

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia ovis* EN PEQUEÑOS RUMIANTES DEL ESTADO DE SINALOA”

**Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

LUCILA GUILLERMINA BELTRÁN VEGA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JAIME ELEAZAR BORBOLLA IBARRA

ASESORES DE TESIS:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

Culiacán, Sinaloa, México; a 21 de Enero de 2020

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR C. **LUCILA GUILLERMINA BELTRÁN VEGA**, 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-DIRECTOR

M. EN C. JAIME ELEAZAR BORBOLLA IBARRA

ASESORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORA

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR

DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

CULIACÁN, SINALOA, 21 DE ENERO DE 2020.



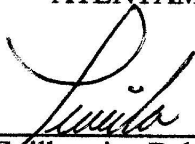
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

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 20 de enero del año 2020, la que suscribe Lucila Guillermina Beltrán Vega, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 05283094, 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 del MC. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación molecular de *Babesia ovis* en pequeños rumiantes del Estado de 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



Lucila Guillermina Beltrán Vega

CORREO ELECTRÓNICO: lucilabeltran@uas.edu.mx
CURP: BEVL900513MSLLCG09

DEDICATORIA

Le agradezco a Dios por haberme permitido llegar hasta este día, guiado en el camino de la vida, ser mi luz y apoyo en todo momento. Por haberme dado la fortaleza en momentos de debilidad.

A mis Padres y hermanos:

Con todo cariño y amor a mis padres Lucila Beltrán y Emilio Beltrán (D.e.p.) por los valores que me han inculcado, por apoyarme en todo momento, guiado y cuidado con mucho amor. Mi eterno agradecimiento por mi existencia. A mi hermana Hilda Beltrán por su amor, paciencia y apoyo incondicional, por el apoyo que me brindó para salir adelante por enseñarme que no hay límites, que puedo lograr lo que me proponga y que solo depende de mí, por su esfuerzo y amor muchas gracias.

A mi familia:

Ellos representan una parte importante de mi vida, porque me han brindado su apoyo constante y por compartir conmigo buenos y malos momentos, a Francisco Javier mi hermano y sobrino quien es mi mano izquierda porque siempre está en mi corazón quien es mi apoyo incondicional hoy y siempre, y a mis amigas incondicionales Marisol Mendoza, Brenda Ponce y Noyra Corona quienes me alientan a salir adelante y brindan fortaleza, para ellas mi admiración.

En especial a la Dra. Idalia Enríquez Verdugo quien siempre fue una luz que me guio y acompaño en este andar, muchas gracias.

*“Lo importante en la vida no es el triunfo sino la lucha. Lo esencial no es haber vencido, sino haber luchado bien.”
(Barón Pierre de Coubertin)*

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis la Dra. Idalia Enríquez Verdugo por la confianza que deposito en mí al aceptarme como tesista, por su apoyo y entrega que me brindo para la realización de esta tesis, por su paciencia y amistad.

A mi comité de tesis la Dra. Idalia Enríquez Verdugo, MC. Jaime Borbolla, Dra. Soila Maribel Gaxiola, Dra. Nohemi Castro del Campo y el Dr. Miguel Ángel Rodríguez quienes me orientaron estos años, por su amistad gracias.

A mi Mama Lucila Beltrán y mi familia quienes siempre estuvieron presentes apoyándome para seguir cumpliendo sueños y metas.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al colegio en Ciencias Agropecuarias y al CONACYT.

A todas aquellas personas que con su apoyo hicieron posible que este proyecto se llevara a cabo.

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Babesiosis	3
2.1.1. Manifestaciones clínicas	3
2.1.2. Pérdidas económicas	3
2.2. Generalidades de <i>Babesia</i> spp	4
2.3. Historia de <i>Babesia</i> spp	4
2.4. Morfología de <i>Babesia</i> spp.....	5
2.5. Clasificación taxonómica de <i>Babesia</i> spp.....	5
2.6. Análisis filogenético de <i>Babesia</i>	6
2.7. Secuencias descritas de <i>Babesia ovis</i> en Genbank.....	8
2.8. Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp	9
2.9. Distribución de <i>Babesia</i> spp.....	11
2.10. Vectores de transmisión de especies de <i>Babesia</i> spp	12
2.11. Diagnóstico.....	13
2.11.1. Diagnóstico directo	13
2.11.2. Diagnóstico indirecto.....	14
2.12. Hospederos domésticos de <i>Babesia</i> spp.....	14
2.13. Generalidades de ovinos y caprinos	14
2.14. Importancia de la actividad ovina y caprina.	15
2.15. Estadísticas de ovinos y caprinos	16
2.15.1. Mundial.....	16
2.15.2. México	16
2.15.3. Sinaloa	16
2.15.4. Culiacán	16
2.16. Enfermedades hemoparasitarias que afectan a ovinos y caprinos	16
2.17. Antecedentes directos	18

