma infectiva (ácaro con cisticercoide

en su interior) hasta que es posible detectar los huevos en el examen coprológico. Además el desprendimiento de proglótidos es intermitente y la ruptura de los mismos en la materia fecal lleva a una distribución heterogénea de los huevos en la muestra, razón por la cual pueden no observarse los huevos conduciendo a un diagnóstico negativo, se menciona que el caballo debe tener más de 200 tenias para hacer el diagnóstico por la técnica coprológica Proudman y Edwards 1992. Además requiere mucho tiempo, entre 15 y 30 minutos por muestra y se observan muchas partículas fibrosas.

La Sensibilidad y Especificidad para la prueba coprológica fue:

$$S = \frac{23}{23+13} * 100 = 63.88\% \qquad E = \frac{103}{103+9} * 100 = 91.9\%$$

Proudman y Edwards , 1992 encontraron 61% y 98% respectivamente en el análisis de 80 muestras de equinos usando la técnica de centrifugación /flotación.

4.2 MÉTODO MOLECULAR

Se evaluaron 112 muestras de heces fecales equinas, para obtener ADN de la excreta se utilizó el método descrito por Menghi *et al.*, 2006.

La presencia del parásito en los animales muestreados fue del 20.53%, (23 positivos moleculares sobre el total de la población evaluada). Datos que contrastan con los encontrados por Traversa *et al.*, 2008, quien en un estudio realizado en Teramo Italia, encontró 62% positivos al parásito por PCR. La sensibilidad y especificidad de esta técnica se consideró con las siguientes fórmulas:

$$S = \frac{23}{23 + 0} * 100 = 100\%$$

$$E = \frac{89}{89 + 0} * 100 = 100\%$$

Para comprobar estos resultados de sensibilidad y especificidad por esta técnica, los animales positivos tendrían que ser sacrificados para realizar el conteo de tenias en la necropsia. De los 23 animales positivos, seis (6) tuvieron antecedentes de cólico, es decir el 26%.

Esta técnica permite detectar *Anoplocephala perfoliata* por su especificidad pues sólo amplifica ADN de la tenia

En particular, la especificidad del juego de cebadores AP-ITS-2-3F/AP-ITS-2-2R, previamente evaluadas por Drogemuller et al. (2004) en la amplificación de diagnóstico de *A. perfoliata*, y el alto rigor de los protocolos moleculares puede llevar a considerar la PCR anidada, el más eficaz enfoque para el diagnóstico de la infección en *A. perfoliata* en caballos. Todos los amplificadores positivos en la PCR dieron el tamaño esperado de 250 pares de bases. (Drogemuller *et al* 2004)

4.3 COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA COPROLÓGICA Y MOLECULAR

Con la técnica coprológica se detectó 16.96% de animales positivos al parásito y con la molecular 20.53%. De los 23 positivos, solo 10 fueron detectados con el método coprológico, por lo tanto con este método hubo 9 falsos positivos y 10 falsos negativos (Tabla 4)

Estos 9 falsos positivos pueden ser atribuidos a que se hayan observado huevos de otros parásitos como *Anoplocephala magna* o *Moniezia sp* por la similitud entre ellos (Meana, 2007)

Tabla 4. Resultados Obtenidos de Presencia de la *Anoplocephala perfoliata*

MUNICIPIO	EVALUADOS	POSITIVOS COPROLÓGICOS	POSITIVOS MOLECULAR	POSITIVOS AL TIEMPO COPROLÓGICO Y MOLECULAR	POSITIVOS COPROLÓGICOS NEGATIVOS MOLECULAR	POSITIVOS MOLECULAR NEGATIVOS COPROLÓGICOS	%
Sevilla	17	5	5	3	2	2	29.41
Dagua	15	3	0	0	3	0	0
Palmira	21	1	2	1	0	1	9.52
Florida	9	5	3	1	4	2	33.33
Candelaria	18	0	2	0	0	2	11.11
El Cerrito	12	1	5	1	0	4	41.66
Jamundí	20	4	6	4	0	2	30
Total	112	19	23	10	9	13	
%	100	16.96	20.53	43.47	39.13	56.52	

La prevalencia para el Municipio de Sevilla fue del (29.41%) con ambos métodos. Para el Municipio de Dagua fue de 20% por el método coprológico y 0% respectivamente (Tabla 4). Resultados que evidencian la dificultad para comprobar correctamente los huevos del parásito cuando se usa la técnica de sedimentación / flotación, debido a la diversidad de formas de los huevos y a que pueden ser éstos fácilmente confundidos con otras estructuras presentes en las heces.

En el Municipio de Palmira se diagnosticó 4.76% animales parasitados con *Anoplocephala perfoliata* con el análisis coprológico y mediante la técnica molecular 9.52% positivos.

En el Municipio de Florida se encontró 55.5. % con el método coprológico y 33.33% con la técnica molecular. Estos resultados pueden atribuirse al pequeño tamaño de muestra.

En Candelaria 0% coprológico y 11.11% molecular. En Cerrito 8.33 % y 41.66% respectivamente, al igual que en Jamundí 20% y 30%

De los positivos molecularmente el 4.34% fueron animales menores de tres (3) años, el 65.21% entre 3 y 10 años y el 30.43% animales mayores de 10 años. Para la variable sexo, el 52.18% fueron hembras y el 47.82% machos.

Respecto a aptitud el 39.13% fueron animales de silla, 47.83% animales dedicados al trabajo y 13.04% hembras receptoras que permanecen en pastoreo o que son alimentados con pastos de corte.

Respecto a manejo, de los animales positivos molecularmente el 39.13% permanecen estabulados y el 60.87% están en pastoreo donde tienen mayor oportunidad de ingerir los ácaros portadores de los cisticercos de la tenia.

En la Figura 5 y 6, se presentan amplificados en geles de agarosa al 1.2%. donde se observan ejemplos de diagnósticos positivos por PCR anidada

