



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



Esplenectomía e infección experimental de un equino para la obtención de una cepa de campo de *Babesia caballi* y *Theileria equi* en México

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Médico Veterinario Zootecnista

Presenta
Alejandra Carapia Pacheco

Dirigido por:
Dr. Diego Josimar Hernández Silva

Querétaro, Qro. a 16 de junio de 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma De Querétaro Facultad de Ciencias Naturales



Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Esplenectomía e infección experimental de un equino para la obtención de una cepa de campo de *Babesia caballi* y *Theileria equi* en México

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Médico Veterinario y Zootecnista

Presenta
Alejandra Carapia Pacheco

Dirigido por:
Dr. Diego Josimar Hernández Silva

SINODALES

Dr. Diego Josimar Hernández Silva
Presidente

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Secretario

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal

MSPAS. José Rodrigo Morales García
Vocal

Dr. Edwin Esaú Hernández Arvizu
Vocal

Dedicatorias

A Ari, que siempre me mantuviste fuerte y centrada en los días nublados, que me esperaste y acompañaste en este camino largo y complejo. Hoy se logró, se terminó la tesis.

A mis padres, Laura y Vicente, que fueron mis pilares para terminar mi carrera. Mamá, gracias por cuidar de Ari en lo que cumplía mi sueño. Papá, gracias por siempre decir que sí a lo que necesitaba.

A mis hermanos, Daniela y Julio, que siempre estuvieron presentes apoyando de cerca y a la distancia.

A mi amix Lupita, que sobrevivió a la carrera conmigo y pasamos la pandemia apoyándonos. También gracias a tu familia por adoptarme en mi vida foránea.

A Mane, que siempre me ayudaste cuando necesité y fuiste el hombro en que podía recargarme.

A los profesores que me dieron clases, todos y cada uno depositó conocimiento en mí.

Agradecimientos

Al Dr. Josimar por su paciencia y darme la oportunidad de trabajar con usted. Siempre he admirado su gran conocimiento y su calidez humana.

Al Dr. Mosqueda, que me guió en mi paso por la licenciatura al ser mi tutor y apostar por este proyecto.

Al MSPAS. Rodrigo, que confió en mí para desarrollar un primer proyecto de investigación y gracias a ese primer acercamiento desarrollé mi tesis.

A Charly y Mayra que me enseñaron a trabajar en el laboratorio y me tuvieron paciencia en ese proceso.

A mis compañeros de laboratorio: Edwin, Aldo, Alma, Daniel, América, Andrés, Chyntia, Checo, Valeria, Iván y Rolando, que de una u otra manera hicieron más ligero este viaje.

Tabla de contenido

<i>Dedicatorias</i>	3
<i>Agradecimientos</i>	4
<i>Abreviaturas</i>	8
<i>Resumen</i>	9
<i>Summary</i>	10
<i>Introducción</i>	11
<i>Antecedentes</i>	12
I. Piroplasmosis equina	12
II. Antecedentes en México	13
III. Vectores	14
IV. Ciclo de vida	16
V. <i>Theileria equi</i>	17
VI. <i>Babesia caballi</i>	18
VII. Patogenia y signos clínicos	19
VIII. Tratamiento	20
IX. Control	21
<i>Justificación</i>	21
<i>Hipótesis</i>	21
<i>Objetivo general</i>	22
<i>Objetivos específicos</i>	22
<i>Metodología</i>	22
1. Obtención de muestras sanguíneas y de garrapatas de caballos de campo	22
2. Procesamiento de muestras	26
3. Extracción de DNA de sangre completa	26
4. Integridad de DNA	27
5. Diagnóstico de <i>B. caballi</i> por nPCR	27
6. Diagnóstico molecular de <i>T. equi</i> por nPCR	29
7. Esplenectomía	32
8. Toma de muestra de sangre infectada con <i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i>	35
9. Lavado y procesamiento de las muestras	35
10. Infección experimental	35

Resultados	36
1.1 Obtención de muestras para el diagnóstico de <i>Babesia caballi</i> y <i>Theileria equi</i> para la identificación de animales infectados	36
2.1 Procesamiento de muestras.....	38
3.1 Extracción de ADN de sangre completa y comprobación de integridad.....	38
4.1 Diagnóstico molecular de <i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i> por nPCR	39
5.1 Esplenectomía	42
6.1 Toma de muestra de sangre infectada con <i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i> y lavado y procesamiento de muestras	49
7.1 Lavado y procesamiento de las muestras	50
8.1 Infección experimental	51
Discusión	54
Conclusión	56
Referencias	57
 Ilustración 1 SENASICA, 2025	15
Ilustración 2 Ciclo de vida de <i>T. equi</i> . CMSP: Células mononucleares de sangre periférica. (Gráfico original de Scoles y Ueti, tomado y modificado , de Salinas Estrella et al 2022) ..	18
Ilustración 3 Ciclo de vida de <i>B. caballi</i> . (Tomado de Salinas-Estrella, 2022)	19
Ilustración 4 Geolocalización del muestreo Jalpan de Serra, Qro	23
Ilustración 5 Geolocalización del muestreo Tamuín, SLP.	24
Ilustración 6 Hoja de identificación	25
Ilustración 7 Protocolo de termociclado para la reacción externa de <i>Babesia caballi</i>	28
Ilustración 8 Protocolo de termociclado para la reacción interna de <i>Babesia caballi</i>	29
Ilustración 9 Protocolo de termociclado para la reacción externa de <i>Theileria equi</i>	31
Ilustración 10 Protocolo de termociclado para la reacción interna de <i>Theileria equi</i>	32
Ilustración 11 Herida crónica sin tratamiento. Tamuín, SLP. Fotografía: Diego Hernández.	37
Ilustración 12 Venopunción de yugular en equino. Jalpan de Serra, Qro. Fotografía: Diego Hernández	37
Ilustración 13 Caballo con una garrapata repleta en la zona rostral. Fotografía: Diego Hernández	38
Ilustración 14 Gel de integridad del muestreo en Jalpan de Serra, Qro.....	39
Ilustración 15 Primer gel de integridad de ADN del muestreo en Tamuín, SLP.	39
Ilustración 16 Segundo gel de integridad de ADN del muestreo en Tamuín, SLP.	39
Ilustración 17 Fragmento de los resultados de la primer nPCR para <i>B. caballi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>B. caballi</i> ; Carril 3-9: Muestras de ADN de equinos de Jalpan de Serra, Qro; Carril 10: Agua grado biología molecular.....	40
Ilustración 18 Fragmento de los resultados de la segunda nPCR para <i>B. caballi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>B. caballi</i> ; Carril 3-11: Muestras de ADN de equinos de Jalpan de Serra, Qro ; Carril 12: Agua grado biología molecular.....	40

Ilustración 19 Fragmento de los resultados de la tercer nPCR para <i>B. caballi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>B. caballi</i> ; Carril 3-8: Muestras de ADN de equinos de Jalpan de Serra, Qro; Carril 9: Sin muestra; Carril 10: Agua grado biología molecular.....	40
Ilustración 20 Fragmento de los resultados de la primer nPCR para <i>B. caballi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>B. caballi</i> ; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Sin muestra; Carril 15: Agua grado biología molecular.....	41
Ilustración 21 Fragmento de los resultados de la segunda nPCR para <i>B. caballi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>B. caballi</i> ; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Sin muestra; Carril 15: Agua grado biología molecular.....	41
Ilustración 22 Fragmento de los resultados de la primer nPCR para <i>T. equi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>T. equi</i> ; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Agua grado biología molecular.....	42
Ilustración 23 Fragmento de los resultados de la segunda nPCR para <i>T. equi</i> . Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a <i>T. equi</i> ; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Agua grado biología molecular.....	42
Ilustración 24 Caballo criollo adquirido para la fase experimental. Fotografía: Alejandra Carapia	43
Ilustración 25 Incisión en fosa paralumbar izquierda del caballo. Fotografía: Maradi Carapia	44
Ilustración 26 Localización del bazo en cavidad abdominal. Fotografía: Maradi Carapial....	44
Ilustración 27 Limpieza de cavidad abdominal con succión. Fotografía: Maradi Carapia... <td>45</td>	45
Ilustración 28 Cara parietal del bazo. Fotografía: Maradi Carapia.....	45
Ilustración 29 Cara visceral del bazo. Fotografía: Maradi Carapia	46
Ilustración 30 Sutura de incisión de cirugía. Fotografía: Maradi Carapia	46
Ilustración 31 Caballo esplenectomizado. Fotografía: Alejandra Carapia	47
Ilustración 32 Frecuencia cardiaca postcirugía.....	47
Ilustración 33 Frecuencia respiratoria postcirugía	48
Ilustración 34 Temperatura postcirugía.....	48
Ilustración 35 Microhematócrito postcirugía	49
Ilustración 36 Muestreo de equinos infectados. Fotografía: Diego Hernández	50
Ilustración 37 Lavado de sangre con medio VyM. Fotografía: Alejandra Carapia	51
Ilustración 38 Frecuencia cardiaca postinfección	51
Ilustración 39 Frecuencia respiratoria postinfección.....	52
Ilustración 40 Temperatura postinfección	52
Ilustración 41 Microhematócrito postinfección	53
Ilustración 42 Frotis sanguíneo con tinción de Giemsa. En el círculo negro se marcan los trofozoitos en forma de "Cruz de Malta" de <i>Theileria Equi</i> , mientras que en el círculo naranja se muestran trofozoitos de <i>Babesia caballi</i> . Fotografía: Edwin Esaú Hernández Arvizu	53

Ilustración 43 Frotis sanguíneo con tinción de Giemsa. En el círculo amarillo se muestran merozoitos de *B. caballi* y en el círculo naranja trozoitos de *B. caballi*. Fotografía: Edwin Esaú Hernández Arvizu..... 54

Tabla 1 Reactivos para la reacción externa de la nPCR de <i>B. caballi</i>	28
Tabla 2 Reactivos para la reacción interna de la nPCR de <i>B. caballi</i>	29
Tabla 3 Reactivos para la reacción externa de la nPCR de <i>T. equi</i>	30
Tabla 4 Reactivos para la reacción interna de la nPCR de <i>T. equi</i>	31
Tabla 5 Resultados de animales positivos a EP, mediante nPCR.....	42

Abreviaturas

Tº - Temperatura

cm - Centímetro

rpm - Revoluciones por minuto

min - Minuto

TAE - Buffer Disolución tampón formada por Tris, Acetato y EDTA

EDTA - Ácido etilenodiaminatetraacético

PBS - Buffer fosfato salino

ºC - Grados Celsius

ml - Mililitro

núm - Número

VYM - Buffer Vega y Murguía para cultivo de *Babesia spp.*

m - Metro

L - Litro

CMSp - Células mononucleares de sangre periférica

Resumen

En México la piroplasmosis equina es una enfermedad de reporte obligatorio y es causada principalmente por *Babesia caballi* y *Theileria equi*. La inespecificidad de los signos clínicos en animales enfermos dificulta el diagnóstico, además de que el diagnóstico de laboratorio es complicado debido a las bajas parasitemias en animales persistentemente infectados. Las pruebas con alta sensibilidad diagnóstica son pruebas moleculares costosas y de difícil acceso en campo. Debido a las restricciones para la exportación de caballos vivos a otros países, y a que México es el segundo importador de carne de caballo en el mundo solo detrás de China, es importante investigar el ciclo de vida de estos parásitos para conocer las proteínas implicadas en los procesos de invasión al eritrocito y su reproducción sexual en el vector. Lo anterior con la finalidad de buscar dianas moleculares que permitan el desarrollo de una vacuna y de pruebas diagnósticas para coadyuvar al control y erradicación de la piroplasmosis equina en México. En este proyecto se recolectaron muestras de sangre de equinos de campo expuestos a garrapatas y se les purificó ADN, para posteriormente detectar la presencia de *B. caballi* y *T. equi* por medio de nPCR. Paralelamente, se realizó una esplenectomía a un caballo. Una vez identificados los equinos de campo infectados se les extrajo sangre completa y se obtuvo el paquete de eritrocitos parasitados. Posteriormente, con los eritrocitos infectados y lavados se infectó de manera experimental en condiciones controladas al caballo esplenectomizado y se monitorearon sus constantes fisiológicas diariamente. Una vez confirmada la infección experimental por medio de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa se obtuvieron muestras de sangre para iniciar cultivo *in vitro* de *B. caballi* y *T. equi*. El tener un cultivo *in vitro* de estos parásitos abre la oportunidad para iniciar investigaciones que permitan entender mejor el ciclo de vida, generar información para candidatos vacunales y desarrollar pruebas diagnósticas contra la piroplasmosis equina.

Palabras clave — Equino, piroplasmosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, esplenectomía.

Summary

In Mexico, equine piroplasmosis is a notifiable disease primarily caused by *Babesia caballi* and *Theileria equi*. The nonspecific nature of clinical signs in infected animals complicates diagnosis, and laboratory testing is challenging due to low parasitemia in persistently infected animals. Highly sensitive diagnostic tests, such as molecular assays, are expensive and not easily accessible in the field. Given the restrictions on exporting live horses to other countries, and considering that Mexico is the second-largest importer of horse meat globally, just behind China, it is essential to investigate the life cycle of these parasites to identify proteins involved in red blood cell invasion and their sexual reproduction in the vector. The goal is to find molecular targets that will aid in developing a vaccine, and diagnostic tests to help control and eradicate equine piroplasmosis in Mexico. In this project, blood samples were collected from field horses exposed to ticks, and DNA was purified to detect the presence of *B. caballi* and *T. equi* using nPCR. Concurrently, a splenectomy was performed on one horse. After identifying infected field horses, whole blood was collected, and the parasitized red blood cell were isolated. These infected red blood cells were subsequently washed and used to experimentally infect the splenectomized horse under controlled conditions, with its physiological parameters monitored daily. Once experimental infection was confirmed through Giemsa-stained blood smears, blood samples were obtained to initiate in vitro cultures of *B. caballi* and *T. equi*. Establishing in vitro culture of these parasites provides a valuable opportunity for further research to better understand their life cycle, generate information for vaccine candidates, and develop diagnostic tests against equine piroplasmosis.

Keywords — Horse, piroplasmosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, splenectomy

Introducción

La piroplasmosis equina es una enfermedad transmitida por garrapatas Ixodidae que afecta a la familia taxonómica de los équidos dentro de los cuales se incluyen los asnos, mulas, cebras y caballos. Los agentes etiológicos de esta enfermedad son *Theileria equi* y *Babesia caballi*, dos hemoparásitos intracelulares del *Phylum Apicomplexa* (Rothschild, 2013). Los signos clínicos desarrollados por estos dos protozoarios son muy similares entre los que se encuentran la fiebre, pérdida del apetito, anorexia, taquicardia, esplenomegalia, anemia hemolítica e ictericia. Los animales infectados que se logran recuperar de la infección aguda permanecen persistentemente infectados convirtiéndose en reservorios de la enfermedad (Scoles & Ueti, 2015).

Debido a que los porcentajes de parasitemia son tan bajos en estos animales es difícil realizar un diagnóstico por métodos tradicionales como lo es la identificación por microscopia con frotis teñidos con tinciones tipo Romanovsky. Sin embargo, son útiles otras técnicas con mayor sensibilidad como la ELISA (Cantú-Martínez et al., 2012) o métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

Países como Canadá, Australia, Gran Bretaña, Irlanda, Japón, Nueva Zelanda contribuyen con el 10.4% de los casos presentados a nivel mundial de piroplasmosis equina. Sin embargo, la ocurrencia del parásito es común en países de Europa, Asia, África, Centro y Sudamérica y algunas partes de Estados Unidos de América (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022). Además, los géneros de garrapatas vectores de la enfermedad pueden estar distribuidos en al menos 25.9 % hasta en un 79% de la superficie continental de México, sobre todo a que presenta condiciones ambientales apropiadas. De acuerdo a la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) aproximadamente el 90% de la población equina vive en áreas endémicas de piroplasmosis en países en vías de desarrollo y donde los equinos son animales empleados para actividades de trabajo (Salinas-Estrella et al., 2022).