III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Tipo de estudio	22
5.2 Área de estudio	22
5.3 Universo de estudio.....	22
5.4 Tamaño de muestra	23
5.5 Toma de muestra	23
5.6 Almacenamiento y transporte de muestras.....	23
5.7 Detección morfológica de <i>Babesia</i> spp.....	23
5.8 Extracción de ADN de sangre de ovinos y caprinos.....	23
5.9 Electroforesis.....	24
5.10 PCR	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1 Identificación morfológica de <i>Babesia</i> spp.....	25
6.2 Identificación molecular de <i>Babesia</i>	26
VII. CONCLUSIONES	28
VIII. LITERATURA CITADA	29
IX. ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1.-	Secuencias de genes secuenciados descritas en Genbank.	9
2.-	Hospedero, especie de <i>Babesia</i> y su distribución geográfica (modificado de Schnittger <i>et al.</i> , 2012).	11
3.-	Vectores de transmisión, especies de <i>Babesia</i> spp y especies domésticas afectadas (modificado de Uilenberg, 2006).	12
4.-	Especies de <i>Babesia</i> que infectan a ovinos y caprinos en el mundo.	18
5.-	Resultados positivos a <i>Babesia</i> spp por microscopía óptica de muestras de sangre de ovinos en el laboratorio de parasitología la FMVZ de la UAS del año 2009 al año 2018.	19
6.-	Resultados positivos a <i>Babesia</i> spp por microscopía óptica de muestras de sangre de caprinos en el laboratorio de parasitología de la FMVZ de la UAS del año 2009 al año 2018.	19
7.-	Número de muestras por especie y sexo.	23
8.-	Resultados de la identificación morfológica de <i>Babesia</i> spp en ovinos y caprinos.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1.-	Manifestaciones clínicas de babesiosis en estado agudo en ovinos y caprinos.....	3
2.-	Análisis filogenético de especies de <i>Babesia</i> : Árbol de consenso de los 170,000 árboles muestreados por el análisis bayesiano de 603 secuencias de ARNr 18S de piroplasma, con <i>Cardiosporidium</i> como grupo externo (Schnittger <i>et al.</i> , 2012).....	6
3.-	Ciclo de vida de <i>Babesia</i> (modificada de Mosqueda, 2012).....	10
4.-	Georreferenciación de ovinos y caprinos muestreados.	22
5.-	Eritrocitos parasitados por <i>Babesia</i> spp de ovinos y caprinos, observadas al microscopio óptico a 100 x.....	26
6. -	Amplicón de <i>Babesia ovis</i> en caprinos carril 3. Marcador molecular de 100 pb situado en el carril 1.	27

RESUMEN

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia ovis* EN PEQUEÑOS RUMIANTES DEL ESTADO DE SINALOA”

Lucila Guillermina Beltrán Vega

La babesiosis es una de las enfermedades más comunes causada por parásitos hemoprotozoarios transmitidas por garrapatas en pequeños rumiantes y es una piroplasmosis zoonótica emergente. La enfermedad y su agente causal son de distribución en regiones de climas tropicales, subtropicales y climas templados, además ocasiona grandes pérdidas económicas en el mundo, sus infecciones pueden ser severas e incluso mortales. El objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente *Babesia ovis* en pequeños rumiantes en el Estado de Sinaloa, con un diseño de investigación transversal, observacional, y descriptivo. Se incluyeron en el estudio un total de 51 muestras (39 ovinos y 12 caprinos) de cuatro ranchos cooperantes, inicialmente se llevó a cabo la identificación morfológica por microscopía óptica y las extracciones de ADN de las muestras por fenol cloroformo y posteriormente se realizó las PCR con los oligonucleótidos de *Babesia ovis* del gen 18S-rRNA forward (5'-TGG GCA GGA CCT TGG TTC TTC T-3') y reverse (5'-CCG CGT AGC GCC GGC TAA ATA-3'). Finalmente, el parásito de *Babesia* spp se observó en el 37% (19/51) muestras, correspondiendo 33% (13/39) ovinos y 50% (6/12) caprinos, una de las muestras de caprinos amplificó a 549 pb. Los resultados mostrados nos indican la presencia de *Babesia ovis* en pequeños rumiantes del Estado de Sinaloa, este estudio es el primer reporte sobre la identificación molecular de este hemoparásito.

Palabras clave: *Babesia ovis*, PCR, Pequeños rumiantes

ABSTRACT

“MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Babesia ovis* IN SMALL RUMINANTS OF THE STATE OF SINALOA”

Lucila Guillermina Beltrán Vega

Babesiosis is one of the most common diseases caused by tick-borne hemoprotozoal parasites in small ruminants and is an emerging zoonotic pyroplamosmosis. The disease and its causative agent are distributed in regions of tropical, subtropical and temperate climates. In addition it causes great economic losses in the world, its infections can be severe and even fatal. The objective of this study Molecular identification of *Babesia ovis* in small ruminants of the State of Sinaloa, with a cross-sectional, observational, and descriptive research design. A total of 51 samples (39 sheep and 12 goats) from four cooperating ranches were included in the study, initially the morphological identification was carried out by optical microscopy and the DNA extractions of the samples by phenol chloroform and then the PCR was performed with the *Babesia ovis* oligonucleotides of the 18S-rRNA forward (5'-TGG GCA GGA CCT TGG TTC TTC T-3') and reverse (5'-CCG CGT AGC GCC GGC TAA ATA-3') gene. Finally, the *Babesia* spp parasite was observed in 37% (19/51) samples, corresponding 33% (13/39) sheep and 50% (6/12) goats, one of the goat samples amplified to 549 bp. The results shown indicate the presence of *Babesia ovis* in small ruminants of the State of Sinaloa, this study is the first report on the molecular identification of these hemoparasites.

Keywords: *Babesia ovis*, PCR, small ruminants.

