



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Estudio prospectivo inmunomolecular de la presencia de  
*Babesia caballi* y *Theileria equi* en México”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA  
**ELIZABETH SALINAS ESTRELLA**

DIRECTOR DE TESIS:  
**JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTOR:  
**GUILLERMINA ÁVILA RAMÍREZ**  
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

**ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

**CD. UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mi Familia, Carlos, Margarita, Joe, Israel, Javi, Cheli, Jessy, Iván, Emiliano, Ramiro, Fabrizio, Matías y Moye, las trece personas más importantes en mi vida; quienes me han ayudado a seguir mis sueños, afrontar responsabilidades y hacer frente a los problemas, quienes son mis críticos y cariñosos consejeros, a ellos no sólo les agradezco por su apoyo durante este proyecto y todo lo que ha involucrado, también les dedico todas las horas de trabajo, pues ellos son mis raíces, mi motor y mis alas.

A Guillermo, Andrea, Karen, Consuelo, Anilú, Germán, Daniel, Jessica, Male, Adolfo, Diego, Rubikah y Nadia, amigos que han creído en mí y quienes me han apoyado y animado a pesar de la distancia.

“(...) porque eres el alto de mi marcha  
y el punto de partida de mi impulso (...)”

Ricardo López Méndez

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme cursar mis estudios de Maestría en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Problemas Nacionales, por el Financiamiento del proyecto “Diagnóstico temprano y prospección de patógenos emergentes de importancia zoonótica transmitidos por garrapatas” con vigencia 2014-2016, pues me permitió realizar este proyecto así como por la beca que me proporcionó para realizar este posgrado y una estancia internacional.

Al Dr. Juan Mosqueda, director de tesis, profesor, ejemplo de desempeño profesional y amigo, por darme la oportunidad de realizar esta meta profesional, por todo el apoyo brindado, por el tiempo dedicado, por la libertad otorgada, la confianza depositada en mí y la gran huella que ha dejado en mi formación académica.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por haber contribuido a mi formación y permitirme realizar parte de la fase experimental de mi proyecto en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales.

A mi Comité Tutorial, la Dra. Guillermina Ávila Ramírez y el Dr. Alfredo Sahagún Ruíz, por su disponibilidad y apoyo, por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito, por sus consejos y buenas críticas y porque desde el inicio hasta el fin me han motivado a crecer académicamente.

Al Dr. Massaro Ueti, por darme la oportunidad y apoyo sin reservas para realizar parte de la fase experimental de este proyecto a través de una estancia en su Laboratorio y por recibirme como un amigo.

Al MVZ Guillermo García en Chiapas, MVZ Evelio Castillo en Tabasco, MVZ Martiniano Acuña en la Sierra Gorda de Querétaro, MVZ Daniel González, MVZ Rodrigo Morales y la MVZ Giselle en San Luis Potosí, M. en C. César Badilla en Sinaloa y a la MVZ Esp. Amelia Lizcano en Yucatán, por su gran apoyo durante la recolección de muestras. Muchas gracias.

A la M. en C. Nadia Jiménez Luna, por su disponibilidad para ayudarme en el muestreo en Querétaro y su apoyo con la extracción de DNA.

Al M. en C. Francisco Martínez Ibáñez por los análisis taxonómicos de las garrapatas colectadas.

A la MVZ Lourdes Guerrero López, por la información amablemente proporcionada sobre los antecedentes de diagnóstico de piroplasmosis equina en el país.

## RESUMEN

La piroplasmosis equina es una enfermedad de caballos, mulas y asnos, producida por los protozoarios intraeritrocíticos *Babesia caballi* y *Theileria equi* y es transmitida por garrapatas cuyas áreas endémicas son regiones tropicales y subtropicales. En México, un estudio realizado en el estado de Nuevo León, utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta demostró una seroprevalencia de 61.7% a piroplasmosis equina mientras que la identificación directa de los parásitos, al microscopio, fue de 0.81%. Considerando que no se conoce la prevalencia de esta parasitosis en la población equina de México y su impacto en la salud animal, se diseñó el presente estudio para conocer su prevalencia en regiones endémicas de garrapatas. Se colectaron muestras de sangre de 269 équidos de 6 estados con clima tropical o semitropical. Se cuantificó en los sueros obtenidos la presencia de anticuerpos específicos utilizando un ensayo comercial de cELISA. Se encontró una seroprevalencia de 55.7% contra *B. caballi* y 68.4% contra *T. equi*. Se realizaron PCR-anidadas (nPCR) para identificar el material genético de los respectivos parásitos y se identificaron 7.8% positivas a *B. caballi* y 78.8% positivas a *T. equi*. Adicionalmente, el gen *ema-1* de *T. equi* fue secuenciado a partir de 30 reacciones de clonación, mientras que el gen *rap-1* de *B. caballi* fue secuenciado a partir de 13 reacciones de clonación. Las secuencias resultantes se alinearon con las respectivas secuencias previamente reportadas en el GenBank. Los análisis realizados no revelaron diferencias que permitieran identificar una cepa en México diferente a las reportadas. Este es el primer reporte de una detección molecular de *T. equi* y *B. caballi* en varios estados de México y confirma una elevada prevalencia de estos parásitos en équidos en el país.

**Palabras clave:** piroplasmosis equina, *Theileria equi*, *Babesia caballi*,

## ABSTRACT

Equine piroplasmosis is a disease of horses, mules and donkeys, produced by the intra-erythrocytic protozoans *Babesia caballi* and *Theileria equi* and is transmitted by ticks whose endemic areas are tropical and subtropical regions. In Mexico, a study carried out in the state of Nuevo León using the indirect immunofluorescence test demonstrated a seroprevalence of 61.7% to equine piroplasmosis whereas the direct identification of both parasites under the microscope was 0.81%. Due to it is not known the prevalence of this parasitosis in the equine population of Mexico and its impact on animal health, the present study was designed to know the prevalence in endemic regions of ticks. Blood samples were collected from 269 equidae from 6 states with tropical or semitropical climate. The presence of antibodies was quantified using a commercial cELISA assay. A seroprevalence of 55.7% was found against *B. caballi* and 68.4% against *T. equi*. Nested PCR (nPCR) was performed to identify the genetic material of the respective parasites and 7.8% positive for *B. caballi* and 78.8% positive for *T. equi* were identified. In addition, the *T. equi ema-1* gene was sequenced from 30 cloning reactions, whereas the *B. caballi rap-1* gene was sequenced from 13 cloning reactions. The resulting sequences were aligned with the respective sequences reported in GenBank. The analyzes did not reveal differences that allowed to identify a strain in Mexico different from those reported. This is the first report of a molecular detection of *T. equi* and *B. caballi* in several states of Mexico and confirms a high prevalence of these parasites in equidae in the country.

**Key words:** equine piroplasmosis, *Theileria equi*, *Babesia caballi*,

# ÍNDICE GENERAL

Dedicatorias .....	1
Agradecimientos .....	2
Resumen.....	3
Abstract .....	4
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE CUADROS .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
Marco teórico.....	9
1.1 Piroplasmosis equina .....	9
1.2 Vectores .....	9
1.3 Distribución .....	10
1.4 Antecedentes de la enfermedad en México .....	12
1.5 Impacto .....	14
1.6 Exportación de productos (ganado y carne) .....	14
1.7 Ciclo biológico .....	16
1.7.1 Ciclo de vida de <i>Theileria equi</i> .....	16
1.7.2 Ciclo de vida de <i>Babesia caballi</i> .....	18
1.8 Patogenia.....	19
1.9 Signos clínicos.....	20
1.10 Tratamiento.....	20
1.11 Diagnóstico.....	20
1.12 Control y Prevención .....	22
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS .....	25

IV.	OBJETIVOS .....	25
V.	Estrategia experimental .....	26
VI.	MATERIAL y MÉTODOS.....	27
6.1	Muestreo .....	27
6.1.1	Recolección y manejo de las muestras .....	28
6.2	Diagnóstico serológico de <i>Babesia caballi</i> y <i>Theileria equi</i> mediante ELISA competitiva.....	29
6.3	Extracción de DNA a partir de sangre completa .....	32
6.4	Cuantificación de DNA.....	33
6.5	Comprobación de Integridad de DNA .....	33
6.6	Diagnóstico molecular de <i>Theileria equi</i> mediante nPCR .....	34
6.7	Diagnóstico molecular de <i>Babesia caballi</i> mediante nPCR.....	35
6.8	Secuenciación.....	37
VII.	RESULTADOS .....	43
7.1	Muestreo .....	43
7.2	Análisis taxonómico.....	46
7.3	Diagnóstico serológico de <i>Babesia caballi</i> y <i>Theileria equi</i> mediante el cELISA .....	47
7.4	Diagnóstico molecular de <i>Babesia caballi</i> y <i>Theileria equi</i> mediante nPCR.....	50
7.5	Secuenciación.....	55
VIII.	DISCUSIÓN.....	59
IX.	CONCLUSIÓN .....	63
9.1	Perspectivas .....	63
9.2	Financiamiento y Participación .....	64
X.	LITERATURA CITADA.....	65
	ANEXO 1. REQUISITOS PARA CERTIFICADO ZOOSANITARIO PARA EXPORTACIÓN.....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de climas en México.....	11
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. equi</i> .....	17
Figura 3. Ciclo de vida de <i>B. caballi</i> .....	19
Figura 4. Estrategia experimental.....	26
Figura 5. Fragmento de los resultados del análisis taxonómico de garrapatas.....	46
Figura 6. Resultados de cELISA por estado.....	49
Figura 7. Cifras totales de animales positivos en la prueba cELISA.....	49
Figura 8. Fragmento de los resultados de la nPCR para <i>Theileria equi</i> .....	51
Figura 9. Fragmento de los resultados de la nPCR para <i>Babesia caballi</i> .....	51
Figura 10. Cifras totales de animales positivos en la prueba nPCR.....	52
Figura 11. Resultados de nPCR por Estado.....	53
Figura 12. Mapa de la secuencia del gen <i>ema1</i> .....	55
Figura 13. Fragmento de alineamiento para <i>ema1</i> .....	56
Figura 14. Mapa de la secuencia del gen <i>rap1</i> .....	57
Figura 15. Fragmento de alineamiento para <i>rap1</i> .....	58

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Muestras enviadas a la DEAR para diagnóstico de piroplasmosis equina de 2010 a 2016. ....	13
Cuadro 2. Muestras para diagnóstico de piroplasmosis equina de 2010 a 2016, de los Estados de Chiapas, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán en conjunto.....	13
Cuadro 3. Ganado equino sacrificado en rastros TIF de 1995-2013. Fuente: Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, SAGARPA, 2015. ....	15
Cuadro 4. Características geográficas y climáticas de las localidades de muestreo. ....	44
Cuadro 5. Número de animales positivos a piroplasmosis mediante la detección de anticuerpos por cELISA.....	48
Cuadro 6. Fragmento de los resultados de extracción de DNA.....	50
Cuadro 7. Resultados comparativos por Estado entre cELISA y nPCR. ....	54

## I. INTRODUCCIÓN

### Marco teórico

#### 1.1 Piroplasmosis equina

La piroplasmosis equina –también conocida como babesiosis equina, theileriosis equina o fiebre biliar– es una enfermedad de distribución mundial que afecta a caballos, mulas y asnos, producida por los protozoarios intraeritrocíticos *Babesia caballi* y *Theileria equi* y es transmitida por diversas especies de garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* en regiones tropicales y subtropicales, así como también de forma iatrogénica mediante el uso de agujas compartidas entre varios équidos (de Waal DT, 1992; Cantú-Martínez *et al*, 2012; ISU, 2010; Méndez, 2012; Scoles y Ueti, 2015).

La definición de esta enfermedad, de acuerdo al Manual de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) sobre animales terrestres 2004, señala que la piroplasmosis equina o babesiosis es una enfermedad de caballos, mulas, asnos y cebras producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Los agentes etiológicos de la piroplasmosis equina son *Theileria equi* y *Babesia caballi*.

Los parásitos causantes de piroplasmosis equina fueron descritos por primera vez a principios del siglo XX, siendo clasificados ambos en el género *Piroplasma*. En 1901, Laveran describió por primera vez un parásito intraeritrocítico en caballos (*P. equi*), mientras que *P. caballi* fue identificado por primera vez como un parásito diferente en 1912 (Nutall y Strickland, 1912; Scoles y Ueti, 2015). Finalmente en la década de 1990 *B. equi* pasó a ser clasificado en el género *Theileria* (Kappmeyer *et al*, 1993; Knowles *et al*, 1997; Mehlhorn y Schein, 1998; Uilenberg, 2006).

#### 1.2 Vectores

Aproximadamente 14 especies de garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Amblyomma* y *Rhipicephalus* pueden ser vectores para estos patógenos (ISU, 2010), las cuales los transmiten de forma transestadial (en el caso de *T. equi*) o

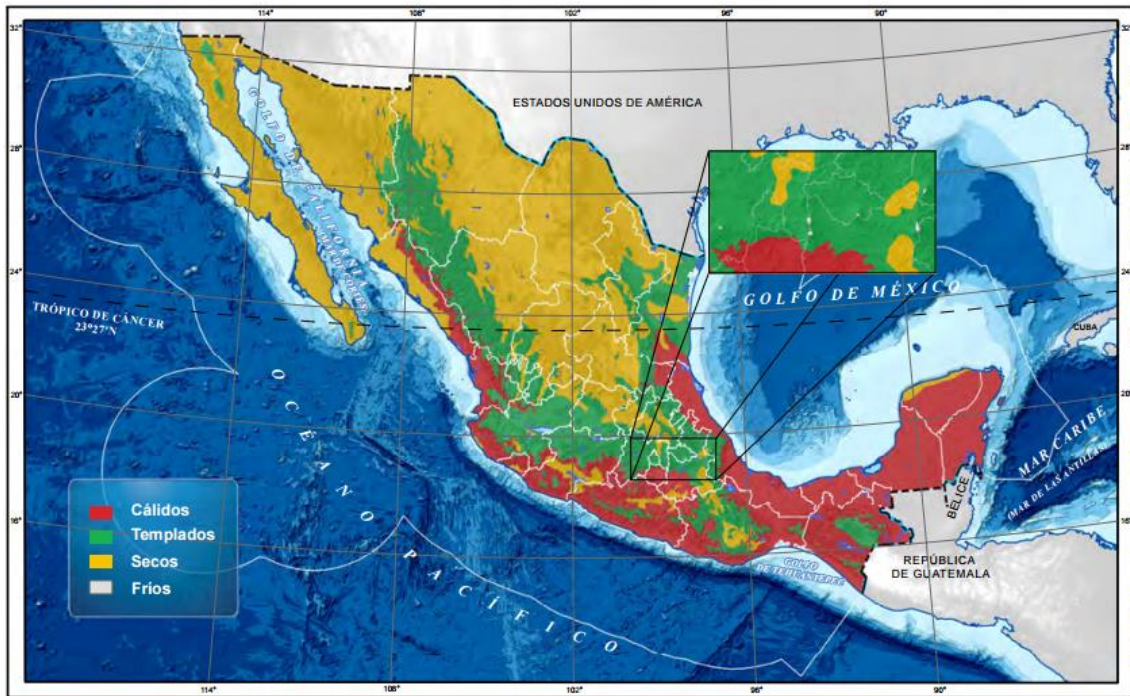
transovárica (en el caso de *B. caballii*) (Schwint *et al*, 2009; Scoles y Ueti, 2015). De las especies de garrapata que se han reportado como transmisoras de los dos protozoarios causantes de piroplasmosis equina en el mundo, *Amblyomma cajennense* (*A. mixtum*), *Dermacentor albipictus* y *D. nitens*, así como *Rhipicephalus microplus* y *R. annulatus* son posibles transmisoras de babesiosis equina en México (Schwint *et al*, 2009; Cantú-Martínez *et al*, 2012; Scoles y Ueti, 2015).

