

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



TESIS:

“DETECCIÓN DE HEMOPARÁSITOS EN EQUINOS DE DEPORTE Y ESPECTÁCULO EN CULIACÁN, SINALOA”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA: MVZ. FRANCISCA ZATARAIN IRIGOYEN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO; A 21 DE ENERO DE 2020.

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **FRANCISCA ZATARAIN IRIGOYEN**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESORA DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESOR DR. CHRISTIAN DE JESÚS URÍAS CASTRO

ASESORA MC. CLAUDIA LEONOR BARRAZA TIZOC

CULIACÁN, SINALOA, 21 DE ENERO DE 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 09 de junio del año 2020, la que suscribe Francisca Zatarain Irigoyen, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 1170104-3, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y la Dra. Nohemí Castro del Campo y cede los derechos del trabajo titulado “DETECCIÓN DE HEMOPARÁSITOS EN EQUINOS DE DEPORTE Y ESPECTÁCULO EN CULIACÁN, SINALOA”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE


Francisca Zatarain Irigoyen

CORREO ELECTRÓNICO: mariaandelaria@gmail.com
CURP: JLS562LM1GHY3456

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, a mis hermanas, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera; que con su ejemplo, dedicación, apoyo y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo hiciese aun cuando todo se complicaba. Gracias por entender el significado del sacrificio, gracias por siempre estar presente a mi lado y nunca juzgarme. Pero sobre todo gracias a mi hija por ser la fuente de mi esfuerzo y todas las energías requeridas en este, gracias por ser el motor de mi vida, el motor que siempre esta encendido y me alienta a ser una mejor persona tanto en lo personal como lo profesional.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores, a quienes les debo una gran parte de mis conocimientos, gracias por prepararme para un futuro competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como las mejores personas.

A todos ustedes, ¡Gracias!

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2. 1. Importancia de los equinos	3
2. 2. La industria equina	3
2.3. Principales parásitos sanguíneos que afectan la salud del equino	4
2.3.1. Piroplasmas.....	4
2.3.2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	4
2.4. Anaplasmosis granulocítica equina	5
2.4.1. Características genómicas de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	5
2.4.2. Proteínas de superficie y polimorfismos.	6
2.4.3. Patogénesis.....	6
2.4.4. Signología clínica.	7
2. 5. Piroplasmosis equina	8
2. 5. 1. Morfología y ciclo de vida de <i>Babesia caballi</i> , <i>Theileria equi</i> en el equino y garrapata.....	9
2. 5. 2. Patogénesis.	12
2. 5. 3. Hallazgos clínicos.	14
2.6. Respuesta inmune a <i>Theileria equi</i> y <i>Babesia caballi</i> en el equino	15
2. 7. Garrapatas como vector de piroplasmosis equina	16
2. 8. Impacto económico y restricciones de la piroplasmosis en el caballo.	17
2.9. Epidemiología de <i>Theileria equi</i> y <i>babesia caballi</i>	18
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
4.1. General:	22
4.2. Específicos:	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Muestreo	23
5.1.1. Tamaño de la muestra.....	23
5.1.2. Criterios de inclusión.....	23

5.1.3. Toma y transporte de muestra	23
5. 3. Análisis de las muestras	24
5. 3. 1. Frotis sanguíneo.....	24
5. 3. 2. Extracción de ADN.....	24
5.3.3. PCR.....	24
5.3.4. Análisis de datos	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
VII. CONCLUSIÓN.....	31
VIII. LITERATURA CITADA.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Frecuencia de hemoparásitos en equinos de deporte y espectáculo en Culiacán	26

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1.-	Ciclo biológico de <i>Theileria equi</i> y <i>Babesia caballi</i> dentro del vector garrapata y del caballo. (a). Desarrollo de <i>Theileria equi</i> dentro del vector garrapata y del caballo. (b). Desarrollo de <i>Babesia caballi</i> dentro del vector garrapata y del caballo.....	10
2.-	Distribución mundial de la piroplasmosis equina en el año 2018	18
3.-	Frotis de sangre de equino con presencia de piroplasmas dentro del eritrocitos	27
4.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1% con marcador de 1000pb (OptiDNA Marker). Amplificación del gen <i>ema-1</i> y <i>ema-1n</i> para <i>Theilreria equi</i> carril 8 y 9	27

RESUMEN

“DETECCIÓN DE HEMOPARÁSITOS EN EQUINOS DE DEPORTE Y ESPECTÁCULO EN CULIACÁN, SINALOA”

FRANCISCA ZATARAIN IRIGOYEN

Las infecciones por hemoparásitos son un problema grave en más del 70% de los países en vía de desarrollo y su presencia en los animales domésticos produce cuadros hemáticos que alteran la salud animal; afectando a diferentes especies de équidos (caballos, asnos, mulas) y teniendo un impacto económico importante en la industria equina. El objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de hemoparásitos en equinos de Culiacán, Sinaloa. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el periodo del 10 de marzo del 2018 al 15 de enero de 2019, en el cual se recolectaron muestras sanguíneas de 144 équidos que fueron seleccionados al azar. Para el diagnóstico morfológico se realizó frotis sanguíneo teñido con tinción de Wright; los cuales se examinaron al microscopio en busca de agentes del orden Rickettsiales y Piroplasmida, la sangre positiva a microscopía óptica se le extrajo ADN y se realizó PCR para detectar los genes *msp4* de *Anaplasma phagocytophilum*, *ema-1* *Theileria equi* y/o *rap-1* *Babesia caballi*. De las 144 muestras sanguíneas el 5.55% (8/144) resultaron positivas por morfología a hemoparásitos, y de las muestras positivas se amplificaron 2 con un fragmento de alrededor de 229 pb de *Theileria equi*, no se logró la amplificación de *Babesia caballi* ni *Anaplasma phagocytophilum*. De los hemoparásitos presentes en los equinos de deporte y espectáculo se identificó por primera vez *Theileria equi* en Culiacán, Sinaloa.

Palabras claves: Hemoparásitos, Equino, Piroplasmosis, PCR.

ABSTRACT

**“HEMOPARASITE DETECTION IN SPORT AND SHOW HORSES IN CULIACÁN,
SINALOA”**

FRANCISCA ZATARAIN IRIGOYEN

Hemoparasite infections are a serious problem in more than 70% of developing countries and their presence in domestic animals produces blood conditions that alter animal health; affecting different species of equidae (horses, donkeys, mules) and having an important economic impact on the equine industry. The objective of this work was to identify the presence of hemoparasites in horses from Culiacán, Sinaloa. A descriptive cross-sectional study was conducted from March 10th of 2018 to January 15th of 2019, in which blood samples were collected from 144 equidae that were randomly selected. For the morphological diagnosis, blood smears stained with Wright staining were performed; which were examined under a microscope for agents of the order Rickettsiales and Piroplasmida, the positive blood by optical microscopy was extracted DNA and PCR was performed to detect the *msp4* genes of *Anaplasma phagocytophilum*, *ema-1 Theileria equi* and / or *rap-1 Babesia caballi*. Of the 144 blood samples, 2.88% (2) were positive by morphology to piroplasma. PCR was performed and a 229 bp fragment of the *ema-1* gene of *Theileria equi* was amplified, amplification of *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* was not achieved. Of the hemoparasites present in the horses of sport and entertainment, *Theileria equi* was first identified in Culiacán, Sinaloa.

Key words: Hemoparasites, Equine, Piroplasmosis, PCR

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente hay un incremento en la práctica de disciplinas deportivas equinas (IFHA, 2011); lo anterior hace que cada vez con más frecuencia se busque un estado sanitario óptimo de los equinos para su óptima participación en justas deportivas (Rodríguez y Conejeros, 2017), por lo que se deben realizar revisiones clínicas periódicas para poder identificar agentes patógenos causantes de enfermedades que afectan su rendimiento (García-Sanmartín *et al.*, 2008). Las pérdidas económicas asociadas con la enfermedad de estos incluyen los costos por tratamiento veterinario, la disminución en el desempeño y la muerte de los animales en casos agudos de la enfermedad; además de las restricciones internacionales para la exportación o la participación en eventos ecuestres deportivos y expositivos de animales seropositivos a *Babesia caballi* o *Theileria equi* (OIE, 2014) figurando entre las enfermedades de reporte sanitario en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2019). Las infecciones por hemoparásitos son un problema grave en más del 70% de los países en vía de desarrollo (Castellanos *et al.*, 2010) los cuales agrupan una gran cantidad de agentes etiológicos causantes de enfermedades de trascendencia para la salud animal a nivel mundial, estos pueden ser transmitidos a los animales domésticos por vectores mecánicos y biológicos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2000). Los hemoparásitos en equinos se han reportado en distintas partes del mundo; para el caso de Sinaloa se han realizado estudios morfológicos por Gaxiola *et al.*, (2001) donde se reportó una prevalencia de 33.3% a *Babesia caballi* y un 9.33% a *Haemobartonella* spp. y recientemente Zatarain *et al.* (2019) reportaron por morfología una frecuencia de 32.63% de *Babesia* spp. y un 18.32% para *Anaplasma* spp. A nivel genético Hawkins *et al.*, (2015) reportaron en Kenia una prevalencia del 77% de *Theileria equi* mediante PCR anidada usando cebadores de 18S ARNr, en Italia Passamonti *et al.*, (2010) reportaron una frecuencia de 8.14% de *Anaplasma phagocytophilum* mediante PCR anidada utilizando el gen 16S ARNr, mientras que en México Ayala-Valdovinos *et al.* (2014) reportaron una frecuencia de 26.72% de *Theileria equi* mediante PCR anidada del gen EMA-1. Estos antecedentes demuestran que los equinos están expuestos a parásitos

sanguíneos por lo que; el objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de hemoparásitos en equinos de deporte y espectáculo de Culiacán, Sinaloa.

II. ANTECEDENTES

2. 1. Importancia de los equinos

Los caballos han sido utilizados por la humanidad durante miles de años para una variedad de propósitos, como fuente de alimento directa (carne y leche), cuero, como bestias de trabajo, con propósitos militares, de recreación y terapéuticos; en tiempos más recientes; a pesar de los cambios demográficos y culturales los caballos aún se encuentran en todo el mundo dado el favorecimiento de la cría selectiva de los mismos (Murray *et al.*, 2013)

La población global de caballos se estima en 58 millones (Murray *et al.*, 2013). De esta población 60% son caballos trabajadores que se encuentran principalmente en países en desarrollo y una proporción significativa del resto se utiliza en las industrias de carreras, ecuestres y recreativas (Pritchard, 2005). En México contamos con una población de 6 260 000 equinos (FAOSTAT, 2006).

2. 2. La industria equina

En el mundo los países con una mayor población equina son los siguientes: 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) (FAOSTAT, 2006).