I. INTRODUCCIÓN

Los ovinos y caprinos son mamíferos rumiantes de importancia económica a través de productos como la carne, leche, lana y piel, fuente de trabajo para familias campesinas en México, otros de sus beneficios zootécnicos son la mejora de los pastos, control de malezas, fertilidad, prolificidad, se adaptan a condiciones geográficas y climáticas adversas (Quittet y Delahaye, 1990). En México, hay registrados alrededor de 8, 902,451 mill cabezas de ovinos y 8, 725,172 mill cabezas de caprinos (SIAP, 2018), la producción de carne de canal fue de 61,606 y 39,777 ton para ovinos y caprinos respectivamente, para el Estado de Sinaloa la producción fue de 8,072 ton de ovinos y 7,151 ton de caprinos., se registraron 186 mil cabezas de ovinos y 165 mil cabezas de caprinos (SIAP, 2018). No obstante con el incremento de la producción los animales suelen ser susceptibles a enfermedades ocasionadas por parásitos, ectoparásitos y hemoparásitos, dentro de estos últimos tenemos *Babesia* spp protozoarios del grupo de *Apicomplexa* de la familia *piroplasmida* que causan babesiosis, enfermedad cuyo vector de transmisión es la garrapata y su distribución es en regiones tropicales, subtropicales y países con clima templado (Bai *et al.*, 2002). La elevada morbilidad y alta mortalidad de la babesiosis originan elevadas pérdidas económicas en la industria ganadera en el mundo de 48 mil millones de dólares al año y en México se pierden alrededor de 3, 587 mill de pesos al año (Meléndez, 1998). Es así como las infecciones por *Babesia* se reportan en distintos países como causantes de un gran impacto económico y de salud en los pequeños rumiantes (Friedhoff, 1997) y están ganando interés creciente como causa de zoonosis emergentes (Penzhorn, 2006). Se han identificado diversas especies de *Babesia* en el mundo infectando a pequeños rumiantes. En estudios realizados en el Noroeste de Irán por Esmailnejad *et al.* (2015) observaron por microscopía óptica *Babesia* spp en 10% (42 /402) muestras de ovinos y caprinos y el 16.7% (67/402) amplificaron al gen de *Babesia ovis* por PCR-RFLP, en el mismo lugar Bazmani *et al.* (2018) detectaron mediante PCR un 11.44% (19/166) positivas a *Babesia* spp y la PCR semi-anidada mostró el 22.89% (38/166) positivas a *Babesia ovis* en ovinos y caprinos. En el Oeste de Irán Naderi *et al.* (2017) al examen microscópico

identificaron *Babesia* spp en 12.22% (47/384) en sangre de ovinos y por PCR *Babesia ovis* en caprinos en el 4.7 % (18/384) de las muestras. En Turquía Ozubek y Aktas (2017) identificaron por el método de PCR y RLB las especies de *Theileria ovis* (17%) *Babesia ovis* (3.5 %), *Babesia* sp. (2%) en caprinos. Estudios realizados en el Estado de Sinaloa por Gaxiola *et al.* (1996) reportaron la detección de formas similares a *Babesia* spp en ovinos y caprinos mediante diagnóstico morfológico, además Gaxiola *et al.* (2006) describieron la presencia de parásitos hemáticos en pequeños rumiantes donde comparten un cuadro clínico similar y vector de transmisión que produce el hemoparásito de *Babesia* spp. Por los antecedentes mencionados el objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente *Babesia ovis* en pequeños rumiantes en el Estado de Sinaloa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Babesiosis

Enfermedad hemoparásita protozoaria del género de *Babesia* altamente patógenos en bovinos, ovinos y caprinos es transmitida por garrapatas, se le conoce como "piroplasmosis", causa de gran impacto económico, veterinario y médico en el mundo, con distribución en regiones tropicales, subtropicales y países con clima templado (Schnitteger *et al.*, 2012).

2.1.1. Manifestaciones clínicas

Las infecciones por *Babesia* se desarrollan con diversos grados que se pueden asociar con la edad del huésped, el estado inmunológico, las infecciones concomitantes con otros patógenos y/o los factores genéticos. Las manifestaciones comunes de infecciones agudas de *Babesia* spp en diferentes huéspedes pueden incluir fiebre, anemia, hemoglobinuria entre otras como se muestra en la Figura 1, en estado crónico la infección puede ser asintomática (Sevinc *et al.*, 2007).

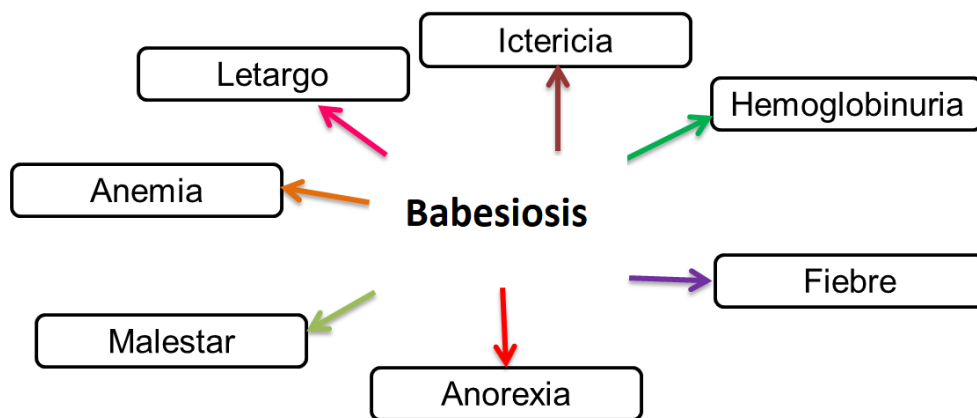


Figura 1. Manifestaciones clínicas de babesiosis en estado agudo en ovinos y caprinos.