### 1.3 Distribución

Los parásitos que causan piroplasmosis equina son endémicos en muchas regiones tropicales y subtropicales, que incluyen partes de África, Medio Oriente, Asia, América Central y del Sur, el Caribe y Europa, debido a que el clima de esas regiones favorece la presencia de los vectores. En áreas templadas pueden encontrarse en menor cantidad. Se cree que *T. equi* tiene una distribución más amplia que *B. caballii* (ISU, 2010).

Las tasas de infección de los equinos domésticos en regiones endémicas están a menudo arriba del 60%; en algunas regiones más del 90% de los animales están infectados con uno o ambos parásitos. La mayoría de estos están persistentemente infectados sin ningún signo de la enfermedad clínica (Scoles y Ueti, 2015).

En México, aproximadamente el 26% de la superficie continental presenta un clima cálido de acuerdo con el INEGI y el CONEVYT. Estas regiones de clima cálido se localizan mayormente en la zona sur y sureste del país. En estos lugares, la presencia de garrapatas es elevada debido a que tanto la temperatura como la humedad son adecuadas para su desarrollo y por lo tanto, es en estas regiones donde los équidos tienen mayor probabilidad de estar en contacto con los patógenos causantes de la enfermedad. En la figura 1 se observa la distribución climática de México, en rojo se observa la extensión del territorio nacional que se caracteriza por presentar un clima cálido.



**Figura 1. Tipos de climas en México. Fuente: Anuario Estadístico y Geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2010, INEGI.**

Debido a que la signología de la piroplasmosis en los equinos es poco clara e inespecífica la presencia de esta enfermedad pasa inadvertida; sin embargo, cuando se introducen caballos del altiplano o de regiones del norte a las zonas costeras, se presentan por lo general casos agudos con elevada mortalidad si no son tratados a tiempo (Quiroz, 2006).

El movimiento de estos animales portadores clínicamente sanos en regiones con garrapatas, representa una posible fuente de infección de las poblaciones de caballos libres, es la base para la propagación de estos parásitos. El aumento de desplazamientos internacionales de caballos, el desarrollo de las poblaciones de garrapatas con una mayor resistencia a los acaricidas químicos y los cambios en el uso de la tierra y climáticos son también factores importantes que aumentan el riesgo de la propagación de estos parásitos a las regiones previamente libres de la infección. Un mal manejo de las poblaciones equinas –

incluida la inadecuada atención veterinaria, la mala alimentación y el exceso de trabajo– puede exacerbar los efectos de la infección (Scoles y Ueti, 2015).

#### 1.4 Antecedentes de la enfermedad en México

En el año 2000, Rodríguez-Vivas y colaboradores, realizaron una revisión de 79 muestras sanguíneas de equinos que fueron enviadas al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY) de 1984 a 1999, las cuales fueron procesadas mediante la técnica de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa al 10%. En dicha revisión se encontraron 3 muestras positivas a *Theileria (Babesia) equi* (3.79%) y 2 muestras positivas a *Babesia caballi* (2.53%).

En el Diario Oficial se publicó el Acuerdo (2007) mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria para los Estados Unidos Mexicanos, donde la babesiosis equina aparece como una enfermedad de notificación mensual obligatoria, dentro del grupo 3, considerada como enzootica pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional. Esta enfermedad también está incluida en la Lista de enfermedades notificables de la OIE (2015).

En el año 2012 se demostró una seroprevalencia de 61.7% en 248 équidos utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta, mientras que la identificación directa del parásito al microscopio permitió la detección de 0.81% de animales infectados y no se detectó asociación con edad o función zootécnica (Cantú-Martínez *et al*, 2012).

Por su parte, la Dirección General de Salud Animal–SENASICA–SAGARPA, mediante la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo (DEAR), realiza vigilancia epidemiológica de esta enfermedad en toda la República Mexicana. De acuerdo con información solicitada directamente a esta Dirección, las pruebas diagnósticas que se llevan a cabo son Tinción con Giemsa, Fijación

del Complemento, ELISA, Inmunodifusión y Tinción de Wright. En el cuadro 1 se observa la cantidad de muestras enviadas para diagnóstico, del año 2010 hasta agosto de 2016, provenientes de toda la República, mientras que en el cuadro 2 se observa la suma de las cantidades de muestras enviadas para diagnóstico de piroplasmosis equina de 2010 a 2016, de los Estados de Chiapas, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán a la DEAR.

**Cuadro 1. Muestras enviadas a la DEAR para diagnóstico de piroplasmosis equina de 2010 a 2016.**

	<b>Enviadas</b>	<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>
<b>2010</b>	762	60	677
<b>2011</b>	823	104	719
<b>2012</b>	1220	197	1023
<b>2013</b>	1028	89	939
<b>2014</b>	812	44	768
<b>2015</b>	1074	93	981
<b>2016</b>	1071	56	1014
<b>Total</b>	<b>6790</b>	<b>643</b>	<b>6121</b>

**Cuadro 2. Muestras para diagnóstico de piroplasmosis equina de 2010 a 2016, de los Estados de Chiapas, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán en conjunto.**

	<b>Enviadas</b>	<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>
<b>2010</b>	101	20	69
<b>2011</b>	160	39	121
<b>2012</b>	132	34	98
<b>2013</b>	260	44	216
<b>2014</b>	172	15	157
<b>2015</b>	203	23	180
<b>2016</b>	39	2	37
<b>Total</b>	<b>1067</b>	<b>172</b>	<b>878</b>

### 1.5 Impacto

En México, las diferentes competencias ecuestres generan una gran derrama económica, además de que gran parte de la población de equinos del país son equinos de trabajo, así mismo se ha observado el aumento en general de la crianza de ganado caballar en todo el país (INEGI, 2014), reportando en 2008 un total de 6,350,000 equinos en el país (Méndez, 2011).

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA (2011) establece que los caballos que se movilicen dentro del territorio nacional deben contar con un certificado zoosanitario de movilización (CZM) o, en su caso, con un pasaporte sanitario y de identificación para caballos de deporte y espectáculo (PSIC) mismo que permite tramitar el aviso de movilización para caballos (AMC); estos documentos avalan el buen estado de salud de los equinos y se tramitan en las oficinas de SAGARPA-SENASICA. En el pasaporte, “de forma periódica, un Médico Veterinario Responsable Autorizado por la SAGARPA/SENASICA en el área de equinos, registra y valida con su firma el estado sanitario del caballo, los diagnósticos de laboratorio, vacunas y cualquier tratamiento que se le aplique”.

### 1.6 Exportación de productos (ganado y carne)

Para el año 2010 se tenían acreditados en funcionamiento 490 establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF), la producción del sistema fue de: bovinos 2,340,704 cabezas; porcinos 5,664,099 cabezas; equinos 97,403 cabezas. En 2013, la cantidad de ganado equino sacrificado fue de 131,987 cabezas en rastros TIF, de acuerdo al reporte de la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria de SAGARPA, que se muestra en la cuadro 3 a continuación.



**Cuadro 3. Ganado equino sacrificado en rastros TIF de 1995-2013. Fuente: Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, SAGARPA, 2015.**

<b>Ganado sacrificado en rastros Tipo Inspección Federal según especie</b>						
<b>Años seleccionados de 1995 a 2013</b>						
<b>Cabezas</b>						
<b>Año</b>	<b>Bovino</b>	<b>Porcino</b>	<b>Equino</b>	<b>Caprino</b>	<b>Ovino</b>	<b>Aves</b>
1995	1 327 718	2 959 878	ND	ND	ND	112 170 677
1996	1 355 686	3 978 622	ND	ND	ND	136 685 404
1997	1 301 565	3 677 554	ND	ND	ND	189 061 903
1998	1 307 449	4 045 061	126 101	ND	ND	219 254 473
1999	1 391 702	4 319 242	92 116	ND	ND	309 329 278
2001	1 219 718	3 744 415	39 907	ND	ND	309 532 566
2002	1 045 806	3 576 728	59 827	ND	ND	397 046 073
2003	1 283 795	4 327 829	23 731	ND	ND	401 054 366
2004	1 587 093	4 507 045	25 474	ND	ND	489 045 550
2005	1 684 590	4 683 994	32 811	ND	ND	567 137 024
2006	1 794 374	5 175 695	32 777	ND	ND	650 038 282
2007	1 933 924	5 898 645	60 486	ND	ND	726 629 630
2008	2 383 192	5 779 550	70 986	ND	ND	766 533 818
2009	2 688 064	5 668 527	87 487	ND	ND	717 944 435
2010	2 340 704	5 664 099	97 403	ND	ND	ND
2011	2 549 509	6 146 018	112 788	ND	ND	551 954 566
2012	2 894 122	6 704 597	103 746	156 440	30 515	795 834 196
2013 P/	2 917 409	7 325 642	131 987	173 080	60 397	751 407 156

Fuente: SAGARPA. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria.

En el Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 2010, se reportó ese año la exportación de animales vivos reproductores de raza pura a Colombia. En el ramo de caballos para saltos o carreras, los países a los que se exportaron fueron Alemania, Bélgica, Chile, España, Estados Unidos, Guatemala, Italia y Panamá. Los países a los que se exportaron caballos sin pedigree para reproducción fueron Belice, Chile, Colombia, Costa Rica, Estados Unidos, Holanda y Panamá. Mientras que la exportación de asnos, mulas y burdéganos se realizó a Micronesia y a Estados Unidos.

De acuerdo con datos de este mismo Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 2010, la exportación de carne fresca, refrigerada o congelada de caballo, asno o mula fue de un total de 10,747,337 kg equivalentes a

37,091,118 dólares. Dicha exportación se realizó a Bélgica, Corea del Sur, Estados Unidos, a la Federación Rusa, Francia, Holanda, Hong Kong, Italia, Japón, Suecia, Suiza, Swazilandia, y a Vietnam. Para el Primer Semestre de 2013, de acuerdo con la Balanza Comercial Agroalimentaria México-Unión Europea (UE), México era el segundo proveedor –por valor de las exportaciones– de carne de caballo (2,014 toneladas, 7,840 miles de euros, equivalente al 21%).

Los requisitos considerados por SENASICA para la exportación tanto de animales vivos como de productos de origen animal se muestran en el anexo 1.

### 1.7 Ciclo biológico

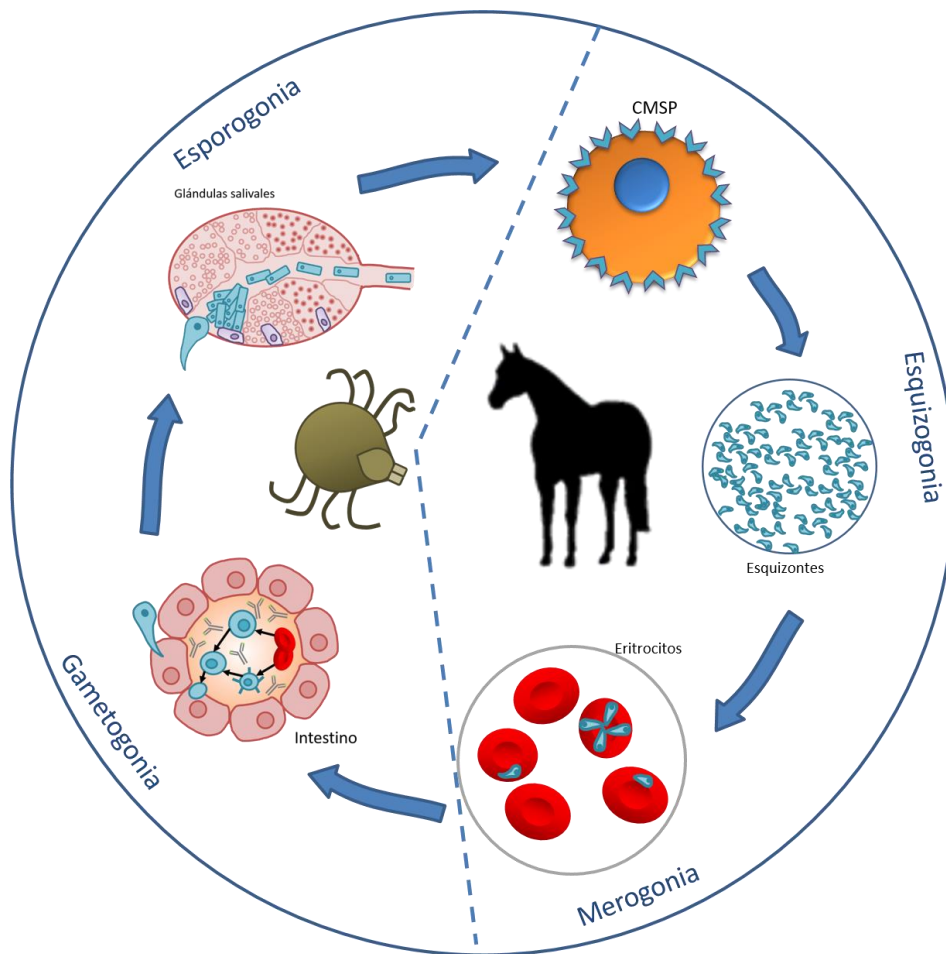
Las especies de parásitos que causan piroplasmosis equina tienen ciclos de vida que son complejos e incluyen una etapa haploide que se replica asexualmente en el hospedero mamífero y una etapa sexual diploide en la garrapata vector. La garrapata es el hospedero definitivo, así como el vector biológico de estos parásitos, ya que es donde se lleva a cabo el desarrollo sexual de los parásitos (Scoles y Ueti, 2015). El ciclo biológico de cada especie es distinto y se explicará por separado.

#### 1.7.1 Ciclo de vida de *Theileria equi*

*Theileria equi* pasa por cuatro etapas de replicación (Figura 2). En el hospedero equino hay replicación asexual (esquizogonia) en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), seguida de otra replicación asexual en los eritrocitos (merogonia). Las garrapatas ingieren eritrocitos infectados de la sangre y la reproducción sexual de los parásitos se produce en el intestino medio de las garrapatas (gametogonia) seguida de una replicación asexual en las glándulas salivales de las garrapatas (esporogonia).