Salinas-Estrella y colaboradores demostraron a través de diferentes técnicas inmunológicas y moleculares que la piroplasmosis equina se encuentra distribuida en todo el territorio mexicano, pues en diferentes regiones geográficamente distantes en todo el país demostraron que caballos muestreados de localidades donde el vector es endémico el 5.24 % resultó positivo para *B. caballi* y 59.11% para *T. equi* (Salinas-Estrella et al., 2022). En México a partir del año 2018 se emitió un acuerdo para la notificación de enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos, donde se enlista la piroplasmosis equina (DOF - Diario Oficial de la Federación, 2018) lo cual hace de manifiesto la importancia de esta enfermedad en nuestro país, ya que México se encuentra dentro de los países principales importadores de carne de caballo con aproximadamente 80,894 toneladas de producción, solo detrás de China que es el

primer productor a nivel mundial. (Cultivos y Productos de Ganadería, FAOSTAT, 2020)

El valor de la industria equina se basa en los eventos deportivos regulados por la FEI (Federación Ecuestre Internacional) y carreras de caballos pura sangre. Diez países en el mundo cuentan con una población equina superior a un millón de individuos: EE. UU (9 500 000), China (7 402 450), México (6 260 000), Brasil (5 787 249), Argentina (3 655 000), Colombia (2 533 621); Mongolia (2 029 100), Etiopía (1 655 383), Federación de Rusia (1 319 358) y Kazajstán (1 163 500). La Unión Europea tiene una población equina estimada en 6 millones.

México fue sede por cuarta vez para la competencia Longines Global Champions Tour (LGCT), la competencia de salto ecuestre más importante del mundo. México ya había sido sede en el serial 2016, 2017 y 2018.

Así mismo es una referencia mundial para el desarrollo de deportes ecuestres, por lo que se importan y exportan caballos de manera continua. Esto se vuelve un riesgo exponencial para brotes de enfermedades en los équidos.

Además que es un país con gran movimiento agrícola. En el año 2021 se cosechó una superficie de 17,229,616.57 ha. (SIAP, 2021). Lo que se traduce en la utilización de animales domésticos como mulas, bueyes, caballos, etc., en el arado tradicional.

En la actualidad no existe alguna vacuna comercial disponible contra la piroplasmosis equina, ni para la causada por *B. caballi*, ni para *T. equi*. Por lo tanto, es necesario abundar en los procesos celulares y moleculares del ciclo de vida para poder evaluar proteínas del parásito que participen en el ciclo de vida dentro del hospedante y en el ciclo de vida sexual en el vector y así proponer candidatos vacunales contra esta enfermedad. Por lo que el presente trabajo pretende obtener muestras de garrapatas que se hayan alimentado de caballos de localidades endémicas para determinar su positividad a *B. caballi*, obtener un aislado de estos parásitos y criopreservarlo para posteriormente, contar con parásitos que permitan establecer y estandarizar el cultivo *in vitro*. Lo anterior con la finalidad de estudiar la interacción molecular durante la entrada del parásito a la célula roja del hospedante. Estos estudios permitirán encontrar dianas inmunológicas que puedan ser evaluadas como candidatos vacunales.

Antecedentes

I. Piroplasmosis equina

La piroplasmose equina (EP por sus siglas en inglés Equine Piroplasmosis, también conocida como fiebre biliar, babesiosis equina o theileriosis equina) es una enfermedad causada por protozoarios que es transmitida por garrapatas y afecta a caballos, mulas, burros y cebras. Los agentes etiológicos causantes de la enfermedad son los hemoparásitos *Babesia caballi* y *Theileria equi*.

Los parásitos que causan EP fueron descritos por primera vez en 1901, y ambos fueron clasificados inicialmente en el género *Piroplasma*, como *Piroplasma equi* y *Piroplasma caballi*. Laveran describió por primera vez un parásito intraeritrocítico de caballos en 1901, llamándolo *P. equi*. Este parásito fue renombrado *Nuttallia equi* y poco después fue reclasificado nuevamente como *Babesia equi*. (Scoles y Ueti, 2015)

En 1993, con base en su ciclo de vida dentro de la garrapata, las etapas linfocíticas en el huésped equino y las similitudes genéticas con otras especies de *Theileria*, *B. equi* fue reclasificada como *Theileria equi*, el nombre actualmente aceptado. (Kappmeyer et al, 1993)

Piroplasma caballi fue identificado por primera vez como un parásito diferente de *T. equi* en 1912 en estudios en el sur de África, donde se sospechaba que los caballos estaban coinfectados con dos especies de parásitos distintas. Los investigadores en Italia y otros lugares confirmaron la presencia de dos especies de parásitos distintas. Posteriormente, *P. caballi* fue trasladado al género *Babesia*, y ha permanecido como *Babesia caballi* desde entonces. (Uilenberg, 2006)

Solo unos pocos países informan el estado libre de Piroplasmosis quina: Australia, Canadá, Gran Bretaña, Irlanda, Japón, Nueva Zelanda y, hasta hace poco, los Estados Unidos; estos países (principalmente los Estados Unidos) representan solo alrededor del 10.4% de la población equina doméstica del mundo. Antes de un gran brote en 2009, se consideraba que los Estados Unidos estaban libres de Piroplasmosis equina. Aunque es de considerable importancia en partes del mundo donde los equinos todavía son una fuente significativa de fuerza de tracción. (Scoles y Ueti, 2015)

II. Antecedentes en México

Se realizó una revisión a 79 muestras sanguíneas de equinos que fueron enviadas al Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY) en los años de 1984-1999, de las cuales se realizó frotis sanguíneo con tinción de Giemsa al 10%. En estos diagnósticos, se obtuvieron 2 muestras positivas a *Babesia caballi* (2.53%) y 3 muestras positivas a *Theileria equi* (3.79%). (Rodríguez-Vivas et al, 2000)

Se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Acuerdo (2007) la lista de enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en México, donde la babesiosis equina aparece como enfermedad de notificación mensual obligatoria dentro del grupo 3, que se considera enzóotica, pero no representa riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública. También está en la lista de enfermedades notificables de la OIE (2015).

En 2017 se investigó la prevalencia de *T. equi* a partir de 1,000 muestras de sangre de caballos aparentemente sanos del oeste de México. Dichas muestras se enviaron al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Guadalajara, México. Como método diagnóstico se utilizó la nPCR y los resultados fueron que el 19.70% de los caballos dieron positivo a *T. equi*. La prevalencia de la enfermedad fue mayor en caballos estabulados con 25.81%, que entre los caballos de pastoreo con 15.02%. La tasa de positividad también fue mayor entre las razas Cuarto de milla con 24.70%, Lusitano con 35.90% y el Caballo Costarricense de Paso con 47.37% con 47.37% que entre las otras siete razas muestreadas. El porcentaje de infección por *T. equi* fue mayor en caballos adultos mayores a los 4 años con 25.05% que entre los potros y potrancas entre los 2 a 4 años con 15.48%, potros de 1 año con 10.49% y los potros menores de 1 año con 10.34%. Los resultados indican que la EP causada por *T. equi* es enzoótica en el occidente de México. (Ayala-Valdovinos, et al, 2017)

En los años 2013-2015, se realizó un estudio epidemiológico transversal para recolectar muestras de sangre en el estado de Veracruz y se muestrearon aleatoriamente 100 equinos, entre los cuales había caballos, burros y mulas. Se realizó un diagnóstico molecular mediante nPCR y sus resultados arrojaron que se detectó ADN de *B. caballi* y *T. equi* en el 18% de las muestras de sangre analizadas, de las cuales 6 fueron machos y 12 hembras. Los municipios que tuvieron estas muestras positivas fueron Tlalixcoyan, Cotaxtla y Veracruz. (Romero-Salas, et al, 2021)

En el año 2022 Salinas-Estrella y colaboradores, realizaron un estudio donde se hizo una recolección de 269 muestras de sangre y suero de caballos, mulas y asnos en los estados de Chiapas, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco y Yucatán; posteriormente se realizó un diagnóstico serológico mediante cELISA y diagnóstico molecular mediante nPCR. En el diagnóstico serológico se obtuvieron como resultado 55.7% de seroprevalencia de *B. caballi* y 68.4% de prevalencia a anticuerpos de *T. equi*. Las muestras de sangre analizadas con nPCR fueron 7.8% positivas a *B. caballi* y 78.8% positivas a *T. equi*, mientras que una qPCR dúplex, mostró 15.24% de muestras positivas a *B. caballi* y 59.11% a *T. equi*. Con estos resultados, 27 muestras fueron secuenciadas para *T. equi* y 13 para *B. caballi*, confirmando la presencia de estos hemoparásitos que causan piroplasmosis equina y sugiriendo que están ampliamente distribuidos en México.

III. Vectores

Hay aproximadamente catorce especies identificadas de garrapatas de la familia Ixodidae, de los géneros *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp. y *Hyalomma* (Méndez, 2012) que son vectores transestadiales de los hemoparásitos y ocho especies pueden transmitir *B. caballi* de manera transovárica. (Schwint et al, 2009)

Las garrapatas de las que hay reporte como transmisoras de los protozoarios causantes de la piroplasmosis en el mundo, *Dermacentor nitens*, *D. albipictus* y *Amblyomma mixtum*, también *Rhipicephalus annulatus* y *R. microplus* son posibles transmisoras de piroplasmosis equina en México. (Cantú-Martínez et al, 2012) A la fecha no se ha podido comprobar su capacidad vectorial.

El territorio mexicano libre de ectoparásitos cuenta con 599,367.84 km cuadrados, lo que representa sólo el 30.60% del territorio nacional, representada por los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (exceptuando los municipios de Morelos, Guadalupe, Calvo) y el norte de Baja California Sur.

En los municipios de Los Cabos, parte sur de La Paz en Baja California Sur; Ahome, El Fuerte y Choix en Sinaloa; así como los municipios de Cuatrocienegas, Ocampo y Sierra Mojada en Coahuila, con una superficie de 67,427.76 km cuadrados, que corresponde al 3.44% del territorio nacional está en fase de erradicación de los ectoparásitos.

El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapatas, la cual comprende 1, 292, 407.02 km cuadrados, con el 65.96% del territorio nacional, como se muestra en la ilustración 1. (SENASICA, 2025)



Ilustración 1 SENASICA, 2025

A nivel mundial se han reportado alrededor de 900 especies de garrapatas en tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nutalliedlidae. En México se han descrito 100 especies, principalmente de las familias Ixodidae y Argasidae. (Rodríguez-Vivas et al, 2016)

En la tabla 1 se muestran los principales géneros de garrapatas y las enfermedades que transmiten.

Garrapata (especies)	Hospederos	Agente (especies)	Enfermedad
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor spp.</i>	Perros, Venados	<i>Ehrlichia canis</i> <i>E. ewengii</i> , <i>E. chaffeensis</i>	Ehrlichiosis Monocítica Canina, Ehrlichiosis Humana
<i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. ricinus</i>	Roedores, humanos, venados	<i>Babesia microti</i>	Babesiosis Humana y Murina
<i>R. microplus</i>	Bovinos	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i>	Babesiosis Bovina
<i>R. sanguineus</i> , <i>D. reticulatus</i>	Perros, carnívoros silvestres	<i>B. canis</i>	Babesiosis Canina
<i>R. sanguineus</i>	Perros	<i>B. vogeli</i>	
<i>D. nitens</i>	Equinos	<i>B. caballi</i> <i>B. equi</i>	Babesiosis Equina
<i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. spinipalpis</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. ovatus</i>	Humanos Venados Roedores, caballos, borregos	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmosis Granulocítica Humana
<i>R. microplus</i> y otras	Rumiantes, venados	<i>A. marginale</i>	Anaplasmosis Bovina
<i>R. sanguineus</i>	Perros	<i>Anaplasma platys</i>	Anaplasmosis Canina
<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. mixtum</i> , <i>A. imitator</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>R. sanguineus</i>	Humanos	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas
<i>Ixodes spp.</i>	Humanos, roedores, aves, venados	<i>Borrelia burdorfferi</i> s.l.	Enfermedad de Lyme

Tabla 1 Géneros de garrapatas y sus principales enfermedades que transmiten. Tomado de Rodríguez-Vivas et al. 2019

La transmisión de enfermedades por garrapatas es alarmante para la salud veterinaria, ya que compromete a diversas especies de animales domésticos y también son de interés en la salud pública por las enfermedades que pueden transmitir al humano, por lo que su investigación es fundamental para el control y erradicación en México.

IV. Ciclo de vida

Los ciclos de vida de estos hemoparásitos son complejos, ya que son similares e incluyen una etapa haploide que tiene replicación asexual en el huésped equino y una etapa sexual diploide en la garrapata vector. La garrapata es el hospedante definitivo y el vector biológico de *B. caballi* y *T. equi* porque es el sitio de desarrollo de la etapa sexual. (Scoles y Ueti, 2015)

Se describen los ciclos de vida de ambos parásitos a continuación.

V. *Theileria equi*

T. equi tiene cuatro etapas de replicación, como se muestra en la ilustración 2. En el hospedante equino hay replicación asexual (esquizogonia) en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), seguido de una replicación asexual en los eritrocitos (merogonia). Las garrapatas se alimentan de eritrocitos infectados de sangre y la reproducción de los parásitos ocurre en el intestino medio de las garrapatas (gametogonia), seguida por una replicación asexual en las glándulas salivales de la garrapata (esporogonia). (Scoles y Ueti, 2015)

Una vez que las garrapatas competentes adquieren eritrocitos infectados durante la alimentación de sangre, el parásito se transforma en su estadio sexual en el lumen del intestino de la garrapata. Los gametos se fusionan para formar un cigoto diploide, que invade las células epiteliales del intestino medio y se vuelve en un kineto móvil. El kineto sale de la célula epitelial del intestino medio y migra en el hemocoele de la garrapata, invadiendo las glándulas salivales de la garrapata. En las glándulas salivales los kinetos tienen meiosis y resultan esporozoitos haploides, estos son la etapa infecciosa liberada con la saliva del huésped cuando la garrapata se alimenta. De esta manera las garrapatas adquieren y transmiten los hemoparásitos de los equinos persistentemente infectados y estos animales sirven como reservorios de los parásitos. (Ueti *et al*, 2005)

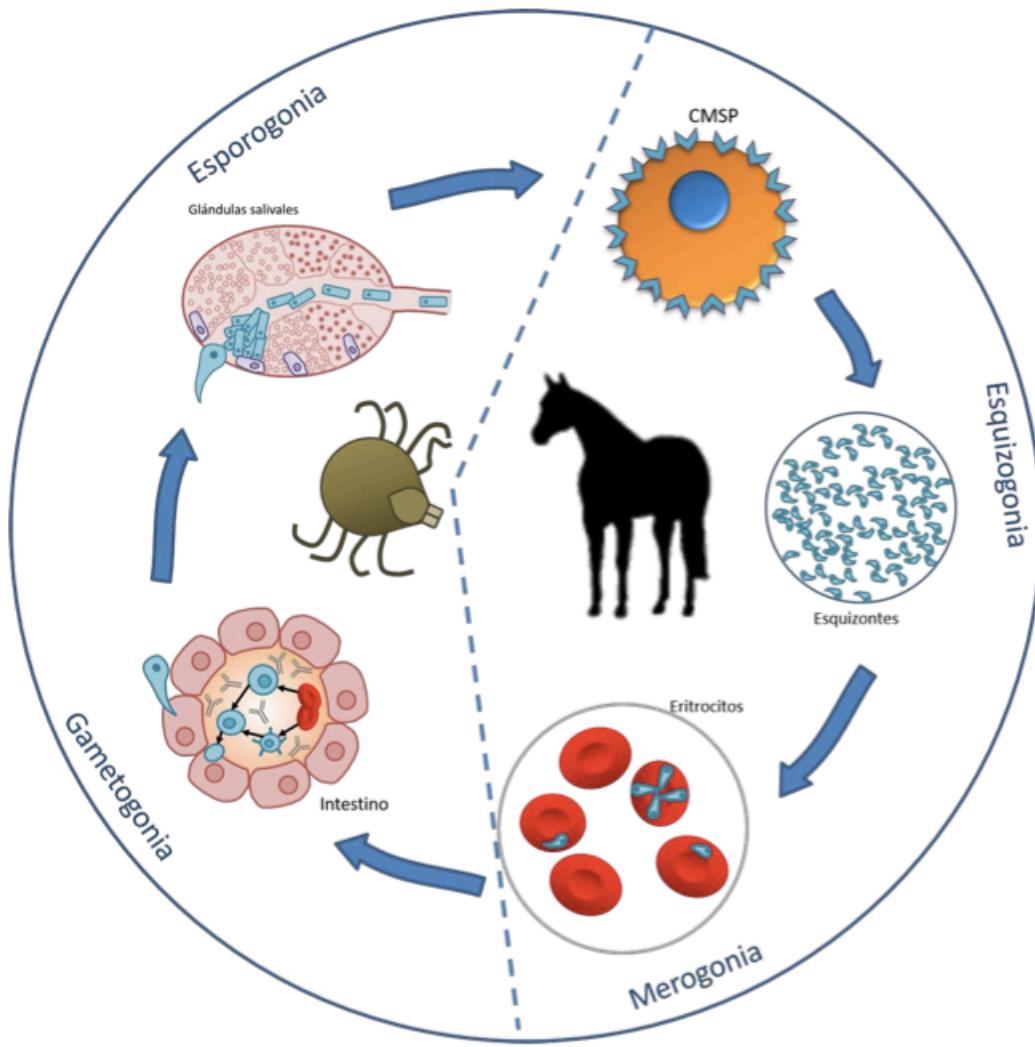


Ilustración 2 Ciclo de vida de *T. equi*. CMSP: Células mononucleares de sangre periférica. (Gráfico original de Scoles y Ueti, tomado y modificado, de Salinas Estrella et al 2022)