2.1.2. Pérdidas económicas

Se desconocen las pérdidas económicas de esta enfermedad. Sin embargo, los costos de la babesiosis bovina están relacionados con abortos, la disminución de la producción de carne y leche, las medidas de control, así como las pérdidas de producción potencial y las restricciones al comercio de ganado. Un claro ejemplo

de la carga económica impuesta por esta enfermedad se puede ilustrar con la campaña de control radical de las garrapatas que se llevó a cabo en el sur de los Estados Unidos en 1906, durando cuatro décadas y con una inversión de millones de dólares, campaña que terminó con la erradicación de las garrapatas del ganado y, por lo tanto, sus parásitos transmitidos, que hicieron de la babesiosis bovina la primera enfermedad erradicada en los Estados Unidos. A partir de la declaración de libre de babesiosis bovina, el ahorro estimado para la industria ganadera es de al menos 3 mil millones de dólares por año. Sin embargo, el ganado en el mundo todavía están expuestos a la enfermedad e incluso en los Estados Unidos, ya que ocasionalmente se producen brotes y la vigilancia epidemiológica es una preocupación permanente (Bock *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 2007; Pérez de León *et al.*, 2010).

2.2. Generalidades de *Babesia* spp

Babesia spp son hemoparásitos protozoarios transmitidos por garrapatas considerados como los segundos parásitos más comúnmente encontrados en la sangre de los mamíferos después de los tripanosomas, en vertebrados se reproducen asexualmente dentro de los eritrocitos, y junto con *Theileria* spp. se les conoce como piroplasmas o piroplasmidos. La fase sexual del ciclo de vida de *Babesia* generalmente tiene lugar en las garrapatas Ixodidae, que adquieren y transmiten los parásitos cuando se alimentan de la sangre del hospedero (Gray y Weiss, 2008). Particularmente, se ha demostrado que la forma de transmisión y la existencia o ausencia de esquizontes son características fenotípicas valiosas para distinguir *Babesia* spp de *Theileria* spp (Uilenberg, 2006).

2.3. Historia de *Babesia* spp

El primero en describir microorganismos dentro de los eritrocitos bovinos de ganado rumano fue Víctor Babes (Babes, 1888), años más tarde observó un organismo similar en la sangre de las ovejas (Babes, 1892). Posteriormente Smith y Kilbourne 1893 en los Estados Unidos describieron que la causa de la fiebre del ganado de Texas se debía a la presencia de un parásito intraeritrocítico transmitido

por garrapatas, enfermedad que afectó a ganaderos en los estados del Sur descrito por primera vez al patógeno de vertebrados transmitido por artrópodos, así mismo Starcovici en 1893 llamó *Babesia bovis*, *Babesia ovis* y *Babesia bigemina* a los parásitos descritos por Babes, y Smith y Kilbourne (Mihalca, 2010). Piana y Galli-Valerio (1895) y Koch (1904) observaron *Babesia* parasitando la sangre de otros animales domésticos, como las que finalmente se conocen como *Babesia canis* en eritrocitos en perros y *Babesia caballi* en los eritrocitos de caballo. A partir de estos hallazgos, se han descrito más de 100 especies diferentes de *Babesia*, gracias a los avances en microscopía, biología celular y técnicas de biología molecular (Levine, 1971; Criado- Fornelio *et al.*, 2004; Uilenberg, 2006; Lack *et al.*, 2012).

2.4. Morfología de *Babesia* spp

Es un piroplasma pequeño miden de 1 a 1.5 micras de diámetro en los eritrocitos pueden tener forma de pera. Afecta los glóbulos rojos y contienen de 2- 4 merozoítos; dentro del eritrocito afectado toma forma de anillo. El Trofozoíto invade el eritrocito, pasa por una etapa anillada hasta cambiar a su forma Ameboide que por medio de fisión binaria longitudinal se forman los cuerpos piriformes llamados merozoítos, y por medio de una fisión binaria más pasan a ser cuerpos cruciformes (Friedhoff, 1997).

2.5. Clasificación taxonómica de *Babesia* spp

El género *Babesia*: pertenece al *phylum Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Piroplasmorina* y familia *Babesiidae* y actualmente existen más de 100 especies del género *Babesia* (Levine, 1971; Allsopp *et al.*, 1994). La especie de *Babesia* que infecta pequeños rumiantes más importante es *B. ovis*, que se ha informado de Europa, África, Asia y el Lejano Oriente. En el árbol filogenético basado en secuencias de 18 S rRNA, la relación más cercana de *B. ovis* (Turquía) parece ser *B. crassa* (93%). Además, *B. motasi* (Ameland) y *B. motasi* (Texel), ambos aislados de ovejas en islas en el norte de los Países Bajos, se segregan en el mismo grupo. *B. crassa* está representado por dos variantes

geográficas de Turquía e Irán, que parecen tener secuencias de genes 18 S rRNA muy similares (Schnittger *et al.* 2003).