En 2012, la Federación equina internacional (FEI) reportó más de 3500 certámenes internacionales en todo el mundo; habiendo un incremento general en el número de eventos, con un aumento de más del 30% en concursos de salto, doma y resistencia entre 2007 y 2010; en 2017, se registraron 140 000 carreras de caballos pura sangre, con y sin obstáculos, y la cuantía total de premios ascendió a 3 100 millones de euros (IFHA, 2017).

Los beneficios económicos y sociales de la industria equina la hacen un contribuyente importante para la economía; además de ser un empleador

significativo, apoyar la preservación del campo, así como una potente herramienta para la inserción y cohesión social (OIE *et al.*, 2013).

2.3. Principales parásitos sanguíneos que afectan la salud del equino

En áreas tropicales y subtropicales de México los hemoparásitos causan importantes problemas de salud a los animales domésticos, produciéndoles cuadros clínicos de enfermedades y en ocasiones la muerte (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2000).

2.3.1. Piroplasmas. El término piroplasma se deriva de la apariencia en forma de pera de las formas replicativas intraeritrocíticas, los géneros *Babesia* y *Theileria* que pertenecen a las familias Babesiidae y Theileriidae (Wise *et al.*, 2013). Existe incertidumbre sobre la clasificación taxonómica apropiada para *T. equi*. aunque se considera una "Babesia pequeña", *T. equi* tiene varias características que lo distinguen de otras especies dentro del género, incluido el desarrollo inicial aparente en los linfocitos antes de la etapa eritrocítica (Rothschild, 2013).

2.3.2. *Anaplasma phagocytophilum*. Es un patógeno intracelular obligado, es el agente causante de la Anaplasmosis granulocítica equina y humana (Rikihisa, 2011) canina y la fiebre transmitida por garrapatas en rumiantes *Anaplasma phagocytophilum* se ha convertido en un patógeno emergente transmitido por garrapatas en los Estados Unidos, Europa, África y Asia, con un número creciente de personas y animales infectados cada año (Cabezas-Cruz *et al.*, 2017); manipulando las vías metabólicas de las células hospedadoras para aumentar la infección y la transmisión en los hospedadores (Lin *et al.*, 2011, Rikihisa, 2011, Cabezas-Cruz *et al.*, 2017). *Anaplasma phagocytophilum* es una bacteria Gram negativa intracelular obligatoria que infecta granulocitos, principalmente neutrófilos, en cuyos citoplasmas forma una "microcolonia" denominada "mórula", una vez en un huésped receptivo, *Anaplasma phagocytophilum* infecta neutrófilos y eosinófilos (Woldehiwet, 2010, Rikihisa, 2011).

2.4. Anaplasmosis granulocítica equina

La infección por *Anaplasma phagocytophilum* en caballos puede desarrollarse como una forma aguda o subclínica (Madigan y Gribble, 1987). La severidad de los signos clínicos de la Anaplasmosis Granulocítica Equina está en función de la edad de los caballos y la duración de la enfermedad, lo que hace difícil reconocerla en una primera evaluación del animal; en los caballos adultos (mayores de 4 años) los signos se desarrollan progresivamente y son fiebre, depresión, anorexia parcial, edema de extremidades, petequias, ictericia, ataxia y resistencia al movimiento, al parecer, los caballos menores de 4 años desarrollan signos más leves, incluyendo una moderada fiebre, depresión, leve edema de extremidades (Meuten y Buergelt, 2014). En los caballos menores de 1 año, es difícil reconocer la signología, ya que solo hay presencia de fiebre que fluctúa de 39.4° a 41.3°C entre el primer y segundo día de infección (Silaghi *et al.*, 2011).

2.4.1. Características genómicas de *Anaplasma phagocytophilum*. Veintiún genomas completos de *Anaplasma phagocytophilum* están actualmente disponibles, pero no son representativos de la diversidad global de *Anaplasma phagocytophilum* y no representan los rangos de hospedadores generales (Dugat *et al.*, 2015), porque diecisiete genomas provienen de cepas recolectadas en los EE. UU., mientras que solo cuatro son de cepas recolectadas en Europa, además, con la excepción de los genomas de cepas humanas, solo entre uno y tres genomas están disponibles para las especies hospedadoras muestreadas (Dugat *et al.*, 2015). El genoma de *Anaplasma phagocytophilum* tiene un solo cromosoma circular y la mayoría de las características genómicas son comunes a los miembros de Rickettsiales. Todos los organismos en el orden Rickettsiales tienen genomas relativamente pequeños (0.8-1.5Mb) y una capacidad de codificación significativamente inferior para el metabolismo intermediario central, el transporte y las funciones reguladoras atribuidas a la evolución reductiva; se desarrollaron como parásitos intracelulares con dependencia de la célula huésped para las funciones necesarias; además la reducción en el tamaño del

genoma puede ser el resultado de varios factores combinados, como la presencia de cuellos de botella en la población, la deriva genética asociada con un pequeño tamaño poblacional y un sesgo de sustitución que favorece la dilección sobre las inserciones (Nilsson *et al.*, 2005).

2.4.2. Proteínas de superficie y polimorfismos. El genoma de *Anaplasma phagocytophilum* tiene tres OMP-1, un *msh2*, dos homólogos de *msh2*, un loci *msh4* y 113 p44 que pertenecen a la superfamilia OMP-1 / MSP2 / P44 (Dunning Hotopp *et al.*, 2006). Las variaciones antigénicas de las proteínas P44 que se detectan en varias tipo de anaplasmas pueden ayudarlos a escapar de la vigilancia inmune del huésped, lo que contribuye a la infección persistente en los huéspedes reservorios (Dunning Hotopp *et al.*, 2006) utilizando un mecanismo recombinante para generar variación antigénica en las OMP inmunodominantes los grupos locales de pseudogenes funcionales que se encuentran en las familias de genes *msh2* y *msh3* que pueden recombinarse en un solo sitio de expresión funcional para generar nuevas variantes antigénicas durante la multiplicación de la bacteria; además, las variaciones pueden surgir espontáneamente, lo que permite la selección de variantes que escapan del sistema inmune del huésped (Brayton *et al.*, 2002).

2.4.3. Patogénesis. *Anaplasma phagocytophilum* puede inhibir los procesos de apoptosis de las células del huésped y tiene la capacidad de modificar los mecanismos relacionados con la generación de energía, la transducción de señales en una célula, así como las reacciones inmunes protectoras (Lin *et al.*, 2011). El patógeno demuestra tropismo a las células de los sistemas hematopoyéticos y fagocíticos (Dumler *et al.*, 2001). Los mecanismos que causan la reducción del número de plaquetas pueden estar relacionados con su destrucción por el sistema inmune, aumento de la fagocitosis por los macrófagos y su desintegración intensificada en el bazo; la hipoplasia de médula ósea también puede provocar la disminución de la producción de trombocitos. La bacteria no induce inflamación, que resulta del hecho de que la pared celular de

Anaplasma phagocytophilum no contiene LPS o peptidoglicano (Rikihisa y Lin, 2010). Los agentes infecciosos *Anaplasma phagocytophilum* transmitidos por artrópodos deben migrar a través del cuerpo de este, para lo cual deben evadir la respuesta inmune del artrópodo y puedan ser transmitidos con éxito a un nuevo hospedero objetivo; las garrapatas tienen un sistema inmune innato que comprende péptidos antimicrobianos como defensinas y microplusina específico de garrapata, proteínas de la familia de 5,3 kDa, lisozimas, un sistema similar al complemento y hemocitos fagocíticos; utiliza una proteína secretada por la garrapata (P11) para infectar los hemocitos, lo que le permite moverse desde el intestino medio a las glándulas salivales en la hemolinfa. Esta interacción es probablemente el resultado de la coevolución prolongada de los artrópodos y los microorganismos que portan (Day, 2016). La garrapata necesita un tiempo mínimo de alimentación de 24 a 48 horas para transmitirla al hospedero, esta bacteria es capaz de residir en las glándulas salivales de las garrapatas del género *Ixodes* spp.; por lo tanto, si está presente en un estado infeccioso y un número adecuado, podría ser transmitida más rápidamente (Diniz y Breitschwerdt, 2011). El intestino medio y las glándulas salivales de las garrapatas desempeñan papeles importantes pero muy diferentes durante la infección, multiplicación y transmisión de patógenos (Hajdusek *et al.*, 2013). El intestino de las garrapatas son probablemente el tejido más importante para la supervivencia, ya que son el sitio inicial de captación y replicación, mientras las glándulas salivales son el lugar final para la replicación y la transmisión (de la Fuente *et al.*, 2016). La patogénesis de *A. phagocytophilum* involucra, internalización, replicación temprana, evasión de la respuesta inmune (inhibición de la apoptosis, estimulación de la autofagia), replicación y liberación (Diniz y Breitschwerdt, 2011).

2.4.4. Signología clínica. El curso de la anaplasmosis granulocítica equina puede ser subclínico o agudo; el período de incubación de la forma aguda de anaplasmosis es de aproximadamente 10 días (Barlough *et al.*, 1995). Inicialmente los síntomas son atípicos, en el animal infectado se desarrolla

apatía, debilitamiento y aumento de la temperatura corporal, a continuación, aparece una aversión al movimiento, marcha rígida, edema doloroso de las articulaciones y tejido subcutáneo de carácter inflamatorio, y algunas veces cojera (Silaghi *et al.*, 2011). Los edemas del tejido subcutáneo pueden persistir incluso durante 2 semanas después de la regresión completa de los otros síntomas (Madigan y Gribble, 1987) o desaparecen directamente después de la terapia con antibióticos (Pusterla *et al.*, 1998).

La intensificación de los síntomas clínicos demuestra una considerable diversificación y, en gran medida, depende de la condición y la edad del animal infectado. Se observa un curso típico de la anaplasmosis granulocítica equina en caballos de más de 3 años de edad (Silaghi *et al.*, 2011). Los animales infectados desarrollan fiebre (39-40° C) que puede persistir durante 6-12 días y se acompaña de síntomas generales e inflamación de las extremidades, la enfermedad en caballos de un año o menos es de naturaleza no grave con síntomas inespecíficos, como falta de apetito y aversión al movimiento, otros síntomas de la anaplasmosis aguda es sangrado de la mucosa, pérdida de peso, aumento del bazo y ganglios linfáticos, durante el período febril, la frecuencia cardíaca aumenta hasta 50-60 latidos por minuto y la frecuencia respiratoria hasta 30 RPM (Adaszek *et al.*, 2009) un trastorno hematológico específico observado en el curso de la anaplasmosis es la trombocitopenia, que conduce a petequias en las membranas mucosas, en particular en la superficie interna de los labios y las encías, además de la trombocitopenia, una prueba hematológica puede revelar leucocitosis o leucopenia con neutropenia y reducción del hematocrito (Silaghi *et al.*, 2011).