VI. *Babesia caballi*

El ciclo de vida de *B. caballi* es similar al de *T. equi*, sin embargo hay diferencias fundamentales (Ilustración 3). *B. caballi* solo experimenta tres etapas de replicación: merogonia, gametogonia y esporogonia, que da como resultado los esporozoitos haploides infecciosos. Cuando las garrapatas infectadas inoculan esporozoitos de *B. caballi* en el equino, éstos invaden directamente los glóbulos rojos. No hay esquizogonia y tampoco hay evidencia que *B. caballi* infecte a las CMSP. Las garrapatas ingieren los eritrocitos infectados y los piroplasmas experimentan gametogénesis en el intestino medio; después de que los kinetos de *B. caballi* escapan del intestino, en lugar de infectar las glándulas salivales, se mueven a través de la hemolinfa, infectando múltiples órganos internos, incluidos los ovarios. La transmisión vertical ocurre cuando los kinetos invaden los huevos en desarrollo.

dentro de los ovarios. En el embrión de garrapata, los kinetos invaden las glándulas salivales y después de que las larvas eclosionan, los parásitos se convierten en esporozoitos, que posteriormente se eliminan en la saliva durante la alimentación de sangre para infectar a los equinos susceptibles. (Scoles y Ueti, 2015)

A diferencia de *T. equi*, los equinos pueden eliminar las infecciones de *B. caballi* después de unos años, pero los parásitos pueden persistir en las garrapatas durante varias generaciones en ausencia de reinfección de un hospedante infectado y, en consecuencia, la población de garrapatas puede ser un reservorio. (Schwint et al, 2008)

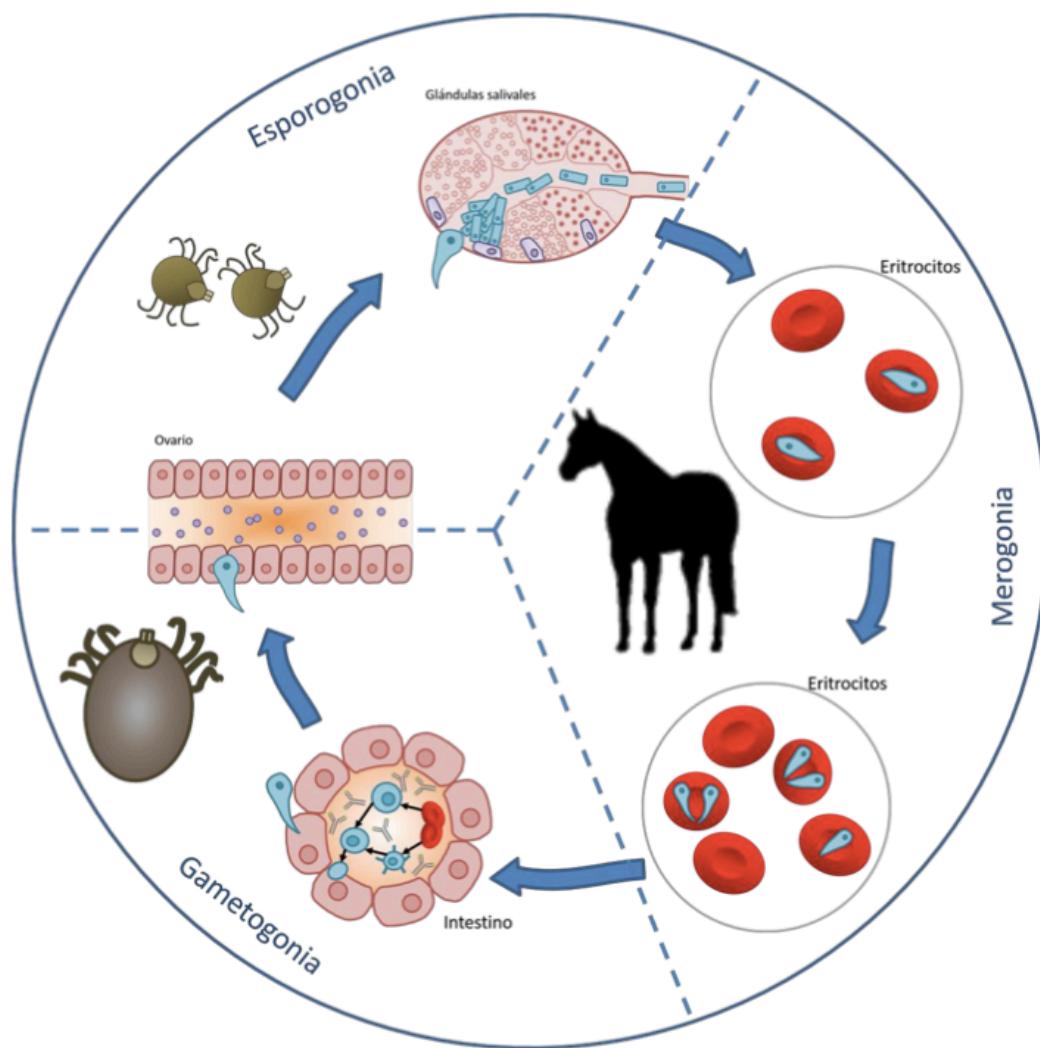


Ilustración 3 Ciclo de vida de *B. caballi*. (Tomado de Salinas-Estrella, 2022)

VII. Patogenia y signos clínicos

La piroplasmosis equina se caracteriza por una anemia hemolítica por la lisis de los eritrocitos producida por la multiplicación de los merozoítos, así como la eliminación

por el bazo de los eritrocitos infectados por los parásitos. De igual manera puede existir trombocitopenia, alteración de la coagulación, vasculitis y microtrombos en vasos sanguíneos pequeños. Puede ocurrir infección transplacentaria que puede dar lugar a abortos, nacimiento de potros infectados, sin embargo no todos los potros que nazcan de madres infectadas, van a ser portadores de la enfermedad. Los anticuerpos del calostro de la yegua, pueden persistir en los potros en los primeros 5 meses de vida. (Paget et al, 1962)

Los signos clínicos de la piroplasmosis equina suelen ser inespecíficos y pueden confundirse con diversas patologías. Su forma de presentación puede ser hiperaguda, aguda o crónica. Los casos agudos se caracterizan por fiebre que supera los 40°C, anorexia, aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria, heces secas y pequeñas y congestión de las mucosas. (Rothschild y Knowles, 2007)

En los casos hiperagudos, los signos son similares, además que los equinos presentan pérdida de peso, fiebre intermitente, mucosas pálidas o con ictericia, también pueden presentar petequias o equimosis, puede presentarse edema en la zona distal de las extremidades. Los casos crónicos presentan anorexia, bajo rendimiento, pérdida de masa corporal y puede haber hallazgo de esplenomegalia.(Cantú-Martínez et al, 2012)

Los caballos que se recuperan de la enfermedad aguda, siguen siendo portadores persistentemente infectados sin signos evidentes de enfermedad y pueden ser reservorios de estos hemoparásitos. (Scoles y Ueti, 2015)

Las yeguas infectadas o portadoras pueden transmitir la enfermedad a los potrillos de manera trasplacentaria o abortar y los portrillos pueden permanecer como portadores asintomáticos o desarrollar anemia. (Rovid et al., 2010)

VIII. Tratamiento

La enfermedad producida por *T. equi* presenta un cuadro más grave y una vez que un equino es infectado con estos hemoparásitos su recuperación es lenta. El tratamiento de elección es dipropionato de imidocarb (1-3 mg/kg), sin embargo actualmente se comercializa el diaceturato de diaminazeno (3-5 mg/kg). (Scoles y Ueti, 2015; Mosqueda et al, 2012)

El uso de diaceturato de diminazeno está prohibido en varios países de la Unión Europea y en Estados Unidos, además que en países como Canadá y algunos de Asia tienen regulaciones estrictas para su uso en animales domésticos debido a la seguridad alimentaria y los residuos que pueden quedar en los productos como carne y leche. (Laylson, et al. 2015)

Sin embargo, es de consideración el uso de estos fármacos, ya que se ha demostrado que el diaceturato de diminazeno se asocia con tiempos de eliminación

prolongados y efectos secundarios como diarrea, anafilaxia y signos del sistema nervioso; además que *Babesia gibsoni*. ha generado resistencia a este fármaco. En el tratamiento con dipropionato de imidocarb, se ha demostrado que causa dolor y reacción en la zona de aplicación en un porcentaje significativo de pacientes, además de problemas gastrointestinales postaplicación. (Hernández-Arvizu, et al, 2024)

IX. Control

En México se implementa el Sistema Internacional de Notificación de Enfermedades, esto siendo parte de la estrategia de la OIE (2015).

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 enfermedades son los responsables de los laboratorios de diagnóstico zoosanitario, Médicos Veterinarios Zootecnistas, productores, personal de farmacias y clínicas veterinarias, personal de Escuelas y Facultades de Medicina Veterinaria, Centros de Investigación, Médicos Veterinarios Zootecnistas de establecimiento para el sacrificio de animales, puntos de verificación de la movilización de animales y productos, Colegios y Asociaciones de MVZS y público en general. (Salinas-Estrella et al, 2022)

Actualmente no existe ninguna vacuna contra *B. caballi* ni contra *T. equi*. (ISU, 2010)

Justificación

En la actualidad no hay cepas de referencia de *Babesia caballi* y de *Theileria equi* en México, no hay una vacuna comercial disponible contra estos agentes etiológicos y no hay laboratorios certificados por la OIE para brindar diagnósticos oficiales de piroplasmosis equina. Por lo tanto el aislar una cepa de campo de *B. caballi* y *T. equi* permitirá establecer las bases de investigación científica e implementar estrategias de control contra la piroplasmosis equina en México.

Hipótesis

La infección experimental de un caballo esplenectomizado con aislados de campo de *Babesia caballi* y *Theileria equi*, adquiridas de equinos previamente diagnosticados, es factible y permite la obtención de muestras parasitarias para estudios posteriores.

Objetivo general

Obtener un aislado de campo de *Babesia caballi* y *Theileria equi* por medio de una infección experimental

Objetivos específicos

1. Adquirir muestras de sangre y garrapatas de equinos en regiones endémicas y donde se ha demostrado la presencia de la piroplasmosis equina
2. Determinar la positividad a *B. caballi* y *T. equi* de las muestras de sangre y garrapatas de equino por medio de métodos moleculares
3. Realizar una esplenectomía a un equino
4. Realizar una infección experimental por medio de la inoculación de eritrocitos infectados con *B. caballi* y *T. equi*

Metodología

1. Obtención de muestras sanguíneas y de garrapatas de caballos de campo

Con la finalidad de obtener sangre de caballos para determinar la presencia de los parásitos *Babesia caballi* y *Theileria equi* se realizaron muestreos en el estado de Querétaro y San Luis Potosí tomando en cuenta los resultados reportados por Salinas et al., 2018.

El primer lugar al que se decidió realizar un muestreo fue en Japlan de Serra, Qro y comunidades aledañas, como se indica en la ilustración 4; ya que se había demostrado la presencia de dichos patógenos.

En este primer muestreo, se recabaron un total de 21 equinos en 9 ubicaciones satelitales distintas.

Muestreo Jalpan de Serra, Qro

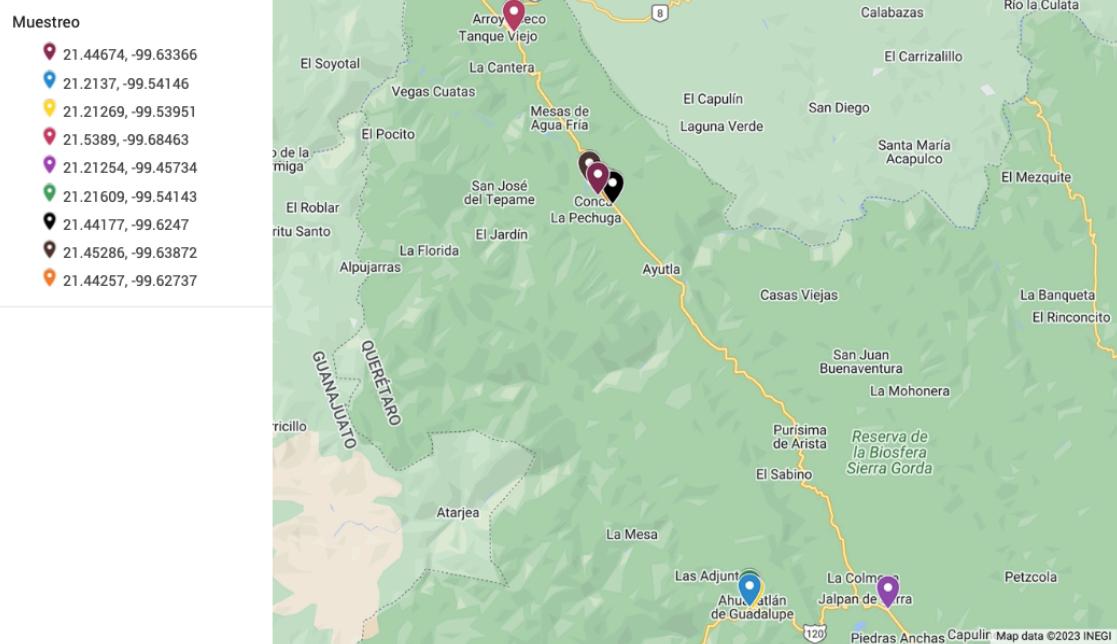


Ilustración 4 Geolocalización del muestreo Jalpan de Serra, Qro

El segundo muestreo se realizó en el municipio de Tamuín, SLP, como se muestra en la Ilustración 5; en esta zona se recabaron un total de 23 equinos en 3 ubicaciones satelitales diferentes.

Muestreo Tamuín, SLP

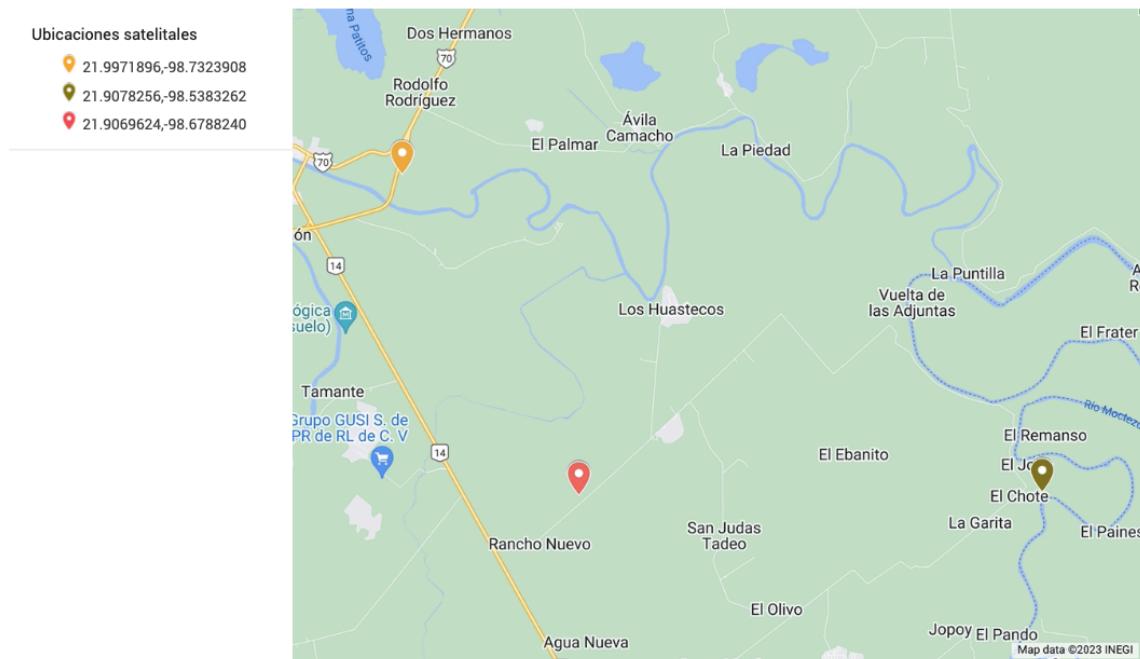


Ilustración 5 Geolocalización del muestreo Tamuín, SLP.