2.6. Análisis filogenético de *Babesia*

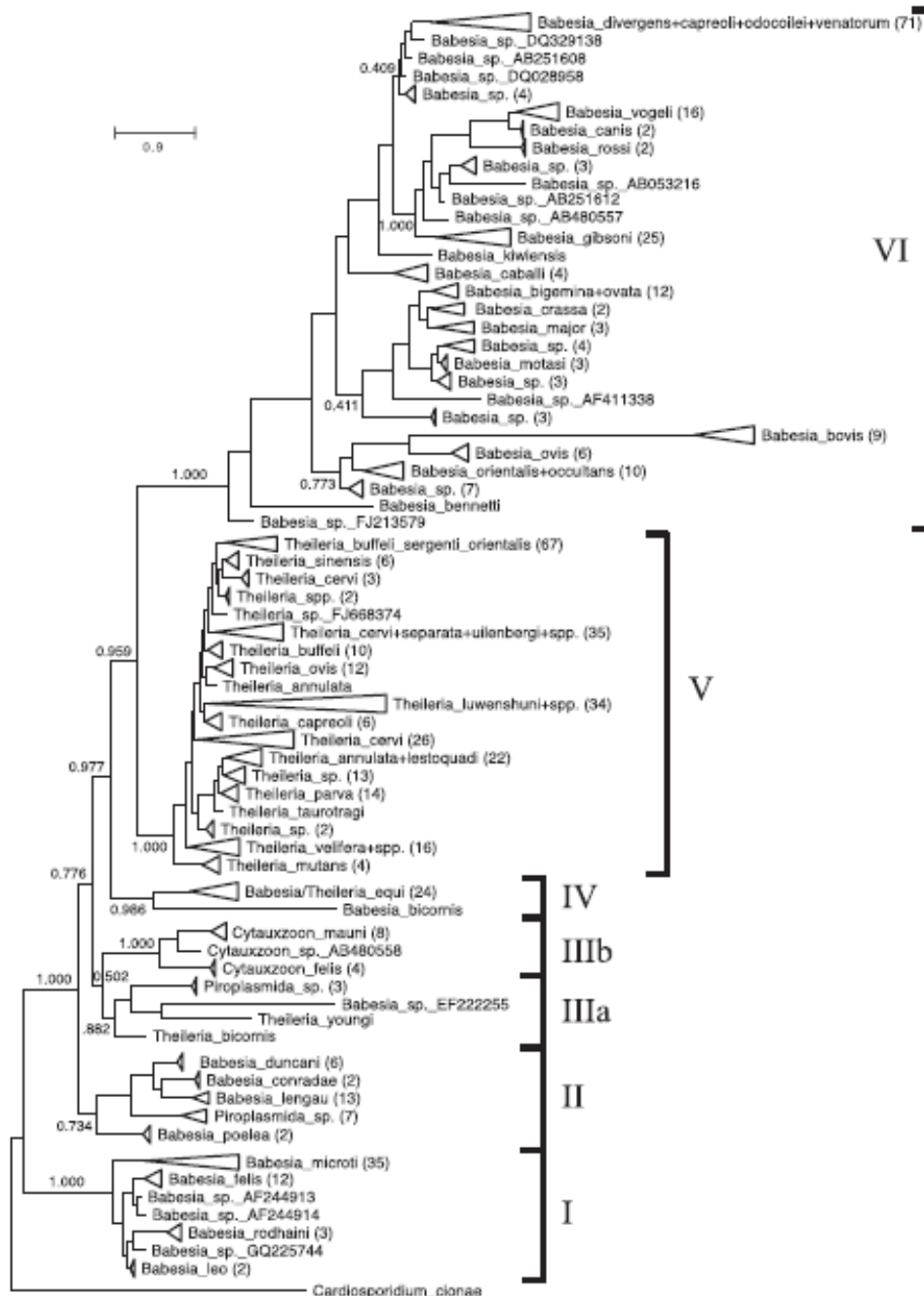


Figura 2. Análisis filogenético de especies de *Babesia*: Árbol de consenso de los 170,000 árboles muestreados por el análisis bayesiano de 603 secuencias de ARNr

18S de piroplasma, con *Cardiosporidium* como grupo externo (Schnittger *et al.*, 2012).

En total, se concluyeron seis linajes de piroplasmidas monofiléticos principales y se describen a continuación en el contexto de los resultados de otros estudios relevantes (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Allsopp y Allsopp, 2006; Lack *et al.*, 2012).

(i) Clado I: comprende *B. microti* y *B. rodhaini* que infectan a los roedores, y los parásitos *B. leo* y *B. felis* que infectan a los felinos. Se ha considerado que los roedores y los felinos son huéspedes evolutivos primordiales (Penzhorn *et al.*, 2001; Criado-Fornelio *et al.*, 2003).

(ii) Clado II: *Babesia* spp aislado de humanos, como la especie *B. duncani*, *Babesia* sp. aislada de ciervos mula y borrego cimarrón. Los aislados humanos se consideran infecciones accidentales, y los huéspedes vertebrados genuinos aún se desconocen (Kjemtrup *et al.*, 2006). Además, este clado contiene las especies caninas de *B. conradae*, que corresponde al antiguo aislado de *B. gibsoni* California, EE. UU., Y *B. lengau* aislado de guepardo en Sudáfrica, además de este último clado se han aislado todos en los estados occidentales de EE. UU., California y Washington, y por lo tanto, al clado a menudo se le conoce como el "clado occidental" (Bosman *et al.*, 2010).