Cuando las garrapatas adquieren eritrocitos infectados de la sangre durante la alimentación, el protozooario se transforma en el estadio sexual en el lumen del

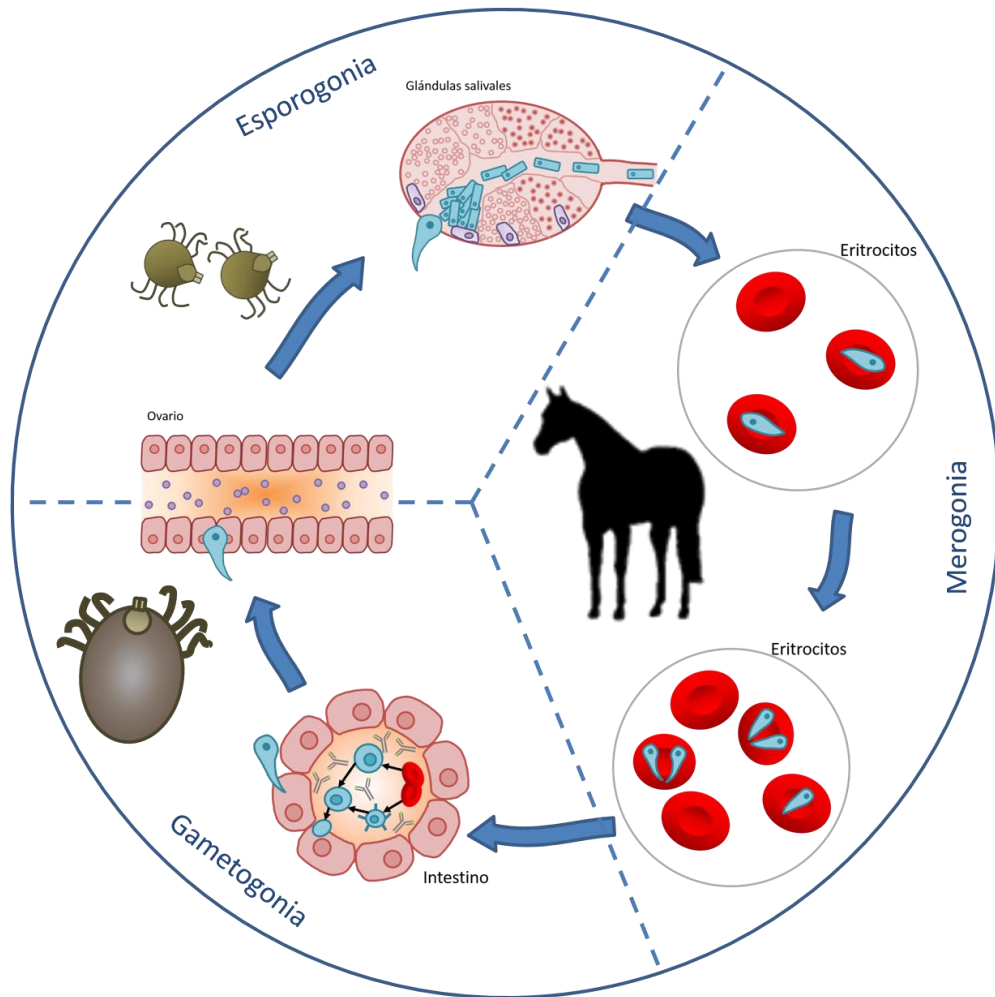
intestino, ya sea un gameto macho o un gameto hembra. Los gametos se fusionan para formar un cigoto diploide que invade las células epiteliales del intestino medio y se transforma en un quineto móvil. El quineto escapa de la célula epitelial del intestino medio y migra a través de la hemolinfa de la garrapata e invade las glándulas salivales. En las glándulas salivales, los quinetos se dividen mediante meiosis, dando lugar a esporozoitos haploides, que son infectantes y son liberados con la saliva en el hospedero cuando la garrapata se alimenta. Las garrapatas pueden adquirir y transmitir patógenos de equinos infectados persistentemente ya que estos equinos sirven como reservorios de los parásitos (Uilenberg, 2006; Scoles y Ueti, 2015).



**Figura 2. Ciclo de vida de *T. equi* (modificado de Scoles y Ueti, 2015 con el permiso de los autores). CMSP= Células mononucleares de sangre periférica.**

### 1.7.2 Ciclo de vida de *Babesia caballi*

El ciclo de vida de *B. caballi* aunque es similar al de *T. equi* en muchos aspectos, hay algunas diferencias fundamentales (Figura 3). A diferencia de *T. equi*, *B. caballi* pasa sólo por tres etapas de replicación: merogonia, gametogonia y finalmente esporogonia, dando lugar a los esporozoitos haploides infecciosos. Cuando el vector infectado inocula esporozoitos de *B. caballi* en el hospedero, estos invaden las células rojas de la sangre directamente. Al igual que con *T. equi*, las garrapatas ingieren los eritrocitos infectados y los piroplasmas se someten a gametogénesis en el intestino medio, es decir, se transforma en el estadio sexual o ya sea en gametos macho o hembra, y ambos se fusionan dando lugar a un cigoto diploide que al invadir las células intestinales se transforma en un quineto; sin embargo, después de que los quinetos de *B. caballi* escapan del intestino, en lugar de infectar las glándulas salivales, se mueven a través de la hemolinfa, infectando a múltiples órganos internos, incluyendo los ovarios. La transmisión vertical se produce cuando los quinetos invaden los embriones en los ovarios. En el embrión de garrapata, los quinetos invaden las glándulas salivales y después de la eclosión de las larvas, los parásitos se desarrollan en esporozoitos, que luego arrojan en la saliva durante la alimentación de sangre para infectar equinos sanos; la diferencia fundamental en el vertebrado radica en que no hay evidencia de que *B. caballi* infecte CMSP (Scoles y Ueti, 2015).



**Figura 3. Ciclo de vida de *B. caballi* (modificado de Scoles y Ueti, 2015 con el permiso de los autores).**

### 1.8 Patogenia

Los parásitos al entrar en contacto con los eritrocitos en el torrente sanguíneo provoca la ruptura de glóbulos rojos, provocando hemólisis, anemia y hemoglobinuria. El bazo juega un papel importante como defensa no específica e inmunológica contra los parásitos y en este se reflejan cambios patológicos durante la infección como son: congestión, aumento de tamaño y en casos agudos de enfermedad la ruptura del bazo (Paget *et al.*, 1962; Reusse, 1954).

### 1.9 Signos clínicos

En general, la babesiosis equina se presenta como una infección aguda, con fiebre intermitente, inapetencia, malestar general, disnea y congestión de mucosas, además se observa anemia, trombocitopenia, ictericia, hemoglobinuria, sudor, abdomen inflamado y debilidad (Rothschild y Knowles, 2007). En los casos crónicos se observa pérdida de peso, baja tolerancia al ejercicio, fiebre transitoria y esplenomegalia (Cantú-Martínez *et al*, 2012; Scoles y Ueti, 2015). En ocasiones las yeguas infectadas o portadoras pueden transmitir la enfermedad a sus potrillos o abortar, mientras que los potrillos pueden permanecer como portadores asintomáticos o desarrollar anemia (Rovid *et al.*, 2010).

### 1.10 Tratamiento

Cuando un equino ha sido infectado con estos protozoarios, su recuperación es lenta, siendo más grave la enfermedad producida con *T. equi*. El tratamiento consiste en dosis de dipropionato de imidocarb (1-3 mg/kg), aunque también se comercializa el diaceturato de diaminaceno (3-5 mg/kg) (Schwint *et al*, 2009; Scoles y Ueti, 2015; Mosqueda *et al*, 2012; Grause *et al*, 2013).

### 1.11 Diagnóstico

Debido a que los signos clínicos no son específicos, la piroplasmosis equina es una enfermedad de difícil diagnóstico; en los Estados Unidos de América ésta enfermedad es considerada como exótica y, aunque fue erradicada, pudieron haberse presentado falsos negativos por la prueba de fijación del complemento (CFT); en México esta prueba también se utilizaba para las importaciones hasta el 2005, por lo que existe la posibilidad de que algunos caballos puedan ser portadores inaparentes (ISU, 2010).

El uso de frotis para la demostración de la presencia de los parásitos en sangre o en órganos es un método de diagnóstico poco confiable, ya que la

parasitemia puede ser muy baja y por lo tanto dificultar la detección. Las tinciones más usadas en el diagnóstico por microscopia son la tinción de Giemsa (OIE, 2004) y la tinción de Wright (Calderón *et al*, 2013). Debido a esto, se han usado las pruebas serológicas para detección de anticuerpos específicos como métodos diagnósticos. Entre las pruebas más usadas se encuentran la fijación de complemento (CFT), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). En la IFI y el ELISA se ha probado que no hay reacción cruzada entre *T. equi* y *B. caballi* (Vargas *et al*, 2004).

Con la prueba de fijación de complemento, los anticuerpos pueden ser detectados a las 2 o 3 semanas y hasta 7 meses después de la infección. En la prueba de inmunofluorescencia indirecta los anticuerpos pueden ser detectados hasta por 24 meses post-infección, el problema es la necesidad de una parasitemia elevada (Morilla, 1981). El ensayo inmunoenzimático puede detectar anticuerpos a los 14 días post-infección (Adams, 2005).

El problema con el uso de la prueba de fijación de complemento son los falsos negativos causados por el fallo de la fijación entre ciertos isotipos de anticuerpos con el complemento de cobayo, que es la fuente de complemento utilizado en las pruebas de CFT. Por lo tanto, la presencia de anticuerpo de un isotipo que no fija el complemento resultará en una reacción de CFT negativa a pesar de que haya anticuerpos presentes contra los parásitos (McGuire, 2005).

La prueba de inmunofluorescencia indirecta, aunque es altamente sensible, es subjetiva y puede producir falsos negativos cuando los títulos de anticuerpos son bajos como ocurre en casos crónicos, los cuales son de gran importancia dado que permanecen como portadores asintomáticos (Sahagún-Ruiz *et al*, 1995; Ueti *et al*, 2008). Tanto el ELISA como el IFA son ensayos que se reservan para el comercio internacional de equinos, debido a que ambos tienen un elevado porcentaje de sensibilidad y especificidad por lo que pueden distinguir entre *Babesia caballi* y *Theileria equi*.

Los Laboratorios Nacionales Veterinarios de Servicios (NVSL) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) han ofrecido una descripción detallada de la producción de antígeno y el protocolo de la prueba de ELISA competitiva. Existe un kit comercial disponible que se basa en los mismos antígenos y anticuerpos monoclonales (VMRD, Inc. Pullman, Washington USA <http://www.vmr.com/>).

En los últimos años, varias pruebas convencionales de PCR se han desarrollado para el diagnóstico de estos hemoparásitos en sangre equina (Bashiruddin *et al*, 1999; Knowles *et al*, 1991; Méndez, 2012). Estas pruebas han demostrado ser altamente sensibles y específicas para la piroplasmosis equina. Sin embargo, las pruebas de PCR convencionales son técnicamente complicadas para aplicaciones a gran escala (Alhassan *et al*, 2007). Debido a ello se ha refinado esta técnica mediante el uso de PCR anidada (Ueti *et al*, 2003; Criado-Fornelio *et al*, 2003) y PCR cuantitativa (Ueti *et al*, 2005).

### 1.12 Control y Prevención

Como parte de la estrategia de la OIE (2015), en México se implementa el Sistema de Internacional de Notificación de Enfermedades, mediante el cual los servicios veterinarios deben notificar:

- a. La aparición de una enfermedad y/o infección de la lista de la OIE, en un país, zona o compartimento.
- b. La reaparición de una enfermedad y/o infección de la lista de la OIE en un país, zona o compartimento, después de haber declarado que se había extinguido el foco.
- c. La aparición de una nueva cepa del agente etiológico de una enfermedad de la lista de la OIE en un país, zona o compartimento.
- d. Un aumento repentino e inesperado en la morbilidad o mortalidad por una enfermedad de la lista de la OIE, prevalente en el país.



- e. Una enfermedad emergente con morbilidad o mortalidad importante o potencial zoonótico.
- f. Evidencia de un cambio en el comportamiento epidemiológico de una enfermedad de la lista de la OIE, como nuevos hospederos susceptibles, aumento de virulencia, mutación del agente etiológico, en particular si hay impacto zoonótico.

En México, la Dirección General de Salud Animal, a través del Sistema de Vigilancia Epidemiológica es la responsable de recabar, analizar la información y enviar las notificaciones e informes a la OIE. Los responsables de informar sobre la sospecha o confirmación de las enfermedades son los responsables de los laboratorios de diagnóstico zoonosano, Médicos Veterinarios, servidores públicos, productores, transportistas; personal de farmacias y clínicas veterinarias; personal de Escuelas Técnicas, Escuelas y Facultades de Medicina Veterinaria, así como de Centros de Investigación; Médicos Veterinarios de establecimientos para el sacrificio de animales, puntos de verificación de la movilización de animales y productos, Colegios y Asociaciones de MVZs y público en general.

No existe una vacuna contra *Babesia caballi* ni contra *Theileria equi* (ISU, 2010; Scoles y Ueti, 2015).

## II. JUSTIFICACIÓN

La piroplasmosis equina se distribuye a nivel mundial y, con base en datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, se estima que aproximadamente el 90% de la población mundial de equinos domésticos (caballos, asnos y mulas) vive en áreas donde la enfermedad es endémica. La población equina mundial era de aproximadamente 112 millones de equinos en 2013, pero muchos équidos domésticos se concentran en los países en desarrollo, en los que se utilizan ampliamente como animales de trabajo (<http://faostat.fao.org>). La piroplasmosis equina en México ha adquirido mayor importancia debido al aumento de la población equina, el aumento en la cría de équidos para actividades recreativas y como animales de compañía, así como animales de trabajo y a la también importante actividad comercial de la exportación de carne de caballo a Europa, Asica, África y América. En México se ha reportado la presencia de la enfermedad utilizando técnicas serológicas pero aún no hay datos suficientes que permitan conocer la situación de la piroplasmosis equina en México mediante técnicas moleculares. La información generada en este trabajo permitirá ampliar el conocimiento de la enfermedad en México y proponer estrategias de control de la enfermedad incluyendo el diagnóstico.

### III. HIPÓTESIS

*Babesia caballi* y *Theileria equi* son patógenos que se encuentran presentes en equinos de México y pueden detectarse por métodos inmunomoleculares.

### IV. OBJETIVOS

Realizar un estudio prospectivo inmunomolecular de *B. caballi* y *T. equi* en equinos de áreas endémicas de garrapatas transmisoras en el país.

1. Determinar la presencia de anticuerpos contra *Babesia caballi* y *Theileria equi* en sueros de equinos en México.
2. Detectar molecularmente la presencia *Babesia caballi* y *Theileria equi* en sangre de equinos de México.
3. Detectar diferencias en las secuencias de las muestras de DNA.

## V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los pasos generales de la estrategia experimental se representan en la figura 4: se realizó un muestreo de équidos provenientes de seis estados de la República Mexicana con las características climáticas de las áreas endémicas de garrapatas y de piroplasmosis. Las muestras que se obtuvieron fueron: sangre, suero y garrapatas de équidos. A partir del suero se realizó la técnica de ELISA competitiva para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra cada patógeno, mientras que para determinar la presencia de cada una de las especies de parásitos, se realizó una PCR anidada a partir de DNA extraído de la sangre. Así mismo para detectar diferencias en las secuencias de DNA se enviaron muestras para secuenciación. Respecto a las garrapatas colectadas, se enviaron algunos ejemplares para su identificación taxonómica.

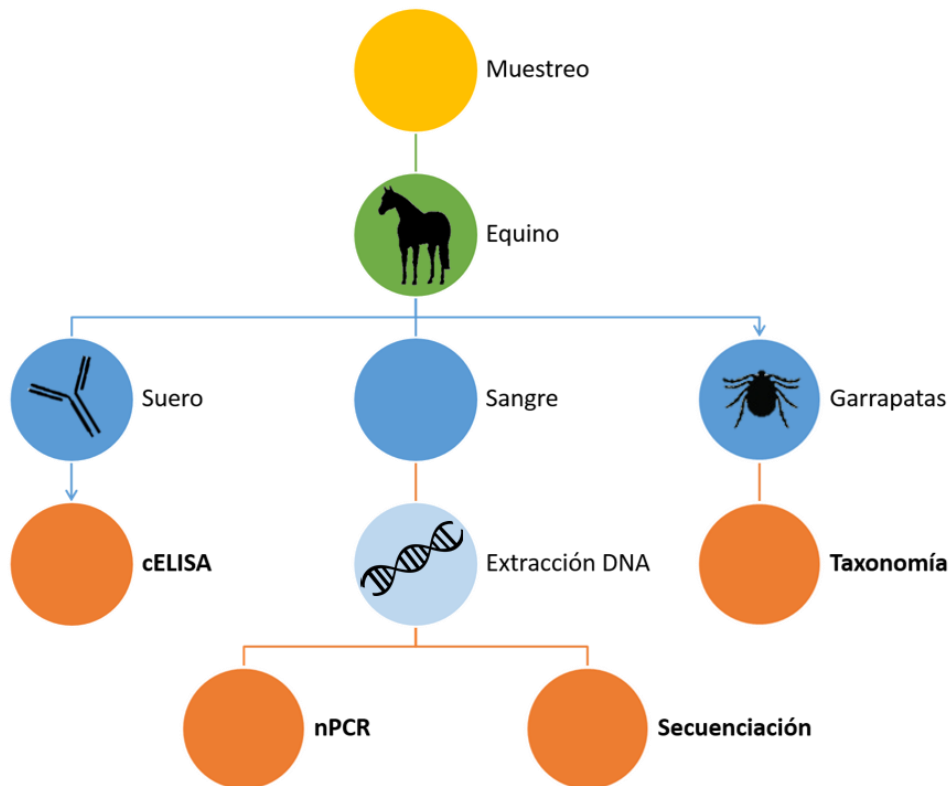


Figura 4. Estrategia experimental.