Una vez seleccionados los sitios de interés, se tomaron las muestras de los caballos disponibles por ubicación, a los ejemplares se les tomó sangre completa y suero por medio de una punción en la vena yugular, ya que es la de elección en los equinos por su calibre y fácil acceso. El lugar para la punción se localiza entre el primer y segundo tercio de la tabla del cuello del equino. Para ello se le aplicó alcohol con la ayuda de una torunda y se ocluyó a la mitad del surco yugular para exponerla y se introdujo la aguja en un ángulo de 45° respecto al surco.

Para la recolección de garrapatas en los equinos muestrados, se les realizó un examen físico revisando las zonas de orejas, tupé, cuello, cruz, lomo y grupa. Una vez identificada la presencia de garrapatas en los ejemplares, se tomaron una por una, sujetándolas de la base del capitulo y retrayéndolas hacia el lado contrario que están fijadas para extraerlas con su hipostoma, posteriormente se depositaron en un contenedor horadado.

Con la finalidad de mantener la integridad de las muestras y asegurar el éxito en los siguientes pasos del proceso experimental, éstas fueron trasnportadas en refrigeración, inmediatamente después de recolección. Para el caso de las garrapatas se transportaron a temperatura ambiente en contenedores con horadados para permitir el intercambio gaseoso.

Con la finalidad de asegurar la calidad en la fase preanalítica, todas las muestras fueron identificados por medio de una etiqueta con el Folio Único de Muestra que corresponde a la hoja de identificación que se muestra en la ilustración 6:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

FOLIO: SA-02-14

Proyecto: Establecimiento y estandarización *in vitro* de *Babesia caballi*, agente etiológico de la piroplasmosis equina.

Fecha: 15/02/2023 Lugar de muestreo: Tamuín, SLP

Ubicación satelital: 21°54'28.7"N 98°32'16.0"E

Nombre del rancho: _____

Nombre del propietario: Rafael Corbajal

Datos del equino

Nombre del equino: _____ Raza: Criollo

Fierro y/o chip: AF

Presencia de garrapatas: SI NO Estabulado: SI NO

Observaciones: nacido capote
Tordillo

Ilustración 6 Hoja de identificación

Las muestras se colectaron en orden de acuerdo con la siguiente lista y el folio único mencionado anteriormente se compuso de claves que aseguran identificar tres elementos principales: 1) tipo de muestra (SA para sangres, SU para suero y GA para garrapatas), 2) número consecutivo de la ubicación satelital, siendo el 1 el primer sitio de muestreo, el 2 el segundo y así sucesivamente, el tercer número del folio es el número consecutivo de cada individuo muestreado. A continuación, se ejemplos con descripción detalla de los folios.

Tubos Vacutainer con EDTA fueron rotulados con las siglas **SA-01-01**.

Considerando que **SA-Sangre**, 01- Ubicación satelital (Orden en que fueron muestreados los lugares 01, 02, 03, etc.) y 01-Número de equinos muestreados (Orden en que fueron muestreados los equinos 01, 02, 03, etc).

Tubos Vacutainer rojos fueron rotulados con las siglas **Su-01-01**.

Considerando que **Su-Suero**, 01- Ubicación satelital (Orden en que fueron muestreados los lugares 01, 02, 03, etc.) y 01-Número de equinos muestreados (Orden en que fueron muestreados los equinos 01, 02, 03, etc).

Vasos recolectores fueron rotulados con las siglas **GA-01-01**.

Considerando que **GA-Garrapata**, 01- Ubicación satelital (Orden en que fueron muestreados los lugares 01, 02, 03, etc.) y 01-Número de equinos muestreados (Orden en que fueron muestreados los equinos 01, 02, 03, etc).

Uno de los criterios de exclusión de las muestras, son aquellas que no fueron rotuladas correctamente o que les faltó información.

2. Procesamiento de muestras

Arribando las muestras de sangre completa al laboratorio estas fueron almacenadas a -20°C

Para la obtención de suero sanguíneo, las muestras en tubo Vacutainer sin anticoagulante se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 min, con ayuda de las micropipetas el suero fue separado y alicuotado en tubos de 1.5 ml.

Cada tubo se etiquetó con el Folio Único de Muestra.

Para evitar el crecimiento de microorganismos en las garrapatas y eliminar contaminantes como pelaje del animal, tierra, etcétera, las garrapatas fueron lavadas. Cada vaso recolector con garrapatas se lavó individualmente de la siguiente manera:

- Las garrapatas se transfirieron en un colador y para quitar la suciedad se enjuagaron con agua de grifo Una vez limpias se colocaron en un vaso recolector limpio.
- Las garrapatas fueron sumergidas en cloruro de benzalconio al 10% y se dejó reposar por 10 min.
- Nuevamente, se pasan las garrapatas al colador para eliminar el líquido y fueron secas con ayuda de toallas de papel interdoobladas.
- Una vez secas se colocaron nuevamente en el vaso recolector limpio y seco.

3. Extracción de DNA de sangre completa

El protocolo para la extracción de DNA con el kit comercial Dneasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) (num. Cat. 69506, Hilden, Germany) de sangre con EDTA fue el siguiente:

1. Se colocaron 20μl de proteinasa K en el fondo de un tubo de 1.5 ml.
2. Se agregaron 100μl de muestra de sangre anticoagulada.
3. Se ajustó el volumen con PBS (estéril) a 220μl (100μl de PBS).
4. Se añadieron 200μl de solución tampón AL y se mezcló en vórtex hasta homogenizar.
5. Se incubaron 10 min. a 56°C.
6. Se agregaron 200μl de etanol grado biología molecular y se mezcló en vórtex.
7. Se cargó la muestra en una columna y se ensambló a un tubo colector.
8. Se centrifugaron a 8000rpm durante 1 min.

9. Con cuidado se descartó el líquido del tubo colector y se ensambló la columna.
10. Se añadieron 500 μ l de solución tampón AW1.
11. Se centrifugaron a 8000rpm durante 1 min.
12. Se descartó el líquido del tubo colector y se ensambló la columna
13. Se añadieron 500 μ l de solución tampón AW2.
14. Se centrifugaron 3 min. a 13,000 rpm.
15. Se descartó el líquido y el tubo.
16. Se colocó la columna en un tubo de 1.5ml.
17. Se agregaron 200 μ l de solución tampón AE.
18. Se incubó 5 min. a temperatura ambiente.
19. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 min.
20. Se almacenaron a -20°C.

4. Integridad de DNA

Una vez realizado el procedimiento de extracción y purificación de ADN con la finalidad de confirmar su integridad se llevó cabo una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora de corrida TAE. Dicha electroforesis se realizó a un voltaje constante de 50 volt/cm durante 50 min, se utilizó como indicador de talla molecular 1Kb (num. Cat. BIO-33025 Bioline, Meridian, UK). El gel de agarosa fue visualizado y fotodocumentado con ayuda el equipoChemiDoc de BioRad (California, USA).

5. Diagnóstico de *B. caballi* por nPCR

Para confirmar que los équidos muestrados estuvieran infectados con *Babesia caballi* se realizó una reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR) basada en el protocolo descrito por Schwint et al. (2008) del gen *rap 1*. Los iniciadores fueron los siguientes:

Rap 1 iniciadores externos:

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

Reverse: BcRap1-nestR 5'-CGCAAGTTCTCAATGTCAG-3'

Amplifican un fragmento del nucleótido 165 al 778.

Rap1 iniciadores internos:

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

Reverse: BcRap1-nestR 5'-CGCAAGTTCTCAATGTCAG-3'

Amplifican un fragmento de 222 pb. (Schwint, 2008)

A continuación, en la Tabla 2, se desglosan los reactivos y los volúmenes requeridos para a realización de la reacción externa de la nPCR para *B. caballi*:

Componente	Volumen	Concentración final	Volumen para 15 reacciones
Master Mix 2X*	6.25 μ l	1X	93.75 μ l
Oligo BcRap1-exF	1 μ l	0.2 μ M	15 μ l
Oligo BcRap1-exR	1 μ l	0.2 μ M	15 μ l
Muestra DNA	.5 μ l	No más de 20 ng	.5 μ l
Agua grado Biología molecular	3.75 μ l	c.b.p volumen final	56.25 μ l
Volumen final	12.5 μ l	---	180 μ l

* MyTaq Mix (Num. Cat. BIO-25042, Bioline, Meridian, UK)

Tabla 2 Reactivos para la reacción externa de la nPCR de *B. caballi*

Con la finalidad de asegurar uniformidad de los componentes de la reacción, el volumen final de la mezcla de reacción para 15 reacciones fue alicuotado y a cada tubo se le agregó muestra, dejando dos tudos como control, un tubo con DNA de *B. caballi* y otro con agua grado biología molecular.

El Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la UAQ cuenta con un amplio inventario de muestras de distintas especies de animales y patógenos, por lo cual de ahí se obtuvo el control positivo de *B. caballi* que se usó en la nPCR, dicho control fue diagnosticado previamente por microscopía y otros métodos moleculares.

El protocolo de termociclado para la reacción externa se muestra en la Ilustración 7:

Protocolo de termociclado para la Reacción Externa de *B. caballi*

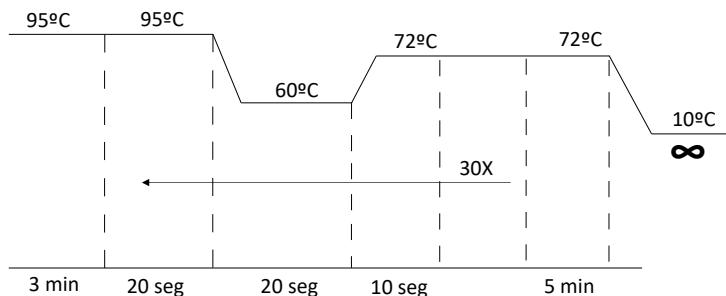


Ilustración 7 Protocolo de termociclado para la reacción externa de *Babesia caballi*

En la Tabla 3, se desglosan los reactivos y los volúmenes requeridos para la realización de la reacción interna de la nPCR para *B. caballi*:

Componente	Volumen	Concentración final	Volumen para 15 reacciones
Master Mix 2X*	6.25 µl	1X	93.75 µl
Oligo BcRap1-intF	1 µl	0.2 µM	15 µl
Oligo BcRap1-intR	1 µl	0.2 µM	15 µl
Muestra DNA	.5 µl	No más de 20 ng	.5 µl
Agua grado Biología molecular	3.75 µl	c.b.p volumen final	56.25 µl
Volumen final	12.5 µl	---	180 µl

* MyTaq Mix (Num. Cat. BIO-25042, Bioline, Meridian, UK)

Tabla 3 Reactivos para la reacción interna de la nPCR de *B. caballi*

El protocolo de termociclado para la reacción interna se muestra en la ilustración 8:

Protocolo de termociclado para la Reacción Interna de *B. caballi*

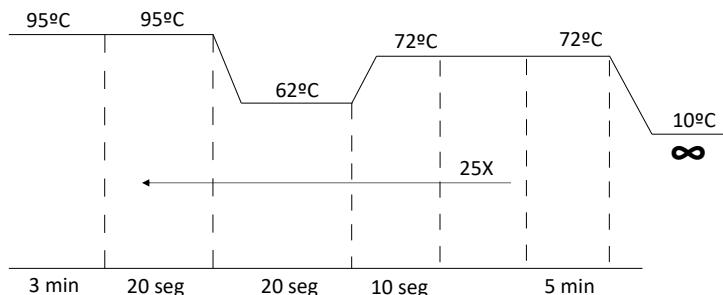


Ilustración 8 Protocolo de termociclado para la reacción interna de *Babesia caballi*

La resolución de los fragmentos de la nPCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución buffer de corrida TAE. Se realizó a un voltaje constante de 50 volt/cm durante 50 minutos, se utilizó como indicador de peso molecular 1Kb. Para la visualización de los fragmentos se realizó en un ChemiDoc de BioRad.

6. Diagnóstico molecular de *T. equi* por nPCR

Para confirmar que los équidos muestreados estuvieran infectados con *T. equi* se realizó nPCR basada en el protocolo de Ueti et. al (2003) que amplifica el gen ema1. Iniciadores:

Ema1 iniciadores externos:

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

Reverse: TeEma1-exR 5'-CGCCATAGACGGAGAAGCC-3

Amplifican un fragmento del nucleótido 165 al 778.

Ema1 iniciadores internos:

Int-Forward: 5'-AAGGACAACAAAGCCATACGT-3'

Int-Reverse: 5'-TTGCCTGGAGCCTTGAAG-3'

Amplifican un fragmento de 227 pb.

A continuación, en la Tabla 4, se desglosan los reactivos y los volúmenes requeridos para a realización de la reacción externa de la nPCR para *T. equi*:

Componente	Volumen	Concentración final	Volumen para 15 reacciones
Master Mix 2X*	6.25 µl	1X	93.75 µl
Oligo TeEma1-exF	1 µl	0.2 µM	15 µl
Oligo TeEma1-extR	1 µl	0.2 µM	15 µl
Muestra DNA	.5 µl	No más de 20 ng	.5 µl
Agua grado Biología molecular	3.75 µl	c.b.p volumen final	56.25 µl
Volumen final	12.5 µl	---	180 µl

* MyTaq Mix (Num. Cat. BIO-25042, Bioline, Meridian, UK)

Tabla 4 Reactivos para la reacción externa de la nPCR de *T. equi*

El protocolo de termociclado para la reacción externa se muestra en la ilustración 9:

Protocolo de termociclado para la Reacción Externa de *T. equi*

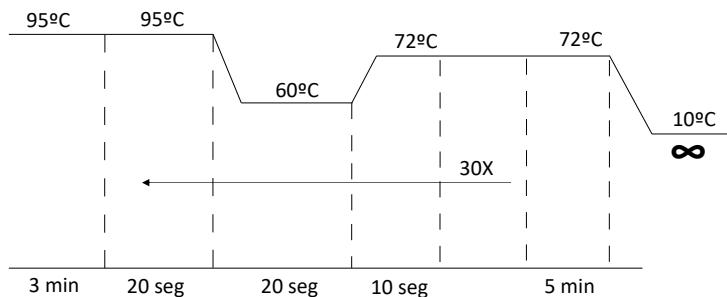


Ilustración 9 Protocolo de termociclado para la reacción externa de *Theileria equi*

En la Tabla 5, se desglosan los reactivos y los volúmenes requeridos para la realización de la reacción interna de la nPCR para *T. equi*:

Componente	Volumen	Concentración final	Volumen para 15 reacciones
Master Mix 2X*	6.25 µl	1X	93.75 µl
Oligo TeEma1 -intF	1 µl	0.2 µM	15 µl
Oligo TeEma1-intR	1 µl	0.2 µM	15 µl
Muestra DNA	.5 µl	No más de 20 ng	.5 µl
Agua grado Biología molecular	3.75 µl	c.b.p volumen final	56.25 µl
Volumen final	12.5 µl	---	180 µl

* MyTaq Mix (Num. Cat. BIO-25042, Bioline, Meridian, UK)

Tabla 5 Reactivos para la reacción interna de la nPCR de *T. equi*

El protocolo de termociclado para la reacción interna se muestra en la ilustración 10:

Protocolo de termociclado para la Reacción Interna de *T. equi*

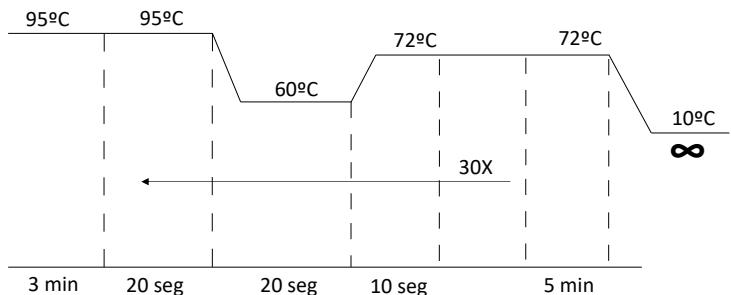


Ilustración 10 Protocolo de termociclado para la reacción interna de *Theileria equi*

La visualización de los amplicones de la nPCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución buffer de corrida TAE y gel red como intercalante. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 50 volt/cm durante 50 minutos y se utilizó un indicador de peso molecular 1Kb. Para la visualización de los fragmentos se realizó en el ChemiDoc (BioRad).