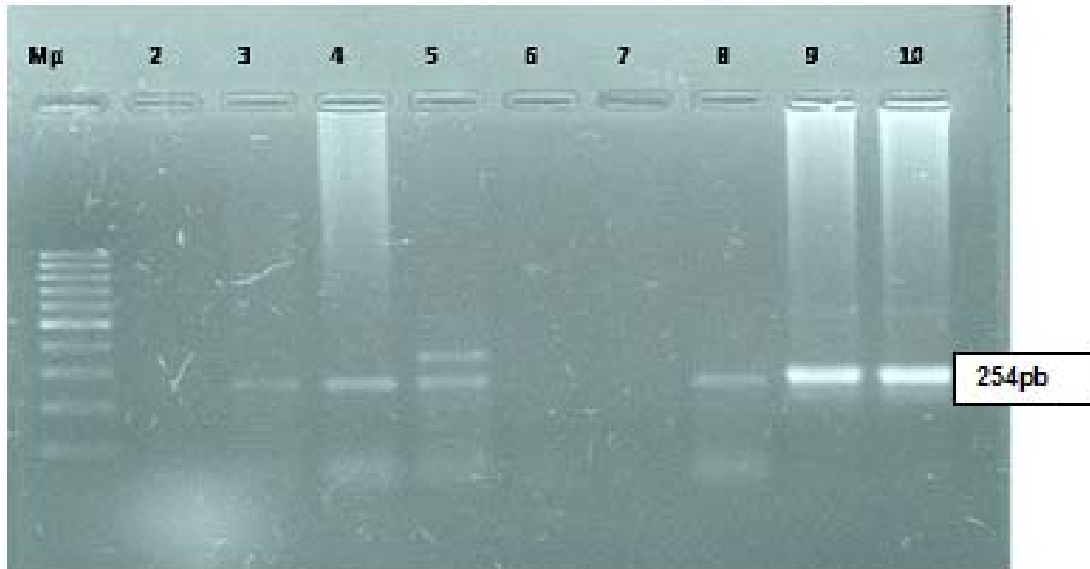


Figura 5. PCR muestras Florida y Villagorgona. Carril 1 Mp. Carril 2 Control negativo, Carril 3 Equino N°1 Florida, Carril 4 equino N°2 Florida, carril 5 equino N°3 Florida; carril 6,7,8, equinos 1,2,3 de Villagorgona, carril 9 y 10 muestras positivas de la *A. perfoliata*.

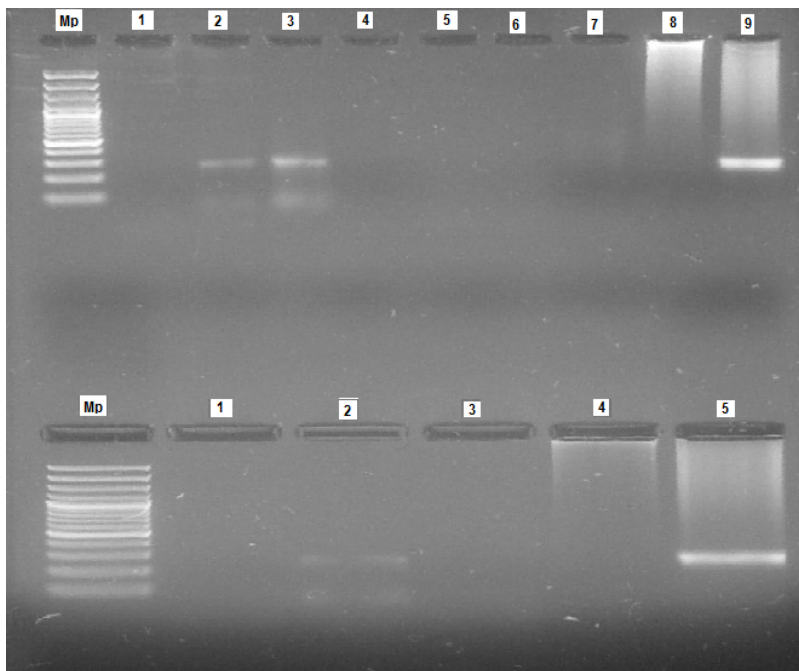


Figura 6. PCR muestras Jamundí. Parte superior: Carril 1 Mp. Carril 1 Control negativo, carriles 2 y 3 Positivos, carriles 8 y 9 muestras positivas. Parte inferior: Carril 2 diagnostico positivo, Carril 4 y 5 muestras positivas de *A. perfoliata*.

El método molecular logra resultados positivos con muestras fecales que han sido negativas con el método coprológico, con una probabilidad muy baja de resultados negativos falsos, pues es capaz de amplificar específicamente tan poco como 0.14 fg de ADN presente en la muestra Traversa *et al.*, 2004.

4.4 RELACIÓN ENTRE SEXO E INFESTACIÓN

Se consideraron los resultados de la detección molecular por su especificidad. Mediante esta prueba se encontró que no existe relación entre el sexo y la presencia de la enfermedad. $X_c^2 < X_t^2$, según se observa en la Tabla 5.

Lo cual se explica por ser el manejo, localización, alimentación similar para los dos sexos. Se encuentra que el 20.7% de las hembras y el 20.4% de los machos estuvieron parasitados.

Chi cuadrado para la independencia entre Sexo y presentación de la parasitosis

Tabla 5. Chi cuadrado para la Independencia entre Sexo y Presentación de la Parasitosis.

SEXO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
Hembra	12	46	58
Macho	11	43	54
TOTAL	23	89	112
Chi cuadrado calculado 0.000178 Chi cuadrado tabulado 3.84 con 1 GL P(0.01 < α < 0.05) No existe relación entre sexo y presentación de la parasitosis.			

Igualmente no se encontró ninguna relación entre aptitud y presencia de *Anoplocephala perfoliata*. Lo que indica que no hay preferencia del parásito hacia

una determinada aptitud de los animales. (Tabla 6).siendo el manejo el que tiene la incidencia sobre la enfermedad.

4.4 RELACIÓN ENTRE APTITUD E INFESTACIÓN

Tabla 6. Chi cuadrado para la independencia entre Aptitud y presentación de la parasitosis

APTITUD	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
Trabajo	8	53	61
Silla	11	30	41
Receptoras	4	6	10
TOTAL	23	89	112
Chi cuadrado calculado 2.2 Chi cuadrado tabulado 3.84 con 1 GL $P(0.01 < \alpha < 0.05)$ No existe relación entre aptitud y presentación de la parasitosis.			

De igual manera, en el estudio realizado para observar la relación entre la edad y la parasitosis se encontró que no existe dependencia de la segunda sobre la primera Tabla 7:

Tabla 7. Chi cuadrado para la independencia entre Edad y presentación de la parasitosis

RESULTADOS	EDAD			TOTAL
	HASTA 3 AÑOS	3 a 10	>10	
Positivos	1	15	7	23
Negativos	7	70	56	89
TOTAL	8	55	49	112
Chi cuadrado calculado 3.6 Chi cuadrado tabulado 3.84 con 1 GL $P(0.01 < \alpha < 0.05)$ No existe relación entre edad y presentación de la parasitosis.				

Considerando la edad y sexo, se encontró que el 29.41% de los positivos coprológicamente para *Anoplocephala perfoliata* en el Municipio de Sevilla eran equinos de entre 3 y 10 años, que habían sido tratados con intervalos de seis (6)

a 12 meses con vermífugos comerciales a base de Albendazole, y una hebra de 40 meses había tenido antecedentes de cólico. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cardona *et al.*, (2005) y superiores a lo obtenido por Aristizábal y López (1981), e inferiores a los encontrados por Benavides *et al.*, 2008.

De los 23 animales positivos molecularmente 6 (26%) habían tenido episodios de cólico y habían sido tratados con vermífugos comerciales entre 1 y 3 meses anterior a la realización de examen coprológico.

Los resultados indican, que el Diagnóstico Molecular por PCR anidada, representa un valioso método para la detección específica de *Anoplocephala perfoliata* en muestras fecales de caballos naturalmente infectados y tiene ventajas sobre el método coprológico, por su especificidad.