2. 5. Piroplasmosis equina

La piroplasmosis equina es una enfermedad causada por protozoarios del género *Babesia*, siendo las especies *Theileria equi* y *Babesia caballi* las que afectan a los equinos; los cuales son transmitidos por garrapatas de los géneros, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus* e *Hyaloma* (De Waal, 1992; Scoles y Ueti,

2015). *Babesia caballi* es transmitida por 10 especies de garrapata tanto vía transestadial como transovarica, comportándose la garrapata como reservorio de la infección, pudiéndose también transmitir por vía intrauterina, lo que podría resultar en un aborto debido a la posible infección del feto durante la gestación (Erbsiöh, 1975; Lewis *et al.*, 1999); *Theileria equi* es transmitida por 11 especies de garrapatas vía transestadial, comportándose el caballo como reservorio (De Waal, 1992; Scoles y Ueti, 2015).

2. 5. 1. Morfología y ciclo de vida de *Babesia caballi*, *Theileria equi* en el equino y garrapata. Los merozoitos de *Babesia caballi* aparecen dentro de los glóbulos rojos como cuerpos basófilos en forma de pera, el tamaño es de aproximadamente 2–5 µm de largo y 1.3–3.0 µm de diámetro (Levine, 1985). Estos dos grandes cuerpos en forma de pera se unen en sus extremos posteriores, característica de gran importancia diagnóstica para la identificación de *Babesia spp.* y, por extensión *Babesia caballi* (Scoles y Ueti, 2015).

En *Theileria equi* los merozoitos intraeritrocíticos son más pequeños, de aproximadamente 2 a 3 µm de largo y periformes, de forma redonda u ovoide (Sumbria *et al.*, 2014). Estos cuatro merozoitos en forma de pera forman una tétrada llamada "cruz de Malta" en los eritrocitos; en otras palabras, *Theileria equi* es un pequeño piroplasma, mientras que *Babesia caballi* es una forma más grande (Malekifard *et al.*, 2014). Finalmente, estos dos piroplasmas se distinguen por la ausencia de transmisión transovarial de *Theileria equi* en las garrapatas, así como por la falta de ciclo preeritrítico en *Babesia* (Bhoora, 2009).

El ciclo de vida de un apicomplexa típico tiene tres etapas distintas (Figura 1 b). Estas etapas ocurren en el huésped y las garrapatas e incluyen; etapa de reproducción asexual en las glándulas salivales (esporogonía), etapa de reproducción asexual en el huésped (merogonía) y reproducción sexual con la formación y fusión de gametos en el intestino de la garrapata (gametogonía). Además, *Theileria equi* tiene una etapa adicional (Figura 1 a) que lo lleva a cuatro etapas en el ciclo de vida al someterse a esquizogonía en las células mononucleares de sangre periférica (Onyiche *et al.*, 2019).

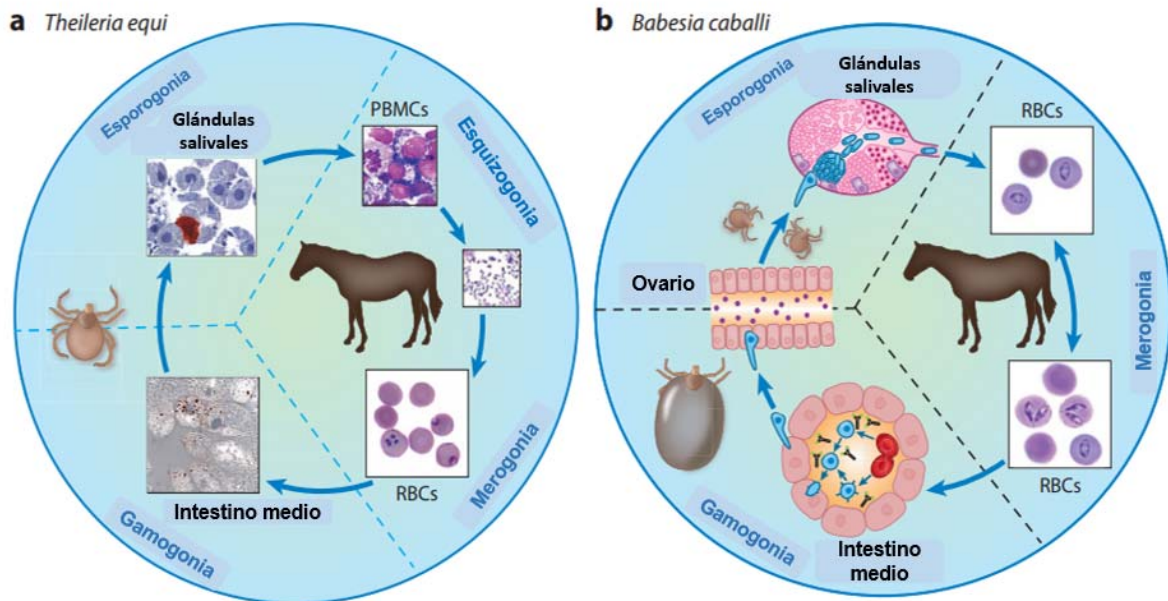


Figura 1. Ciclo biológico de *Theileria equi* y *Babesia caballi* dentro del vector garrapata y del caballo. (a). Desarrollo de *Theileria equi* dentro del vector garrapata y del caballo. (b). Desarrollo de *Babesia caballi* dentro del vector garrapata y del caballo. Abreviaturas: PBMC, células mononucleares de sangre periférica; RBCs, glóbulos rojos. Imagen adaptada de Scoles y Ueti, 2015 y Onyiche, 2019.

2. 5 .1. 1. *Theileria equi*. Existe un nivel considerable de variación en el ciclo de vida de *T. equi* dependiendo de las especies de garrapatas involucradas (Moltmann *et al.*, 1983; Rothschild, 2013). Los esporozoitos de *Theileria equi* se inyectan en una especie equina no infectada pero susceptible por garrapatas durante la alimentación a través de la saliva (Schein *et al.*, 1981; de Waal y van Heerden, 2004; Onyiche, *et al.*, 2019). Al entrar en el hospedador los esporozoitos invaden principalmente las células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) y aquí pasan a la etapa de esquizogonía formando grandes microsquizontes y macrosquizontes, estos parásitos más tarde dan lugar a merozoitos, los merozoitos liberados de los esquizontes invaden los eritrocitos y en ellos alcanzan la etapa de merogonía formando dos cuerpos con forma de pera y, en algunos casos, la división en cuatro merozoitos dentro de los eritrocitos

dando como apariencia cuatro cuerpos piriformes con formas de "cruz de Malta" (Brüning, 1996). La hemólisis de los eritrocitos infectados conduce a la liberación de merozoitos que ingresan a nuevos glóbulos rojos y continúan el ciclo de replicación (Mehlhorn y Schein, 1998). Después de la ingestión de los gametocitos en los eritrocitos por un vector de garrapatas competente, la transformación comienza en el intestino medio de las garrapatas, comenzando con la división nuclear seguida de la formación de protuberancias y finalmente cuerpos de rayos; aproximadamente 4 a 6 días después, los cuerpos de los rayos se dividen y forman microgametos y macrogametos y la fusión de estos gametos conduce a la formación de cigotos (replicación sexual); los kinetes se forman dentro del cigoto que invade las células epiteliales de los intestinos medios hacia la hemolinfa e infecta la garrapata (Onyiche *et al.*, 2019).

2. 5. 1. 2. *Babesia caballi*. El ciclo de vida de *Babesia caballi* se inicia después de la alimentación de garrapatas infectadas en un huésped equino no infectado pero susceptible; los vectores garrapatas inoculan los esporozoitos que maduran a través de la saliva en el huésped (Onyiche *et al.*, 2019). Los esporozoitos de *Babesia caballi* invaden los eritrocitos donde se convierten en trofozoitos que crecen y se unen en dos merozoitos en forma de pera (Rothschild, 2013). Los merozoitos se multiplican e infectan nuevos glóbulos rojos y el ciclo se repite (Short, 2012).

La infección se inicia mediante la alimentación de garrapatas infectadas, con mayor frecuencia *Dermacentor nitens*, en un huésped equino saludable, los esporozoitos invaden inmediatamente los eritrocitos, donde se desarrolla a partir de un pequeño cuerpo anaplasmoide (trofozoíto) que consiste predominantemente de material nuclear en una esfera ameboide más grande que se divide en dos grandes cuerpos piriformes (merozoitos) que miden aproximadamente 2-5 μm de largo y 1.3-3 μm de diámetro (Short, 2012). Cuando una garrapata no infectada se alimenta posteriormente del caballo infectado e ingiere eritrocitos parasitados, la mayoría de los parásitos se destruyen dentro del intestino medio de la garrapata (Short, 2012). Sin embargo, algunos

merozoitos sobreviven y forman pequeños cuerpos redondos que flotan libremente dentro del contenido intestinal de la garrapata, estos cuerpos esféricos dan lugar a grandes cuerpos clavados (en forma de maza) que penetran en las células epiteliales del intestino medio y sufren múltiples fusiones, seguido por la infección de una variedad de tejidos en la garrapata, donde ocurre un ciclo secundario de fisión múltiple (Rothschild, 2013). Los tejidos infectados en la garrapata femenina incluyen los huevos y todos los tejidos, excepto las glándulas salivales, los pequeños cuerpos periformes producidos en las glándulas salivales de las larvas, las ninfas y los adultos de la próxima generación de garrapatas son los infecciosos para el caballo (Friedhoff y Soule, 1996).