## VI. MATERIAL y MÉTODOS

### 6.1 Muestreo

La ecuación para determinar el tamaño de muestra necesario para calcular el porcentaje que pudiera tener o no la variable de interés cuando no se conoce la población total, es la siguiente:

$$n = z^2 pq / d^2$$

Cuando la población es muy grande o cuando no se conoce el valor de  $p$  se realiza un muestreo piloto. Considerando el teorema central del límite, que dice “la distribución de medias muestrales se aproxima a la distribución normal, cuando el número de los elementos contenidos en la muestra es lo suficientemente grande”, por lo tanto se calculó que un número no menor de 30 debía ser evaluado para contar con una aproximación razonable del estimador (Jaramillo y Martínez, 2010).

Se usó la fórmula mencionada anteriormente para calcular el tamaño de muestra sustituyendo los valores como se indica a continuación:

$$n = z^2 pq / d^2$$

$n$ = tamaño de muestra

$z$ = nivel de confianza (1.96)

$p$ = probabilidad de que ocurra el evento (0.77)

$q$ = 1- $p$ , probabilidad de que no ocurra el evento (0.23)

$d$ = error estimado (0.05)

El resultado del cálculo del tamaño de muestra fue de 272 y se estableció un mínimo de 30 muestras por estado. Se seleccionaron 6 estados de la república mexicana donde se considera endémica la presencia de garrapatas, debido principalmente a las condiciones climáticas de referencia, tales como humedad, temperatura y altitud. Se obtuvieron muestras de équidos de los estados de Yucatán, Chiapas, Querétaro, Tabasco, Sinaloa y San Luis Potosí, debido a la

posibilidad de acceso a los équidos y a las características del clima de esos estados, ya que Chiapas tiene un 50.6% y 20% de superficie territorial de trópico húmedo y de trópico seco respectivamente; Querétaro 19.5% de trópico seco; Yucatán 9.8% y 90.2% de trópico húmedo y seco respectivamente; Tabasco 100% de trópico húmedo, San Luis Potosí 4.8% de trópico húmedo y 10.1% de trópico seco y Sinaloa 2.4% y 56.1% de trópico húmedo y seco, respectivamente, de acuerdo al Anuario estadístico y geográfico 2014 del INEGI.

Durante el muestreo se colectó la mayor cantidad posible de datos de los animales muestreados, para obtener referencias, sin embargo, dadas las condiciones de propiedad de los animales, no se colectó la misma cantidad de datos de cada uno de los équidos muestreados, debido a que los propietarios no siempre estaban al tanto del historial completo de los animales. Entre los datos recabados estuvieron: localidad, identificación del animal, edad, sexo, historial de vacunas y desparasitaciones, historial de enfermedades o signos de enfermedad y tratamientos.

#### 6.1.1 Recolección y manejo de las muestras

Las muestras de suero fueron obtenidas mediante punción de la vena yugular en équidos, utilizando tubos Vacutainer sin anticoagulante (dejando coagular en refrigeración para aumentar la velocidad del proceso), los cuales fueron centrifugados por 15 minutos a 1500 rpm, se prepararon alícuotas de 1.0 ml, y fueron almacenadas en congelación después de su rotulación.

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción de la vena yugular en équidos de zonas tropicales de México, utilizando tubos Vacutainer con anticoagulante y después de ser centrifugados por 15 minutos a 1500 rpm, se eliminó el plasma y el paquete celular fue alicuotado y almacenado a -20°C después de su rotulación.

## 6.2 Diagnóstico serológico de *Babesia caballi* y *Theileria equi* mediante ELISA competitiva

Para realizar el diagnóstico de los équidos que tenían anticuerpos contra *Babesia caballi* y *Theileria equi*, se utilizó un kit comercial de ELISA competitiva marca VMRD (Washington, EEUU). El protocolo que se siguió se describe a continuación.

### Preparación

- a. Atemperar reactivos: Se colocaron las muestras de suero, reactivos y placas a temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) antes de comenzar la prueba.
- b. Preparación de los controles y muestras: Los controles positivo y negativo y las muestras de suero que fueron probadas se diluyeron 1/2 con el buffer de dilución de suero. -estas diluciones fueron hechas en una placa de transferencia no recubierta de antígeno o en tubos individuales. El control positivo se cargó en duplicado y el control negativo en triplicado, independientemente del número de muestras de suero que se probaron por placa. Cuando se usaron las placas completas fue mejor colocar los controles en pozos de diferentes áreas de la placa. Los controles se cargaron en cada placa.
- c. Preparación de las placas: Se removieron las placas de su envoltura. Se aseguraron las tiras que fueron usadas en el marco y se numeró cada tira para mantener la orientación.
- d. Preparación del anticuerpo primario (monoclonal): Se diluyó 1 parte del anticuerpo primario 100x con 99 partes del buffer de dilución de anticuerpo. Ejemplo: Para 96 pozos, se mezclaron 60 $\mu\text{l}$  de anticuerpo primario 100x con 5.940ml de buffer de dilución de anticuerpo para obtener 6ml de anticuerpo primario 1x. Se necesitaron 50 $\mu\text{l}$  por pozo.
- e. Preparación del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa: Se diluyó 1 parte del anticuerpo secundario 100x conjugado con peroxidasa con 99 partes del buffer de dilución de anticuerpo. Ejemplo: Para 96 pozos, se

mezclaron 60µl de anticuerpo secundario 100x conjugado con peroxidasa con 5.940 ml de buffer de dilución de anticuerpo para obtener 6ml de anticuerpo secundario 100x conjugado con peroxidasa. Se necesitaron 50µl por pozo.

- f. Preparación de la solución de lavado: Se diluyó 1 parte de la Solución de lavado concentrada 10x con 9 partes de agua destilada. Se necesitaron 1.8ml por pozo aproximadamente. Se dispuso de una cantidad extra por las pérdidas en pipeteo, reservorios, etc.

#### Procedimiento de la prueba

1. Carga de controles y muestras de suero: Usando una micropipeta para 50µl, se transfirieron los controles diluidos y las muestras de suero a las placas recubiertas con antígeno; estos fueron cargados en la placa tan rápido como fue posible. Se golpearon suavemente los laterales de la placa varias veces para asegurar que las muestras cubrieran el fondo de los pozos. Se tuvo cuidado de no salpicar muestras de un pozo a otro. Se incubó la placa 30 min a temperatura ambiente.
2. Lavado: Después de los 30 minutos de incubación, se lavó la placa 3 veces. Se tiró el contenido de los pozos y se removió el remanente de suero y controles sacudiendo la placa invertida 4 veces sobre una toalla de papel limpia. Inmediatamente se llenó cada pozo con solución de lavado 1x, usando una pipeta multicanal. Se vació la solución de lavado de la placa y se sacudió la placa invertida sobre una toalla de papel limpia. Se repitió este mismo método un total de 3 veces.
3. Anticuerpo primario: Se agregaron 50µl de anticuerpo primario diluido (1x) a cada pozo. Se golpearon suavemente los laterales de la placa varias veces para asegurar que el anticuerpo primario cubriera el fondo de los pozos. Se incubó la placa 30 min a temperatura ambiente.
4. Lavado: Después de los 30 minutos de incubación, se lavó la placa 3 veces como se describió anteriormente.
5. Anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa: Se agregaron 50µl de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido (1x) a cada pozo. Se



golpeó suavemente los laterales de la placa varias veces para asegurar que el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa cubriera el fondo de los pozos. Se incubó la placa 30 min a temperatura ambiente.

6. Lavado: Después de los 30 minutos de incubación, se lavó la placa 3 veces como se describió anteriormente.
7. Solución sustrato: Se agregaron 50µl de la solución sustrato a cada pozo. Se golpeó suavemente los laterales de la placa varias veces para asegurar que el sustrato cubriera el fondo de los pozos. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiente. Se evitó dejar la placa bajo la luz directa del sol. No se vaciaron los pozos.
8. Solución de paro: Se agregaron 50µl de la solución de paro a cada pozo. Se golpeó suavemente los laterales de la placa varias veces para asegurar que el sustrato y la solución de paro se mezclaran. No se vaciaron los pozos.
9. Lectura y obtención de resultados: Inmediatamente después de añadir la solución de paro, la placa fue leída en un espectrofotómetro de absorbancia para microplacas, utilizando el software MPM 6. Se configuró la longitud de onda para la lectura de la densidad óptica a 655 nm.
10. Los reactivos restantes fueron devueltos a su almacenamiento a 4°C.

Cálculo del % de Inhibición (%I):

$$\%I = 100[1 - (O.D \text{ Muestra} / O.D. \text{ Control Negativo})]$$

Validación de la Prueba

El promedio de los Controles Negativos debió tener una densidad óptica >0.300 y <2.000

El promedio de los Controles Positivos debió tener una inhibición de  $\geq 40\%$

## Interpretación de los Resultados

Si una muestra produjo  $\geq 40\%$  de inhibición, esta fue positiva.

Si una muestra produjo  $< 40\%$  de inhibición, esta fue negativa.

### 6.3 Extracción de DNA a partir de sangre completa

Para realizar la detección molecular de *Babesia caballi* y *Theileria equi* a partir de la sangre colectada, se procedió primero a extraer el DNA utilizando un kit comercial de la marca GE (EE.UU.) siguiendo el protocolo como se indica a continuación.

Protocolo para la extracción de DNA con Ilustra Blood genomic Prep Mini Spin Kit® de GE para muestras de sangre.

1. Se colocaron 20 $\mu$ l de proteinasa K en el fondo de un tubo de 1.5 ml.
2. Se agregaron 300 $\mu$ l (óptimo 150 $\mu$ l) de muestra de sangre.
3. Se añadieron 400 $\mu$ l de buffer de lisis tipo 10.
4. Se mezclaron en vortex 15 seg.
5. Se incubaron por 10 min a temperatura ambiente.
6. Ensamblaje de la columna en el tubo colector.
7. Se cargó el lisado completo en el centro de la columna.
8. Se tapó la columna y se centrifugó 1 min a 11,000 x g.
9. Con cuidado se descartó el sobrenadante del tubo colector.
10. Se agregaron 500 $\mu$ l de buffer de lisis tipo 10 en la columna.
11. Se centrifugaron por 1 min a 11,000 x g.
12. Con cuidado se descartó el sobrenadante.
13. Se agregaron 500 $\mu$ l de buffer de lavado tipo 6 a la columna.
14. Se centrifugaron por 3 min a 11,000 x g.
15. Se descartaron el sobrenadante y el tubo colector con cuidado de no tocar el fondo de la columna.
16. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml.

17. Se agregaron 200µl de buffer de elución tipo 5, pre-calentado a 70°C, a la columna.

18. Se incubaron 1 min a temperatura ambiente.

19. Se centrifugaron 1 min a 11,000 x g.

20. Se almacenaron a -20°C.

#### 6.4 Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se realizó con base en lo descrito por Bautista (2010) usando NanoDrop.

1. Se agregaron 2 µl de solución blanco para calibrar.

2. Se limpió para colocar la muestra y se agregaron 2 µl de la muestra de DNA extraído.

3. Se guardaron los datos de la lectura en un archivo tipo Excel.

#### 6.5 Comprobación de Integridad de DNA

Para comprobar la integridad del DNA se realizaron los siguientes pasos con base en lo descrito por Bautista (2010).

1. Se preparó un gel de agarosa al 1% en cámara de electroforesis.

2. Se colocó el marcador de peso molecular en el primer pozo y en los demás pozos las muestras de DNA con buffer de carga.

3. Se programó a 60V, 400A y 60 min la fuente de poder conectada a la cámara de electroforesis.

4. Se colocó el gel en el fotodocumentador.

## 6.6 Diagnóstico molecular de *Theileria equi* mediante nPCR

La PCR (anidada) para *Theileria equi* se basó en el protocolo descrito por Ueti *et. al.* (2003) para la amplificación del gen *ema1*, obteniendo un fragmento de 227 bp. Los iniciadores usados fueron los siguientes:

Ema1 iniciadores externos:

Forward: TeEma1-exF 5'-CCGAGGAGGAGAAACCCA-3'

Reverse: TeEma1-exR 5'-CGCCATAGACGGAGAAGCC-3'

Los cuales amplifican un fragmento del nucleótido 165 al 778.

Ema1 iniciadores internos:

Forward, 5'-AAGGACAACAAGCCATACGT-3';

Reverse, 5'-TTGCCTGGAGCCTTGAAG-3'

Estos amplifican un fragmento de 227 pb.

La reacción externa se preparó en 20µl de volumen total, utilizando 1µl de primer TeEma1-exF, 1µl de primer TeEma1-exR, 1µl de DNA, 10µl Sigma 2x Jumpstart Red Taq mix y 7µl de agua libre de nucleasas.

El protocolo de termociclado se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

95°C por 3 minutos

30 ciclos:

95°C por 30 segundos

62°C por 30 segundos

72°C por 20 segundos

72°C por 5 minutos

10°C final.

La reacción interna (anidada) se preparó en 20µl de volumen total, utilizando 1µl de primer TeEma1-intF, 1µl de primer TeEma1-intR, <1µl de DNA procedente de la reacción externa, 10µl Sigma 2x Jumpstart Red Taq mix y 8µl de agua libre de nucleasas.

El protocolo de termociclado se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

95°C por 3 minutos

25 ciclos:

95°C por 30 segundos

62°C por 30 segundos

72°C por 20 segundos

72°C por 5 minutos

10°C final.

#### 6.7 Diagnóstico molecular de *Babesia caballi* mediante nPCR

La PCR (anidada) para *Babesia caballi* se basó en el protocolo descrito por Schwint *et. al.* (2008) para la amplificación del gen *rap1*, obteniendo un fragmento de 222 bp. Los iniciadores usados fueron los siguientes:

Rap1 iniciadores externos:

Forward: BcRap1-exF 5'-GATTACTTGTCGGCTGTGTCT-3';

Reverse: BcRap1-nestR 5'-CGCAAGTTCTCAATGTCAG-3

Los cuales amplifican un fragmento del nucleótido 165 al 778.

Rap1 iniciadores internos:

Forward: BcRap1-intF 5'-GCTAAGTACCAACCGCTGA-3';

Reverse, BcRap1-nestR 5'-CGCAAGTTCTCAATGTCAG-3

Estos amplifican un fragmento de 222 pb.

La reacción externa se preparó en 20µl de volumen total, utilizando 1µl de primer BcRap1-exF, 1µl de primer BcRap1-nestR, 1µl de DNA, 10µl Sigma 2x Jumpstart Red Taq mix y 7µl de agua libre de nucleasas.

El protocolo de termociclado se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

95°C por 3 minutos

30 ciclos:

95°C por 20 segundos

60°C por 20 segundos

72°C por 20 segundos

72°C por 5 minutos

10°C final.

La reacción interna (anidada) se preparó en 20µl de volumen total, utilizando 1µl de primer BcRap1-intF, 1µl de primer BcRap1-nestR, <1µl de DNA procedente de la reacción externa, 10µl Sigma 2x Jumpstart Red Taq mix y 8µl de agua libre de nucleasas.