Las PCRs específicas para marcadores de diagnóstico en el ADNr demostraron ser de gran alcance para superar las limitaciones del diagnóstico coprológico. Por lo tanto, es preciso señalar que estos resultados sugieren que la PCR anidada, previamente desarrollada (Drogemuller *et al.*, 2004) para detectar y amplificar el ADN de *A. perfoliata* en muestras fecales de caballos parasitados, representa un método válido para el diagnóstico molecular específico de la infección de *A. perfoliata* a partir de muestras fecales tomadas en el campo.

El hallazgo en una muestra de PCR-positivo que ha sido negativo en el examen coprológico, sugiere menor sensibilidad del clásico enfoque coprológico. También se evidencia que la PCR anidada puede ser una herramienta útil para el seguimiento a la respuesta del tratamiento anti-céstodo en los caballos, que no sea con fines epidemiológicos, como para investigar la distribución y la prevalencia de la infección por *A. perfoliata* en équidos en varias zonas geográficas.

Sin embargo, el método cualitativo basado en la PCR que aquí se utilizó no permite una estimación de la carga parasitaria, perjudicando así la interpretación clínica del estado parasitológico del animal infectado (es decir, relación entre el número de tenias y el riesgo de cólicos) que por el momento sólo es posible con los métodos serológicos, aunque parcialmente. Desde este punto de vista, podría ser de importancia para modificar aún más este protocolo de PCR anidada, por ejemplo, mediante el desarrollo de una (semi) - PCR cuantitativa en tiempo real, que fue recientemente validada para *Strongylus vulgaris* (Nielsen *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Se detectó *Anoplocephala perfoliata* por diagnóstico de sedimentación -flotación de huevos en equinos del Valle del Cauca.

Se validaron métodos moleculares para detectar *Anoplocephala perfoliata* en materia fecal en equinos y se compararon los resultados con el método de sedimentación/flotación.

Se evaluó la relación entre sexo, aptitud para el trabajo y la infestación con *A. perfoliata*.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio, indican claramente que la técnica de PCR anidada para la detección específica de ADN de *A. perfoliata* proporciona un diagnóstico útil y es una herramienta de investigación, aunque otros estudios son necesarios para su validación definitiva, por ejemplo, mediante el aumento en el número de animales estudiados, la confirmación en la necropsia de los resultados moleculares y la evaluación cuantitativa de protocolos basados en la PCR.

RECOMENDACIONES

- Ampliar el área de muestreo en el Valle del Cauca y en Colombia.
- Realizar muestras pareadas para determinar incidencia por época
- Efectuar conteo de huevos por gramo
- Investigar sobre la Distribución de Ácaros oribátidos en el Valle del Cauca
- Realizar estudios para determinar la presencia de *Anoplocephala magna* y *Paranoplocephala mamillana* en Colombia
- Evaluar la variabilidad de *A. perfoliata*, mediante secuenciación o marcadores moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARISTIZÁBAL JF, JA LÓPEZ. 1981. Prevalencia de Nematodos y céstodos en équidos de varios municipios de Caldas. Manizalez. Tesis de graduacion, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia.Universidad de Caldas, Colombia
2. BARTLETT and STIRLING. 2003. A short History of the Polymerase Chain Reaction. *In: methods mol biol. 3-6. Vol 172 p 249-255*
3. BELAK, S. 2001. Molecular diagnosis of animal diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn. , 1, 434-444.*
4. BELLO, T., ABELL, B. S., Jill, E. 1999. Are equine tapeworms an emerging disease? A retrospective study. The Sandhill Equine Center, 635 Valley View Rd, Siuthern Pines, , Volumen 19, Number 11.
5. BENAVIDES, J. A., ARIAS, W.H.B., RUIZ, J. A. T, SÁNCHE, J. A., CUARTAS, J.A., BENAVIDES, G.A. 2008. Anaplocephala perfoliata en el Noroccidente de Colombia. *Arch. Med Vet 40 , 309-313.*
6. BUCKNELL D.G., GASSER, R.B., BEVERIDGE, I. 1995. The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. *Int J Parasitol 25, 711-724.*
7. BUCKNELL,D.G. Gassser R.B., Beveridge I.1995. The Prevalence and Epidemiology of Gastrointestinal Parasites of Horses in Victoria, Australia. Melbourne, Australia: University of Melbourne, Departament of Veterinary Sciencie. *Int J. Parasitol. Jun 25(6):711-24*

8. CAMPBELL, L. 2010. Pathological changes caused by *Anoplocephala perfoliata* in the equine ileocecal junction. *Revista de Comunicaciones de Investigación Veterinaria* . 43-52
9. CARDONA, E. C. 2005. Caracterización de nematodos gastrointestinales de equinos que llegan a la central ganadera de Medellín. *Revista Col-Cienc. Pec.* 18 , 4.
10. CASTAÑO, Z. R. 2005. Parásitos de los equinos. Red de Helminología para América Latina y el Caribe. América Latina y El Caribe.
11. COLWELL ,D.D., BARON.R.W, 1990. Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. Bovis*) (Dipteria Oestridae)using ELISA. *Medical and Veterinary Entology* 4, 35-42
12. Corporación Colombia Internacional. Oferta Agropecuaria. ENA Cifras [en línea] 2009. <http://www.cci.org.co/> (Consulta: 12 marzo, 2010)
13. COSTA, M., BROOKES, S.J.H., HENNIG, G.W., 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 (Suppl. 4), iv15–iv19.
14. DEVRAN, Z; GÖZEL, U; SÖĞÜT, M.; YILDIZ, Ş. ELEKÇİOĞLU, İ. 2002. Identification of Root-Knot Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by Using rDNA and mtDNA Markers. *Turk J Agric For. Citrus and Greenhouse Crops Research Institute. Antalya, Turkey.* 26: 337 – 341.
15. DROGEMULLER, M., BEELITZ, P., PFISTER, K., SCHNIEDER, T., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. 2004. Amplification of ribosomal DNA of *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. *Veterinary Parasitology, Volume 130, Issues 1-2, 10 June 2005, Page 175.*
16. GASSER, R. W. 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses-significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131 , 1-13.
17. HOGLUND, J. L. 1995. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Anoplocephala perfoliata in horse sera.* Retrieved

2010, from Área de Parasitología. Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA: <http://cniia.inta.gov.ar/helminto>.