2. 5. 2. Patogénesis. La piroplasmosis equina tiene un efecto patogénico severo y complicado tanto en los tejidos como en los órganos de los équidos infectados, incluido el efecto mecánico representado por la destrucción y la hemólisis de los glóbulos rojos (anemia hemolítica) o la liberación de sustancias vasoactivas como kinin y kallikrein, seguidos de hipotensión, shock y muerte de los équidos afectados (Hunfeld *et al.*, 2008). El período de incubación varía de 12 a 19 días para *Theileria equi* y de 10 a 30 días para *Babesia caballi* y coincide con el pico de fiebre y eritrólisis (De Waal, 1992). Las alteraciones en el contenido de proteínas y lípidos de la membrana de los eritrocitos; además de los aumentos en el malondialdehído plasmático durante la parasitemia severa sugieren que la acumulación de iones oxidativos resultantes de la peroxidación lipídica altera la composición bioquímica de los eritrocitos, lo que conduce a la hemólisis; estas alteraciones pueden dar como resultado una mayor rigidez de los eritrocitos, así como una menor deformabilidad, lo que contribuye a la estasis microvascular; el volumen de células generalmente disminuye al 20%, pero puede caer al 10% o menos (Ambawat *et al.*, 1999). La anemia extrema es más común en las infecciones por *Theileria equi* donde se observa hemoglobinuria de gravedad variable secundaria a hemólisis severa por la infección, la cual puede ser seguida por nefrosis y la aparición de orina de color café (Zobba *et al.*, 2008); la ictericia es causada por la hemólisis lo cual el resultado del aumento de la bilirrubina

indirecta (no conjugada), que se deposita en las superficies mucosas y en otros lugares, ocasionando un color amarillo; la piroplasmosis equina conduce al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y a la hipercoagulabilidad, luego de una disfunción multiorgánica (Donnellan y Marais, 2009). La aglomeración de eritrocitos infectados que resulta en la formación de micro trombos puede bloquear los vasos sanguíneos pequeños, lo que lleva a una estasis sanguíneo venoso posterior y una condición hipotensiva aguda, que puede causar la muerte del animal (de Waal y van Heerden, 2004). En el caso de *Babesia caballi*, la aglomeración de eritrocitos parasitados puede conducir a una oclusión microvascular; la trombocitopenia simultánea y la respuesta inflamatoria sistémica provocan daño endotelial, así como aumento de la permeabilidad vascular y, en casos graves, coagulación intravascular diseminada (CID) y el secuestro esplénico o el consumo excesivo de trombocitos; los caballos gravemente afectados experimentan edema, hemorragia, isquemia y anoxia, que culminan en disfunción orgánica (Al-Saad *et al.*, 2010). También puede causar edema articular, el cual podría deberse a las diferencias entre la presión hidrostática arterial y la presión osmótica venosa que hacen que los líquidos escapen de los vasos y se acumulen en las partes distales del cuerpo; la hipoproteinemia también puede desempeñar un papel en la diálisis y la acumulación de fluidos edematosos, la deshidratación aparece en équidos infectados con piroplasmosis equina, esto puede deberse a la falta de fluidos corporales, lo que resulta en urea u oliguria, aumento de la sed y pelo áspero (Al-Saad *et al.*, 2010). Muchas complicaciones ocurren debido a la piroplasmosis equina, incluyendo estasis gastrointestinal, enteritis catarral, cólico, infertilidad en sementales, arritmias cardíacas, neumonía, edema pulmonar, insuficiencia renal aguda, laminitis y enfermedad del sistema nervioso central (de Waal y van Heerden, 2004; Tamzali, 2013). La infección en la gestación se da por el paso de los eritrocitos infectados a través de la barrera placentaria ha sido implicado como el modo probable de transmisión de la enfermedad en el útero y puede ser el resultado del daño a los vasos sanguíneos placentarios, lo que lleva a la mezcla de sangre materna y fetal cerca o en el momento del parto o aborto; no todos los

potros de una yegua infectada nacen infectados, y no se han identificado los factores que determinan si se produce infección prenatal (Scoles y Ueti, 2015).

2. 5. 3. Hallazgos clínicos. Las infecciones clínicas pueden ser peragudas, agudas, subagudas y crónicas (Zobba *et al.*, 2008). Los caballos infectados con *Babesia caballi* o *Theileria equi* pueden presentar signos clínicos similares, aunque los signos asociados con la infección por *Babesia caballi* tienden a ser más leves o incluso no aparentes (Rothschild y Knowles, 2007).

2. 5. 3. 1. Portadores no aparentes. La gran mayoría de los caballos seropositivos a *Babesia* son caballos portadores no aparentes, con bajos niveles de parasitemia y sin signos clínicos evidentes; sin embargo, los caballos atléticos o de trabajo pesado pueden disminuir el rendimiento deportivo en comparación con los caballos no infectados; estos caballos también corren el riesgo de desarrollar una infección manifiesta con enfermedad clínica (Hailat *et al.*, 1997).

2. 5. 3. 2. Piroplasmosis equina subaguda. Los caballos con piroplasmosis equina subaguda exhiben diversos grados de anorexia, malestar general, pérdida de peso, pirexia intermitente, anemia normocítica normocrómica, edema de extremidades, bajo rendimiento, taquicardia y taquipnea (de Waal, 1992). Las membranas mucosas varían de rosa pálido o amarillo pálido a amarillo brillante, con petequias ocasionales y equimosis. Pueden aparecer signos de cólico intermitente (de Waal, 1992) la aparición de signos de cólico en un caballo infectado puede ocurrir debido a una insuficiencia hepática que conduce a un déficit de secreción de sales biliares lo que produce trastornos digestivos, ya sea en forma de diarrea o estreñimiento, mientras que la hemoglobinuria frecuente puede causar glomerulonefrosis y daño renal, así como microtrombosis en capilares intestinales (Al-Saad, 2009). La orina puede ser de color amarillo oscuro a marrón o rojo, según el grado de hemoglobinuria (Al-Saad, 2009). Los caballos con EP subaguda suelen tener esplenomegalia, que es palpable por vía rectal (de Waal, 1992). Si no se trata, estos caballos pueden volverse severamente anémicos con una marcada debilidad general (Rothschild, 2013).

2. 5. 3. 3. Piroplasmosis equina crónica. Los caballos con piroplasmosis equina crónica generalmente presentan antecedentes de signos clínicos inespecíficos, que incluyen inapetencia leve, bajo rendimiento, pérdida de peso, mal estado corporal y malestar general, la anemia puede ser mínima (de Waal, 1992). Los signos clínicos de piroplasmosis equina crónica son variables o inespecíficos y a menudo se confunden con una variedad de otras enfermedades como la tripanosomiasis, la anaplasmosis granulocítica equina y la anemia infecciosa equina (Rothschild y Knowles, 2007). Las anomalías clínico-patológicas en caballos con infección crónica por *Theileria equi* o *Babesia caballi* pueden incluir un recuento reducido de glóbulos rojos, recuento de plaquetas y concentración de hemoglobina (De Waal, 1992). Los cambios adicionales en el análisis de sangre pueden incluir: disminución de las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, hierro sérico y fósforo; aumento de la concentración sérica de bilirrubina y tiempos de coagulación prolongados (Holman *et al.*, 1993). Después de aproximadamente 10 días de infección, se desarrolla linfocitosis y el hematocrito a menudo disminuye a aproximadamente el 20%, pero puede caer al 10% o menos; la anemia extrema es más común con la infección por *T. equi*, la concentración sérica de bilirrubina suele ser normal en casos crónicos y solo se puede observar anemia leve (Rothschild, 2013).

2.6. Respuesta inmune a *Theileria equi* y *Babesia caballi* en el equino

La inmunidad protectora está presente mientras un caballo albergue el piroplasma, que en la mayoría de los casos es de por vida; no hay inmunidad cruzada entre *Theileria equi* y *Babesia caballi* (Rothschild, 2013). La resistencia a la enfermedad clínica adquirida por los caballos después de la infección por *Babesia caballi* es el resultado de la estimulación continua de la inmunidad por el parásito persistente, pero se desconocen los mecanismos exactos involucrados; la inmunidad innata probablemente juega un papel central en el control de los parásitos de *Babesia caballi*, aunque el papel preciso de los neutrófilos, los macrófagos y las células asesinas naturales (NK) en el control de parásitos no

está bien definido (de Waal *et al.*, 1987). El bazo es importante para eliminar los piroplasmas, los caballos con bazo intacto a menudo controlan la infección y sobreviven, mientras que los caballos esplenectomizados desarrollan parasitemia severa y sucumben a la infección (Knowles, 1996). A pesar de su importante papel, el bazo y la inmunidad innata son insuficientes para la protección contra piroplasmosis equina en ausencia de inmunidad adaptativa (Rothschild, 2013). La inmunoglobulina Ga (IgGa) y la IgGb se correlacionan con el control de *Theileria equi* durante la etapa aguda de la infección mientras que la IgG (T) aumenta durante la infección crónica y los caballos infectados con *Theileria equi* producen preferentemente anticuerpos contra las proteínas de superficie de merozoito altamente conservadas, específicamente los antígenos 1 y 2 de *Theileria equi* merozoito (ema-1 y ema-2); los anticuerpos transferidos pasivamente de *Theileria equi* y *Babesia caballi* pueden persistir en el potro durante 4 a 5 meses (Knowles *et al.*, 1992).

2. 7. Garrapatas como vector de piroplasmosis equina

Las garrapatas juegan un papel vital en el ciclo y la transmisión natural de la piroplasmosis equina, existe una relación obligatoria entre los piroplasmas y sus vectores; no se puede mantener presente en ausencia de vectores que la transporten y transmitan ya que los piroplasmas requieren a las garrapatas para completar su ciclo de vida (Gou *et al.*, 2013). Como resultado de esto, se da la distribución universal de la piroplasmosis equina la cual está estrechamente relacionada con la propagación de los vectores, las garrapatas ixódidas son los hospedadores finales (definitivos) y los transportadores de *Theileria equi* y *Babesia caballi* (Zapf y Schein, 1994). De las 867 especies de garrapatas conocidas (Jongejan y Uilenberg, 2004). Scoles y Ueti (2015) enumeraron 33 especies de garrapatas ixódidas pertenecientes a seis géneros como vectores competentes responsables de transmitir la piroplasmosis equina. Los vectores confirmados para piroplasmosis equina son garrapatas pertenecientes a tres géneros: *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Hyalomma* (De Waal, 1992). Sin embargo, la evidencia reciente muestra que otros géneros como Ixodes,

Haemaphysalis y *Amblyomma* son también capaces de transmitir la piroplasmosis equina tanto en condiciones naturales como experimentales (Scoles y Ueti, 2015). Se ha informado de la transmisión transplacentaria de yeguas preñadas al feto que en la mayoría de los casos conducen al aborto (Lewis *et al.*, 1999). También puede transmitirse accidentalmente a través de la sangre mediante jeringas contaminadas, agujas hipodérmicas o instrumentos utilizados en cualquier cirugía o procedimiento de vacunación (transmisión iatrogénica); además se puede transmitir por transfusión de sangre infectada o infección inducida experimentalmente en equinos susceptibles a través de la inoculación intramuscular, intravenosa o subcutánea de sangre infectada (de Waal y van Heerden, 2004).

2. 8. Impacto económico y restricciones de la piroplasmosis en el caballo.