El protocolo de termociclado se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

95°C por 3 minutos

25 ciclos:

95°C por 20 segundos

60°C por 20 segundos

72°C por 20 segundos

72°C por 5 minutos

10°C final.

La resolución de los fragmentos amplificados por nPCR se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) en solución búfer de corrida TAE (AccuGen) y teñidos con SyberSafe® al 1% (v/v). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 10 volt/cm. Se utilizó como indicador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder de 1000 pb (Invitrogene). La observación de los fragmentos amplificados se efectuó a través de un transiluminador de luz UV (Bio-Rad). Los resultados obtenidos se registraron en fotografías digitales para su análisis utilizando el programa QuantityOne 4.5.3, de BioRad®.

### 6.8 Secuenciación

Para obtener muestras de DNA para secuenciación se realizaron los procedimientos de clonación y posteriormente la transformación de células competentes como se describen a continuación. Las células transformadas fueron puestas a incubar para obtener colonias y cultivarlas con el objetivo final de obtener, después de su aislamiento, DNA plasmídico para ser enviado a secuenciar.

Para el alineamiento se utilizó la secuencia reportada del gen *ema1* con número de acceso XM\_004829445.1 y la secuencia reportada del gen *rap1* con número de acceso AF092736.1 en el GenBank.

Los protocolos de PCR para la amplificación del gen completo *ema1* para *T. equi* y *rap1* para *B. caballus* se describen a continuación:

Ema1 iniciadores:

Forward: Ema1-full-F 5'- ATGATTTCCAATCCTTTGCT-3'

Reverse: Ema1-full-R 5'- GTAAAATAGAGTAGAGAATGCAATGG-3

Los cuales amplifican un fragmento del nucleótido 65 al 880.

El protocolo de termociclado se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

95°C por 3 minutos

25 ciclos:

95°C por 30 segundos

51°C por 30 segundos

72°C por 20 segundos

72°C por 5 minutos

10°C final.

Rap1 iniciadores:

Forward: Bcab rap1 For 5'- ATGAGGTGTTCTGCGAGTT-3'

Reverse: Bcab rap1 Rev 5'- GAGAGAGGCTTCATAGTTGTC- 3

Los cuales amplifican un fragmento del nucleótido 119 al 1877.

El protocolo de termociclado se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

95°C por 3 minutos

25 ciclos:



95°C por 30 segundos

53°C por 30 segundos

72°C por 20 segundos

72°C por 5 minutos

10°C final.

### Clonación

1. Se prepararon las reacciones de clonación TOPO® en un tubo de PCR (cada una) usando los reactivos en el siguiente orden:

1µl de producto fresco de PCR

1µl de solución salina

2µl de agua libre de nucleasas

1µl de vector TOPO®

2. Al terminar, los reactivos se almacenaron nuevamente a -20°C. La solución salina y el agua se almacenaron a 4°C.
3. La reacción se mezcló suavemente e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (22° a 23°C), inmediatamente después se colocó en hielo y se procedió a la transformación de las células competentes One Shot® TOP10.

### Transformación

1. Se descongeló en hielo 1 vial de células One Shot® por cada transformación por aproximadamente 10 minutos.

2. Se atemperaron las placas con Luria Broth selectivas a ampicilina (LBA) a 37°C.
3. Se agregaron 2µl de la reacción de clonación TOPO® en un vial de células *E. coli* químicamente competentes One Shot® y se mezclaron suavemente. No se mezclaron por pipeteo.
4. Se incubaron en hielo por 15 minutos.
5. Se colocó el tubo con las células por 30 segundos a 42°C sin agitar.
6. Inmediatamente se transfirieron los tubos a hielo.
7. Se añadieron 250µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente.
8. Después de tapar perfectamente el tubo se puso a agitar horizontalmente (200rpm) a 37°C por 45 minutos.
9. Por cada transformación se extendieron de 10 a 200µl en una placa selectiva (con LBA) pre-calentada e incubaron a 37°C toda la noche. Se utilizaron dos placas por cada transformación con diferentes volúmenes, una con 50µl y otra con 200µl.

#### Análisis de colonias positivas

1. Se tomaron de 5 a 10 colonias y se cultivaron en medio LB con ampicilina (50µg/ml).
2. Se aisló el DNA plasmídico.
3. Se enviaron a analizar los plásmidos mediante secuenciación.

#### Cultivos para Mini-Prep

1. Se combinaron 1ml de caldo LB con 1µl de ampicilina 50mg/ml.

2. Se añadieron 3ml de LBA a un tubo de 15ml.
3. Se tomó una colonia de bacterias de una placa de LBA con un palillo.
4. Se colocó el palillo dentro del medio en el tubo.
5. Se taparon los tubos sin apretar y se aseguró la tapa con cinta.
6. Se incubó toda la noche a 37°C con agitación a 200rpm.
7. A la mañana siguiente el cultivo se removió de la incubadora y se almacenó a 4°C.

Aislamiento de DNA plasmídico usando el kit Wizard plus mini-prep (Promega, USA).

1. Se obtuvieron las pastillas (sedimento) a partir del cultivo mediante centrifugado en RT7+ a 3,000rpm por 10 minutos.
2. Se removió el sobrenadante a un contenedor de residuos biológicos y se autoclavearon los fluidos.
3. Se suspendió completamente la pastilla con 250µl de solución de resuspensión celular.
  - a. Se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml previamente rotulado.
4. Se añadieron 250µl de solución de lisis celular a cada muestra; para mezclar se invirtió el tubo 4 veces.
5. Se añadieron 10µl de solución de proteasa alcalina; para mezclar se invirtió el tubo 4 veces. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

6. Se añadieron 350µl de solución de neutralización; para mezclar se invirtió el tubo 4 veces.
7. Se centrifugó a máxima velocidad de microcentrífuga por 10 minutos a temperatura ambiente.
  - a. Se ensambló la columna en el tubo de colección.
8. Se decantó el lisado en la columna.
9. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el filtrado y se reinsertó la columna en el tubo de colección.
10. Se añadieron 750µl de solución de lavado (con etanol agregado). Se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto.
11. El paso 11 se repitió con 250µl de solución de lavado.
12. Se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.
13. Se transfirió la columna a un tubo estéril de 1.5ml para microcentrífuga. Se tuvo cuidado de no transferir nada de solución de lavado junto con la columna.
14. Se añadieron 50-100µl de agua libre de nucleasas a la columna. Se dejó reposar por 1 a 5 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Finalmente se descartó la columna y se procedió a almacenar el DNA a -20°C.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Muestreo

Durante la recolección de muestras en los Estados de Chiapas, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco y Yucatán se obtuvieron un total de 269 muestras de sangre y suero de caballos, mulas y asnos.

En el cuadro 3 se especifican las localidades donde se llevaron a cabo los muestreos, así como las características geográficas y climáticas de cada una.

**Cuadro 4. Características geográficas y climáticas de las localidades de muestreo.**

<b>Estado</b>	<b>Localidad</b>	<b>Ranchería</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Altitud</b>	<b>Temperatura media anual</b>	<b>Precipitación Pluvial media</b>	
<b>Chiapas</b>	Cintalapa,		16° 39' N y 93° 44' W	540 msnm.	24.5°C	800 mm anuales	
	Tonalá,		16° 06' N y 93° 45' W	60 msnm	27.1°C	1653 mm anuales	
	Mapastepec,		15° 26' N y 92° 54' W	50 msnm.	22.2°C	2,500 mm anuales	
	Cacahoatán,		14° 59' N y 92° 10' W	480 msnm.	25.4°C	4,120 mm anuales	
	Tuxtla Gutiérrez,		16° 45' N y 93° 07' W	600 msnm	26.5°C	2,030 mm anuales	
	Ocozocoautla		16° 45' N y 93° 22' W	820 msnm	23.4°C	951 mm anuales	
		Llano San Juan,					
		Playas de Catazajá,		17° 44' N y 92° 01' W	10 msnm	26.4°C	2,322 mm anuales
		Yajalón,		17° 10' N y 92° 20' W	800 msnm	25.7°C	2,120 mm anuales
		San Pablo Chalchihuitán		16° 58' N y 92° 39' W	1,450 msnm	22.5°C	2,036 mm anuales
<b>Querétaro</b>	Arroyo Seco		21° 15'- 21° 35' N/99° 25' y 99° 47' W	560 msnm	22°C	10.5 mm anuales	
		San José de las Flores,					
		Casas Viejas, El Bosque, El Sabinito, Agua Fría.					
	Landa de Matamoros		21° 06' y 21°27' N 99° 03' a 99° 22' W	350 msnm.	22°C	920 mm anuales	
	Jalpan de Serra		21°40'- 21°05'N/99°06'- 99°32' W	200 msnm.	24.5°C	1500 mm anuales	
<b>Tabasco</b>	Huimanguillo,		17°19' N 93°23' W	29 msnm	26.9°C	2,290.3 mm anuales	
	Macultepec,		18°20' N 93°15' W	10 msnm	33.6°C	2,237 mm anuales	

<b>Yucatán</b>	Nacajuca	18°09' N 93°01' W	10 msnm	26.4°C	1,707 mm anuales
	Tzucacab	19° 38' y 20° 09' N 88° 59' y 89° 14' W	36 msnm	25.8°C	108.4 mm anuales
	Hobonil,				
	Sucilá,	21°07'- 21°14' N/ 88° 16'-88° 25' W	12 msnm	26.4°C	70.1 mm anuales
	Buctzotz,	21°06' - 21°25" N / 88°21"- 88°51" W	7 msnm	26.3°C	469 mm anuales
<b>Sinaloa</b>	Tizimín,	07°58' N/88°09'04" W	15 msnm	25.8°C	1,084 mm anuales
	Muna,	20°24'-20°35' N/ 89°37'-89°47' W	29 msnm	25.5°C	69.7 mm anuales
	Temozón.	20° 48'-20° 57' N /87° 47'-88° 16' W	22 msnm	25.8°C	82 mm anuales
	Culiacán	24°02"- 25°14"N/106°56"-107°50"W	53 msnm	24°C	658 mm anuales
	Aguaruto				
<b>San Luis Potosí</b>	Ciudad Valles	21° 59"N / 99°01"W	70 msnm	24.5°C	1,400 mm anuales
	Tantoc				
	Laguna del Mante				
	Gallitos				
	Tamuín	21°46"- 22°24"N/98°24"- 98° 27" W	20 msnm	25.8°C	883 mm anuales
	Tampaón				

Fuente: [www.inafed.gob.mx](http://www.inafed.gob.mx)

## 7.2 Análisis taxonómico

Se obtuvieron garrapatas de 130 équidos, mismas que fueron separadas y rotuladas con la identificación del équido; posteriormente se lavaron y se enviaron muestras al Centro Nacional de Constatación en Sanidad Animal (CENAPA) en el Estado de Morelos para realizarse un análisis taxonómico. Estos análisis reportaron la identificación de *Amblyomma imitator* en Querétaro, *Amblyomma cajennense* en Yucatán y *Dermacentor (Anocentor) nitens* en San Luis Potosí y Tabasco. Estos análisis no revelaron presencia de garrapatas *Rhipicephalus microplus* tal como se expone un fragmento de los análisis en la Figura 5 (número de muestra 2). En Chiapas y Sinaloa no se pudo colectar ningún estadio de garrapatas en los caballos muestreados.

No. Muestra	Clave	♀ -R	♀ -S/R	♂	Ninfa s	Género y especie
1	San José de las Flores de Vaca	-	2	1	3	<i>Amblyomma imitator</i>
		-	1	-	-	<i>Boophilus microplus</i>
2	San José de las Flores de Caballo	-	2	-	3	<i>Amblyomma imitator</i>
3	San José de las Flores Humano	-	1	2	-	<i>Amblyomma imitator</i>
4	Rancho 3 Cruces	1	2	2	-	<i>Amblyomma imitator</i>
5	Rancho 3 Cruces Bovino	-	3	1	2	<i>Amblyomma imitator</i>
6	Los Aguacates 3, 2, 1	2	4	-	-	<i>Boophilus microplus</i>
7	Garrapatas de becerra de Amazcala	2	1	-	-	<i>Dermacentor Albipictus</i>

**Figura 5. Fragmento de los resultados del análisis taxonómico de garrapatas, realizado por el MC Francisco Martínez Ibáñez. En rojo se muestra la clasificación de las garrapatas obtenidas del Estado de Querétaro.**



### 7.3 Diagnóstico serológico de *Babesia caballi* y *Theileria equi* mediante el cELISA

Con las muestras de sueros se realizó la prueba inmunológica de ELISA competitiva (cELISA, VMRD), para la detección de anticuerpos contra *Babesia caballi* y *Theileria (Babesia) equi*. Se utilizaron 3 placas de 96 pozos para la detección de anticuerpos contra cada especie; en cada una de las placas se utilizaron 3 pozos para los controles negativos, 2 pozos para controles positivos y 1 pozo vacío como blanco; la lectura de las placas se realizó a 655 nm. De acuerdo con la estandarización de esta prueba y con base en las instrucciones de la misma, se calculó el porcentaje de inhibición (%I) siguiendo las indicaciones del fabricante, cuyo resultado determinó la positividad de las muestras.

Los resultados del cuadro 5 y la figura 6 señalan que, en el Estado de Querétaro, 30 muestras fueron colectadas y analizadas, siendo 14 positivas a anticuerpos contra *T. equi* y 15 fueron positivas a anticuerpos contra *B. caballi*, 15 muestras fueron negativas a ambos parásitos; 14 de las 30 muestras estuvieron coinfectadas. En el Estado de Tabasco, 33 muestras fueron colectadas y analizadas, siendo 24 positivas a anticuerpos contra *T. equi* y 22 fueron positivas a anticuerpos contra *B. caballi*, sólo 7 muestras fueron negativas a ambos parásitos y 20 de las 33 demostraron estar coinfectadas. En el Estado de Chiapas, 77 muestras fueron colectadas y analizadas, siendo 55 positivas a anticuerpos contra *T. equi* y 70 fueron positivas a anticuerpos contra *B. caballi*, sólo 2 muestras fueron negativas a ambos parásitos y 50 de las 77 muestras estuvieron coinfectadas. En el Estado de Yucatán, 61 muestras fueron colectadas y analizadas, siendo 59 positivas a anticuerpos contra *T. equi* y 19 fueron positivas a anticuerpos contra *B. caballi*, sólo 2 muestras fueron negativas a ambos parásitos y 19 de 61 muestras revelaron coinfección. En el Estado de Sinaloa, 34 muestras fueron colectadas y analizadas, solo 1 positiva a anticuerpos contra *T. equi* y 1 positiva a anticuerpos contra *B. caballi*, 33 muestras fueron negativas a ambos parásitos y solamente 1 muestra mostró coinfección. En el Estado de San Luis Potosí, también fueron colectadas y analizadas 34 muestras, siendo 31 positivas a

anticuerpos contra *T. equi* y 23 positivas a anticuerpos contra *B. caballi*, solamente 2 muestras fueron negativas a ambos parásitos y 22 de las 34 muestras demostraron coinfección.

Del total de 269 muestras, 184 fueron positivas a anticuerpos contra *Theileria equi*; mientras que contra *Babesia caballi*, 150 muestras resultaron positivas, como también se puede observar en la figura 7.