18. HWANG, U. & KIM, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*. Yonsei University, College of Medicine, Department of Parasitology. Seoul, Korea. 37(4): 215-228.
19. JOUSSON, O., BARTOLI, P., PAWLOWSKI, J., 1999. Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae. (Digenea), *Int. J. Parasitol.* **29** (1999), pp. 1853–1858.
20. LEE, D.L., TATCHELL, R.J., 1964. Studies on the tapeworm *Anoplocephala perfoliata* Parasitology. Aug; 54:467-79.
21. LITTLE, S. 1999. Adult tapeworms in horses: Clinical significance. *Comp. s.c.: Pract. Vet. Volumen 21(4)*.
22. LYONS E., TOLLIVER S. y DRUDGE J. 1999. Historical perspective of cyathostoms: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*, , 85, 97-112.
23. MATEUS, G. L. 1976. Observaciones sobre parasitismo gastrointestinal en equinos de la Sabana de Bogotá y áreas vecinas. In *X CONGRESO NACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA* (pp. 162-163). Medellín, Colombia.
24. MATTHEWS, J. B. 2004. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anaplocephala perfoliata*. *Vet. Res.* **35**, 371-381.
25. MEANA, A. L. B. 1997. Reliability of coprological diagnosis of *Anaplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* **74**, 79-83.
26. MENGHI, C. I., GATTA, C. L., MAKIYA, R., MÉNDEZ, O.C. 2006. Detección molecular de *Dientamoeba fragilis* en heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. *Parasitol Latinoam* **61**: 146 – 151.
27. NIELSEN, M.K., PETERSON, D.S., MONRAD, J., THAMSBORG, S.M., OLSEN, S.N., KAPLAN, R.M., 2008. Detection and semi-quantification of *Strongylus*

- vulgaris DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 38, 443–453.
28. PAVONE, S.; VERONESI, F.; GENCHI, C.; PIERGILI F.D., BRIANTI, E.; MANDARA, M.T. 2011. Pathological changes caused by *Anoplocephala perfoliata* in the mucosa/submucosa and in the enteric nervous system of equine ileocecal junction *Veterinary Parasitology* 176 43–52
 29. PEREIRA J.R., VIANNA. S.S. 2006. Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 140, 289-295.
 30. POWERS, T. 2004. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands To Barcodes. *Annual Reviews Phytopathology*. Department of Plant Pathology, University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA. 42: 367 – 83.
 31. PROUDMAN y EDWARDS G.B., 1992. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet. Rev.* 131 , 71-72.
 32. PROUDMAN y TRESS 1996b. C.J. Proudman and A.J. Trees, Use the excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* céstodosis. *Vet. Parasitol* 61 (1996), pp. 239–247.
 33. PROUDMAN y TRESS.1996a. C.J. Proudman and A.J. Trees, Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anaplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. *Parasite Immunol.* 18 (1996), pp. 499–506.
 34. PROUDMAN, C. F. 1998. Tapeworms as infection is a significant risk factor for spasmodic colic in the horse. *Equine Vet. J.* 30 , 194-199.
 35. PROUDMAN, C. J. 1999. Tapeworm as a cause of Intestinal Disease in Horses. *Parasitology Today, Vol. 15. No. 4* .
 36. PROUDMAN, C. J. 2003. Diagnosis, Treatment, and Prevention of tapeworm-associated Colic. *Journal of Equine Veterinary Science*. Volume 23, Number 1, 6-9.
 37. SAMBROOK, J. R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ra. edición.

38. SANGIONI, L.A., VIDOTTO, O., LUZ, B., BONEZI, G.L. 2000. Study of the Prevalence and characteristics of anatomohistopatologic lesions associated with *Anoplocephala perfoliata* (GOEZE, 1782) in abated equines from a refrigerated slaughter house in Apucarana - PR. *Rev Brás Parasitol Vet* 9, 129-133.
39. SEITZINGER, A. H.D. 2001. A comparison of the economic costs of equine lameness, colic, and equine protozoal Myleencephalitis (EPM). *Centers for Epidemiology and Animal Health* .
40. SKOTAREK, S. L., COLWELL, D. D., GOATER, C. P. 2010. Evaluation of diagnosis techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*. 172, 249-255
41. SLIVINSKA, K. D. 2006. Helminth fauna of sympatric Przewalski's Equus przewalskii Poljakov, 1881 and domestic horses E. caballus L, in the Chernobyl exclusion zone. *Department of & Ecology, Agricultural University of Wroclaw, ul. Kozuchowska 5b, 51-630 Wroclaw, Poland* , 51-630.
42. SLOCOMBE, J. O. 2007. Clinical trials of efficacy of praziquantel horse paste 9% against tapeworms and its safety in horses. *Vet. Parasitol* 144 , 366-370.
43. SOULSBY, E.J.L. 1968. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 6th ed., "Mönnig's Veterinary Helminthology & Entomology", Baillière, Tindal and Cassel Ltd., London. England. London. England.
44. SUBBOTIN, S. A.; MADANI, M.; KRALL, E.; STURHAN, D. & MOENS, M. 2005. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology*. 95:1308-1315.
45. TRAVERSA, D. F. 2008. A comparasion of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anaplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). *Veterinary Parasitology* 152 , 271-277.

46. TRAVERSA, D. G. 2004. Semi-nested PCR for the specific detection of *Habronema microstoma* or *Habronema muscae* DNA in horse faeces. *Parasitology* 129, 733--773.
47. URQUHART, G. M. 2001. *Parasitologia Veterinaria*. s. c.: Acribia. páginas 147-148.
48. WANG, X.; BOSSELUT, N.; CASTAGNONE, C.; VOISIN, R.; ABAD, P. & ESMENJAUD, D. 2003. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. *Phytopathology* 93:160-166.
49. WHITE, N. A. 1990. *In the Equine Acute Abdomen*. White, N. a., ed. Página 50-64.
50. WILLIAMSON, R. M., GASSER, R. B., MIDDLETON, D., BEVERIDGE, I. 1997. The distribution of *Anoplocephala perfoliata* in the intestine of the horse and associated pathological changes. *Veterinary Parasitology* 73, 225-241.
51. WISHART, J.; PHILLIPS, M. S.; BLOK, V. C. 2002. Ribosomal Intergenic Spacer: A Polymerase Chain Reaction Diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Nematology*. Scottish Crop Research Institute. Invergowrie, United Kingdom. 92 (8): 884 – 892.

ANEXOS

ANEXO 1.

Tabla 8. Formulario de Registro de Información

Ficha Técnica

FECHA			
HACIENDA:		m.s.n.m.:	
Animal Número:			
Color:		Sexo:	
Peso:		Edad:	
Equino ()	Anal()	Mular ()	
Silla ()	trabajo ()	Mixto ()	
Estabulación ()	Pastoreo ()	Mixto ()	
Alimentación			
Pasto ()	Nombre pasto:	Concentrado:	Mixto ()
Última vermifugación:			
Realiza coprológicos si ()	no()		
Cómo escoge el antihelmíntico:			
Nombre			
Consejo Veterinario			
Precio			
Clase de fármaco			
Opinión popular			
¿Rota la droga empleada? Si ()	No ()		
Resultado coprológico:		Molecular:	

ANEXO 2.

Tabla 9. Presupuesto para 96 Muestras

Actividad	Valor unitario	Cantidad	Total
Extracción de ADN (Fenol, Cloroformo, Tris, NaCl, Etanol, ácido bórico, EDTA)	10000	96	960000
Reacciones de PCR (Taq, DNTPs, cebadores)	12000	96	1152000
Visualización en geles de agarosa	2000	96	192000
Uso de termociclador y costo de energía	*400	96	38400
Costos de personal	**10000	12	120000
TOTAL			2462400
* \$5000 pesos la hora uso			
** 10.000 pesos hora			

ANEXO 3

Cuadro No. 1.