La piroplasmosis equina puede causar pérdidas económicas significativas que incluyen el costo del tratamiento, disminución de la producción de équidos, abortos, pérdida de rendimiento o muerte, incapacidad para cumplir con los requisitos internacionales para exportaciones o participación en competencias y deportes ecuestres (García-Sanmartín *et al.*, 2008). La piroplasmosis tiene una distribución mundial (Figura 2) figurando entre las enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE); la aparición de esta enfermedad debe notificarse dentro de las 72 horas posteriores a la detección; el monitoreo a largo plazo de la prevalencia de la enfermedad es muy importante en países donde se ha informado la piroplasmosis equina para poder prevenir los posibles efectos adversos en la industria ecuestre, debido a la tasa de morbilidad y mortalidad la cual puede variar del 10 al 50% (OIE, 2013). Para la importación de équidos las autoridades veterinarias de los países importadores deben exigir la presentación de un certificado veterinario internacional que acredite que los animales no manifestaron ningún signo clínico de piroplasmosis equina el día del embarque; que sus resultados sean negativos en pruebas de diagnóstico para piroplasmosis equina (*Theileria equi* y *Babesia caballii*) efectuadas en menos de 30 días previos al embarque; también deben ser exentos de garrapatas, mediante un tratamiento preventivo en los casos necesarios, los 30 días anteriores al

embarque; para el caso de la importación temporal de caballos de competición las autoridades veterinarias de los países importadores podrán contemplar la posibilidad de importar temporalmente caballos de competición que resulten positivos a los procedimientos de control, siempre y cuando se tomen las siguientes precauciones; los caballos deberán ir acompañados de un pasaporte sanitario, deberán presentar un certificado veterinario internacional que acredite que los animales no manifestaron ningún signo clínico de piroplasmosis equina el día del embarque; que fueron sometidos a un tratamiento contra las garrapatas durante siete días anteriores al embarque; que los caballos se hayan mantenido en un perímetro en el que se toman las precauciones necesarias para controlar las garrapatas y que están bajo la supervisión directa de la autoridad veterinaria; siendo examinados periódicamente para detectar la presencia de estas (OIE, 2019).

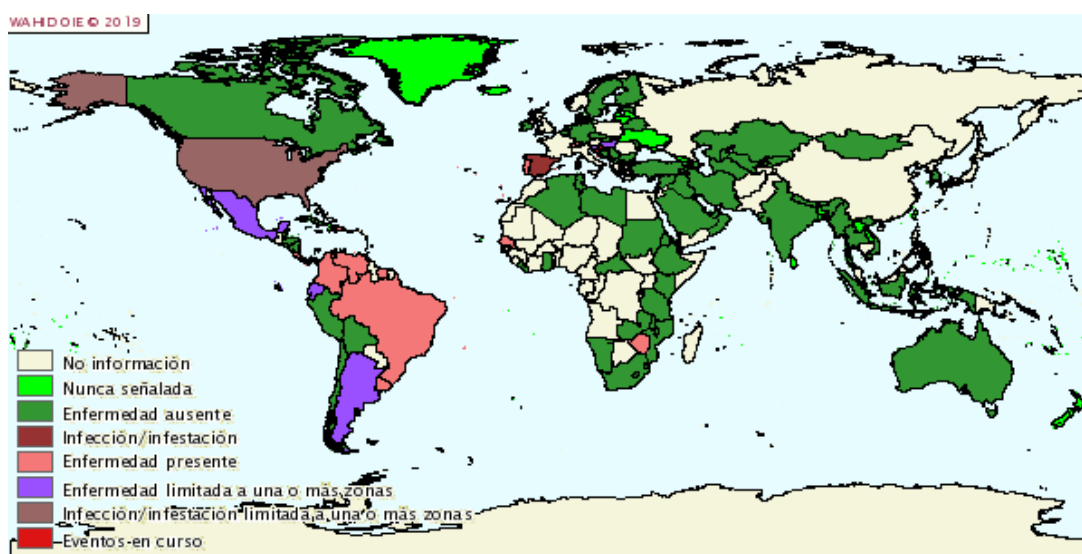


Figura 2. Distribución mundial de la piroplasmosis equina en el año 2018. Imagen obtenida de la base de datos del sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHIS Interface) de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2019).

2.9. Epidemiología de *Theileria equi* y *Babesia caballi*

La piroplasmosis equina se ha reportado a nivel mundial, como el estudio realizado en Cuba por Díaz-Sánchez *et al.*, (2018) donde reportan por medio de tinción Giemsa y basado en parámetros morfológicos y biométricos a *Babesia caballi* con 5.2 % y *Theileria equi* con 13.8 % en las 58 muestras de equinos analizadas. Estudios realizados por serología se han realizado en Texas por Scoles *et al.*, (2011) e identificaron en 360 caballos en el condado de Kleberg, mediante cELISA un 81.1% de animales positivos a *Theileria equi*; Short *et al.*, (2012) reportan en Florida 9.5% de *Theileria equi* en 210 caballos utilizando cELISA, IFAT, en el caso de Sudamérica Viera *et al.*, (2013) reportan una seroprevalencia de 78.3% de *Theileria equi* y un 69.2% *Babesia caballi* en 166 equinos de tiro y 32 equinos de trabajo rural muestreados en Brasil utilizando cELISA; Mujica *et al.*, (2011) reportaron una seroprevalencia de 50.3% de *Theileria equi* y un 70.6% *Babesia caballi* en 360 muestras de suero equino recolectadas de 9 municipios del estado de Lara en Venezuela utilizando ELISA con antígenos recombinantes y anticuerpos monoclonales; en Europa, Garcia-Bocanegra *et al.*, (2013) reportan una seroprevalencia de 50.3% de *Theileria equi* y un 11.4% *Babesia caballi* por cELISA en España; Piantedusi *et al.*, (2014) reportaron una seroprevalencia de 57.1% de *Theileria equi* y un 11.45% *Babesia caballi* en Italia en 203 equinos asintomáticos utilizando IFAT; Kumas *et al.*, (2013) reportaron una seroprevalencia de 32.6% de *Theileria equi* en 120 muestras de sueros de equinos en la India por ELISA utilizando el gen de ema-2 en animales con 99 días pos-infección; Hawkins *et al.*, (2015) reportaron una prevalencia 77% de *Theileria equi* % en 77 burros y 16 cebras de pastoreo en África mediante nPCR usando cebadores de rARN (5' AGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGC-3') (5' AACTGACGACCTCCAATCTCTAGTC-3'), en Asia, Steinman *et al.*, (2012) reportan una prevalencia de 26.4% de *Theileria equi* en 590 equinos asintomáticos de 46 granjas mediante de Israel PCR por el gen rRNA 18S.

Con respecto a estudios realizados en México, Gaxiola *et al.*, (2001) donde reportaron una prevalencia de 33.3% a *Babesia caballi* y un 9.33% a *Haemobartonella* spp. en 75 equinos utilizado el método de diagnóstico por

morfología, al igual Zatarain *et al.*, (2019) donde reportaron una frecuencia de 32.63% de *Babesia* spp. y un 18.32% para *Anaplasma* spp. en 573 equinos, basándose en los parámetros descrito por la OIE (2014). Utilizando diagnóstico genético Ayala-Valdovinos *et al.*, (2014) reportan una frecuencia de 26.72% de *Theileria equi* en 48 caballos por nPCR utilizando el gen EMA-1 (F 5'ATTGACCACGTCACCATCGA'3 R 5'GTCCTTCTTGAGAACGAGGT'3).

III. HIPÓTESIS

En los equinos de deporte y espectáculo de Culiacán, Sinaloa se encuentran parásitos Rickettsiales y Piroplasmidos sanguíneos.

IV. OBJETIVOS

4.1. General:

- Identificar la presencia de hemoparásitos en equinos de deporte y espectáculo en Culiacán, Sinaloa.

4.2. Específicos:

- Detectar morfológicamente hemoparásitos en sangre de equinos.
- Detectar molecularmente hemoparásitos en sangre de equinos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en equinos de deporte y espectáculo de Culiacán, Sinaloa. la cual está ubicada en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México, ubicada geográficamente en las coordenadas 24° 48' latitud Norte y 107° 23' latitud Oeste, con una altura de 60 msnm, la temperatura media anual del estado es de 25°C, las temperaturas mínimas promedio son alrededor de 10.5°C en el mes de enero y las máximas promedio pueden ser mayores a 36°C durante los meses de mayo a julio; con 144, 159 y 92 días despejados, medio nublados y nublados al año, respectivamente; precipitación pluvial promedio anual de 790 mm, con lluvias en verano Julio a Septiembre, el clima de la región es tropical seco (INEGI, 2009).

5.1. Muestreo

5.1.1. Tamaño de la muestra. Un total de 144 muestras de sangre de equinos fueron tomadas por conveniencia (Thrusfield, 1990). Con un total de 144 muestras de sangre de equinos las cuales se recolectaron del 10 de marzo del 2018 al 15 de enero de 2019.

5.1.2. Criterios de inclusión. Se tomaron muestra de sangre a equinos del municipio de Culiacán, Sinaloa; cuya raza fue Español, Frisón o Cuarto de milla, mayores de 2 años y 6 meses con fin zootécnico de deporte y espectáculo, con y sin signos clínicos.

5.1.3. Toma y transporte de muestra. Las muestras fueron tomadas asépticamente por punción de la vena yugular, se colectaron 5 ml de sangre de cada ejemplar en tubos Vacutainer estériles conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cada tubo fue debidamente identificado con el nombre y número de animal muestreado. Las muestras se colocaron en un contenedor a una temperatura de 4°C y fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

5. 3. Análisis de las muestras

5. 3. 1. Frotis sanguíneo. Las muestras se procesaron por frotis sanguíneos, los cuales se tiñeron mediante coloración de Wright y se examinaron para determinar la presencia de hemoparásitos. Se consideraron los parámetros morfológicos y biométricos que incluyen la forma, la ubicación del sitio y el tamaño del hemoparásito en cualquier eritrocito infectado. Este diagnóstico se basó en las características morfológicas y estructurales descritas para cada hemoparásito. En el caso de *Babesia caballi* se visualizaron, en el interior de los eritrocitos, cuerpos periformes unidos en pares por sus extremos posteriores formando un ángulo agudo entre sí (OIE, 2014). Para *Theileria equi* se observaron estructuras periformes; de forma redonda u ovoide, dispuestas en tétradas formando el arreglo conocido como "Cruz de Malta" (OIE, 2014), para el caso de *Anaplasma phagocytophilum* se observaron en neutrófilos y eosinófilos, colonias similares a la mora llamadas "mórulas" (Woldehiwet, 2010).

5. 3. 2. Extracción de ADN. Se obtuvo el ADN de las 144 muestras mediante la técnica fenol-cloroformo descrita por Sambrook *et al.*, (1989) utilizando amortiguador de lisis (TE: tris 100 mM y EDTA 10 mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, e incubando a 37°C con calor seco y a 56°C con calor húmedo por 1 h, posteriormente se separó y se agregó fenol (1:1), se centrifugó a 12 000 rpm y a la parte del sobrenadante se agregó cloroformo (1:1), se agregó etanol absoluto incubándose a 24 h a -20°C, y se centrifugó a 13 000 rpm/15 min y al precipitado se disolvió en agua. El ADN extraído se observó mediante el uso de un gel de agarosa al 1% teñido con gel red con luz ultravioleta (Huang *et al.*, 2010).