7. Esplenectomía

Con la finalidad de obtener eritrocitos infectados para posteriormente establecer un cultivo *in vitro* de los dos parásitos fue necesario realizar una infección en condiciones experimentales, para lo cual se realizó una esplenectomía en un caballo en las instalaciones del Hospital Veterinario de Grandes Especies (HVGE) de la UAQ. Aprobado por el comité de bioética (35FCN2022).

Se adquirió un caballo criollo, de 3 años de edad, con una condición corporal de 2/5 y sin medicina preventiva. Se recibió al caballo en el HVGE; se estabuló en una caballeriza de 5m x 5m, con piso de cemento y una cama de viruta con un grosor de 30 cm, agua en cubeta de 20L con graduación para saber la cantidad exacta de consumo al día y un contenedor redondo de plástico como comedero, contando en todo momento con supervisión del personal del hospital; así como tenía programado paseos de 30 min, 3 veces al día y examen físico general 2 veces por día. Se le dio una dieta balanceada para aumentar su condición corporal a 3/5, se le realizó balance orodental, se aplicaron las vacunas contra tétanos e influenza equina y se le administró desparasitante fenbendazol a una dosis de 1mg/kg.

La cirugía realizada consiste en la extirpación quirúrgica del bazo, bajo un protocolo anestésico, analgésico y de antibioterapia. Fue realizada por el cirujano MSPAS. José Rodrigo Morales García, primer ayudante el MVZ. Emmanuel Castañeda Villafranca, anestesista pMVZ. Alejandra Carapia Pacheco, ambulantes en quirófanos fueron la pMVZ. María Guadalupe Robles Ruiz y el eMVZ. Eder Hernández Plata y más médicos especialistas y certificados participaron para realizarla con éxito.

Aunque hay referencias que describen la esplenectomía en equinos, los médicos expertos en este tipo de cirugías consideraron estas muy invasivas, por lo que la cirugía se realizó de manera experimental con base en la experiencia del cirujano MSPAS. José Rodrigo Morales García, la cual se describe a continuación.

La técnica prequirúrgica de lavados, tricotomía y suturas se basó tomando como referencias algunas técnicas descritas en bovinos por Matt (2008) y Sánchez (2011), por lo que se realizaron adaptaciones a la anatomía del caballo.

La cirugía se dividió en distintos tiempos:

- Prequirúrgico

Al caballo se dietó 15 h de alimento sólido y 6 h de agua. A la altura de la región de la fosa paralumbar izquierda se realizó un lavado con jabón quirúrgico neutro y tricotomía con rasuradora con peine del núm. 50.

- Sedación

El protocolo de inducción anestésica fue con xilacina al 10%, utilizando una dosis de 1.1 mg/kg, gliceril guayacol éter usado a dosis efecto y ketamina a una dosis de 2.2 mg/kg. Una vez profundizado el caballo se conectó al vaporizador para iniciar con la anestesia total endovenosa (TIVA). (Lerche P. 2013)

- Quirúrgico

La cirugía se realizó con el equino anestesiado en un plano profundo en la posición de decúbito lateral derecho. Se realizó un embrocado a tres tiempos con yodopovidona al 1% y etanol al 70% en la zona quirúrgica abarcando del decimoquinto par de costillas, fosa paralumbar izquierda y tuberosidad coxal. Se hizo un bloqueo con lidocaína al 2% en el lugar de incisión, el cual se realizó trazando una línea de 15 cm paralela al borde caudal del último par de costillas con 5 cm de separación por medio de infiltración a lo largo de la línea de incisión.

Se hizo una incisión con bisturí utilizando una hoja del núm. 22 en la línea trazada a la altura de la fosa paralumbar izquierda en unos 15 cm de longitud, incidiendo en los siguientes planos; piel, tejido subcutáneo, músculo oblicuo externo, músculo oblicuo interno, músculo transverso abdominal y peritoneo.

Una vez incidido el peritoneo se ingresó a cavidad abdominal y se localizó el colon descendente con bandas, el cual se opriime con cuidado para poder localizar el bazo. El bazo estaba localizado de forma oblicua en las últimas tres costillas en su porción dorsal hasta el vértice ventral que se extendía en punta hacia craneal alrededor de la novena costilla. Se procedió a hacer disección roma de la cápsula que se encuentra adherida anatómicamente a su porción dorsal en la cara parietal al diafragma y en su porción craneal a la curvatura mayor del estómago.

Ya que fueron retiradas las adherencias anatómicas del bazo, se logró ubicar el hilio esplénico (ligamento gastroesplénico, arteria y vena esplénica, ligamento renoesplénico y ligamento frenicoesplénico) ubicado en la porción parietal del tercio craneal en su posición medial, se procedió a ligar con sutura de ácido poliglicólico del núm. 3 con un nudo de cirujano simple a dos centímetros de separación del bazo, para esto se utilizó un botón de guía para lograr pasar la sutura alrededor del hilio esplénico. Una vez ligado se cortó con tijeras de mayo curvas en el espacio entre el bazo y la ligadura, después se procedió a retirar el bazo.

El cierre de tejidos se realizó en el siguiente orden; peritoneo con puntos continuo simple con sutura de ácido poliglicólico del núm. 2-0; músculos oblicuo externo, oblicuo interno y transverso abdominal con sutura de ácido poliglicólico del núm. 3 con puntos en equis; tejido subcutáneo con sutura de ácido poliglicólico del núm. 3 con puntos en equis, por último se suturó piel con sutura Braunamid núm. 0 con puntos en colchonero horizontal, aproximando los bordes para lograr una cicatrización por primera intención.

- Postquirúrgico

El equino fue internado y llevado a recuperación en una caballeriza en el HVGE mediante monitoreo las 24 h, recibió analgesia con meglumina de flunixin (1.1 mg/kg) cada 12h por tres días, postcirugía se le realizó una infusión con lidocaína al 2%, antibioterapia con doble esquema de antibióticos por 10 días con penicilina G procaínica (22,000 UI/kg) y gentamicina (6.6 mg/kg), además de monitoreo de su microhematócrito (Hto) y proteínas totales séricas (PPT) cada 24h por cuatro días postcirugía, esto con la finalidad de notar cambios en caso de alguna hemorragia por el retiro del bazo.

Para proteger la zona de incisión del ambiente postcirugía, se colocó un apósito de manera vertical en la incisión y se vendó el abdomen para sostenerlo.

La limpieza de la herida fue diaria durante 5 días. La incisión se rociaba abundantemente con solución salina al mismo tiempo que se esponjeaba con gasas estériles, al finalizar este procedimiento se secaba la zona con gasa estéril para

posteriormente aplicar larvicida y cicatrizante en polvo y aerosol, por último se colocaba un apósito nuevo.

8. Toma de muestra de sangre infectada con *B. caballi* y *T. equi*

Con la finalidad de obtener muestras infectadas de los patógenos, se localizó nuevamente a los animales que salieron positivos a las pruebas diagnósticas. Se programó un nuevo muestreo en el municipio de Tamuín, SLP rastreando los equinos con diagnósticos positivos. A cada equino antes de ser muestreado se le realizó un lavado a tres tiempos con yodopovidona al 1% y etanol al 70% para disminuir la contaminación de los materiales y se extrajeron 15 tubos Vacutainer con Heparina de cada equino muestreado, el volumen final obtenido de cada equino fue de 90 ml. Dichas muestras se trasladaron al Laboratorio de Investigación de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), en una hielera con refrigerantes durante 7 h aproximadamente del trayecto San Luis Potosí-Querétaro.

9. Lavado y procesamiento de las muestras

Las muestras fueron lavadas 3 veces con solución VYM estéril, según el procedimiento de Vega *et al.*, (1985) y se eliminó la capa flogística de la sangre. Se realizó una mezcla de la sangre de los animales detectados como positivos anteriormente, con la finalidad de eliminar el suero y todos sus componentes, junto con los anticuerpos y células blancas para quedarse únicamente con los eritrocitos infectados y de esta manera asegurar que en el proceso de la infección experimental del equino, la muestra tuviera patógenos.

Los eritrocitos infectados se depositaron en una jeringa estéril de 50 ml y se transportó en una hielera con refrigerantes a la Nave de Infectómica Animal (NINFA), Campus Amazcala de la UAQ, donde se encontraba el equino.

10. Infección experimental

Con la finalidad de obtener células rojas infectadas con los parásitos, se realizó una infección experimental y se utilizó el equino al que se le realizó la esplenectomía. Se inoculó la sangre previamente seleccionada y lavada con medio VYM por vía intravenosa lenta e intramuscular profunda con 15 ml cada aplicación.

Para asegurarnos del bienestar animal del equino se monitorizó diariamente su estado de salud mediante la toma de sus constantes fisiológicas y su hematocrito, la alteración de estos signos clínicos serían indicativos de una infección.

Las constantes fisiológicas que se consideraron fueron la frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR), temperatura (T) y microhematocrito (HTO). Una de las consideraciones que se tuvo fue medir su hematocrito hasta que la temperatura del caballo aumentara de su rango normal para no realizar el proceso invasivo constantemente.

Una vez que aumentó la temperatura, se realizó una extracción de sangre para hacer un frotis sanguíneo con tinción de Giemsa. Ya que se observaron parásitos en frotis sanguíneo se realizó una extracción de sangre infectada por punción de la vena yugular y se recolectó en un matraz estéril, el cual contenía canicas de cristal para favorecer la formación del coágulo de fibrina.

Al obtener la muestra de sangre se inició la terapéutica con dipropionato de imidocarb de 120 mg, con dosis de 4 ml para el peso del caballo; el monitoreo del equino continuó hasta que sus constantes fisiológicas se normalizaron y sus frotis sanguíneos fueron negativos a la presencia de los hemoparásitos. Una vez concluída esta fase experimental se prescindió del ejemplar.

Las muestras de sangre obtenidas del proceso de infección experimental fueron usadas para iniciar el cultivo *in vitro* de *B. caballi* y *T. equi* y una parte fue criopreservada en nitrógeno líquido para su posterior utilización. El cultivo de ambos parásitos no forma parte de esta estrategia experimental.

Resultados

1.1 Obtención de muestras para el diagnóstico de *Babesia caballi* y *Theileria equi* para la identificación de animales infectados

Los equinos muestreados en las comunidades visitadas eran usados para actividades agrícolas, ganaderas y de transporte, así mismo la mayor parte de estos no estaban estabulados y su alimentación se basa en libre pastoreo en potreros determinados. Su condición corporal de la mayoría de los animales era deficiente y presentaban heridas crónicas no tratadas como se muestra en la Ilustración 11 una lesión en la zona ventral del tórax del caballo.



Ilustración 11 Herida crónica sin tratamiento. Tamuín, SLP. Fotografía: Diego Hernández

De los 44 equinos muestrados en total, 5 fueron burdéganos y 39 caballos. No se registraron datos de sexo ni medidas corporales. En la Ilustración 12 se observa la punción de la vena yugular para la extracción de sangre, esto en Jalpan de Serra.



Ilustración 12 Venopunción de yugular en equino. Jalpan de Serra, Qro. Fotografía: Diego Hernández

De los equinos muestrados, 13 tuvieron presencia de garrapatas, las cuales para los fines del proyecto no se identificaron taxonómicamente. En la Ilustración 13 se muestra la presencia de una garrapata repleta en la zona rostral del caballo y este ejemplar tenía como método de alimentación libre pastoreo en temporadas de lluvia.

La mayoría no presentó garrapatas, ya que los propietarios refirieron que a los caballos los bañan con ixodicidas de manera periódica, junto con los bovinos que tienen.

Ningún ejemplar muestreado tenía signología de la enfermedad.



Ilustración 13 Caballo con una garrapata repleta en la zona rostral. Fotografía: Diego Hernández

2.1 Procesamiento de muestras

De acuerdo al número de equinos seleccionados se obtuvo un total de 44 muestras sanguíneas y 44 de suero, una se descartó por no cumplir con la forma de etiquetado en el folio único de muestra ya que no era posible rastrear su origen; así mismo de 7 equinos se obtuvieron garrapatas y tres de éstas se trasladaron a la incubadora del LINVAS para su oviposición, mientras que las ninfas restantes fueron almacenadas a -20°C. Para los fines de este proyecto las garrapatas obtenidas no son de relevancia para los fines de este proyecto.

Los sueros fueron almacenados en tubos de 1.5 ml dentro de una criocaja a -20°C y etiquetados con el folio único de muestra. La sangre completa fue almacenada en tubos Vacutainer con EDTA a -20°C y etiquetados con la fecha de la toma de muestra, especie, folio único de muestra y lugar de obtención

3.1 Extracción de ADN de sangre completa y comprobación de integridad

De los 44 caballos se logró obtener 43 muestras de ADN, las cuales se confirmó la integridad por medio de un gel de electroforesis de agarosa al 1%. Para tener un orden en las muestras recolectadas, se realizó la comprobación de integridad de ADN por cada municipio. En la Ilustración 14 se comprueba la integridad de ADN de las muestras recolectadas en Jalpan de Serra, Qro.

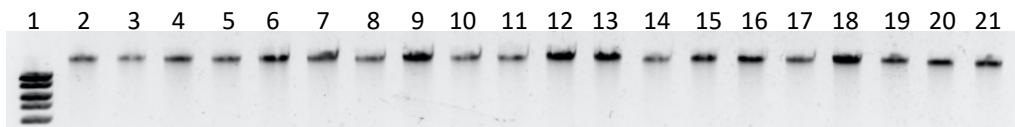


Ilustración 14 Gel de integridad del muestreo en Jalpan de Serra, Qro.

En las ilustraciones 15 y 16, se comprueba la integridad de ADN obtenido a partir del muestreo en Tamuín, SLP.

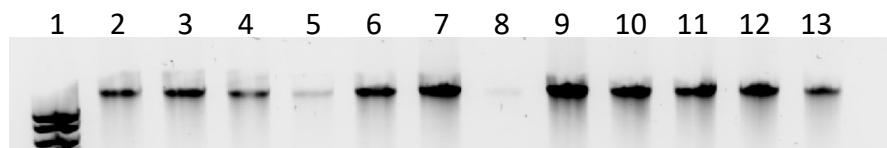


Ilustración 15 Primer gel de integridad de ADN del muestreo en Tamuín, SLP.

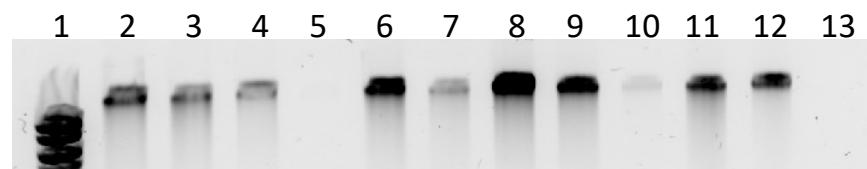


Ilustración 16 Segundo gel de integridad de ADN del muestreo en Tamuín, SLP.

4.1 Diagnóstico molecular de *B. caballi* y *T. equi* por nPCR

Posteriormente se realizaron las pruebas de nPCR para determinar la presencia del patógeno en las muestras recolectadas de los equinos en los diferentes municipios.

En las primeras dos nPCR realizadas, se observaron fragmentos amplificados de distinta talla molecular, en la Ilustración 17 fue en los carriles 4 y 5, en la ilustración 18, fue en los carriles 5, 8, 9 y 11.