INVENTARIO EQUINO, ASNAL Y MULAR POR DEPARTAMENTO. AÑO 2010									
		Equinos			Asnos			Mular	
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Total
Departamentos	Número de cabezas								
Total nacional	886.624	1.239.484	2.126.109	69.604	102.194	171.798	152.006	158.304	310.310
Antioquia	84.892	96.500	181.392	2.319	4.713	7.032	38.381	34.465	72.845
Atlántico	3.024	4.393	7.417	549	885	1.435	634	679	1.313
Bolívar	19.740	24.323	44.064	4.282	9.462	13.744	6.715	9.024	15.739
Boyacá	13.558	17.467	31.025	553	985	1.538	2.287	1.447	3.734
Caldas	11.135	15.065	26.200	798	287	1.085	2.266	4.783	7.048
Casanare	89.069	114.578	203.648	332	2.791	3.123	2.680	2.161	4.840
Cauca	12.058	27.723	39.781	73	87	160	741	1.363	2.104
Cesar	37.870	45.133	83.003	3.179	7.719	10.898	10.250	12.962	23.212
Córdoba	101.285	171.542	272.827	5.383	16.384	21.767	8.853	13.359	22.212
Cundinamarca	26.435	35.763	62.198	1.026	2.788	3.814	4.635	4.036	8.671
Huila	11.235	21.386	32.621	40	903	943	1.367	1.833	3.200
La Guajira	14.251	10.737	24.988	20.280	14.242	34.522	2.898	2.039	4.938
Magdalena	19.307	27.268	46.575	5.552	10.053	15.606	9.980	11.852	21.832
Meta	45.662	76.675	122.338	135	134	269	2.411	1.844	4.255
Nariño	3.105	11.872	14.977	15	16	31	162	140	302
Norte de Santander	11.562	18.070	29.632	392	1.731	2.123	8.574	10.310	18.884

Quindío	1.264	2.087	3.351	0	15	15	113	-	113
Risaralda	2.120	3.739	5.859	17	34	51	1.481	1.001	2.482
Santander	25.726	39.343	65.069	1.657	1.625	3.282	16.469	10.225	26.694
Sucre	19.129	30.232	49.360	3.528	7.563	11.091	3.062	4.089	7.151
Tolima	22.819	25.249	48.068	405	1.239	1.644	4.962	3.999	8.962
Valle del Cauca	14.817	17.807	32.625	39	227	265	2.469	1.069	3.538
Otros departamentos	296.561	402.530	699.091	19.048	18.310	37.358	20.616	25.626	46.241

Fuente: Encuesta Nacional Agropecuaria 2010. MADR- DANE-CCI

Cuadro No. 2

Inventario equino, asnal y mular años 2009 – 2010

Especie	Año 2010	Año 2009*
Equinos	2.126.109	2.505.579
Asnal	171.798	220.846
Mular	310.310	432.977

Fuente: Encuesta Nacional Agropecuaria 2010. MADR- DANE-CCI.

*Fuente: Encuesta Nacional Agropecuaria 2009. CCI – MADR

Dionisio Ortiz Herrera

Profesional Oferta Agropecuaria
Corporación Colombia Internacional-CCI
Calle 16 No 6-66 piso 7
Tel: 3443111 Ext: 283 Cel: 3123516065
Bogotá D. C. Colombia
lediaz@cci.org.co

ANEXO 4. Evidencias de las 112 Muestras

Tabla 10. Datos Generales de las 112 Muestras

N	FECHA	LOCALIZACION	IDENTIFICACION	PROPIETARIO	FINCA	PESO/KG
1	4-Dicb-2009	Sevilla	E1	Jairo Maya	El Rancho	304
2	4-Dicb-2009	Sevilla	E2	Jairo Maya	El Rancho	345
3	4-Dicb-2009	Sevilla	E3	Jairo Maya	El Rancho	345
4	4-Dicb-2009	Sevilla	E4	Jairo Maya	El Rancho	286
5	4-Dicb-2009	Sevilla	E5	Jairo Maya	El Rancho	304
6	4-Dicb-2009	Sevilla	E6	Jairo Maya	El Rancho	345
7	4-Dicb-2009	Sevilla	E7	Jair Zapata	Inv. Zapata	304
8	5- Dicb-2009	Sevilla	E8	Ferney Vallejo	El Carmen	347
9	5- Dicb-2009	Sevilla	E9	Ferney Vallejo	El Carmen	304
10	5- Dicb-2009	Sevilla	E10	Dario Zapata	El Carmen	345
11	5- Dicb-2009	Sevilla	E11	Ferney Vallejo	El Carmen	305
12	5- Dicb-2009	Sevilla	E12	Federico Zapata	San José	328
13	Junio 15-2010	Km 28	E1	Paz Animal	Paz Animal	270
14	Junio 15-2010	Km 28	E2	Paz Animal	Paz Animal	279
15	Junio 15-2010	Km 28	E3	Paz Animal	Paz Animal	305
16	Junio 15-2010	Km 28	E4	Paz Animal	Paz Animal	310
17	Junio 15-2010	Km 28	E5	Paz Animal	Paz Animal	330
18	Junio 15-2010	Km 28	E6	Paz Animal	Paz Animal	304
19	Junio 15-2010	Km 28	E7	Paz Animal	Paz Animal	304
20	Junio 15-2010	Km 28	E8	Paz Animal	Paz Animal	347
21	Junio 15-2010	Km 28	E9	Paz Animal	Paz Animal	270
22	Junio 15-2010	Km 28	E10	Paz Animal	Paz Animal	345
23	Junio 15-2010	Km 28	E11	Paz Animal	Paz Animal	346
24	Junio 15-2010	Km 28	E12	Paz Animal	Paz Animal	360
25	Junio 15-2010	Km 28	E13	Paz Animal	Paz Animal	328
26	Junio 15-2010	Km 28	E14	Paz Animal	Paz Animal	355
27	Junio 15-2010	Km 28	E15	Paz Animal	Paz Animal	308
28	Agosto 12-2010	Palmira	E1	Varios	La Medalla	345
29	Agosto 12-2010	Palmira	E2	Varios	La Medalla	150
30	Agosto 12-2010	Palmira	E3	Varios	La Medalla	340
31	Agosto 12-2010	Palmira	E4	Varios	La Medalla	268
32	Agosto 12-2010	Palmira	E5	Varios	La Medalla	350
33	Agosto 12-2010	Palmira	E6	Varios	La Medalla	304
34	Agosto 12-2010	Palmira	E7	Varios	La Medalla	350
35	Agosto 12-2010	Palmira	E8	Varios	La Medalla	300
36	Octubre 10-2010	Tarragona	E1	Francisca Palacios	Vega del rio	200
37	Octubre 10-2010	Tarragona	E2	Graciano Palacios	Vega del rio	232
38	Octubre 10-2010	Tarragona	E3	Julio Escobar	Vega del rio	310
39	Octubre 10-2010	Tarragona	E4	Alexander Palacio	Vega del rio	310
40	Octubre 10-2010	Tarragona	E5	Robinson Ortiz	Vega del rio	270
41	Noviembre 25/2010	Florida	E1	Jairo Soto	Rancho Alegre	200
42	Noviembre 25/2010	Florida	E2	Jairo Soto	Rancho Alegre	360
43	Noviembre 25/2010	Florida	E3	Jairo Soto	Rancho Alegre	280
44	Noviembre 25/2010	Florida	E4	Jairo Soto	Rancho Alegre	290
45	Noviembre 20/2010	Villagorgona	E1	José A. Narváez	Orilla de carretera central	270