5.3.3. PCR. Solo se realizó PCR a las muestras que resultaron positivas por frotis sanguíneo a el agente de la familia Anaplasmataceae y/o Piroplasmas. El material genético extraído formó parte de una mezcla de reacción para PCR a 25 µl (Buffer 10X MgCl₂, dNTPs, H₂O inyectable estéril, Taq Polimerasa (Thermo Scientific™ DreamTaq Hot Start PCR Master Mix), oligonucleótidos y DNA), la reacción se llevó a cabo en los termocicladores (TECHNE GENIU y BIORAD T100) para la amplificación del gen EMA-1, para *T. equi* las condiciones de termociclado utilizadas

fueron: por 25 ciclos, la temperatura de desnaturalización que se utilizó fue a 95°C por 5 min, la alineación a 95°C por 15 s y la extensión a 60°C por 15 s, 72°C por 15 s, con una extensión final de 72°C por 5 min. Con los oligonucleótidos: *ema-1* F [5'CCGAGGAGGAGAACCCA] *ema-1* R [5'CGCATAGACGGAGAAGCC] para el nPCR *ema-1n* de *T. equi* las condiciones de termociclado utilizadas fueron: 25 ciclos, la temperatura de desnaturalización que se utilizó fue a 95°C por 5 min, la alineación a 95°C por 5 s y la extensión a 60°C por 5 s, 72°C por 5 s, con una extensión final de 72°C por 5 min. Con los oligonucleótidos: *ema-1n* F [5'AAGGACAACAAGCCATACGT] *ema-1n* R [5'TTGCCTGGAGCCTTGAAG] (Baptista *et al.*, 2013). Para la amplificación del gen *rap-1* para *B. caballi* las condiciones de termociclado utilizadas fueron: 25 ciclos, la temperatura de desnaturalización que se utilizó fue a 95°C por 5 min, la alineación a 95°C por 15 s y la extensión a 60°C por 15 s, 72°C por 15 s, con una extensión final de 72°C por 5 min. Con los oligonucleótidos: *rap-1* F [5'GATTACTTGTCGGCTGTGTCT] para el nPCR *rap-1n* de *B. caballi* las condiciones de termociclado utilizadas fueron: por 25 ciclos, la temperatura de desnaturalización que se utilizó fue a 95°C por 5min, la alineación a 95°C por 5 s y la extensión a 60°C por 5 s, 72°C por 5 s, con una extensión final de 72°C por 5 min. Con los oligonucleótidos: *rap-1n* F [5'GCTAAGTACCAACCGCTGA] y *rap-1n* R [5'CGCCAAGTTCTCAATGTCAG] (Schwint *et al.*, 2008). Para la amplificación del gen *msp4* de *A. phagocytophilum* las condiciones de termociclado utilizadas fueron: 35 ciclos, la temperatura de desnaturalización se utilizada fue a 94°C por 30 s, la alineación a 60°C por 30 s y la extensión a 68°C por 30 s, con una extensión final de 70°C por 10 min. Con los oligonucleótidos: *msp4AP5* [5'-ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG-3'] y *msp4AP33* [5'-TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG-3'] (De la Fuente *et al.*, 2005).

Los productos de PCR se revelaron en geles de agarosa al 1% teñido con Gel Red (GELRED NUCLEIC ACID GEL STAIN, 10,000X de BIOTIUM) y se visualizaron en un transluminador ultravioleta utilizando marcador de tamaño de 1000pb [OptiDNA Market] (Huang *et al.*, 2010).

5.3.4. Análisis de datos. El análisis de los datos obtenido se realizó mediante tablas de frecuencia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de las muestras analizadas por microcopia se encontró que un 5.55% (8/144) de ellas presentaron formaciones intraeritrocíticas compatibles a piroplasmas (Figura 3), de estas muestras positivas se obtuvo el ADN y se les realizó PCR. Para la amplificación de *B. caballi* y *A. phagocytophilum* se utilizaron el gen *rap-1* y el gen *msp4* respectivamente donde no se logró observar reacciones positivas, sin embargo, al utilizar el gen *ema-1* por nPCR se observaron 2 amplificaciones positivas (Figura 4) de alrededor de 229 pb para *Theileria equi*. En los equinos positivos no se observaron signos clínicos.

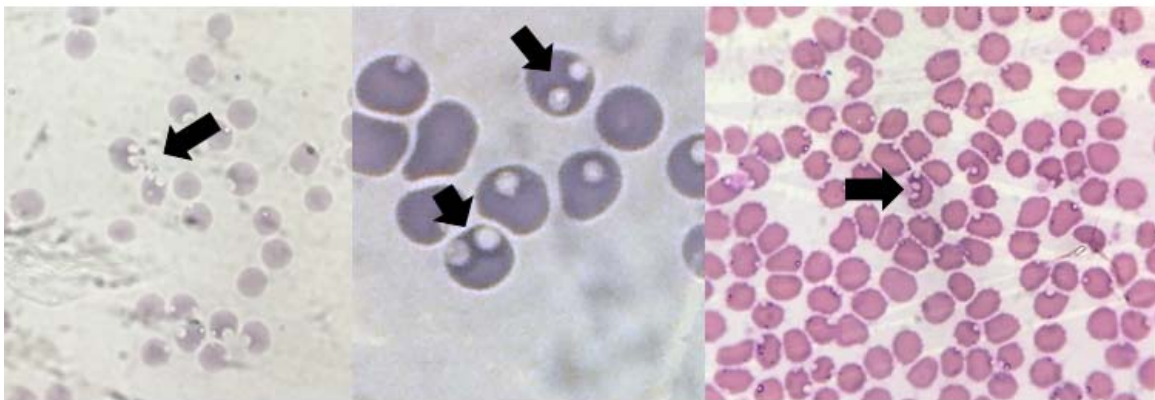


Figura 3. Frotis de sangre de equino con presencia de piroplasmas dentro del eritrocitos.

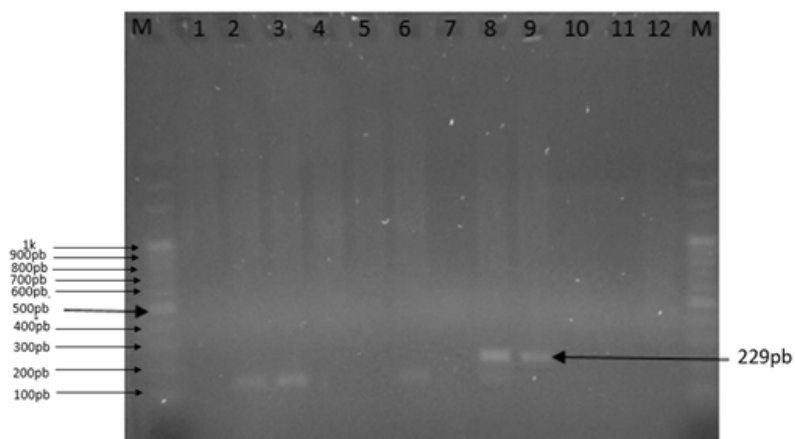


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con marcador de 1kb (OptiDNA Marker) en el carril 1. Amplificación del gen *ema-1* para *Theileria equi* carril 8 y 9.

Las piroplasmosis equinas son enfermedades que afectan a una gran cantidad de caballos en todo el mundo; por tanto, cualquier información sobre la prevalencia de esta infección en las poblaciones de caballos es esencial para controlar la enfermedad y reducir las pérdidas económicas generadas (Montes *et al.*, 2017). Existen diferentes pruebas serológicas disponibles para realizar estudios epidemiológicos (IFAT, cELISA) e identificación del agente (PCR) actualmente, la Organización Mundial de Sanidad Animal recomienda ambas técnicas para la importación (OIE, 2019).

Se han publicado diversos estudios sobre la identificación de hemoparásitos en equinos en el municipio de Culiacán, Sinaloa (Gaxiola *et al.*, 2001, Gaxiola *et al.*, 2010, López *et al.*, 2013, Zatarain *et al.*, 2019). Gaxiola *et al.* (2001) reportaron la prevalencia de hemoparásitos en equinos del 33.33% (25/75), de los cuales el 24% (18/75) pertenece a *Babesia caballi* y un 9.33% (7/75) a *Haemobartonella* spp, en el estudio actual se obtuvo un 5.55% donde se observa una menor frecuencia de hemoparásitos y puede deberse a que los equinos eran animales sin signos de enfermedad aparente y en las muestras del estudio mencionado fueron tomadas de pacientes con signos sugerentes a piroplasmosis equina. A nivel mundial, un estudio realizado en Cuba por Díaz-Sánchez *et al.* (2018) donde reportan por medio de tinción Giemsa a eritrocitos con cuerpos de inclusión compatibles con *Babesia* spp/*Theileria* spp (13/100) con una prevalencia del 13%. Esta prevalencia difiere debido a que en este estudio los equinos no presentan garrapatas y el de Cuba hay alta presencia de garrapatas. Es difícil de diagnosticar Hemoparásitos por frotis sanguíneo en los animales portadores aun en casos con enfermedad aguda o en animales con bajo nivel de parasitemia (Iowa State University, 2008). Las discrepancias de la incidencia de la piroplasmosis equina podrían estar relacionadas con las condiciones de alojamiento, el pastoreo y la actividad de los caballos (Viera *et al.*, 2013). Además, de las medidas para el control de estas enfermedades y las pruebas seleccionadas para el diagnóstico (Abutarbush *et al.*,

2012), el clima y la fauna de garrapatas también son importantes; donde la temperatura y/o humedad y/o precipitación influyen en las poblaciones de garrapatas (Steinman *et al.*, 2012).

López *et al.* (2013) lograron identificar la presencia de *Anaplasma phagocytophilum* por nPCR en equinos de Culiacán, Sinaloa analizando un total 138 muestras encontrando un 9.42% (13/138) positivas de las muestras analizadas, en nuestro estudio no se encontraron formas compatibles a *Anaplasma* spp. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron dos muestras positiva a *Theileria equi* por PRC anidado, lo cual coincide con el estudio de Agudelo-Ruíz *et al.* (2017) donde se realizó una identificación molecular de hemoparásitos en equinos del noroeste de Colombia, a 135 equinos donde 100% resultó negativo para la familia Anaplasmataceae, se describió a *T. equi* como el hemoparásito de mayor presencia con 13.3% (18/135) utilizando un fragmento de 450 pb del gen 18S ribosomal de piroplasmas. Con respecto al estudio de Vargas *et al.*, (2004) donde implementación de la técnica de PCR en la identificación de *Babesia* spp. en equinos provenientes de la Región Metropolitana de Chile con y sin signología clínica, coincide en que el piroplasma de mayor presencia fue *Theileria equi* 10.78% (14/77) con respecto a 0.77% (1/77) de *Babesia caballi* utilizando los genes de 16S rDNA. Baptista *et al.* (2013) y Mahmoud *et al.* (2016), utilizaron el mismo protocolo y gen (*ema-1*) de este estudio y amplificaron *Theileria equi* en sangre de 88 caballos y 51 burros.