(iii) Clado III: compuesto por un Clado IIIa comprendido por *Theileria youngi*, *Theileria bicornis* y *Babesia* sp. aislados de carpincho y el Clado IIIb integrado por *Cytauxzoon* spp. La evidencia de la presencia de esquizontes solo existe para *Cytauxzoon* spp. y no se pudo producir para *T. youngi* o *T. bicornis* (Kjemtrup *et al.*, 2006; Nijhof *et al.*, 2003; Reichard *et al.*, 2005).

(iv) Clado IV: contiene los piroplasmidos *B. bicornis* y *T. equi*. Según este resultado, *T. equi* no puede considerarse ni un *Theileria* s.s. (Clado V) ni una *Babesia* s.s. especie (Clado IV), pero representa con *B. bicornis* un grupo monofilético separado. Los esquizontes han sido identificados inequívocamente en

T. equi, y el reconocimiento del Clado IV subraya que los esquizontes no son un rasgo de carácter confinado a *Theileria* s.s. (Clado V), pero representan un rasgo más antiguo (Allsopp *et al.*, 1994).

(v) Clado V: incluye *T. annulata*, *T. parva*, *T. lestoquardi*, un complejo de *T. buffeli* no proliferativo de leucocitos y *T. ovis*. Los parásitos de *Theileria* de este grupo infectan exclusivamente a los ungulados. Por lo tanto, nuestra topología de árbol proporciona una fuerte evidencia de la reclasificación propuesta previamente de algunas especies de *Babesia* como *T. youngi*, *T. bicornis* (Clado IIIa), *C. felis* (Clado IIIb), *B. bicornis* y *T. equi* (Clado IV) (Allsopp *et al.*, 1994; Reichard *et al.*, 2005; Allsopp y Allsopp, 2006). Este clado también está bien respaldado por Lack *et al.* (2012).

(vi) Clado VI: grupo que incluye las especies de *B. gibsoni*, *B. canis*, *B. rossi* y *B. vogeli* que infectan a los caninos, así como las especies recientemente descritas de *Babesia* s.s. especies que infectan a otros carnívoros (oso, puma y mapache) y roedores de campo, por lo que puede denominarse como el "clado carnívoro / roedor". En el análisis de Criado-Fornelio *et al.* (2003), las especies caninas agrupadas con algunas especies infectando ungulados, como *B. divergens* y *B. odocoilei*, que constituyen el Clado 4. Se pensó que este último representaba un linaje más antiguo con respecto a otras especies de *Babesia* incluidas en otras ramas del Clado VI, como *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi* y *B. ovis* Criado-Fornelio *et al.* (2003).

2.7. Secuencias descritas de *Babesia ovis* en Genbank.

Análisis de las secuencias de genes registradas en la base de datos del Genbank de *Babesia ovis*, donde se reportan 126 secuencias de 14 genes descritos los cuales amplifican para este parásito, en el cuadro 1 se describen los genes, número de registro en Genbank y el número de pares de bases que contiene cada secuencia.

Cuadro 1. Secuencias de genes secuenciados descritas en Genbank.

<i>Babesia ovis</i>-GEN	NÚMERO	PB
18S ribosomal RNA gene	61	198-1698
small subunit ribosomal RNA	29	413-1683
18S small subunit ribosomal RNA gene	1	1672
rhoptry protein	7	173-4175
ATP-binding protein	2	400-599
Secreted antigen	2	1137-1156
12D3 antigen	1	599
heat shock protein 70	1	1930
alpha-tubulin	1	1548
CPC1-like protease 1	2	981-1209
rhoptry homologue	2	1491-1592
vignain-like protease	1	1350
C1A cysteine protease	2	1209-1347
ovipain-2 gene	1	1347
No-pertenecen a <i>Babesia ovis</i>	13	
TOTAL	126	

2.8. Ciclo de vida de *Babesia* spp

Babesia spp solo parasita los eritrocitos del hospedador vertebrado (Buscher *et al.*, 1988). En la figura 3 se muestra el ciclo generalizado de *Babesia* este se inyecta en el torrente sanguíneo de un huésped vertebrado con pequeñas cantidades de saliva, durante la mordedura y alimentación de sangre de una garrapata infectada. Después de invadir los eritrocitos, se diferencian en trofozoítos que se dividen asexualmente (merogonía) en dos o, a veces, cuatro merozoitos. Los merozoitos salen de los eritrocitos e invaden otros nuevos, continuando el ciclo replicativo en el huésped. Algunos merozoitos detienen la división y se transforman en gamontes o pregametocitos. La gametogonia y esporogonia tienen lugar en la garrapata. Cuando los pregametocitos son absorbidos por una garrapata que se alimenta de un huésped infectado, se diferencian en el intestino en gametos, que se fusionan

formando un cigoto diploide (gamogonía). Los cigotos experimentan meiosis dando lugar a kinetes haploides móviles, que se multiplican por esporogonia y acceden a la hemolinfa, invadiendo y continuando su replicación en varios órganos de garrapatas, incluidas las glándulas salivales. Aquí, tiene lugar un ciclo final de diferenciación y multiplicación, en el que los kinetes se transforman en esporozoitos que infectarán a un huésped vertebrado después de que la garrapata se haya mudado a la siguiente etapa, es decir, larvas a ninfa o ninfa a adulto (transmisión tranststadial). En algunas *Babesia* spp se produce la transmisión transovarial donde los kinetes también invaden los ovarios y los huevos de las garrapatas y se forman esporozoitos infecciosos en las glándulas salivales de las larvas de la próxima generación (Bock *et al.*, 2004).