N	FECHA	LOCALIZACION	IDENTIFICACION	PROPIETARIO	FINCA	PESO/KG
46	Noviembre 20/2010	Villagorgona	E2	Fabio López	Orilla de carretera central	310
47	Noviembre 20/2010	Villagorgona	E3	Jorge Escobar	Orilla de carretera central	340
48	Enero 17/2011	El Paraíso	E1	Freddy Rojas	cerca Paraíso	250
48	Enero 17/2011	El Paraíso	E1	Freddy Rojas	cerca Paraíso	250
49	Enero 17/2011	El Paraíso	E2	Freddy Rojas	cerca Paraíso	230
50	Enero 17/2011	El Paraíso	E3	Esmeralda Timaná	cerca Paraíso	325
51	Enero 17/2011	El Paraíso	E4	Jaime Rojas	cerca Paraíso	325
52	Enero 17/2011	El Paraíso	E5	Aristarco Tilman	cerca Paraíso	310
53	Enero 17/2011	El Paraíso	E6	Aristarco Tilman	cerca Paraíso	390
54	Enero 17/2011	El Paraíso	E7	Luz Edith Rojas	cerca Paraíso	236
55	Enero 17/2011	El Paraíso	E8	Luz Edith Rojas	cerca Paraíso	325
56	Enero 17/2011	El Paraíso	E9	Anderson Jiménez	cerca Paraíso	304
57	Enero 17/2011	El Paraíso	E10	Anderson Jiménez	cerca Paraíso	310
58	Enero 17/2011	El Paraíso	E11	Doris Caicedo	cerca Paraíso	288
59	Enero 17/2011	El Paraíso	E12	Doris Caicedo	cerca Paraíso	200 kg
60	febrero 24/2011	Sevilla	E1	Jaime Restrepo	El Portal	320
61	febrero 24/2011	Sevilla	E2	Ovidio Delgado G.	El Portal	270
62	febrero 24/2011	Sevilla	E3	Alberto Lema	El Portal	220
63	febrero 24/2011	Sevilla	E4	Ovidio Delgado G.	El Portal	280
64	febrero 24/2011	Sevilla	E5	Jorge Cadena	El Portal	320
65	Mayo 26/2011	Villagorgona	E1	Hugo Pantoja	Los Cábulos	323
66	Mayo 26/2011	Villagorgona	E2	Hugo Pantoja	Los Cábulos	325
67	Mayo 26/2011	Villagorgona	E3	Hugo Pantoja	Los Cábulos	350
68	Mayo 26/2011	Villagorgona	E4	Hugo Pantoja	Los Cábulos	320
69	Mayo 26/2011	Villagorgona	E5	Hugo Pantoja	Los Cábulos	110
70	Mayo 26/2011	Villagorgona	E6	Hugo Pantoja	Los Cábulos	304
71	Mayo 26/2011	Villagorgona	E7	Hugo Pantoja	Los Cábulos	304
72	Mayo 26/2011	Villagorgona	E8	Hugo Pantoja	Los Cábulos	300
73	Mayo 26/2011	Villagorgona	E9	Hugo Pantoja	Los Cábulos	320
74	Mayo 26/2011	Villagorgona	E10	Hugo Pantoja	Los Cábulos	340
75	Mayo 26/2011	Villagorgona	E11	Hugo Pantoja	Los Cábulos	290
76	Mayo 26/2011	Villagorgona	E12	Hugo Pantoja	Los Cábulos	345
77	Mayo 26/2011	Villagorgona	E13	Hugo Pantoja	Los Cábulos	300
78	Mayo 26/2011	Villagorgona	E14	Hugo Pantoja	Los Cábulos	280
79	Mayo 26/2011	Villagorgona	E15	Hugo Pantoja	Los Cábulos	345
80	Junio 9/2011	Jamundí	E1	William Ospina	Criadero Las Vegas	470
81	Junio 9/2011	Jamundí	E2	William Ospina	Criadero Las Vegas	461
82	Junio 9/2011	Jamundí	E3	William Ospina	Criadero Las Vegas	450
83	Junio 9/2011	Jamundí	E4	William Ospina	Criadero Las Vegas	440
84	Junio 9/2011	Jamundí	E5	William Ospina	Criadero Las Vegas	436
85	Junio 9/2011	Jamundí	E6	William Ospina	Criadero Las Vegas	390
86	Junio 9/2011	Jamundí	E7	William Ospina	Criadero Las Vegas	368
87	Junio 9/2011	Jamundí	E8	William Ospina	Criadero Las Vegas	368
88	Junio 9/2011	Jamundí	E9	William Ospina	Criadero Las Vegas	173
89	Junio 18/2011	Jamundí	E1	La Berraquera		304
90	Junio 18/2011	Jamundí	E2	La Berraquera		345
91	Junio 18/2011	Jamundí	E3	La Berraquera		280
92	Junio 18/2011	Jamundí	E4	La Berraquera		340
93	Junio 18/2011	Jamundí	E5	La Berraquera		390
94	Junio 18/2011	Jamundí	E6	La Berraquera		330
95	Junio 18/2011	Jamundí	E7	La Berraquera		360
96	Junio 18/2011	Jamundí	E8	La Berraquera		390
97	Junio 18/2011	Jamundí	E9	La Berraquera		410
98	Junio 18/2011	Jamundí	E10	La Berraquera		350
99	Junio 18/2011	Jamundí	E11	La Berraquera		260
100	Septiembre 6/2011	Palmira	E1	Dr. Giovani Herrera	CEI Had Santa Bárbara	370
101	Septiembre 6/2011	Palmira	E2	Dr. Giovani Herrera	CEI Had Santa Bárbara	320
102	Septiembre 6/2011	Palmira	E3	Dr. Giovani Herrera	CEI Had Santa Bárbara	320
103	Septiembre 6/2011	Palmira	E4	Dr. Giovani Herrera	CEI Had Santa Bárbara	368

N	FECHA	LOCALIZACION	IDENTIFICACION	PROPIETARIO	FINCA	PESO/KG
104	Septiembre 6/2011	Palmira	E5	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	368
105	Septiembre 6/2011	Palmira	E6	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	40
106	Septiembre 6/2011	Palmira	E7	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	330
107	Septiembre 6/2011	Palmira	E8	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	380
108	Septiembre 6/2011	Palmira	E9	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	345
109	Septiembre 6/2011	Palmira	E10	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	280
110	Septiembre 6/2011	Palmira	E11	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	370
111	Septiembre 6/2011	Palmira	E12	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	325
112	Septiembre 6/2011	Palmira	E13	Dr. Giovanni Herrera	CEI Had Santa Bárbara	350