Los caballos infectados por *Theileria equi* pueden seguir siendo portadores de por vida, mientras que los caballos infectados por *Babesia caballi* la eliminan del torrente sanguíneo de 1–4 años después de la infección (Salim *et al.*, 2008). Además, que los tratamientos no eliminan completamente *Theileria equi* de los animales (Brüning, 1996). Diversos autores (García-Bocanegra *et al.*, 2013; Aharonson-Raz *et al.*, 2014; Guidi *et al.*, 2015; Bartolomé del Pino *et al.*, 2016) sugirieron que la edad era un factor de riesgo, ya que los animales de mayor edad pueden estar expuestos a las garrapatas por un período más largo que los animales jóvenes. Sin embargo, otros autores mostraron que no hay una relación de prevalencia con respecto edad (Golynski *et al.*, 2008; Grandi *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2014; Prochno *et al.*, 2014).

El presente estudio se encontró positivos un potro de 3 años y un adulto de 5 años de edad para *T. equi* lo que sugiere que la edad no fue un factor que influyese en el presente estudio. El hecho de encontrarse *Theileria equi* presente en los equinos de Culiacán, Sinaloa sugiere un problema, ya que existe evidencia de que los animales infectados con *Theileria equi* pueden convertirse en portadores de por vida (Brüning, 1996). Con respecto a las razas Sevinc *et al.*, (2008) en su estudio realizado en España descubrió que las razas españolas tienen una prevalencia de infección menor que las razas no nativas, lo que sugiere que los caballos de razas no nativas de México son más propensos a una infección por *Theileria equi*.

VII. CONCLUSIÓN

Se concluye que los equinos de Culiacán, Sinaloa presentan hemoparásitosis; al haberse detectado en sangre *Theileria equi*, siendo éste el primer reporte del piroplasmido en la región, y representa un problema en la salud animal; por lo que se deben establecer programas sanitarios a fin de garantizar mejores condiciones de salud y manejo permitiendo así el correcto funcionamiento fisiológico de los equinos, además, del impacto como una posible zoonosis adquirida por la picadura de una garrapata cuando los individuos interactúan accidentalmente con el ciclo natural de parásito en el ambiente.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abutarbush, S. M., Alqawasmeh, D. M., Mukbel, R. M., Al-Majali, A. M. 2012. Equine babesiosis: Seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59(1): 72–78.
- Adaszek, Ł., Winiarczyk, S., Łukaszewska, J., 2009. A first case of ehrlichiosis in a horse in Poland. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* .116(9): 330–334.
- Aharonson-Raz, K., Rapoport, A., Hawari, I. M., Lensky, I. M., Berlin, D., Zivotofsky, D., Klement, E., Steinman, A. 2014. Novel description of force of infection and risk factors associated with *Theileria equi* in horses in Israel and in The Palestinian Authority. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 5(4): 366–372.
- Al-Saad, K. M. 2009. Acute babesiosis in foals. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 8(12): 2585-2589.
- Ambawat, H. K., Malhotra, D. V., Kumar, S., Dhar, S. 1999. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Veterinary parasitology*. 85(4): 319-324.
- Ayala-Valdovinos, M. A., Lemus-Flores, C., Galindo-Garcia, J., Sanchez-Chipres, D., Duifhuis-Rivera, T., Anguiano-Estrella, R., Bañuelos-Pineda, J., Rodriguez-Carpena, J. G. 2014. Nested PCR detection of *Theileria equi* infection and frequency in horses imported into Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 13: 859-863. doi:10.3923/javaa.2014.859.863
- Baptista C, Lopes M. S, Tavares A. C, Rojer H, Kappmeyer L, Mendonça D, Machado A. C. 2013. Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. *Ticks Tick Borne Dis*. 4:242–5.
- Barlough, J. E., Madigan, J. E., DeRock, E., Dumler, J. S., Bakken, J. S., 1995. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the Human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). *Journal of Clinical Microbiology*. 33(12): 3333–3334.

- Bartolomé del Pino, L. E., Nardini, R., Veneziano, V., Iacoponi, F., Cersini, A., Autorino, G.L., Buono, F., Sicluna, M. T. 2016. Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in CentralSouthern Italy: Sero-molecular Surrey and associated risk factors. Ticks and Tick-borne Diseases. (7): 462–469.
- Bhoora, R. 2009. Molecular characterization of Babesia caballi and Theileria equi, the aetiological agents of equine piroplasmosis, in South Africa (Doctoral dissertation, University of Pretoria). Disponible en: <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/24874/Complete.pdf?sequence=6Tustin>
- Brayton, K. A., Palmer, G. H., Lundgren, A., Yi, J., Barbet, A. F. 2002. Antigenic variation of Anaplasma marginale msp2 occurs by combinatorial gene conversion. Molecular microbiology. 43(5): 1151-1159.
- Brüning, A. 1996. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. British Veterinary Journal. 152(2): 139-151.
- Cabezas-Cruz, A., Alberdi, P., Valdés, J. J., Villar, M., de la Fuente, J. 2017. Anaplasma phagocytophilum infection subverts carbohydrate metabolic pathways in the tick vector, Ixodes scapularis. Frontiers in cellular and infection microbiology. 7:23. doi: 10.3389/fcimb.2017.00023
- Day M. 2016. Interaction of the Host Immune System with Arthropods and Arthropodborne Infectious Agents. En: Day M. Arthropod-borne Infectious Diseases of the dog and cat. Boca Ratón: CRC Press. (1): 25 – 34
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., Kocan, K. M. 2016. Anaplasma phagocytophilum uses common strategies for infection of ticks and vertebrate hosts. Trends in microbiology, 24(3): 173-180.
- de la Fuente, J., Massung, R.F., Wong, S.J., Frederick, K.C., Lutz, H., Meli, M., Von Loewenich, F.D., Grzeszczuk, A., Torina, A., Caracappa, S., Mangold, A.J., Narajo, V., Stuen, S., Kocan, K.M. 2005. Sequence analysis of the msp4 gene of Anaplasma phagocytophilum strains. Journal of clinical microbiology. 43(3): 1309-1317.

- de Waal, D. T. 1992. Equine piroplasmosis: a review. *British Veterinary Journal*, 148(1), 6-14.
- de Waal, D. T. y van Heerden, J. 2004. Equine piroplasmosis. In: J.A.W. Coetzer (Ed.) *infectious diseases of livestock*. (pp. 244-245). South Africa: Oxford University Press, Cape Town.
- Díaz-Sánchez, A. A., Fonseca-Rodríguez, O., del Castillo-Domínguez, S. L., Alfonso-Dorta, Y., Lobo-Rivero, E., Corona-González, B., Vega-Cañizares, E. 2018. Hematological alterations found in horses (*Equus caballus*) infected with *Babesia caballi* and *Theileria equi*. *Revista de Salud Animal*. 40(1): 1-10.
- Diniz, P. y Breitschwerdt, E. 2011. *Anaplasma phagocytophilum* Infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis). En: Greene C. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4a ed. ELSEVIER. p.227-238.
- Donnellan, C. M. B., y Marais, H. J. 2009. Equine piroplasmosis. *Infectious Diseases of the Horse*, ed. Mair TS, Hutchinson RE. *EVJ*. p. 333-40.
- Dugat, T., Lagrée, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J., Haddad, N. 2015. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. (5): 61.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(6): 2145–2165.
- Dunning Hotopp, J.C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ren, Q., Wu, M., Utterback, T.R., Smith, S., Lewis, M., Khouri, H., Zhang, C., Niu, H., Lin, Q., Ohashi, N., Zhi, N., Nelson, W., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sundaram, J., Daugherty, S.C., Davidsen, T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Haft, D.H., Selengut, J.D., Sullivan, S.A., Zafar, N., Zhou, L., Benahmed,

F., Forberger, H., Halpin, R., Mulligan, S., Robinson, J., White, O., Rikihisa, Y., Tettelin, H., 2006. Comparative genomics of emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genetics*. 2(2): 21.

Erbsiöh, J. 1975. Babesiosis in the reborn foal. *J. Reprod. Ferhl. Suppl.* 23:725.

FAOSTAT. 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/es/>

Friedhoff, K. T. y Soule, C. 1996. An account on equine babesioses. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*. 15: 1191-1201.

García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, Ł., Carbonero, A., Almería, S., Jaen-Tellez, J. A., Gutierrez-Palomino, P., Arenas, A. 2013. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *The Veterinary Journal*. 195(2): 172-178.

Garcia-Sanmartin, J., Barandika, J. F., Juste, R. A., Garcia-Perez, A. L., Hurtado, A. 2008. Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. *Medical and veterinary entomology*. 22(4): 318-325.

Gaxiola, C. S. M., Borbolla, I. J. E., Rentería, G. R., Aguilar, B. R., Caro, P. F., Valenzuela, G. D., Veliz, F. A. Felix, R. F., Linares, A. D. 2001. Prevalencia de hemoparásitos en equinos del municipio de Culiacán, Sinaloa, México. V Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Mazatlán, Sinaloa. p.79.

Golynski, A. A., Fernandes, K. R., Baldani, C. D., Golynski, A. L., Madeiro, A. S., Machado, R. Z., Botteon, P. T., Massard, C. L. 2008. Seroepidemiological studies on *Babesia equi* in horses from the State of Rio Grande do Sul determined by indirect immunofluorescence test and Elisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17(S1): 317–321.

Gou, H., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Chen, Z., Liu, Z., Ren, Q., Li, Y., Yang, J., Yin, H., Luo, J. 2013. Coevolutionary analyses of the relationships between piroplasmids and their hard tick hosts. *Ecology and evolution*. 3(9): 2985-2993.

- Guidi, E., Pradier, S., Lebert, I., Leblond, A. 2015. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of theileriosis and babesiosis in horses. *Parasitology Research*. 114(1): 71–83.
- Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sasser, D., Kramer, L. H. 2011. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11(7): 955–956.
- Hailat, N. Q., Lafi, S. Q., Al-Darraj, A. M., & Al-Ani, F. K. 1997. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary parasitology*. 69(1-2): 1-8.
- Hajdusek O, Sima R, Ayllón N, Jalovecka M, Perner J, de la Fuente J, Kopacek P. 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 16(3):26.
- Hawkins, E., Kock, R., McKeever, D., Gakuya, F., Musyoki, C., Chege, S. M., Mutinda, M., Kariuki, E., Davidson, Z., Low, B., Skilton, R. A., Njahira, M. N., Mark Wamalwa, M., Maina, E. 2015. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* as well as the identification of associated ticks in sympatric Grevy's zebras (*Equus grevyi*) and donkeys (*Equus africanus asinus*) in northern Kenya. *Journal of wildlife disease*. 51(1): 137-147.
- Holman, P. J., Frerichs, W. M., Chieves, L., & Wagner, G. G. 1993. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(3): 698-701.
- Huang Q, Baum L, Fu WL. 2010. Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. *Clin Lab* 2010. 56: 149 – 152.
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., Gray, J. S. 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*. 38: 1219-1237.
- Hussain, M. H., Saqib, M., Raza, F., Muhammad, G., Asi, M. N., Mansoor, M. K., Saleem, M., Jabbar, A. 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five

draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4): 248–256.