**Cuadro 5. Número de animales positivos a piroplasmosis mediante la detección de anticuerpos por cELISA.**

	Querétaro	Tabasco	Chiapas	Yucatán	Sinaloa	San Luis Potosí	Totales
Total de muestras	30	33	77	61	34	34	<b>269</b>
Positivas a <i>T. equi</i>	14	24	55	59	1	31	<b>184</b>
Positivas a <i>B. caballi</i>	15	22	70	19	1	23	<b>150</b>
Negativas a ambos	15	7	2	2	33	2	<b>61</b>

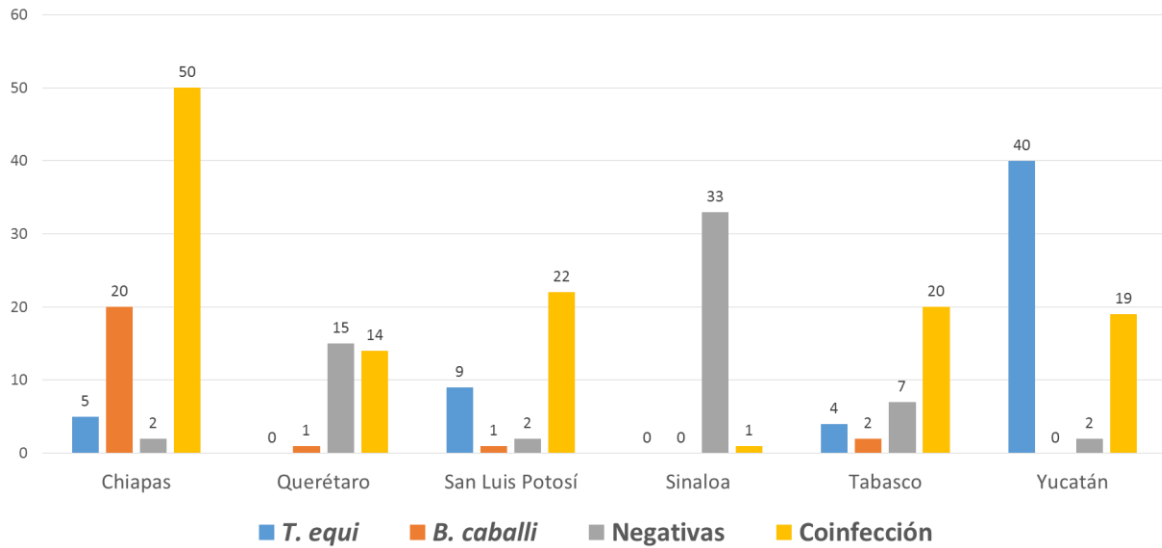


Figura 6. Resultados de cELISA por estado. Se observan el número de animales positivos a *T. equi* (azul), número de animales positivos a *B. caballi* (naranja), animales negativos (gris) y finalmente los valores de coinfección de las muestras (amarillo).

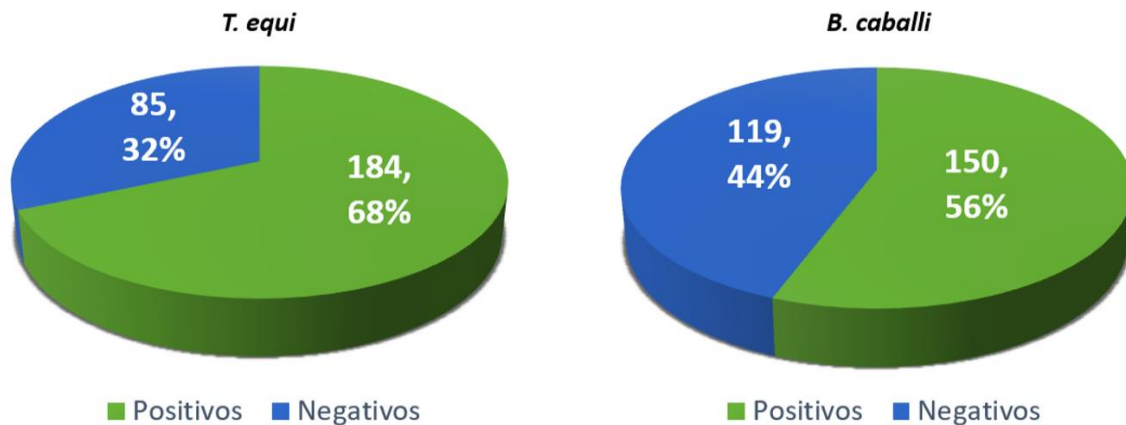


Figura 7. Cifras totales de animales positivos en la prueba cELISA. A la izquierda, en verde, el número y porcentaje de animales positivos a anticuerpos contra *Theileria equi*; a la derecha, en verde, animales positivos a anticuerpos contra *Babesia caballi*.

#### 7.4 Diagnóstico molecular de *Babesia caballi* y *Theileria equi* mediante nPCR

Las muestras de sangre fueron utilizadas para la extracción de DNA. A continuación se muestra un fragmento (Cuadro 6) de los resultados obtenidos de la determinación de la concentración de DNA en las muestras procesadas.

**Cuadro 6. Fragmento de los resultados de extracción de DNA.**

Muestra	Concentración	U	260/280
91	52.9	ng/μl	1.71
92	32.2	ng/μl	1.79
93	10.7	ng/μl	1.41
94	81.8	ng/μl	1.8
95	58	ng/μl	1.85
96	63.2	ng/μl	1.77
97	27	ng/μl	2.06
98	66.4	ng/μl	2.14
99	65.5	ng/μl	1.36
100	21.2	ng/μl	1.89

A continuación se llevaron a cabo las pruebas de PCR anidada (nPCR) para determinar la presencia de DNA de los patógenos en las muestras de DNA provenientes de sangre de los équidos. En las siguientes imágenes se muestran fragmentos de los resultados obtenidos mediante la resolución de los amplicones (227 bp y 222 bp para *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente) por electroforesis en gel de agarosa al 1% para detección de *T. equi* (figura 8) y *B. caballi* (figura 9).

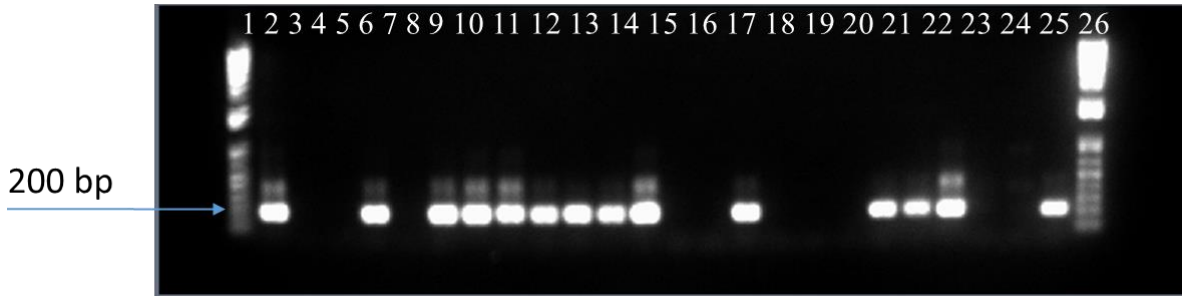


Figura 8. Fragmento de los resultados de la nPCR para *Theileria equi*. Carril 1 y 26: 1kb Plus DNA ladder Invitrogene; Carril 2: gDNA *T. equi*, Carril 3: Agua libre de nucleasas; Carriles 4-25: Muestras de DNA de equinos de México.

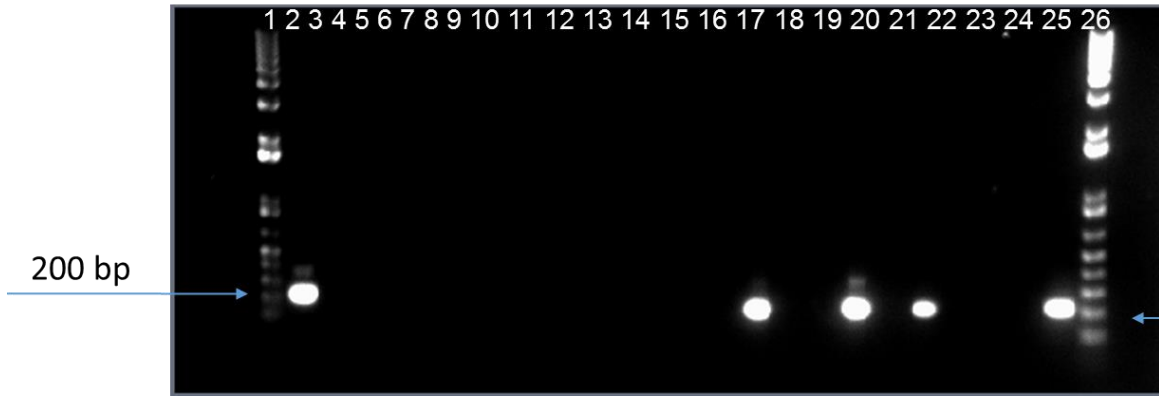
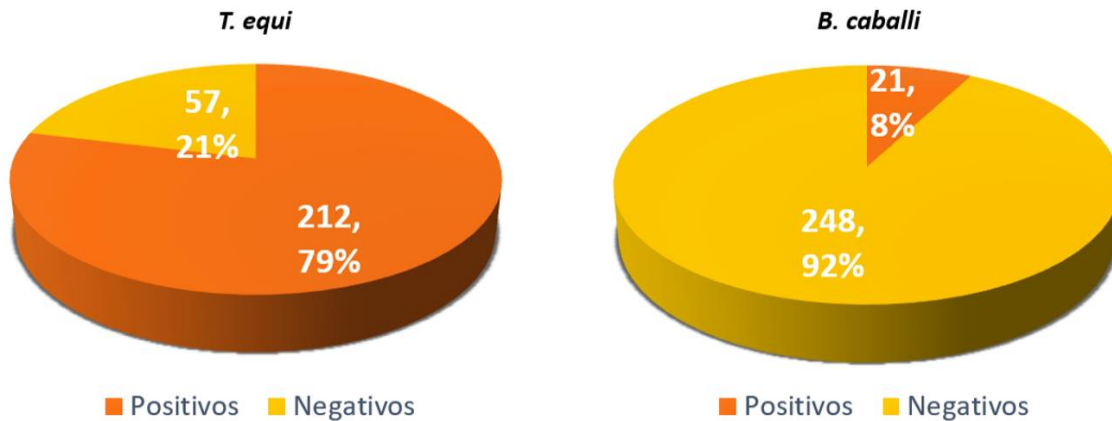


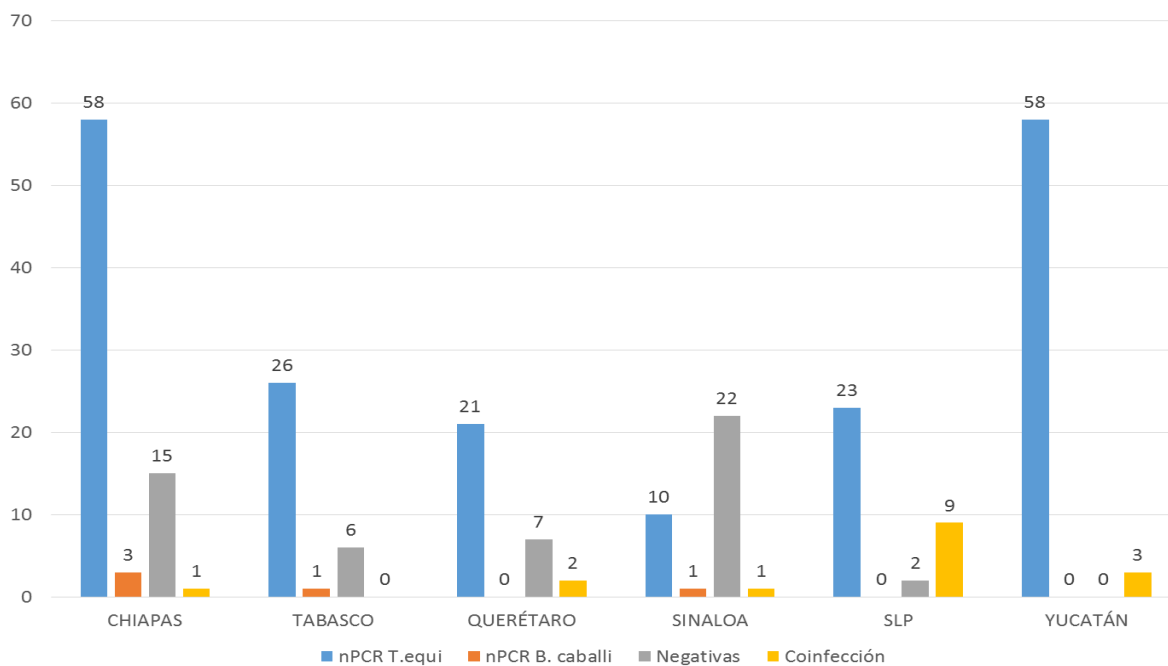
Figura 9. Fragmento de los resultados de la nPCR para *Babesia caballi*. Carril 1 y 26: 1kb Plus DNA ladder Invitrogene; Carril 2: gDNA *B. caballi*, Carril 3: Agua libre de nucleasas; Carriles 4-25: Muestras de DNA de equinos de México.



**Figura 10. Cifras totales de animales positivos en la prueba nPCR. A la izquierda, en naranja, el número y porcentaje de animales positivos a DNA de *Theileria equi*; a la derecha, en naranja, animales positivos a DNA de *Babesia caballi*.**

Del total de 269 muestras de DNA extraídas, 212 fueron positivas a *Theileria equi* y sólo 21 fueron positivas a *Babesia caballi* (figura 10). Como se observa también en el cuadro 7, de las 77 muestras colectadas de Chiapas, 58 fueron positivas a *T. equi*, 3 positivas a *B. caballi* y 15 negativas a ambos, 1 de las 77 muestras estaba coinfectada. De 33 muestras de Tabasco, 26 resultaron positivas a *T. equi*, 1 positiva a *B. caballi* y 6 negativas a ambos; ninguna de las 33 muestras estuvieron coinfectadas. De 30 muestras de Querétaro, 21 resultaron positivas a *T. equi*, ninguna fue sólo positiva a *B. caballi* y 7 fueron negativas a ambos; 2 de las 30 muestras estuvieron coinfectadas. De 34 muestras de Sinaloa, 10 resultaron positivas sólo a *T. equi*, 1 fue positiva sólo a *B. caballi* y 22 negativas a ambos; 1 muestra de las 34 mostró coinfección. De 34 muestras de San Luis Potosí, 23 resultaron positivas a *T. equi*, ninguna fue sólo positiva a *B. caballi* y 2 fueron negativas a ambos; 9 de las 34 muestras demostraron coinfección. De 61 muestras de Yucatán, 58 resultaron positivas a *T. equi*, ninguna fue sólo positiva a *B. caballi*, 3 de 61 muestras revelaron coinfección y tampoco hubo muestras

negativas a ambos, como se puede observar en la figura 11, donde se observa claramente una mayor detección de *T. equi* por sobre la detección de *B. caballi*.



**Figura 11. Resultados de nPCR por Estado. Se exponen las muestras positivas a *T. equi* (azules), positivas a *B. caballi* (naranjas), negativas a ambos (grises) y muestras coinfectadas (amarillas).**

En el cuadro 7, a continuación, se muestran los resultados numéricos de ambas pruebas (cELISA y nPCR) por número de muestras y su equivalencia en porcentaje de animales positivos tanto a *Babesia caballi* como a *Theileria equi*.