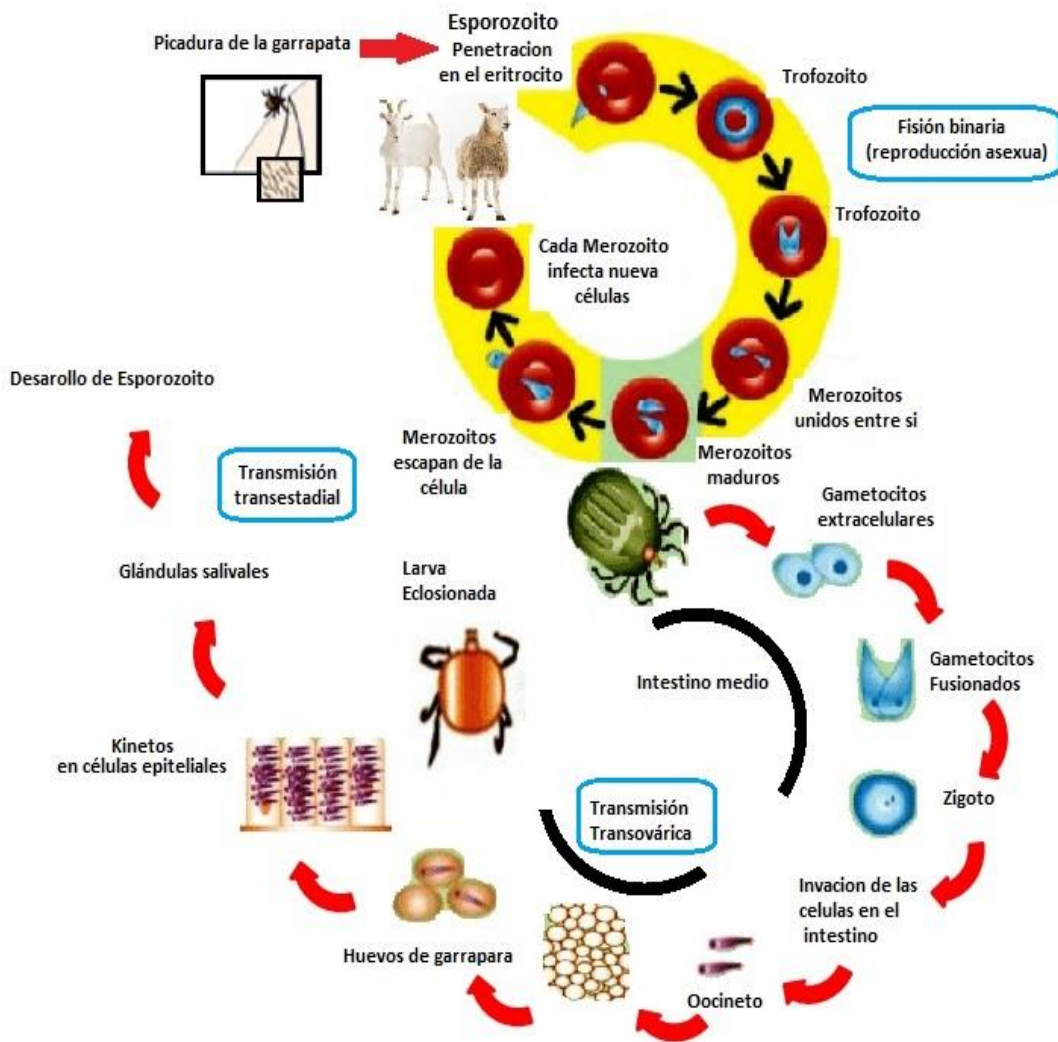


Figura 3. Ciclo de vida de *Babesia* (modificada de Mosqueda, 2012).

2.9. Distribución de *Babesia* spp

Se han identificado diferentes especies de parásitos de *Babesia* spp en distintos hospederos distribuyéndose en América, Asia, África, Europa, España Portugal, Sudafrica, China y Australia como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Hospedero, especie de *Babesia* y su distribución geográfica (modificado de Schnittger *et al.*, 2012).

Hospedero	Especie	Distribución
Bovinos	<i>B. bovis</i> ,	África, América, Asia, Australia, Europa
	<i>B. bigemina</i>	África, América, Asia, Australia, Europa
	<i>B. major</i>	Asia, Europa
	<i>B. occultans</i>	África
	<i>B. ovata</i>	Asia
	<i>B. divergens</i>	Europa
	<i>B. sp. Kashi</i>	China
Búfalo de agua	<i>B. orientalis</i>	Asia
	<i>B. bovis</i>	América, Asia
Caballo	<i>B. bigemina</i>	América, Asia
	<i>T. equi</i>	Europa, América
Caballo, burro, mula	<i>B. caballi</i>	África, América, Asia, Europa
Cerdo	<i>B. trautmanni</i>	África, Europa
Ovinos y Caprinos	<i>B. crassa</i>	Asia
	<i>B. ovis</i>	África, Asia, Europa
	<i>B. motasi</i>	África, Asia, Europa
Ovino	<i>B. sp. xinjiang</i>	China
Perro	<i>B. vogeli</i>	África, América, Asia, Australia, Europa
	<i>B. conradae</i>	América (USA)
	<i>B. gibsoni</i>	Asia, África, América, Europa
	<i>B. vitalii</i>	América (Brasil)
	<i>Babesia sp.</i>	América (USA)
	<i>B. rossi</i>	Sudáfrica
	<i>T. annae</i>	España Portugal
	<i>B. canis</i>	Europa
Felinos	<i>B. felis</i>	South África
	<i>B. presentii (canis)</i>	Asia (Israel)

2.10. Vectores de transmisión de especies de *Babesia* spp

Se han identificado los géneros de garrapatas que transmiten el hemoparásito de *Babesia* en los animales domésticos. En el cuadro 3 se muestran la detección de los géneros de los vectores, la especie de *Babesia* y los animales domésticos.