Tabla 11. Datos Específicos de las 112 Muestras

N	SEXO	EDAD	COLOR	TIPO DE EQUIDO	APTITUD	MANEJO	ALIMENTACION
1	Macho	48 meses	Moro	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
2	Hembra	8 años	Moro	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
3	Hembra	12 años	Zaino	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
4	Hembra	40 meses	Cervuno	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
5	Macho	12 años	Castaño Oscuro	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
6	Macho	8 años	Blanco	Equino	Trabajo	Estabulado	Mixto
7	Hembra	5 años	Cervuno	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
8	Hembra	16 años	Alazán	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
9	Hembra	7 años	Moro	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
10	Macho	4.5 años	Zaino	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
11	Hembra	7 años	Castaño	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
12	Mecho	4 años	Castaño	Equino	Silla	Estabulado	Mixto
13	macho	14 años	Castaño	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
14	hembra	4 años	Bayo	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
15	macho	20 años	Blanco	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
16	Macho	12 años	Bayo	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
17	Macho	9 años	Castaño	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
18	Hembra	8 años	Alazán	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
19	hembra	12 años	zaino	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
20	macho	8 años	Blanco	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
21	Macho	18 años	Castaño	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
22	Hembra	17 años	Mora	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
23	hembra	18 años	Castaño	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
24	macho	10 años	Moro	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
25	hembra	18 años	blanco	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
26	hembra	18 años	Castaño	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
27	hembra	12 años	Alazán	Equino	Trabajo	Pastoreo	pastoreo
28	Hembra	11 años	Alazán	Equino	Silla	Pesebrera	Caña, king gras, concentrado
29	Macho	7 meses	Alazán	Muleto	Cerrero	Pesebrera	Caña, king gras, concentrado
30	Macho	11 años	Castaño	Equino	Silla	Pesebrera	Caña, king gras, concentrado
31	macho	28 meses	Alazán claro	Equino	Silla	Pesebrera	Caña, king gras, campeón dorado
32	Macho	8 años	Alazán	Equino	Silla	Pesebrera	Caña, king gras, Equinon
33	Hembra	7 años	Bayo	Equino	Silla	Pesebrera	Caña, king gras, campeón dorado
34	Macho	15 años	Castaño	Equino	Silla	Pastoreo	Estrella, grama
35	Hembra	7 años	Mora	Equino	Silla	Pastoreo	concentrado de lactancia
36	Hembra	2 años	moro	Equino	Cerrero	mogolla, miel, pasto de corte	
37	Hembra	20 años	Castaño	Equino	trabajo	mogolla, miel, pasto de corte	
38	Macho	8 años	Zaino	Equino	trabajo	Salvado, mogolla, miel, elefante	
39	Macho	7 años	Castaño	Equino	trabajo	Salvado, mogolla, miel, elefante	
40	Macho	13 años	Moro	Equino	trabajo	Salvado, mogolla, miel, elefante	
41	Macho	2 años	Alazán	Equino	Silla	King grass, cana picada, cana de maiz	
42	Macho	6 años	Castaño	Equino	Silla		
43	Hembra	4 años	Cervuno	Equino	Silla		
44	Hembra	10 años	Cervuno	Equino	Silla		

N	SEXO	EDAD	COLOR	TIPO DE EQUIDO	APTITUD	MANEJO	ALIMENTACION
45	Macho	12 años	Castaño	Equino	Carretilla		
46	Macho	8 años	Castaño	Equino	Carretilla		Cana picada, mogolla, equinon, miel
47	Macho	12 años	Castaño	Equino	Carretilla		
48	Hembra	8 años	Castaño	Equino	trabajo		
48	hembra	8 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
49	hembra	7 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
50	hembra	10 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
51	hembra	8 años	Moro	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
52	Macho	20 años	Blanco	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
53	Hembra	12 años	zaino	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
54	Hembra	13 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
55	Macho	13 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
56	macho	9 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
57	Hembra	10 años	Castaño	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
58	Hembra	12 años	Alazán tostado	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
59	Macho	7 años	Alazán	Equino	trabajo		Mogolla, cana picada ,pasto de corte,
60	Hembra	4 años	Castaño	Equino	Silla		Concentrado campeón , pasto kingras
61	Hembra	20 años	Castaño	Equino	Silla		Concentrado campeón , pasto kingras
62	Hembra	2 años	Castaño	Equino	Proceso de amansamiento		Concentrado campeón , pasto kingras
63	Hembra	12 años	Bayo	Equino	Silla		Concentrado campeón , pasto kingras
64	Macho	7 años	Castaño	Equino	Silla		Concentrado campeón , pasto kingras
65	Macho	7 años	Castaño	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
66	Macho	8 años	Naranjuelo	Equino	Silla		King gras, concent Ekinon 15
67	macho	14 anos	Cervuno	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
68	macho	13 anos	Castaño	Equino	Silla		Salvado de maiz, ekinon
69	macho	12 meses	Castaño	Equino	Silla		Forraje king gras y salvado
70	Hembra	12 anos	Bayo	Equino	Silla		Forraje y ekinon 15
71	Hembra	17 anos	Castaño	Equino	Silla		Forraje y ekinon 15
72	Hembra	7 anos	zaino	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
73	macho	8 anos	Castaño	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
74	macho	8 anos	Zaino	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
75	Macho	2 anos	Castaño	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
76	Hembra	8 anos	Castaño	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
77	Hembra	7 anos	zaino	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
78	macho	8 anos	rosillo	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
79	Hembra	9 anos	Castaño	Equino	Silla		King gras, concent Pura Sangre
80	Macho	10 años	Castaño	Equino	trabajo		Pastp morado y Estrella
81	Hembra	14 años	Blanca	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
82	Hembra	8 años	Castaño	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
83	Hembra	10 años	Alazán	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
84	Hembra	10 años	Mora	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
85	Hembra	7 años	Alazán	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
86	Hembra	9 años	Apalouza	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
87	Hembra	8 años	Isabela	Equino	Receptora		Pastp morado y Estrella
88	Macho	16 años	Moro	Burro	Reproductor		Pastp morado y Estrella
89	Macho	7 años	Castaño	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
90	Macho	9	zaino	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
91	Macho	9	Alazán	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
92	Macho	5	Castaño	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
93	hembra	10	Castaño	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
94	Macho	20	Castaño	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
95	Macho	19	zaino	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
96	Macho	19	Castaño	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
97	Macho	11	Castaño	equino	pesebrera		campeon dorado, alfalfa, avena heno
98	Macho	7	alazán tosta	equino			campeon dorado, alfalfa, avena heno
99	hembra	13	Castaño	equino	trabajo carga pasto		pastoreo
100	hembra	6	Alazán	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
101	Macho	12	Castaño	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
102	hembra	12	Blanca	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana

N	SEXO	EDAD	COLOR	TIPO DE EQUIDO	APTITUD	MANEJO	ALIMENTACION
103	Macho	11	Castaño	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
104	hembra	7	Castaño	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
105	hembra	1 mes	Negro	equino			Concentrado, mogolla, cogollo de cana
106	Macho	7	Castaño	equino	Reproductor		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
107	hembra	8	Castaño	equino	Silla		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
108	hembra	17	Alazán	equino	Silla		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
109	hembra	12	pinto	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
110	Macho	9	moro	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
111	hembra	5	Castaño	equino	Equinoterapia		Concentrado, mogolla, cogollo de cana
112	hembra	11	Alazán	equino	Silla		Concentrado, mogolla, cogollo de cana