**Cuadro 7. Resultados comparativos por Estado entre cELISA y nPCR.**

Estado	Total muestras	cELISA <i>T.equi</i>	cELISA <i>B. caballi</i>	nPCR <i>T.equi</i>	nPCR <i>B. caballi</i>
CHIAPAS	77	55 (71.4%)	70 (90.9%)	59 (76.6%)	4 (5.2%)
TABASCO	33	24 (72.7%)	22 (66.6%)	26 (78.7%)	1 (3.03%)
QUERÉTARO	30	14 (46.6%)	15 (50%)	23 (76.6%)	2 (6.6%)
SINALOA	34	1 (2.9%)	1 (2.9%)	11 (32.3%)	2 (5.8%)
SLP	34	31 (91.1%)	23 (67.6%)	32 (94.1%)	9 (26.4%)
YUCATÁN	61	59 (96.7%)	19 (31.1%)	61 (100%)	3 (4.9%)
<b>Totales</b>	<b>269</b>	<b>184 (68.4%)</b>	<b>150 (55.7%)</b>	<b>212 (78.8%)</b>	<b>21 (7.8%)</b>



## 7.5 Secuenciación

A partir de las muestras positivas en la nPCR se realizaron 30 reacciones de clonación de los productos de PCR para *T. equi* y 13 para *B. caballi*, utilizando el sistema TOPO®. Se seleccionaron varias colonias de bacterias las cuales fueron analizadas por PCR para comprobar la presencia del inserto y después fueron cultivadas en medio LB más ampicilina; posteriormente se aisló el DNA plasmídico y éste fue enviado a secuenciar en ambas direcciones, cinco veces cada muestra.

Las muestras secuenciadas fueron analizadas en el programa BioEdit y posteriormente se realizó un alineamiento con el programa ClustalOmega para encontrar diferencias entre las secuencias de los diferentes Estados. En la figura 12 se muestra el mapa de la secuencia del gen *ema1* y los iniciadores para ese gen mientras que en la figura 13 se muestra un fragmento del alineamiento de las secuencias obtenidas en este trabajo con la secuencia reportada en el GenBank del gen *ema1* con número de acceso XM\_004829445.1 en la cual se observa la homología entre las secuencias obtenidas con la secuencia previamente reportada.

```
>XM_004829445.1 Babesia equi equi merozoite antigen 1 (BEWA_026850) mRNA,
complete cds
GTGTCACTATACATTTATCGCTCAAATCGCCTTGAAGTTTTAGGGTGAAGAAATTTCTGTCAAGATGATT
TCCAAATCCTTTGCTTTTGTTCGCATCCATTGCCATTTTCGAGCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCA
AGGCCTCTGGAGCTGTCGTCGACTTCCAGTTGGAGTCCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGA
GGAGCACATCGTCTACACTGCTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATC
AAGACCTTTGACTTGAAGGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACG
TCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTGCGAGCTCGA
GGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTC AAGGGCTTCGAGGCCGTCTCCGTTGACTTGGCCGCTGCA
GTCTCCGACAAGTTCACCGAGACCACCTTTGGCTCCGGCAAGAAGCACACCTTCAAGGCTCCAGGCAAGC
GCGTCCTCAAGGTCGTCGATGGCAAGACTGAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGA
GCTCTTTGTTTTCCAGTGACAACAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAG
GAAATCTTCTTGAAACTCGTTGAAAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTTGC
ATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTACAAGGTCGTATACGATGGCTTCTCCGTCTATGGCGCACT
CTTGGCTGTCGCCGCCATGTCATTTTCTACTCTATTTTACTAAGTGACGACATGCTCATAAAATTGTGAT
CATGTATA
```

**Figura 12. Mapa de la secuencia del gen *ema1*. En azul se marca el iniciador sentido y en morado el iniciador antisentido.**

```

1-1_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAATTGG
1-2_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAATTGG
1-4_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAATTGG
1-5_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAATTGG
XM_004829445.1     GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAATTGG
1-3_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAATTGG
*****

1-1_C1PE1516M      AGTCCATTGACCACTGACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACTGCTC
1-2_C1PE1516M      AGTCCATTGACCACTGACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACTGCTC
1-4_C1PE1516M      AGTCCATTGACCACTGACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACTGCTC
1-5_C1PE1516M      AGTCCATTGACCACTGACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACTGCTC
XM_004829445.1     AGTCCATTGACCACTGACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACTGCTC
1-3_C1PE1516M      AGTCCATTGA-CACCTGACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACTGCTC
*****

1-1_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-2_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-4_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-5_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
XM_004829445.1     ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-3_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
*****

1-1_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-2_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-4_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-5_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
XM_004829445.1     TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-3_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
*****

1-1_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-2_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-4_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-5_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
XM_004829445.1     TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-3_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACAGTGATAAGTGGGTCG
*****

```

**Figura 13. Fragmento de alineamiento para *ema1*. Se muestran cinco secuencias obtenidas a partir de *T. equi* mexicanas alineadas con la secuencia reportada en el GenBank con número de acceso XM\_004829445.1 para *ema1* de *T. equi*.**

Así mismo, en la figura 14 se muestra el mapa de la secuencia del gen *rap1* y los iniciadores para ese gen mientras que en la figura 15 se muestra un fragmento del alineamiento de las secuencias obtenidas en este trabajo con la secuencia reportada en el GenBank del gen *rap1* con número de acceso AF092736.1 en la cual se observa la homología entre las secuencias obtenidas con la secuencia previamente reportada.

```
>AF092736.1 Babesia caballi clone X6 rhostry-associated protein 1 (RAP-
mRNA, complete cds
TATCTTTATACTAATCATATATAGCTGTGCTGTGTATGTTTGTGTCTATAACAAGGCACTTTGTGTAATAG
GGTTGTGTCTATTGCCAGATACTGATACTTACAGGCGTGTATCGTACAATGAGGGTGTCTGCGAGTTTCGC
TTTTCGGGCGCCCTCTTGCTTGTAGCAAGGGGTGCCCTGGCCGTTTGGCCACAACAGCCGTGTTTCCATCAT
GGCTCCCAGCGACTCTGTGGGCGACGTGACTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAGTGTGGACTCAGCT
GCCAATGCCTATATGATCAACAGTGAACATGAGCGATTACTTGTGGCTGTGTCTGACAACCTCGCCGAGC
GCATTTGCAGTCAGGTCCCTAAGGGGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGCGC
TAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAACCGCTGACCCTT
CCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGATTTATACTCTTCAAGGAGAGTGACGCTAATCCGGCCAATAGCA
CTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTTCAGAAAGGGGCAAGAACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAA
TCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGACCGCGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTG
TACATGGCCACGCTTACTACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAAGT
TGTCTTTCACTACTGGGTGTTTCGGCTGGGGCATCAAGAGGGCACTTAAGCAGATTATTCGCTCTAACCT
GCCCTTGACATCGGGACAGAACACAGCGTCACTCGCCTGCAGCACATTACGAGCAGTTACAAGGATTAC
ATGGATACGCAGATTCCCTGCACTGCCCAAGTTCGCGAAGCGTTTCTCCCTTATGGTAGTGCAGAGGCTGC
TGGCCACCGTGGCTGGTTACGTCGACACCCCGTGGTATAAGAAGTGGTACATGAAGCTGAAGAACTTTAT
GGTGAACAGGGTGTTCATTCCTACAAAGAAGTTCCTCAATAAGGAAATTCGTGAGCCCTAGTAAGGCATTA
AAAGAAAAGGTGTCAACCGACACCAAGGATTTATTCGAGAACAAAATTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCT
TCAATAAGGAAAATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTAAGAAGAAAAGTGTCAAACGACGCCAAGGATTTATT
CGAGAACAAAATTTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCATCAATAACGAAATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTA
ATAAGAAAAGTGTCAACGGGGGCCGAGGATTTATTCGAGAACAAAATTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCA
TCAATAACGAAAATTCGTGACCCTGGTAAGGCATTAATAAGAAAAGTGTACACCGAGGCCGATGATTTATT
CGAGAACAAAATTTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCATCAATAAGGAAATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTA
ATAAGAAAAGTGTCTACCGAGGCCGATAATTTATTTGGAGAAATAGGTTGCGAAGCCCTGAGGAAGCACC
GCAAGGGCAACGTTAGTGACAGCGGGGAATCTGAGGAAATTTCCGGCTGTGGGTGAATCTTTGGAATCCGA
CAACGAAATGAAGACCCAGGAGTCAATGAACTCGGAGAGTGCTTCTACCGAACTCCCTTCTGAGGAGTCC
GAGGGAAGAGTCGGCTGCTATGGTTATTGAGCAGCCACCCTGGAGGAGGCCAGCCAGATCGCATTGCCT
GCTGAAGAAGACAGCTCAGAGTTGCAGGAAACCTCCGACAACTATGAAGCCTCTCTCTAGTCACCTTTGA
CGTCCATCGCACTGCTCGGAGAATATAAAAACGCATTGCTCGGTTGCACTCTAG
```

Figura 14. Mapa de la secuencia del gen *rap1*. En azul se marca el iniciador sentido y en verde el iniciador antisentido.

```

1-1_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAAGTTGG
1-2_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAAGTTGG
1-4_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAAGTTGG
1-5_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAAGTTGG
XM_004829445.1     GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAAGTTGG
1-3_C1PE1516M      GCATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCCAAAGGCCTCTGGAGCTGTCGTGCGACTTCCAAGTTGG
*****

1-1_C1PE1516M      AGTCCATTGACCAACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTC
1-2_C1PE1516M      AGTCCATTGACCAACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTC
1-4_C1PE1516M      AGTCCATTGACCAACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTC
1-5_C1PE1516M      AGTCCATTGACCAACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTC
XM_004829445.1     AGTCCATTGACCAACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTC
1-3_C1PE1516M      AGTCCATTGA-CACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTC
*****

1-1_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-2_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-4_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-5_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
XM_004829445.1     ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
1-3_C1PE1516M      ATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACT
*****

1-1_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-2_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-4_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-5_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
XM_004829445.1     TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
1-3_C1PE1516M      TGAAGGAACAAAACCCAAAGACTGTCGTGAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTGCG
*****

1-1_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-2_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-4_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-5_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
XM_004829445.1     TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCG
1-3_C1PE1516M      TCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACAGTGATAAGTGGGTCG
*****

```

Figura 15. Fragmento de alineamiento para *rap1*. Se muestran cinco secuencias obtenidas a partir de *B. caballi* mexicanas alineadas con la secuencia reportada en el GenBank con número de acceso AF092736.1 para *rap1* de *B.caballi*.

## VIII. DISCUSIÓN

Para la determinación del tamaño de muestra en el presente estudio (n=269) se utilizó la fórmula descrita por Jaramillo y Martínez (2010) para este efecto cuando no se conoce el tamaño de la población, por lo que se tomaron como referencia trabajos en los que se han realizado pruebas serológicas y/o moleculares (Bashiruddin *et al*, 1999; Nicolaiewsky *et al*, 2001; Rampersad *et al*, 2003; Sigg *et al*, 2010; Rosales *et al*, 2013; García-Bocanegra *et al*, 2013) para determinar la presencia de piroplasmosis equina y con ello poder tener una aproximación para calcular la probabilidad de encontrar esta infección en los seis Estados de la República Mexicana que se seleccionaron. Dichos Estados fueron seleccionados tomando en cuenta sus características climáticas (Cuadro 3) –las que son de importancia por la influencia del clima en la presencia del vector, tal como describen Scoles y Ueti (2015), Wise y colaboradores (2014) y Roshtchild (2013)–, así como por la posibilidad de reunir el número mínimo de animales para el muestreo en cada Estado.

El análisis taxonómico reportado en este trabajo reveló la presencia de *Amblyomma imitator* en Querétaro, *Amblyomma cajennense* en Yucatán y *Dermacentor (Anocentor) nitens* en San Luis Potosí y Tabasco, mientras que no se encontraron garrapatas *Rhipicephalus microplus*. No obstante, Wise y colaboradores (2014) apuntan a *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como garrapatas transmisoras de *Theileria equi*, así como a *Dermacentor nitens*, *D. albipictus* y *D. variabilis* como transmisoras de *Babesia caballi* en América del Norte, Sin embargo, en el presente trabajo, no se realizaron estudios con las garrapatas para confirmar la presencia o la transmisión de los hemoparásitos, debido en parte a la falta de uniformidad en el número de garrapatas colectadas a consecuencia de las diversas situaciones climáticas cada Estado así como al manejo previo que pudieron tener los équidos muestreados, en cuanto a aplicación de tratamientos garrapaticidas o baños como medida de manejo preventivo.

Utilizando la técnica de ELISA competitiva la cantidad de muestras positivas fue más elevada (55.7%) que los resultados de la PCR anidada (7.8%) en el caso de *Babesia caballi* (cuadro 5); esto podría deberse a diferentes factores, tales como las características evaluadas por cada técnica ya que con la prueba de ELISA se buscan anticuerpos mientras que con la PCR se busca el DNA del parásito. Los anticuerpos pueden estar presentes pocos días después del contacto inicial del sistema inmune con el parásito (Kindt *et al*, 2007) hasta mucho tiempo después de que el parásito haya sido eliminado del hospedero, lo cual puede suceder sin que se le haya dado tratamiento (Wise *et al*, 2014; de Waal, 1992), es decir que, el DNA parasitario podrá encontrarse durante el tiempo correspondiente del periodo prepatente hasta la eliminación del parásito del équido; estos resultados coinciden en comportamiento con los reportados por Rosales *et al* (2013) quienes encontraron por cELISA un 23.2% de positividad mientras que la PCR confirmó sólo un 4,4% de las muestras positivas.

En el presente trabajo la prueba de cELISA demostró una seroprevalencia de 68.4% para *Theileria equi* contra 55.7% para *Babesia caballi*. De acuerdo con lo reportado por García-Bocanegra y colaboradores (2013) la seropositividad fue notablemente más elevada para *Theileria equi* (50.3%) que para *Babesia caballi* (11.4%); también Cantú-Martínez y colaboradores (2012), encontraron una mayor seropositividad para *T. equi* (45.2%) que para *B. caballi* (27.4%) utilizando la misma prueba. En tanto que la nPCR demostró un 78.8% de muestras positivas para *Theileria equi* contra un 7.8% de muestras positivas a *Babesia caballi*. Estas diferencias pueden deberse a la posibilidad de que *Babesia caballi* pueda eliminarse del hospedero sin necesidad de tratamiento, tal y como se mencionó con anterioridad, así como al momento en que fue tomada la muestra, pues cabe recordar que la recolección de muestras se llevó a cabo en una sola toma a cada équido, por lo que se pudo haber obtenido la muestra en un periodo de tiempo en el cual el título de anticuerpos no haya sido suficientemente elevado para ser detectado –en el caso de los animales negativos a anticuerpos pero positivos a DNA– mientras que para el caso donde no hubo detección de DNA pero si de

anticuerpos, hay que recordar que algunos animales pudieran tener anticuerpos maternos circulantes (Rovid *et al.*, 2010) además de que aún existe la remota posibilidad que la parasitemia no haya sido lo suficientemente elevada por haberse colectado la muestra en el periodo inicial de la infección o que se hubiese tomado cuando se presentaba secuestro capilar (Wise *et al.*, 2014).

De acuerdo con datos proporcionados por la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo de SENASICA-SAGARPA, durante el periodo comprendido del año 2010 a agosto de 2016 (cuadro 1) fueron enviadas de todo el país 6,790 muestras para diagnóstico de piroplasmosis equina, de las cuales sólo 643 fueron positivas, lo que equivale al 9.46% de muestras positivas solamente; mientras que en el cuadro 2 se muestran los datos generales de las muestras provenientes de los seis Estados estudiados en este trabajo, durante el periodo comprendido del año 2010 a agosto de 2016, el cual demuestra que el total durante estos años fue de 1067 muestras, de las que 177 fueron positivas, lo cual equivale al 16.78%, todo esto independientemente de la técnica diagnóstica utilizada, sin embargo, como se mencionó con anterioridad, las técnicas mayormente utilizadas fueron la fijación del complemento y la observación microscópica, las cuales presentan grandes desventajas en cuanto a sensibilidad se refiere (McGuire, 2005). Estos datos de la DEAR, muestran un precedente que contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo. Cabe aclarar que los datos proporcionados por la DEAR no especifican si dichas muestras fueron positivas a uno o ambos parásitos, además de que no se utilizó la misma prueba diagnóstica para cada muestra, debido a lo cual dichos reportes arrojan resultados correspondientes a identificación del parásito o presencia de anticuerpos, los cuales pueden ser solamente anticuerpos de memoria o bien anticuerpos maternos.