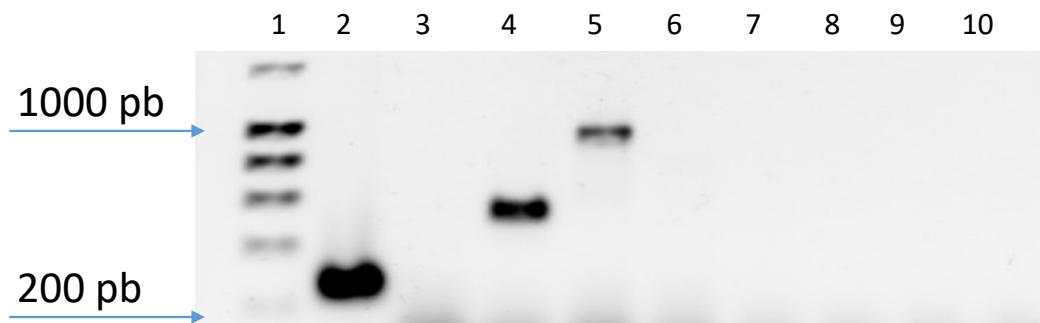


Ilustración 17 Fragmento de los resultados de la primer nPCR para *B. caballi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *B. caballi*; Carril 3-9: Muestras de ADN de equinos de Jalpan de Serra, Qro; Carril 10: Agua grado biología molecular.

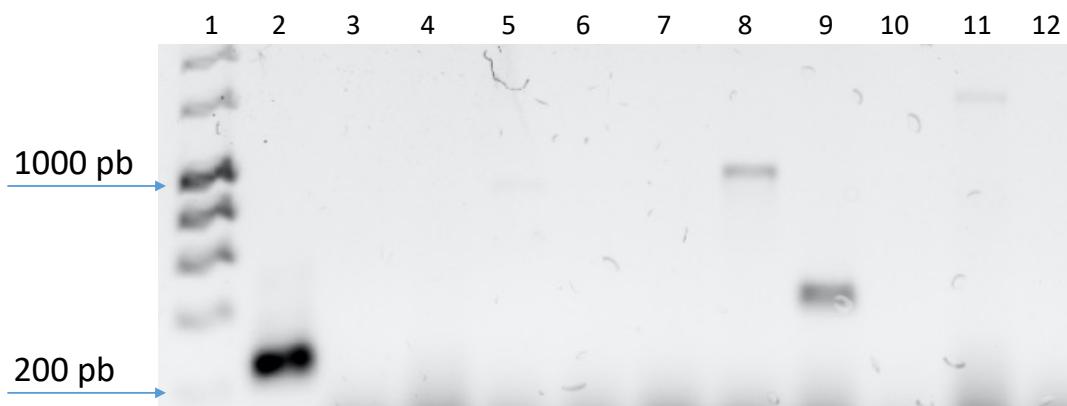


Ilustración 18 Fragmento de los resultados de la segunda nPCR para *B. caballi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *B. caballi*; Carril 3-11: Muestras de ADN de equinos de Jalpan de Serra, Qro ; Carril 12: Agua grado biología molecular.

Posterior a estos resultados, se repitió una nPCR de las muestras que presentaron amplificación. En la ilustración 19 se observa que no hubo equinos positivos al parásito.

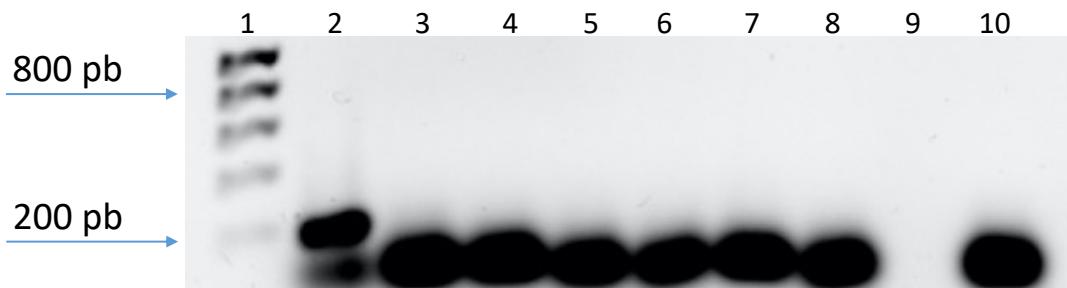


Ilustración 19 Fragmento de los resultados de la tercer nPCR para *B. caballi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *B. caballi*; Carril 3-8: Muestras de ADN de equinos de Jalpan de Serra, Qro; Carril 9: Sin muestra; Carril 10: Agua grado biología molecular.

Para las muestras obtenidas en Tamuín, SLP. Se realizó el mismo protocolo de detección molecular de *B. caballi* y *T. equi* mediante nPCR.

En la ilustración 20 se observan los primeros resultados obtenidos. Dando como resultado ninguna muestra positiva. Mientras que en la Ilustración 21, en el carril 10 hubo una muestra positiva.

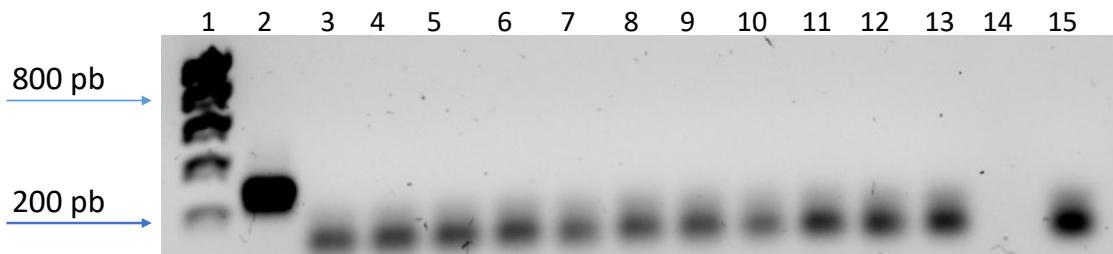


Ilustración 20 Fragmento de los resultados de la primer nPCR para *B. caballi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *B. caballi*; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Sin muestra; Carril 15: Agua grado biología molecular.

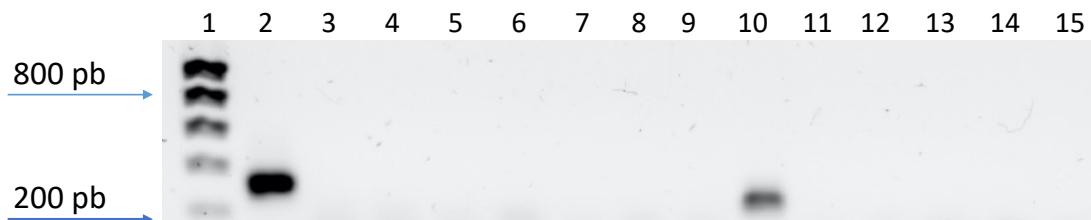


Ilustración 21 Fragmento de los resultados de la segunda nPCR para *B. caballi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *B. caballi*; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Sin muestra; Carril 15: Agua grado biología molecular.

Posteriormente se realizó nPCR para diagnóstico molecular de *T. equi* y los resultados obtenidos son los siguientes:

En la Ilustración 22 se observa en los carriles 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12 y 13 muestras positivas.

En la Ilustración 23 resultaron en los carriles 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13 muestras positivas.

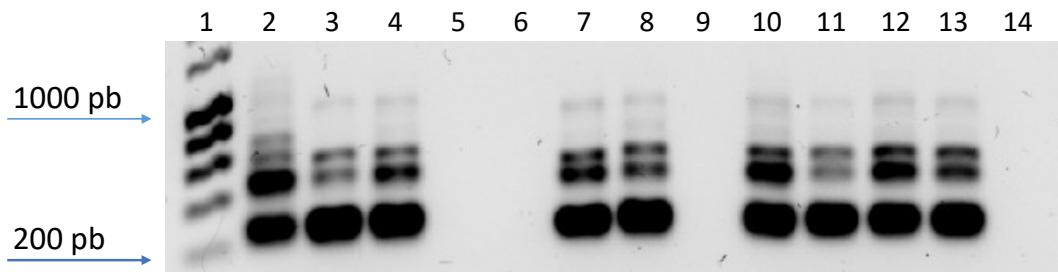


Ilustración 22 Fragmento de los resultados de la primera nPCR para *T. equi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *T. equi*; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Agua grado biología molecular.

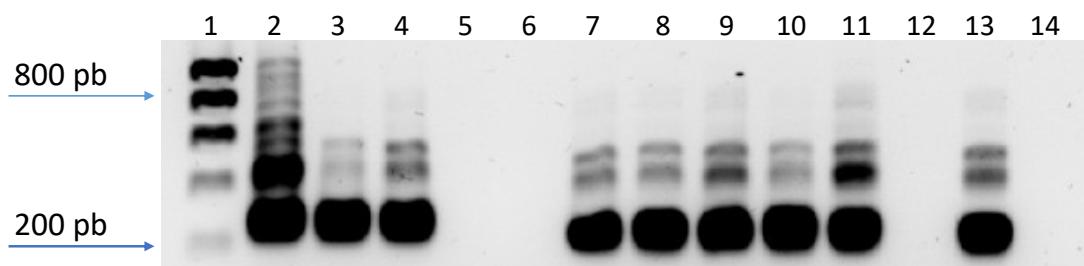


Ilustración 23 Fragmento de los resultados de la segunda nPCR para *T. equi*. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: ADN positivo a *T. equi*; Carril 3-13: Muestras de ADN de equinos de Tamuín, SLP; Carril 14: Agua grado biología molecular.

En la Tabla 6 se describe el total de animales infectados de cada hemoparásito en los dos lugares de muestreo

	Jalpan de Serra, Qro.	Tamuín, SLP.	Totales
Total de muestras	21	23	44
Positivas <i>B. caballi</i>	0	1	1
Positivas <i>T. equi</i>	0	16	16
Negativas a ambas	21	6	27

Tabla 6 Resultados de animales positivos a EP, mediante nPCR

5.1 Esplenectomía

El caballo adquirido para la cirugía presentaba pobre condición corporal como se muestra en la Ilustración 24. Se aplicó un esquema completo de medicina preventiva y participó en actividades prácticas de enseñanza en el HVGE de la UAQ.



Ilustración 24 Caballo criollo adquirido para la fase experimental. Fotografía: Alejandra Carapia

Existen diversas referencias bibliográficas sobre las constantes fisiológicas del caballo, que marcan límites de frecuencia cardíaca entre 28-40 latidos por minuto (lpm), frecuencia respiratoria entre 8-16 respiraciones por minuto (rm), sin embargo a la llegada del caballo se registraron constantes fisiológicas elevadas de hasta 76 lpm y 39 rm, promediando un total de 59 lpm y 32 rm, mientras que la temperatura estaba en rangos normales, promediando 37.6°C. Al principio se consideró que era estrés postviaje, posteriormente nos percatamos que esas eran sus constantes fisiológicas normales, ya que se le hacía examen físico 2 veces por día y siempre mantuvo esos rangos sin presentar signos clínicos de alguna enfermedad o de síndrome abdominal agudo.

Antes de entrar a cirugía se midieron constantes fisiológicas basales y fueron 54 lpm, 29 rpm, Hto 35% y PPT 7.2 g/dL, esto con el propósito de conocer si había cambios drásticos de éstas postcirugía.

Respecto al proceso quirúrgico, al ser una técnica adaptada de otra especie, hay cambios anatómicos de consideración. Algunas bibliografías sugieren retirar la 18va costilla del caballo; sin embargo, se buscó no hacer tan invasiva la cirugía y se logró ingresar a cavidad abdominal y localizar el bazo, únicamente haciendo una incisión en el costado izquierdo, como se muestra en la Ilustración 25.



Ilustración 25 Incisión en fosa paralumbar izquierda del caballo. Fotografía: Maradi Carapia

Posteriormente se realizó la búsqueda del bazo dentro de cavidad (Ilustración 26) y una vez ubicado se realizó disección roma de la cápsula que está adherida y se encontró el hilio esplénico que se ligó y se cortó.



Ilustración 26 Localización del bazo en cavidad abdominal. Fotografía: Maradi Carapia

Una vez que se cortó el hilio esplénico se extrajo el bazo cuidadosamente de la cavidad. Por la naturaleza anatómica y su considerable irrigación sanguínea, se presentó un sangrado abundante al momento de extraerlo, por lo que se utilizó la succión de quirófano, como se muestra en la Ilustración 27, para limpiar la cavidad y asegurarse que no hubiera hemorragia del hilio esplénico.



Ilustración 27 Limpieza de cavidad abdominal con succión. Fotografía: Maradi Carapia

En las Ilustraciones 28 y 29 se expone el bazo que se extrajo en cirugía, en su porción parietal y en su porción visceral, con dimensiones anatómicas normales.



Ilustración 28 Cara parietal del bazo. Fotografía: Maradi Carapia



Ilustración 29 Cara visceral del bazo. Fotografía: Maradi Carapia

Finalmente se suturaron las capas de músculo y piel, como se muestra en la Ilustración 30, para finalizar la cirugía.



Ilustración 30 Sutura de incisión de cirugía. Fotografía: Maradi Carapia

Una vez que el caballo salió de cirugía, ingresó a recuperación y estuvo monitoreado las 24h por 5 días postcirugía. En la Ilustración 31 se muestra al caballo postcirugía con una faja en el abdomen para proteger la incisión.



Ilustración 31 Caballo esplenectomizado. Fotografía: Alejandra Carapia

Los 5 días postcirugía fueron de gran importancia, ya que en estos se observaría cualquier cambio patológico en el equino; sin embargo, todas sus constantes fisiológicas estuvieron dentro de rango. Su frecuencia cardiaca promedió 60 lpm, su frecuencia respiratoria 20 rm, su temperatura corporal 38°C, su microhematocrito de 35% y sus proteínas plasmáticas totales de 6.9 g/dL.

Previo a la cirugía el caballo promedió 59 lpm y 32 rm los primeros días de su estancia en el HVGE.

Las constantes fisiológicas registradas los 5 días posteriores a la cirugía se representan en las siguientes Ilustraciones:

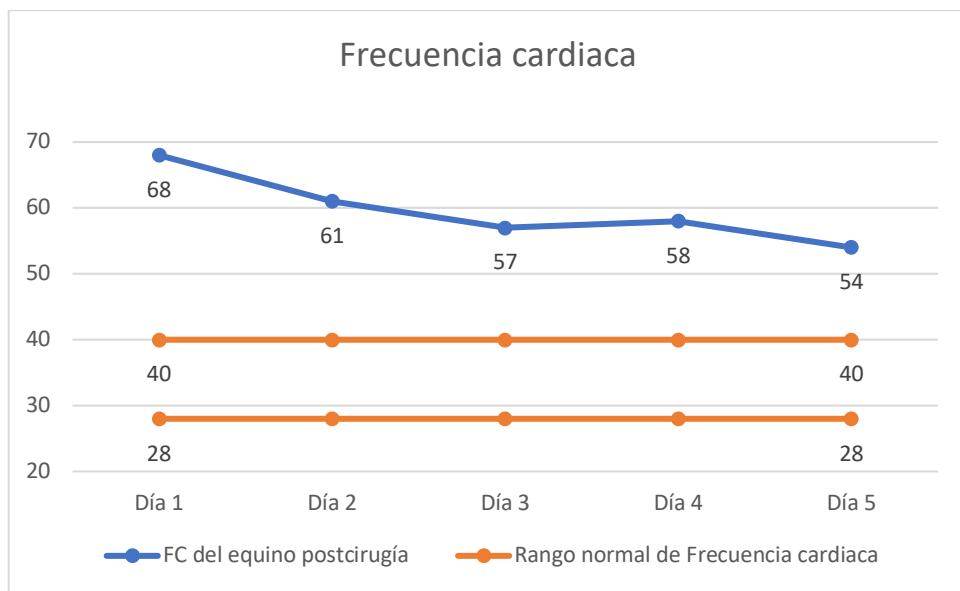


Ilustración 32 Frecuencia cardiaca postcirugía

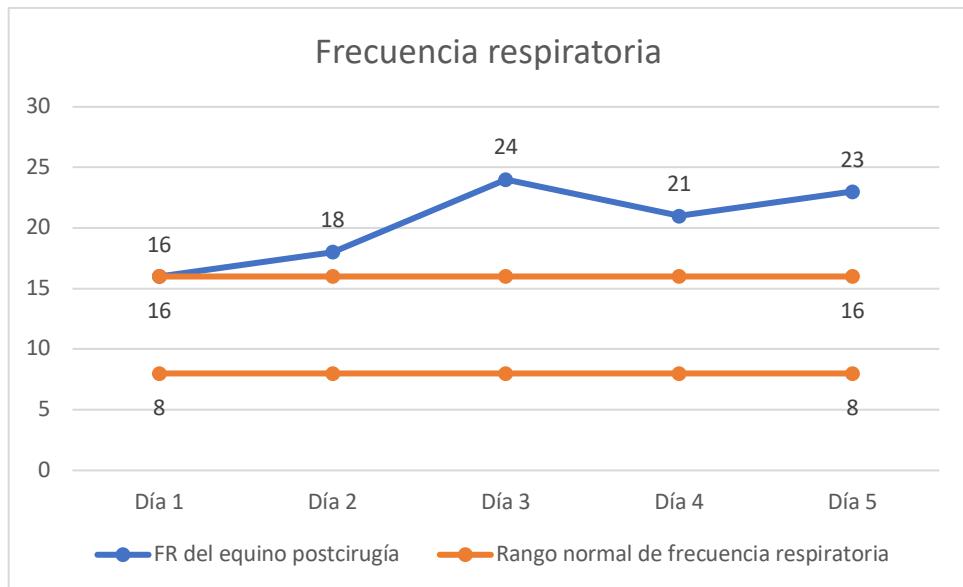


Ilustración 33 Frecuencia respiratoria postcirugía

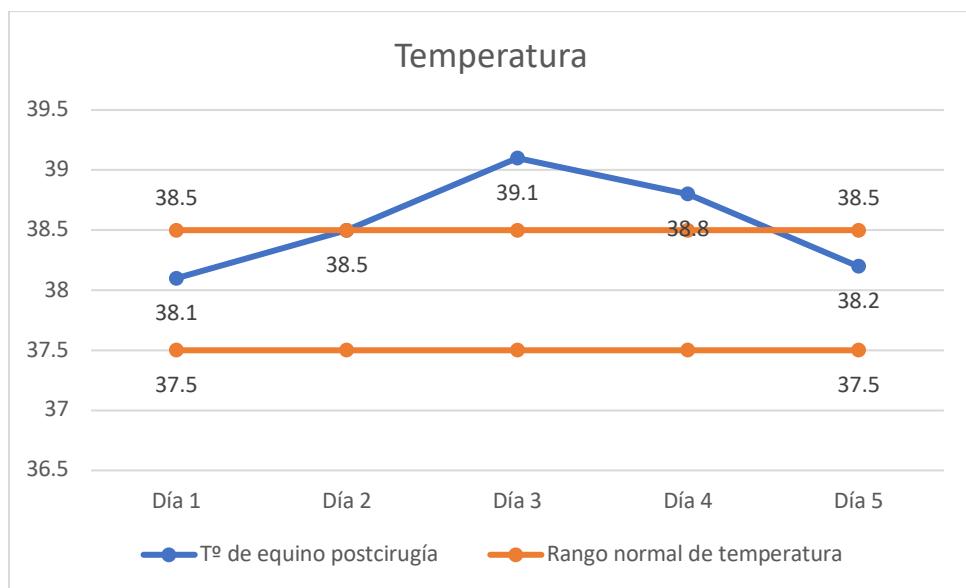


Ilustración 34 Temperatura postcirugía

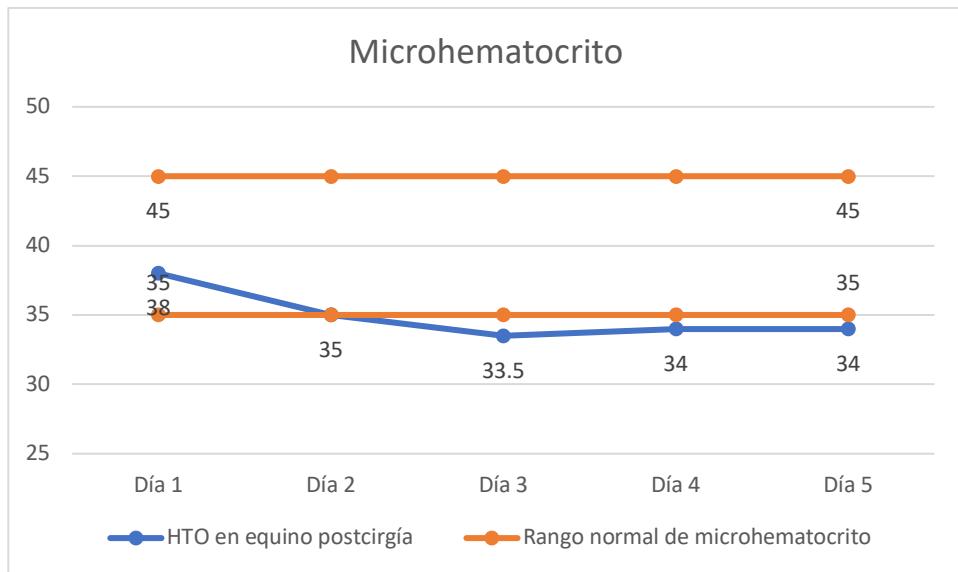


Ilustración 35 Microhematocrito postcirugía

6.1 Toma de muestra de sangre infectada con *B. caballi* y *T. equi* y lavado y procesamiento de muestras

Se lograron localizar 4 equinos con diagnósticos positivos, de los cuales se obtuvieron 15 tubos con heparina de cada uno.

En la Ilustración 36 se ilustra el lavado a tres tiempos en el equino antes de la colecta de sangre.



Ilustración 36 Muestreo de equinos infectados. Fotografía: Diego Hernández

Las muestras se almacenaron en una hielera con refrigerante y se trasladaron durante 7h al LINVAS en el estado de Querétaro.

7.1 Lavado y procesamiento de las muestras

A la llegada al LINVAS, las muestras llegaron lo suficientemente frías para ser procesadas. El volumen total obtenido de los equinos fue de 360 ml, sin embargo con el proceso de eliminación de la capa flogística, se obtuvo un volumen final de 30 ml de sangre infectada. La cual se utilizó para la infección experimental.

En la ilustración 37 se muestra la fase final de la eliminación de la capa flogística de la sangre obtenida.

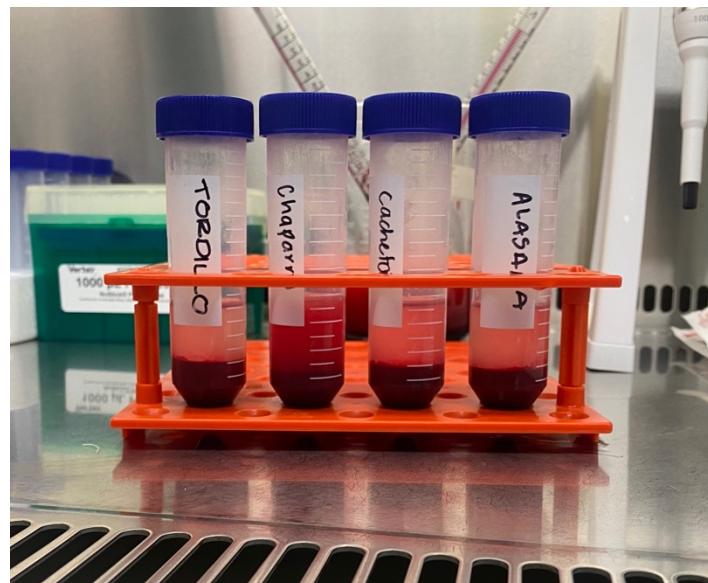


Ilustración 37 Lavado de sangre con medio VyM. Fotografía: Alejandra Carapia

El volumen final obtenido de 30 ml de sangre, se depositó en una jeringa de 50 ml de capacidad y se trasladó a la NINFA en una hielera con refrigerantes.

8.1 Infección experimental

Posterior a la inoculación de la sangre, se monitoreó al caballo diariamente hasta que presentara signos de enfermedad y al finalizar con la terapéutica de la infección. En las siguientes Ilustración se muestra el rango que mantuvieron sus constantes fisiológicas (FC, FR, T y HTO) durante la infección experimental y los dos días posteriores al inicio de la terapéutica.

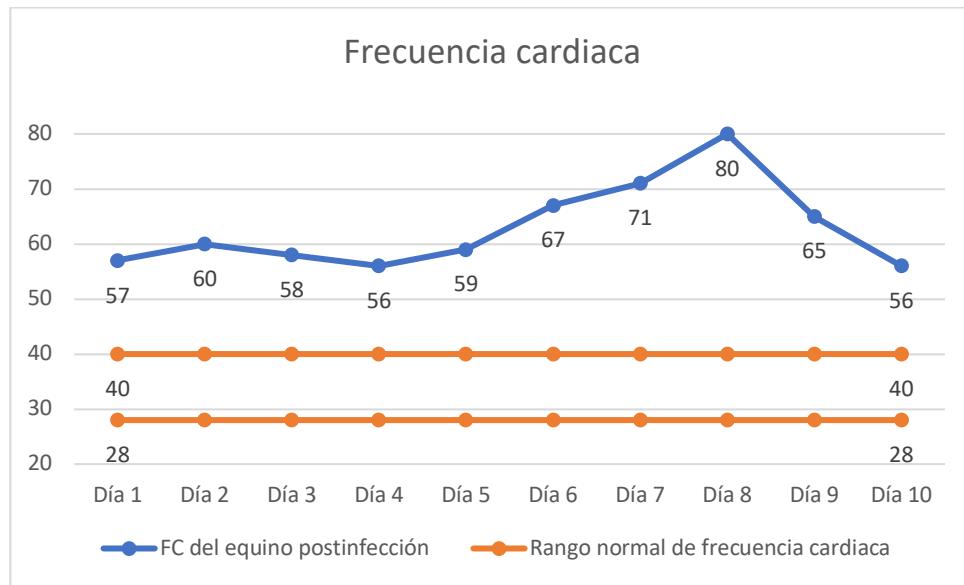


Ilustración 38 Frecuencia cardiaca postinfección

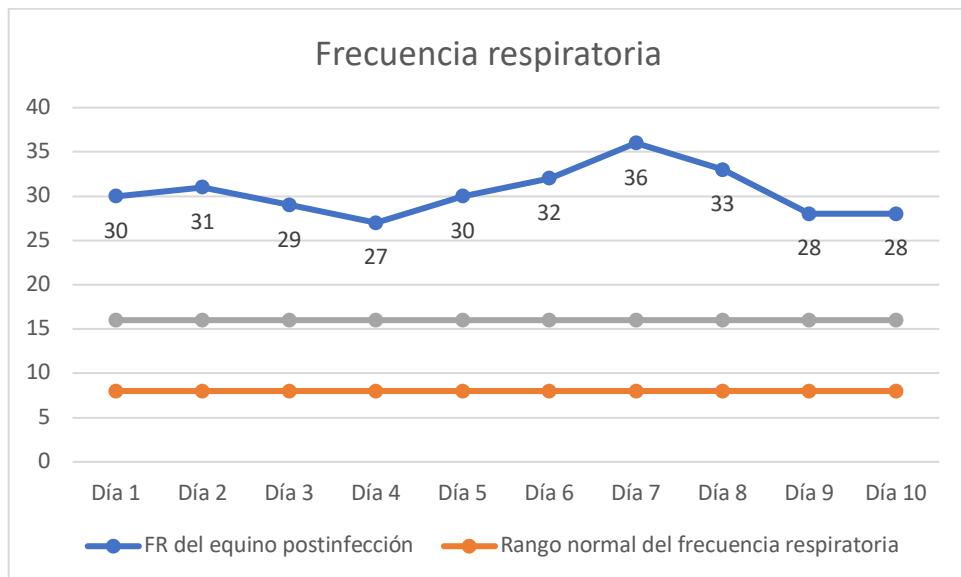


Ilustración 39 Frecuencia respiratoria postinfección

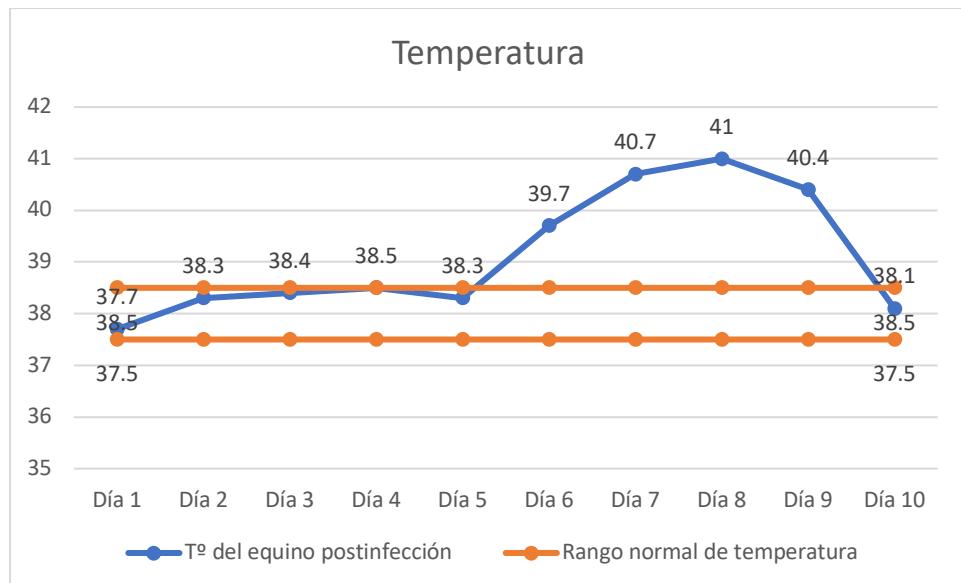


Ilustración 40 Temperatura postinfección

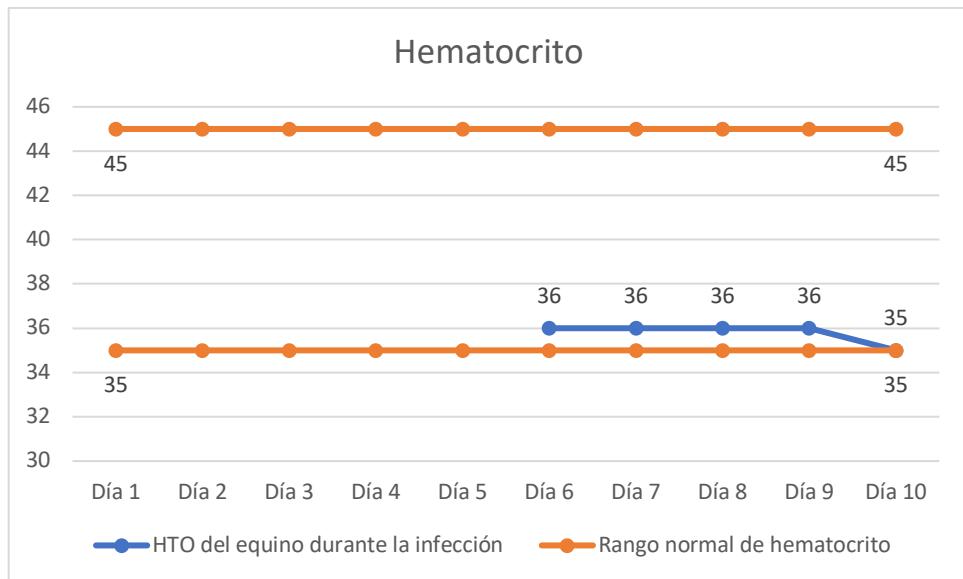


Ilustración 41 Microhematocrito postinfección

Se observó que las constantes fisiológicas se mantuvieron en un rango constante durante los primeros 5 días postinfección; al sexto día aumentaron y se realizaron frotis sanguíneos para comprobar la parasitemia en sangre. En el día 6, la parasitemia fue de 0.6%, mientras que para el día 8 presentó una parasitemia de 2.6%.

En la Ilustración 42 se muestra el frotis realizado el día 7 de la infección, donde se observan merozoitos de *T. equi* en forma de “Cruz de Malta” y trofozoitos de *B. caballi*.

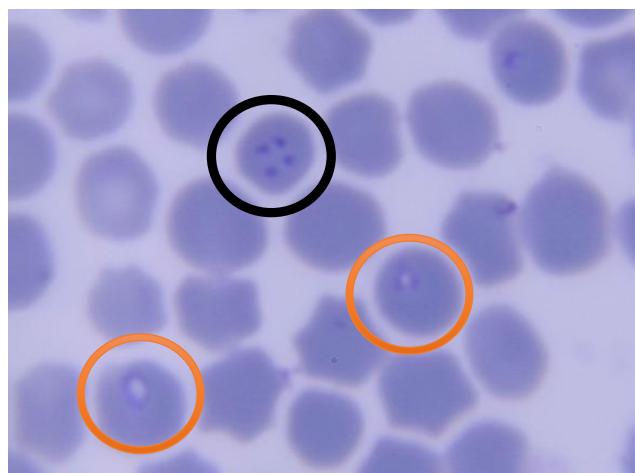


Ilustración 42 Frotis sanguíneo con tinción de Giemsa. En el círculo negro se marcan los trofozoitos en forma de "Cruz de Malta" de *T. equi*, mientras que en el círculo naranja se muestran trofozoitos de *B. caballi*. Fotografía: Edwin Esaú Hernández Arvizu

En la ilustración 43 se muestran merozoitos y trozoitos de *B. caballi* en el frotis realizado el día 8 de la infección.