IFHA. 2017. Annual Report 2017. Appendix 1 - Analysis of Racing Statistics 2017. Disponible en: https://www.ifhaonline.org/resources/Annual_Report_2017.pdf.

INEGI. 2009. Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática, Censo Agrícola Ganadero y Forestal 2007. Consultado [16 de enero 2007]. Disponible en <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/clim.cfm?c=444&e=09>

Jongejan, F. y Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*. 129(S1): S3-S14.

Knowles, D. P., Kappmeyer, L. S., Stiller, D., Hennager, S. G., Perryman, L. E. 1992. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(12): 3122-3126.

Knowles Jr, D. P. 1996. Control of *Babesia equi* parasitemia. *Parasitology Today*. 12(5): 195-198.

Kumar S., Kumar R., Gupta A. K., Yadav S. C. Goyal S. K., Khurana S. K., Singh R. K. 2013. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. *Veterinary Parasitology*. 198(1-2):7-10.

Lepidi, H., Bunnell, J.E., Martin, M.E., Madigan, J.E., Stuen, S., Dumler, J.S., 2000. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 62(1): 29–37.

Levine, N. D. 1985. *Veterinary protozoology* (No. 636.0896016 L665). Ames: Iowa State University Press. Disponible en: [https://www.cell.com/partod/pdf/0169-4758\(86\)90185-7.pdf](https://www.cell.com/partod/pdf/0169-4758(86)90185-7.pdf)

Madigan, J. E., Gribble, D., 1987. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 190(4): 445–448.

- Mahmoud, M. S., El-Ezz, N. T. A., Abdel-Shafy, S., Nassar, S. A., El Namaky, A. H., Khalil, W. K., Knowles, D., Kappmeyer, L., Silva, G. M., Suarez, C. E. 2016. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasites & vectors*. 9(1): 260.
- Majazki, J., Wüppenhorst, N., Hartelt, K., Birtles, R., von Loewenich, F. D. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific ankA gene sequences. *BMC veterinary research*. 9(1): 235.
- Malekifard, F., Tavassoli, M., Yakhchali, M., Darvishzadeh, R. 2014. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. In *Veterinary research forum: an international quarterly journal*. 5 (2): 129.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Pérez-Sánchez, R. 2012. DE, E. Y. C. V. D. Garrapatas: características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital. Detalles de la influencia de las garrapatas sobre la producción y sanidad animal. p.1-8. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/58125377/160-garrapatas.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DGARRAPATAS+CARACTERISTICAS+AN+ATOMICAS+EP.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191015%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20191015T080916Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=94890d2ee016818925937cf7db8e6e7912997ba2f27fa1a3225481d82b4172a3
- Mehlhorn, H. y Schein, E. 1998. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitology research*. 84(6): 467-475.
- Meuten D y Buergelt C. 2014. Diseases of the Hemolymphatics System. En: Buergelt C, Piero F. *Color Atlas of Equine Pathology*. Iowa: Wiley Blackwell. p 471–509.

- Moltmann, U. G., Mehlhorn, H., Schein, E., Voigt, W. P., Friedhoff, K. T. 1983. Ultrastructural Study on the Development of *Babesia equi* (Coccidia: Piroplasmia) in the Salivary Glands of its Vector Ticks 1. *The Journal of protozoology*. 30(2): 218-225.
- Montes, C. M. G, Fernández-García, J. L., Martínez-Estélez, M. Á. H. 2017. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. *Parasite*. (24):14.
- Mujica, F. F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R. D., Barrios, N., Álvarez, R., Granda, F. 2011. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Veterinary Parasitology*. 178(1-2): 180-183.
- Murray, G., Munstermann, S., & Lam, K. 2013. Benefits and challenges posed by the worldwide expansion of equestrian events—new standards for the population of competition horses and equine disease free zones (edfz) in countries'. 31st General Session World Assembly OIE, 26-31. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.444.2561&rep=rep1&typ e=pdf>
- Nilsson, A. I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J. C. D., Andersson, D. I. 2005. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *PNAS* 102 (34): 12112–12116.
- Lewis, B. D. 1999. Transplacental transmission of *Babesia equi* in horses and chemotherapy of small *Babesia* species. PhD thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
- Lin, M., Kikuchi, T., Brewer, H.M., Norbeck, A.D., Rikihisa, Y., 2011. Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Front. Microbiol.* 2:24. doi: 10.3389/fmicb.2011.00024
- López, A. C. V., Gaxiola, C. S. M., Enríquez, V. I., Castro, D.N., Cota, G. S. C. 2013. Identificación de *Anaplasma phagocytophilum* por PCR anidado en equinos de Culiacán, Sinaloa (Tesis maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa. p.14-17

- OIE. 2014. Equine piroplasmosis. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in. 2014:8.
- OIE. 2019. Base de datos del Sistema mundial de información zoonosaria (WAHIS Interface) – Versión 1. Disponible en: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributonmap/index/newlang/es?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=61&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2018&selected_report_period=2&selected_start_month=1&date_submit=OK. Accesada 20 de agosto de 2019.
- OIE. 2019. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Disponible en: https://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmlfile=chapitre_equine_piroplasmosis.htm#article_equine_piroplasmosis.2. Accesada 20 de agosto de 2019.
- OIE. 2013. Murray, J. G., Munstermann, S., Lam, K. 2013. Benefits and Challenges posed by the worldwide expansion of equestrian events – new standards for the population of competition horses and equine disease free zones (EDFZ) in countries.
- Onyiche, T. E., Suganuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., & Thekisoe, O. 2019. A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *International journal of environmental research and public health*. 16(10): 1736.
- Passamonti, F., Fabrizia, V., Katia, C., Stefano, C., Giacomo, C., Luisa, M. M., Piergili, F. D., Verini, S. A., Mauro, C. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 33(1): 73-83.
- Piantedosi, D., D'Alessio, N., Di Loria, A., Di Prisco, F., Mariani, U., Neola, B., Santoro, M., Montagnaro, S., Capelli, G., Veneziano, V. 2014. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. *The Veterinary Journal*. 202(3): 578-582.

- Posada-Guzmán MF, Dolz G, Romero-Zúñiga JJ, JiménezRocha AE. 2015. Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in blood from equines from four indigenous communities in Costa Rica. *Veterinary Medicine International*, 2015, 236278.
- Pusterla, N., Lutz, H., Braun, U. 1998. Experimental infection of four horses with *Ehrlichia phagocytophila*. *Veterinary Record*. 143(11): 303-305.
- Pritchard J. C., Lindberg A. C., Main D. C. J., Whay, H. R. 2005. Assessment of the Welfare of Working Horses, Mules and Donkeys, using Health and behavior Parameters, *Prev. Vet. Med.* 69: 265 – 83.
- Prochno, H. C., Scorsin, L. M., De Melo, F. R., Baldani, C. D., Falbo, M. K., de Aquino, L. C., Lemos, K. R. 2014. Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 23(1): 85–89.
- Rikihisa, Y., Lin, M., 2010. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* type IV secretion and Ank proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 13(1): 59–66.
- Rikihisa Y. 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 24(3): 469–489.
- Rodríguez J. P., Conejeros, O. C. 2017. Diagnóstico serológico de *Anaplasma phagocytophilum* en caballos Fina Sangre de Carrera pertenecientes al Valparaíso Sporting Club Viña del Mar. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 27(2): 2012.
- 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). *Revista biomédica*. 11(4): 277-282.
- Rothschild, C. y Knowles, D. 2007. Equine piroplasmosis. In *Equine Infectious Diseases*, ed. Sellon DC, Long Mt. Saunders, Elsevier, St. Louis, MO. p. 465–73.
- Rothschild, C. M. 2013. Equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7), 497-508.

- Salim, B. O. M., Hassan, S. M., Bakheit, M. A., Alhassan, A., Igarashi, I., Karanis, P., Abdelrahman, M. B. 2008. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitology Research*. 103(5): 1145–1150.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. En: *Molecular cloning. Laboratory manual*. 2da. Edition. Cold spring Harbor laboratory press 1989.
- Sevinc, F., Maden, M., Kumas, C., Sevinc, M., Ekici, O. D. 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Veterinary Parasitology*. 156(3–4): 173–177.
- Scoles, G. A., Hutcheson, H. J., Schlater, J. L., Hennager, S. G., Pelzel, A. M., Knowles, D. P. 2011. Equine piroplasmiasis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. *Emerging infectious diseases*. 17(10): 1903.
- Scoles, G. A. y Ueti, M. W. 2015. Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Annual review of entomology*. 60: 561-580.
- Schein, E., Rehbein, G., Voigt, W. P., Zweggarth, E. 1981. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmedizin und Parasitologie*. 32(4): 223-227.
- Short, M. A., Clark, C. K., Harvey, J. W., Wenzlow, N., Hawkins, I. K., Allred, D. R., Knowles, D. P., Corn, J. L., Grause, J. F., L., Hennager, S. G., Kitchen, D. L., Traub-Dargatz, J. L. 2012. Outbreak of equine piroplasmiasis in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 240(5): 588-595.
- 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. *J Med Entomol*. 45:1152–5.
- Silaghi, C., Liebisch, G., Pfister, K., 2011. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasites & Vectors*. 4(1): 161.

- Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I. M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G. 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology*. 187(3-4): 558-562.
- Sumbria, D., Moudgil, A. D., Singla, L. D. 2014. Equine Piroplasmosis: current status. *Veterinaria*. 1(1): 9-14.
- Tamzali, Y. 2013. Equine piroplasmosis: An updated review. *Equine Veterinary Education*, 25(11), 590-598.
- Thrusfield, M. V. 1990. *Epidemiología veterinaria*. Acribia, Zaragoza (trad. de la 1ª Ed. 1986).
- Vieira, T. S., Vieira, R. F., Finger, M. A., Nascimento, D. A., Sicupira, P. M., Dutra, L. H., Deconto, I., Barros-Filho, I. R., Dornbusch, P. T., Biondo, A. W., Vidotto, O. 2013. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*. 4(6): 537-541.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167 (2–4): 108–122.
- Zapf, F. y Schein, E. 1994. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma* species. *Parasitology research*. 80(4): 297-302.
- Zatarain, I. F., Enríquez, V. I., Castro del C. N., Gaxiola, S. M., Rodríguez, G. M. A., Pérez, C. J. J., Urías, C. C. 2019. Identificación morfológica de hemoparásitos en equinos de Culiacán, Sinaloa, México. XI Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Monterrey, Nuevo León. p. 236.
- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., Parpaglia, M. L. P. 2008. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*. 28(5): 301-308.