En la secuenciación realizada en este trabajo no se encontraron diferencias entre los aislados que indiquen la presencia de una cepa diferente a las reportadas. Mahmoud y colaboradores (2016) señalan que la secuenciación del gen *rap-1* de *B. caballii* les mostró una alta conservación de nucleótidos entre aislados de équidos de Egipto con la secuencia de referencia en el GenBank.

A pesar de ser una enfermedad de notificación obligatoria, la diferencia entre lo reportado por las instancias oficiales con los resultados de este trabajo, pueden deberse a distintos motivos: el primero y más común es el movimiento continuo de animales y el cambio de propietarios que favorecen la pérdida de información respecto al historial clínico de los animales; segundo, ésta es una enfermedad que puede pasar desapercibida una vez que los animales han superado la etapa aguda y en el caso de *Theileria equi* se convierten en portadores asintomáticos de por vida, lo cual contribuye en gran medida a la diseminación de la enfermedad (Grause *et al*, 2013; Ueti *et al*, 2008); tercero, en muchos lugares de la República, existen propietarios que utilizan incorrectamente los fármacos disponibles contra esta enfermedad (si es que los usan) pues muchas veces no terminan los tratamientos o subdosifican, lo cual puede beneficiar la resistencia de los parásitos a los fármacos en uso (Mosqueda *et al*, 2012); cuarto, además está el problema de resistencia de las garrapatas, puesto que en algunos lugares los caballos son introducidos a los baños de inmersión junto con los bovinos, situación que impide determinar la dosis exacta del fármaco garrapaticida que está recibiendo cada équido, sin contar además que los animales continúan en el mismo hábitat en el que las garrapatas existen; quinto, finalmente no se puede dejar de lado el factor humano, es decir la transmisión iatrogénica, cuando el manejo preventivo de otras enfermedades (la aplicación de vacunas) o la medicación en ocasiones realizada por los dueños o los encargados de las caballerizas o establos, se convierte en un factor de riesgo de infección, puesto que se lleva a cabo sin los conocimientos necesarios para evitar la diseminación de enfermedades.



## IX. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron 269 muestras de sangre y suero de equinos de seis Estados de la República Mexicana, de las cuales 55.7% fueron positivas a anticuerpos contra *B. caballi* y 7.8% fueron positivas a la presencia de DNA del mismo parásito, en tanto que contra *T. equi*, el 68.4% fueron muestras positivas a la presencia de anticuerpos y 78.8% a la presencia del DNA. Por lo tanto, se concluye que la piroplasmosis equina es una enfermedad que se encuentra presente en los equinos de México debido a la presencia en la sangre de los equinos tanto de anticuerpos contra los parásitos causantes, *Babesia caballi* y *Theileria equi*, como del DNA de los mismos parásitos, los cuales son transmitidos por garrapatas *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma imitator* y *Anocentor nitens*, cuyas zonas endémicas son regiones de clima cálido tal como lo reporta la literatura.

Dado que el presente trabajo fue un estudio prospectivo tal como su título lo indica, es necesario ampliar el conocimiento en esta enfermedad empezando por su distribución y factores que influyen en su presentación, realizando un estudio epidemiológico que abarque una mayor cantidad de territorio nacional, siendo el objetivo determinar la presencia y factores de riesgo en todo el país. Así mismo, es necesario estudiar la transmisión de esta infección a los equinos por los diferentes géneros de garrapatas.

### 9.1 Perspectivas

La colaboración con instituciones dedicadas a la salud o zootecnia equina es recomendable para ampliar la cobertura del estudio y obtener mayor retroalimentación. Igualmente, es indispensable la participación de las instituciones gubernamentales dedicadas a la salud, epidemiología y bioseguridad para establecer en primer lugar un estudio nacional eficiente y representativo, al igual que acciones de prevención y control (idealmente eliminación) de la enfermedad, las cuales deben ir de la mano con la educación a los propietarios,

trabajadores y MVZ para realizar diagnósticos tempranos eficientes y de calidad y de esta forma controlar la dispersión.

## **9.2 Financiamiento y Participación**

Este trabajo fue realizado bajo el Financiamiento del proyecto “Diagnóstico temprano y prospección de patógenos emergentes de importancia zoonótica transmitidos por garrapatas” sufragado por CONACyT con vigencia 2014-2016, así como por la Beca Nacional de CONACyT en colaboración con la Universidad Nacional Autónoma de México. Las pruebas serológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las pruebas moleculares se llevaron a cabo en el Departamento de Microbiología y Patología de la Universidad Estatal de Washington bajo la dirección del Doctor Massaro Ueti. Los análisis taxonómicos fueron realizados en el Laboratorio de Taxonomía del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal por el MC Francisco Martínez Ibáñez. Se agradece la información proporcionada por la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo de SENASICA-SAGARPA a la MVZ María de Lourdes Guerrero López.

## X. LITERATURA CITADA

1. Adams S., (2005), Equine Piroplasmosis: Detection of Carriers Prior to Importation into the United States, Veterinary Medical Research and Development, 17:1.
2. Alhassan A., Iseki H., Kim C., Yokoyama N., Igarashi I., (2007), Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates, Trop Anim Health Prod 39:369–374
3. Bashiruddin, J.B., Camma, C. and Rebelo, E., (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. Veterinary Parasitology, 84,75–83.
4. Bautista Garfias Carlos Ramón. INIFAP, SAGARPA, Centro de Investigación disciplinaria en parasitología veterinaria. Libro técnico No. 2. 2010. Diagnóstico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. Capítulo 11. Extracción de ADN de hemoparásitos. Juan Joel Mosqueda Gualito.
5. Calderón A., Cardona J, Vergara O. (2013). Frecuencia de *Babesia spp.* en caballos de Montería, Colombia, Córdoba (Colombia). U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 16(2), 451-458.
6. Cantú-Martínez M.A., Segura-Correa J.C., Silva-Páez M.L., Avalos-Ramírez R., Wagner G.G., (2012), Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from Northeastern Mexico, J. Parasitol., 98(4), 869–870.
7. Criado-Fornelio A., Martínez-Marcos A., Buling-Saraña A., Barba-Carretero J.C., (2003), Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe, Part I. Epizootiological aspects, Veterinary Parasitology 113: 189–201
8. De Waal DT, (1992), Equine piroplasmosis: a review, British Veterinary Journal. 148:6–14.

9. García-Bocanegra I., Arenas-Montes A., Hernández E., Adaszek Ł., Carbonero A., Almería S., Jaén-Téllez J.A., Gutiérrez-Palomino P., Arenas A, (2013), Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids, *The Veterinary Journal* 195, 172–178
10. Grause J.F, Ueti M.W., Nelson J.T., Knowles D.P., Kappmeyer L.S., Bunn T.O., (2013) Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses, *The Veterinary Journal* 196, 541–546
11. INEGI, (2014), Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos, México, 872p. ISBN: 978-607-739-409-9
12. Iowa State University (ISU), (2010), Piroplasmosis equina, The Center of Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, [www.cfsph.iastate.edu/IICAB/](http://www.cfsph.iastate.edu/IICAB/)
13. Jaramillo-Arango C.J., Martínez-Maya J.J., (2010), Epidemiología Veterinaria, El Manual Moderno, México D.F. págs. 112-117
14. Kappmeyer LS, Perryman LE, Knowles DP., (1993), A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. *Mol Biochem Parasitol* 62:121–4.
15. Knowles DP, Kappmeyer LS, Perryman LE. (1997), Genetic and biochemical analysis of the erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 90:69–79.
16. Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A., (2007), *Inmunología de Kuby*, 6ª edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana pp. 447-474, Impreso en México.
17. Knowles D.P., Perryman L.E., Goff W.L., Miller C.D., Harrington R.D., Gorham J.R., (1991) A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites, *Infect. Immun.* 59 2412-2417.
18. Mahmoud M.S., Abu El-Ezz N.T., Abdel-Shafy S., Nassar S.A., El-Namaky A.H., Khalil W.K.B., Knowles D.P., Kappmeyer L., Silva M.G., Suarez C.E., (2016), Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in

- equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches, *Parasites & Vectors* 9:260
19. Méndez M.J.I., (2012), Monografía: Situación actual de la Piroplasmosis Equina en México, Universidad Veracruzana, Trabajo recepcional.
  20. McGuire T.C., (2005), Reasons to Avoid the CF Test for Detecting Antibodies in Cattle, Sheep, Goat and Horse Sera, VMRD.
  21. Mehlhorn H, Schein E, 1998. Redescription of *Babesia equi* (Laveran, 1901) as *Theileria equi*. *Parasitol Res* 84(6):467–475.
  22. Morilla G.A., (1981), Inmunología de la Babesiosis, *Rev. Ciencia Veterinaria* 3: 239-275.
  23. Mosqueda J., Olvera-Ramírez A., Aguilar-Tipacamú G., Cantó G.J., 2012, Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis, *Current Medicinal Chemistry* 19:1504-1518
  24. Nicolaiewsky T.B., Richter M.F., Lunge V.R., Cunha C.W., Delagostin O., Ikuta N., Fonseca A.S., da Silva S.S., Ozaki L.S., (2001), Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction, *Veterinary Parasitology*, 31; 101 (1): 9-21.
  25. Nuttall G.H.F., Strickland C., 1912, On the occurrence of two species of parasites in equine “piroplasmosis” or “biliary fever”, *Parasitology* 5:65–96
  26. OIE, (2015), Código Sanitario para los Animales Terrestres, Capítulo 1.2 Criterios de inscripción de enfermedades, infecciones e infestaciones en la lista de la OIE, acceso en línea: [http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E\\_summry.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E_summry.htm) (diciembre de 2015)
  27. Paget, G. E., Alcock, S. J. and Ryley, J. F. (1962). The pathology of *Babesia rodhaini* infections in mice, *Journal of Pathology and Bacteriology* 84, 218-220.
  28. Quiroz H, (2006), Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos, Editorial Limusa, p. 199-201.

29. Rampersad J., Cesar E., Campbell M.D., Samlal M., Ammons D., (2003), A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses, *Vet. Parasitol.* 114, 81–87
30. Reusse, U. (1954). Zur Klinik und Pathologie der Hunde-Babesiose. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 5, 45–1469.
31. Rodríguez-Vivas R.I., Cob-Galera L.A., Domínguez-Alpizar J.L., (2000), Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999), *Rev Biomed*; 11:277-282.
32. Rosales R., Rangel-Rivas A., Escalona A., Jordan L.S., Gonzatti M.I., Aso P.M., Perrone T., Silva-Iturriza A., Mijares A., (2013), Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR, *Veterinary Parasitology* 196, 37–43.
33. Rothschild C.M., Knowles D.P., (2007), Equine piroplasmiasis, In *Equine Infectious Diseases*, Ed. Sellon DC, Long Mt. Saunders Elsevier, St. Louis, MO. p. 465–473.
34. Rovid A., Allen J., Gaylon J., Lofstedt J., Victoria M., (2010), Enfermedades emergentes y exóticas de los animales, Primera Edición. Iowa, USA. p. 256-258.
35. SAGARPA, (2007), Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, [www.sagarpa.gob.mx/tramitesyServicios/.../SENASICA-01-031%20B.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/tramitesyServicios/.../SENASICA-01-031%20B.pdf) (Consultado en diciembre de 2015)
36. Sahagún-Ruiz A., Waghela S.A., Wagner G.G., (1995), Cloning and expression of a *Babesia caballi* protein from a genomic library in Lambda Zap II, International Information System for the Agricultural Science and Technology
37. Schwint O.N, Knowles D.P., Ueti M.W., Kappmeyer L.S., Scoles G.A., (2008), Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari:

- Ixodidae) is restricted to one generation in the absence of alimentary reinfection on a susceptible equine host. *Journal of Medical Entomology*. 45 (6): 1152-1155.
38. Schwint O.N, Ueti MW, Palmer GH, Kappmeyer LS, Hines MT, Cordes RT, Knowles DP, Scoles GA. (2009). Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrob Agents Chemother*. 53 (10):4327-32.
39. Scoles A.G., Ueti W.M., (2015), Vector ecology of equine piroplasmiasis, *Annu. Rev. Entomol*. 60:561–80
40. SENASICA, (2011), Acuerdo por el que se exenta a los caballos para deportes y espectáculos del certificado zoosanitario de movilización. [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/211460/ACUERDO\\_por\\_el\\_que\\_se\\_exenta\\_a\\_los\\_caballos\\_para\\_deportes\\_y\\_espectaculos\\_del\\_certificado\\_zoosanitario\\_de\\_movilizacion.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/211460/ACUERDO_por_el_que_se_exenta_a_los_caballos_para_deportes_y_espectaculos_del_certificado_zoosanitario_de_movilizacion.pdf) (Consultado en mayo de 2017)
41. Sigg L., Gerber V., Gottstein B., Doherr M.G., Frey C.F., (2010), Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population, *Parasitology International* 59, 313–317
42. Ueti M.W., Palmer G.H., Kappmeyer L.S., Scoles G.A., Knowles D.P., (2003), Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (12): 5803-5809
43. Ueti M.W., Palmer G.H., Kappmeyer L.S., Statfield M., Scoles G.A., Knowles D.P., (2005), Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia, *Journal of Clinical Microbiology*, Aug., p. 3755–3759
44. Ueti M.W., Palmer G.H., Scoles G.A., Kappmeyer L.S., Knowles D.P., (2008), Persistently Infected Horses Are Reservoirs for Intrastadial Tick-Borne Transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*, *Infection and Immunity*, Aug., p. 3525–3529

45. Uilenberg G., (2006), *Babesia* – a historical overview, *Veterinary Parasitology* 138: 3-10
46. Vargas D., Bonet R., Oliva P., Campano S., (2004), Implementación de la técnica de PCR en la identificación de *Babesia ssp* en equinos, *Parasitol Latinoam* 59: 179 – 182.
47. Wise L.N., Pelzel-McCluskey A.M., Mealey R.H., Knowles D.P., (2014), Equine Piroplasmiasis, *Vet Clin Equine* 30, 677–693



## ANEXO 1. REQUISITOS PARA CERTIFICADO ZOOSANITARIO PARA EXPORTACIÓN

### Animales vivos

<b>Documento requerido</b>	<b>Presentación</b>
Resultados de pruebas de laboratorio oficial o aprobado o autorizado, cuando sean solicitados por el país importador	Original y Copia
Certificado de vacunación cuando sea solicitado por el país importador	Original y Copia
Documento que acredite el origen del (los) animal (es)	Original y Copia
Reseña de las características del (los) animal (es)	Original y Copia
Certificado de salud del (los) animal (es) emitido por un médico veterinario, en papel membretado de no más de cinco días de expedido o de acuerdo a la vigencia establecida por el país de destino, en caso de que sea diferente, anexando fotocopia de la cédula profesional del médico veterinario que lo expidió	Original y Copia
Otros que requiera el país de destino	Original y Copia

### Productos y Subproductos

<b>Documento requerido</b>	<b>Presentación</b>
Resultados satisfactorios de análisis de control de calidad de cada lote a exportar o de acuerdo con un plan de monitoreo validado, para productos destinados al consumo humano o consumo animal	Original y Copia
Descripción y/o diagrama de flujo del proceso al que fue sometido el producto, indicando tiempos y temperaturas	Original y Copia

Documento que acredite su origen	Original y Copia
Certificado para la Exportación de Buenas Prácticas Sanitarias vigente emitido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, para productos destinados a consumo humano, o documento equivalente emitido por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria+B8	Original y Copia
Otros que requiera el país de destino	Original y Copia