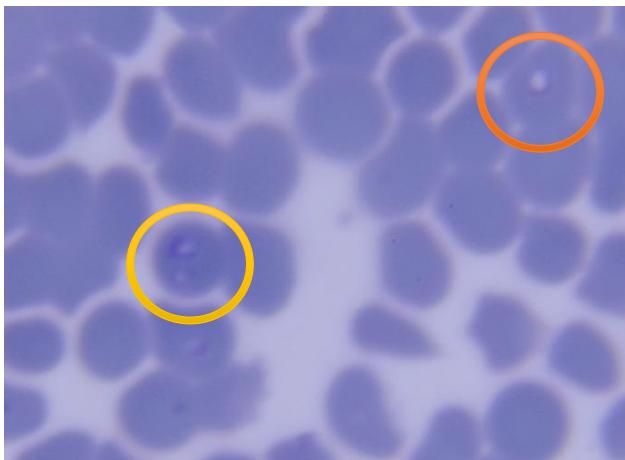


Ilustración 43 Frotis sanguíneo con tinción de Giemsa. En el círculo amarillo se muestran merozoitos de *B. caballi* y en el círculo naranja trozoitos de *B. caballi*. Fotografía: Edwin Esaú Hernández Arvizu

El día 8 de la infección inició el tratamiento contra la infección y, al día 10, sus frotis fueron negativos y sus constantes fisiológicas volvieron a su rango habitual.

Discusión

Los caballos muestreados en las zonas elegidas para el presente trabajo fueron positivos para el diagnóstico molecular de los patógenos *T. equi* y *B. caballi*, como anteriormente fue demuestrado por Salinas-Estrella y colaboradores (2022), donde determinaron la presencia de ambos parásitos en caballos de zonas de Querétaro y en San Luis Potosí. En comparación con los resultados obtenidos en este estudio, se determinó la presencia de los parásitos solamente en caballos ubicados en el estado de San Luis Potosí. Cabe mencionar que es probable que la ausencia de equinos positivos en el estado de Querétaro contrasta con los resultados de Salinas-Estrella (2017) debido a la cantidad de muestras recolectadas, donde en este estudio se analizaron un total de 44 equinos, 21 de Querétaro y 23 en San Luis Potosí; mientras que en el otro estudio se analizaron un total de 269 muestras, de las cuales en Querétaro se muestrearon 30 equinos y en San Luis Potosí 34.

Utilizando la técnica de nPCR, se obtuvo 1 muestra positiva a *B. caballi* teniendo un porcentaje del 2.27%; mientras que para *T. equi* arrojó un porcentaje del 36.36% con 16 muestras positivas, tomando como el 100% las 44 muestras obtenidas en este estudio. La mayoría de los estudios publicados de piroplasmosis equina en México muestran un diagnóstico positivo a *T. equi* mayor en comparación con *B. caballi*, como lo demostraron Rodríguez-Vivas et al, (2000), Ayala-Valdovinos, et al, (2017), Romero-Salas, et al, (2021) y Salinas-Estrella, et al (2022). Lo que concuerda con nuestro estudio, que si bien considera una cantidad de muestras muy reducida, se apegó a la tendencia de estudios de mayor envergadura donde las infecciones de *B. caballi* está presente en menor porcentaje. Cantú-Martínez et

al, (2012), infieren que la mayor presencia de *T. equi* en comparación con *B. caballi* se puede deber a que una de las infecciones es autolimitante y se logra controlar a diferencia del otro parásito; sin embargo, a nuestro saber no existe información de las causas celulares, moleculares y/o inmunológicas que demuestren lo contrario. Lo que confirma la existencia de estos hemoparásitos en comunidades de San Luis Potosí, coincidiendo con Salinas-Estrella, et al, (2017).

De acuerdo con los datos presentados por Rodríguez-Vivas et al, (2000) se demostró una prevalencia de 3.79% para *T. equi* y de 2.53% para *B. caballi*; del mismo modo, Cantú Martínez, et al, (2012), encontraron una elevada seroprevalencia de 45.2% para *T. equi*, mientras que para *B. caballi* fue de 27.4%, estas marcadas diferencias pueden deberse a que *B. caballi* es eliminada por el hospedante sin tratamiento farmacológico.

La esplenectomía realizada al caballo para hacer este experimento se ejecutó de una manera diferente a la propuesta por Roberts, et al,(1978), en el que se sugiere se retire la 18va del caballo para tener un mejor acceso a la cavidad abdominal y así a las estructuras que rodean el bazo; sin embargo se menciona que los caballos esplenectomizados en su estudio, sufrieron neumotórax y una recuperación de la anestesia muy larga, por lo que un espécimen tuvo parálisis del nervio supraescapular, comprometiendo su salud y el experimento.

A diferencia de Roberts y colaboradores en el presente trabajo se consiguió realizar la esplenectomía sin retirar dicha costilla, haciendo menos invasivo el abordaje quirúrgico y obteniendo mejores resultados en el proceso postoperatorio y facilitando el manejo del dolor del caballo. Lo anterior se vio reflejado en un tiempo de recuperación de 5 días, estando el caballo de pie a los 30 minutos de haber terminado la cirugía; presentando constantes fisiológicas normales en 5 días postcirugía, en comparación de las cirugías publicadas en otros estudios donde los equinos se tardaron 8 días en promedio en tener constantes fisiológicas normales, además de secuelas graves (anteriormente descritas) que presentaron algunos especímenes. Esta adaptación quirúrgica fue lograda por el trabajo en conjunto de los participantes y la experiencia del cirujano.

Gracias a la esplenectomía exitosa, se llevó a cabo la infección experimental con los resultados esperados. El caballo experimentalmente infectado presentó una parasitemia del 3%, dichos resultados son similares a los obtenidos durante los estudios que se realizan para la investigación de piroplasmas de bovinos donde bovinos esplenectomizados e infectados naturalmente alcanzan parasitemias de 1% a 3% en 8 días, por ejemplo 1% para *B. bovis* y 3% para *B. bigemina* en 8 y 15 días respectivamente. (Hernández- Arvizu, et al, 2024).

En la búsqueda bibliográfica para la elaboración de este trabajo no se encontró información de datos relacionados con infecciones experimentales y esplenectomías en caballos, salvo la realizada por Roberts y colaboradores (1978), donde describen la esplenectomía, pero no detallan datos sobre el proceso de infección experimental. Mientras que la información publicada en bovinos sobre la

infección experimental y la parasitemia obtenida en bovinos por Hernández-Arvizu y colaboradores (2024), señala que en su experimento en el que se infectó a dos bovinos con diferentes cepas cada uno (*B. bovis* y *B. bigemina*) y alcanzaron parasitemias de 1% (en 8 días) y 3% (en 15 días) respectivamente, se extrajo sangre para realizar el cultivo *in vitro* de estos hemoparásitos.

Las infecciones experimentales resultan ser una herramienta valiosa para el estudio de los patógenos ya que son metodologías que permiten su aislamiento, y la obtención de formas parásitarias que pueden ser útiles para estudios de los factores de patogenicidad, factores de virulencia y sobretodo como obtención de células parásitarias para establecer líneas de cultivo y poder investigar en laboratorio de manera *in vitro* los genes, proteínas y dinámicas moleculares y celulares de los parásitos, como se ha hecho en otros patógenos como *Babesia spp.*, como *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, etc., que son apicomplexos. Estas herramientas son útiles cuando los cultivos tradicionales no son posibles por su naturaleza intracelular.

Con la finalidad de reducir el uso de animales vivos para la experimentación, este estudio pretende proporcionar el material biológico para que se puedan establecer las bases de un cultivo celular. Si bien, se recurrió al uso de un animal de experimentación, pretende a todas luces, reducir el uso de animales apegándose a los principios de las 3 R de la bioética, propuestos por Russell y Burch, (1959). Estos se describen como: Reemplazo, que son las tecnologías o enfoques que reemplazan o evitan directamente el uso de animales en experimentos; Reducción, son las estrategias que minimizan el número de animales por experimentos, a través de la aplicación de metodologías y estadísticas que permiten un nuevo diseño experimental apropiado y un adecuado análisis de datos para garantizar la obtención de resultados sólidos y reproducibles; y el Refinamiento que son las modificaciones de los procedimientos de cría o experimentales que reducen o eliminan la molestia, dolor o angustia.

Conclusión

- En las muestras recolectadas en San Luis Potosí, se determinó la presencia de *B. caballi* y *T. equi*.
- Las muestras obtenidas en Querétaro resultaron negativas probablemente por la baja cantidad de muestras recolectadas. Se sugiere un mayor número de equinos muestreados para futuros estudios.
- La esplenectomía fue exitosa por la modificación de la técnica usada en bovinos.
- La cirugía demostró mejores resultados postquirúrgicos que las descritas en otras publicaciones, por lo que esta nueva propuesta de técnica quirúrgica para los equinos es segura, menos invasiva y con buenos resultados.
- Gracias a la esplenectomía de un caballo, se logró realizar un infección experimental de *T. equi* y *B. caballi* y tener material biológico para otros experimentos.

- Gracias a la infección experimental de un caballo esplenectomizado se obtuvieron células infectadas con *T. equi* y *B. caballi* que sirvieron para establecer un cultivo *in vitro* de estos parásitos.

Referencias

1. Camacho-Nuez, M., Hernández-Silva, D. J., Castañeda-Ortiz, E. J., Paredes-Martínez, M. E., Rocha-Martínez, M. K., Alvarez-Sánchez, M. E., Mercado-Curiel, R. F., Aguilar-Tipacamu, G., & Mosqueda, J. (2017). Hap2, a novel gene in *Babesia bigemina* is expressed in tick stages, and specific antibodies block zygote formation. *Parasites & Vectors*, 10(1), 568. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2510-0>
2. Cooperación Técnica MAPA/OPS/PANAFOTSA. (2017). Manual veterinario de toma y envío de muestras: Manual técnico (1o). PANAFOTSA-OPS/OMS.
3. Cultivos y Productos de Ganadería, FAOSTAT. (2020). <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
4. DOF - Diario Oficial de la Federación. (2018). http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018#gsc.tab=0
5. Eckholt Peña Natalia, Marañón Camila & Correa Felipe. 2017. Inhalation anesthesia in horses: characteristics and considerations at the time of its use. Sustainability, Agri, Food and Environmental Research, 5. 1-26.
6. Doherty, T., A Valverde. 2006. Manual of Equine Anesthesia and Analgesia, First Ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1995). Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. Food & Agriculture Org. McIlwraith, C. W., & Rollin, B. E. (2011). Equine Welfare. Wiley.
8. Medlock, J., Balenghien, T., Alten, B., Versteirt, V., & Schaffner, F. (2018). Field sampling methods for mosquitoes, sandflies, biting midges and ticks. EFSA Supporting Publications, 15(6), 1435E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1435>
9. Mosqueda, J., Falcon, A., Antonio Alvarez, J., Alberto Ramos, J., Oropeza-Hernandez, L. F., & Figueroa, J. V. (2004). *Babesia bigemina* sexual stages are induced *in vitro* and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. International Journal for Parasitology, 34(11), 1229-1236. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.003>
10. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Residuos peligrosos biológico- infecciosos. Clasificación y especificaciones de Manejo. (2002). <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
11. Núñez-Ochoa, L., & Bouda, J. (2007). Patología Clínica Veterinaria (2a). UNAM.
12. OIE-Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021). Bienestar de los équidos de trabajo. En Código Sanitario para los Animales Terrestres.
13. SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021) <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

14. Cantú-Martínez, M. A., Segura-Correa, J. C., Silva-Páez, M. L., Avalos-Ramírez, R. & Wagner, G. G. Prevalence of Antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Horses From Northeastern Mexico. *para* **98**, 869–870 (2012).
15. Scoles A.G., Ueti W.M., (2015), Vector ecology of equine piroplasmosis, *Annu. Rev. Entomol.* 60:561-80.
16. 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.
17. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2025) Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrafa *Boophilus spp.* <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
18. Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique. London: Methuen.
19. Roberts, M. C., & Groenendyk, S. (1978). Splenectomy in the horse. *Australian veterinary journal*, 54(4), 196–197. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1978.tb02450.x>
20. George Laylson da Silva Oliveira, Rivelilson Mendes de Freitas, Diminazene aceturate An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics, *Pharmacological Research*, Volume 102, 2015, Pages 138-157, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.005>.
21. Hernández-Arvizu, E.E.; Asada, M.; Kawazu, S.-I.; Vega, C.A.; Rodríguez-Torres, A.; GarcíaMorales, R.; Pavón-Rocha, A.J.; León-Ávila, G.; Rivas-Santiago, B.; Mosqueda, J. Antiparasitic Evaluation of Aquiluscidin, a Cathelicidin Obtained from *Crotalus aquilus*, and the Vcn-23 Derivative Peptide against *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *B. ovata*. *Pathogens* 2024, 13, 496. <https://doi.org/10.3390/pathogens13060496>
22. Rodríguez-Vivas RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martínez I, Reyes-Novelo E Esteve-Gassent, MD, y Pérez de León AA. 2016. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology* 215:106-113.
23. Romero-Salas, D., Solis-Cortés, M., Zazueta-Islas, H. M., Flores-Vásquez, F., Cruz-Romero, A., Aguilar-Domínguez, M., Salguero-Romero, J. L., de León, A. P., Fernández-Figueroa, E. A., Lammoglia-Villagómez, M. Á., Becker, I., & Sánchez-Montes, S. (2021). Molecular detection of *Theileria equi* in horses from Veracruz, Mexico. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(3), 101671. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101671>
24. Ayala-Valdovinos, M. A., Lemus-Flores, C., Galindo-García, J., Bañuelos-Pineda, J., Rodríguez-Carpena, J. G., Sánchez-Chiprés, D., & Duifhuis-Rivera, T. (2017). Diagnosis and prevalence of *Theileria equi* horses in western Mexico by nested PCR. *Parasitology international*, 66(1), 821–824. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.09.011>
25. 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.
26. 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.
27. Iowa State University (ISU), (2010), Piroplasmosis equina, The Center of Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, www.cfsph.iastate.edu/IICAB/
28. 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.
29. Ueti MW, Palmer GH, Kappmeyer LS , Statdfield M , Scoles GA , Knowles D P. 2005. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquireand transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. *J. Clin. Microbiol.* 43:3755-59
30. Uilenberg G. 2006. Babesia: una reseña histórica. *Vet Parasitol.* 138: 3-10.
31. Rothschild C.M, Knowles D.P., (2007), Equine piroplasmosis In Equine Infectious Diseases, Ed. Sellon DC, Long Mt. Saunders Elsevier, St. Louis, MO. P. 465-473.
32. Méndez M.J.I., (2012), Monografía: Situación actual de la Piroplasmosis Equina en México, Universidad Veracruzana, Trabajo recepcional.
33. Medrano-Bugarini, R. A. et al. Detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Soft Ticks and Horses at Ciudad Juarez, Mexico. *swen* **44**, 647–658 (2019).
34. 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.
35. 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.
36. 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5803-5809.2003>
37. Márquez-Valdelamar, L. M, A. Serrato-Díaz y R. Cerritos-Flores. 2013. Secuenciación de fragmentos de ADN. En: A. Cornejo-Romero, A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar y M. G. Rocha-Munive (eds.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos.
38. Salinas Estrella Elizabeth. 2017. *Estudio prospectivo inmunomolecular de la presencia de Babesia caballi y Theileria equi en México*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional-Universidad Nacional Autónoma de México.

39. Lerche P. (2013). Total intravenous anesthesia in horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 29(1), 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2012.11.008>
40. Matt D. M. (2008) *Bovine Surgery of the Skin.*, 24(3), 0-526. doi:10.1016/j.cvfa.2008.06.001
41. Sánchez N. R (2011). Laparotomía Exploratoria en Bovinos. Técnica Quirúrgica. Cursode Graduación en Buiatria. Módulo Quirúrgico.
42. Vega, C. A., Buening, G. M., Green, T. J., & Carson, C. A. (1985). In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. *American journal of veterinary research*, 46(2), 416–420.
43. 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.