Tabla 12. Resultado de las 112 Muestras

N	ULTIMA VERMIFUGACION	ANTECEDENTES DE COLICO	CONDICION DEL ANIMAL	RESULTADO COPROLOGICO PARA ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA	RESULTADO MOLECULAR
1	Novbr/2009	no	Entero	Negativo	Positivo
2	Novbr/2009	no		Negativo	Negativo
3	Novbr/2009	no		Negativo	Negativo
4	Novbr/2009	si		Positivo	Positivo
5	Novbr/2009	no	Entero	Positivo	Positivo
6	Novbr/2009	no	Castrado	Negativo	Negativo
7	Sin vermifugar	no		Negativo	Negativo
8	Junio 2009	no		Negativo	Negativo
9	Junio 2009	no		Negativo	Negativo
10	Novbr/2009	no	Entero	Positivo	Positivo
11	5- Dicb-2009	no		Negativo	Negativo
12	Novbr/2009	no	Entero	Negativo	Negativo
13	no saben	no se sabe	castrado	Negativo	Negativo
14	no saben	no se sabe		Positivo	Negativo
15	no saben	no se sabe	castrado	Negativo	Negativo
16	no saben	no se sabe	castrado	Positivo-Javier Negativo	Negativo
17	no saben	no se sabe	castrado	Negativo	Negativo
18	no saben	no se sabe		Negativo	Negativo
19	no saben	no se sabe		Negativo	Negativo
20	no saben	no se sabe	castrado	Positivo-Javier Negativo	Negativo
21	no saben	no se sabe	castrado	Positivo	Negativo
22	no saben	no se sabe		Negativo	Negativo
23	no saben	no se sabe		Negativo	Negativo
24	no saben	no se sabe	castrado	Negativo	Negativo
25	no saben	no se sabe		Negativo	Negativo
26	no saben	no se sabe		Negativo	Negativo
27	no saben	no se sabe		Positivo	Negativo
28	Mayo/2010	no		Negativo	Negativo
29	sin vermifugar	no	Entero	Negativo	Negativo
30	Mayo/2010	no	Entero	Negativo	Negativo
31	Mayo/2010	no	Entero	Negativo	Negativo
32	Mayo/2010	no	Castrado	Negativo	Negativo
33	Mayo/2010	si		Ooquistes de Coccidias	Positivo
34	Mayo/2010	no	Castrado	Negativo	Negativo
35	Mayo/2010	no		Negativo	Negativo
36	ninguna	no		Positivo	Negativo
37	ninguna	no	caquetico	Positivo	Negativo

N	ULTIMA VERMIFUGACION	ANTECEDENTES DE COLICO	CONDICION DEL ANIMAL	RESULTADO COPROLOGICO PARA ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA	RESULTADO MOLECULAR
38	ninguna	no	Arenero	Positivo	Negativo
39	ninguna	no	Entero	Positivo	Negativo
40	A veces	no	Entero	Negativo	Negativo
41	Ninguna	no	Entero-Verrugas	Negativo	negativo
42	Ninguna	no	Entero	Positivo	Positivo
43	Ninguna	si		Negativo	Positivo
44	Ninguna	no		Negativo	Positivo
45	Junio/2010	no	Entero	negativo	negativo
46	ninguna	no	Entero	negativo	negativo
47	Junio/2010	si	Entero	negativo	Positivo
48	ninguna	no sabe		Negativo	negativo
48	Septiembre	no		negativo	
49	Septiembre	no		negativo-Esytromgilos	negativo
50	Septiembre	no		negativo	Positivo
51	ninguna	no		negativo	negativo
52	a veces	no	Castrad;	negativo	Positivo
53	a veces	no		negativo-Esytromgilos	negativo
54	a veces	no		negativo	negativo
55	a veces	no	Castrad;	negativo-Esytromgilos	Positivo
56	a veces	no		negativo	negativo
57	a veces	no		positivo	Positivo
58	a veces	no		negativo-Esytromgilos	negativo
59	a veces	no	Castrad;	negativo-Esytromgilos	Positivo
60	Octubre	no		Negativo	Negativo
61	Enero	no		Positivo	Positivo
62	Diciembre	no		Positivo	Negativo
63	Enero	no		Negativo	Negativo
64	Enero	no	castrado	Negativo	Negativo
65	Mayo 1	no	castradp	Negativo	Negativo
66	Mayo 1	no	castrado	Negativo	Negativo
67	Abril	no	castrado	Negativo	Negativo
68	Marzo	no	Castrado	Negativo	Negativo
69	Marzo	si	entero	Negativo	Negativo
70	Mayo 5	no		Negativo	Negativo
71	Marzo	no		Negativo	Negativo
72	marzo	no		Negativo	Negativo
73	abril	no	castrado	Negativo	Negativo
74	Mayo	no	Enterp	Negativo	Negativo
75	marzo	si	entero	Negativo	Positivo
76	marzo	no		Negativo	Negativo
77	Abril	no		Negativo	Negativo
78	marzo	ni	castrado	Negativo	Negativo
79	abril	no		Negativo	Negativo
80	Febrero 3	no	Castrado	Negativo	Negativo
81	Febrero 3	no		Positivo	Positivo
82	Febrero 3	no		Negativo	Positivo
83	Febrero 3	no		Negativo	Negativo
84	Febrero 3	no		Negativo	Negativo
85	Febrero 3	no	Prefñada	Negativo	Negativo
86	Febrero 3	no		Negativo	Negativo
87	Febrero 3	no		positivo	positivo
88	Febrero 3	no		Negativo	Negativo

N	ULTIMA VERMIFUGACION	ANTECEDENTES DE COLICO	CONDICION DEL ANIMAL	RESULTADO COPROLOGICO PARA ANOPLOCEPHALA PERFOLIATA	RESULTADO MOLECULAR
89	Junio 18	si	entero	Negativo	Negativo
90	Diciembre 2010	no	entero	Negativo	Positivo
91	junio 2010	no	castrado	Negativo	Negativo
92	Diciembre 2010	no	castrado	positivo	Positivo
93	Diciembre 2010	no		Negativo	Negativo
94	Diciembre 2010	no	castrado	Negativo	Negativo
95	Diciembre 2010	no	entero	Negativo	Negativo
96	Diciembre 2010	no	entero	Negativo	Negativo
97	junio 2010	no	entero	Negativo	Negativo
98	Diciembre 2010	no	entero	Negativo	Negativo
99	Diciembre 2010	No saben		positivo	Positivo
100	Octubre 5	si		Positivo	Positivo
101	Octubre 5	si	Castrado	Negativo	Negativo
102	Octubre 5	no		Negativo	Negativo
103	Octubre 5	no	Entero	Negativo	Negativo
104	Octubre 5	no	Lactando	Negativo	Negativo
105				Negativo	Negativo
106	Octubre	no	Entero	Negativo	Negativo
107	Octubre	no		Negativo	Negativo
108	Ninguna	No saben		Negativo	Negativo
109	Ninguna	No saben		Negativo	Negativo
110	Ninguna	No saben		Negativo	Negativo
111	Ninguna	No saben		Negativo	Negativo
112	Ninguna	No saben		Negativo	Negativo