Cuadro 3. Vectores de transmisión, especies de *Babesia* spp y especies domésticas afectadas (modificado de Uilenberg, 2006).

Género del Vector	Especie de <i>Babesia</i>	Especie Doméstica
<i>Hyalomma</i>	<i>B. beliceri</i>	Bovino
<i>Boophilus, Rhipicephalus</i>	<i>B. bigemina</i>	Bovino, búfalo
<i>Boophilus, Rhipicephalus</i>	<i>B. bovis</i>	Bovino, búfalo
<i>Ixodes</i>	<i>B. divergens</i>	Bovino
<i>Ixodes??</i>	<i>B. jakimovi</i>	Bovino, reno
<i>Haemaphysalis</i>	<i>B. mayor</i>	Bovino
<i>Hyalomma</i>	<i>B. occultans</i>	Bovino
<i>Haemaphysalis</i>	<i>B. ovata</i>	Bovino
<i>Rhipicephalus</i>	<i>B. orientalis</i>	Búfalo
Unknown	<i>B. crassa</i>	Oveja, cabra
<i>Haemaphysalis</i>	<i>B. motasi</i>	Oveja, cabra
<i>Rhipicephalus</i>	<i>B. ovis</i>	Oveja, cabra
<i>Dermacentor, Hyalomma, Rhipicephalus</i>	<i>B. caballi</i>	Caballo, burro, mula
Unknown	<i>B. pernoncitoi</i>	Cerdo
<i>Rhipicephalus</i>	<i>B. trautmanni</i>	Cerdo
<i>Dermacentor</i>	<i>B. canis</i>	Perro, gato
<i>Haemaphysalis</i>	<i>B. rossi</i>	Perro
<i>Rhipicephalus</i>	<i>B. vogeli</i>	Perro
?	<i>Babesia sp</i>	Perro
<i>Haemaphysalis, Rhipicephalus</i>	<i>B. gibsoni and other small of dogs</i>	Perro
Unknown	<i>B. (canis) presentii</i>	Gato
Unknown	<i>B. felis</i>	Gato

En ovinos y caprinos se han identificado en las especies de *Babesia ovis*, *B. motasi* y *B. crassa* en el este y sureste Europeo, España, Portugal, Oriente próximo, Asia central, en los países mediterráneos y zonas subsaharianas, en Centroamérica mediante técnica morfológicas (México y Cuba) (Bai *et al.*, 2002; Habela *et al.*,

2003; Schnittger *et al.*, 2003), en Irán, *Babesia ovis* en mediante PCR, PCR-RBL (Ranjbar-Bahadori *et al.*, 2012; Esmailnejad *et al.*, 2015; Bazmani *et al.*, 2018) *Babesia* spp, *Babesia crassa*, *Babesia motasi* (Bilgic *et al.*, 2017), en Turquía *Babesia ovis*, *Theileria ovis* y *Babesia* spp (Ozubek y Aktas., 2017). En el Noroeste de Túnez se identificó por PCR la especie de *Babesia ovis* (Rjeibi *et al.*, 2014). En México se han realizado estudios de identificación de *Babesia* en bovinos identificando la presencia de *B. bigemina* y *B. bovis* endémicas de las regiones tropicales y sub tropicales, siendo ya ampliamente estudiadas (Rojas *et al.*, 2011; Mosqueda *et al.*, 2012), para las especies de *Babesia ovis*, *B. motasi* y *B. crassa* responsables de la babesiosis ovina, se han descrito en Centroamérica es decir México y Cuba mediante pruebas de PCR (Habela *et al.*, 2003).

Desde el año 1996, Gaxiola *et al.* (1996) reportaron formas similares al hemoparásito de *Babesia* presentes en frotis sanguíneo de ovinos y caprinos. En Culiacán en el Laboratorio de Parasitología de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa se realiza el diagnóstico de hemoparásitos como *Babesia* spp entre otros en ovinos y caprinos por frotis sanguíneo en tinción por Wright y Giemsa.

2.11. Diagnóstico

Para el diagnóstico de las infecciones de babesiosis y theileriosis se conocen dos métodos: directo e indirecto.

2.11.1. Diagnóstico directo

Detectar el agente causal de la infección o enfermedad en el animal por medio del reconocimiento e identificación de los estadios intraeritrocitarios del parásito y se basa en parte, en el tamaño, la morfología, y las características de tinción de Giemsa y Giemsa-Wright. Pero este método solo puede detectar el parásito en infecciones agudas y debido a su baja sensibilidad no es posible detectar parásitos en infecciones crónicas o subclínicas (Almeria *et al.*, 2001). Y dentro de las técnicas de detección molecular para *Babesia* existe la técnica de Reacción en

Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante el gen RNAr 18S (Sevinc *et al.*, 2018; Naderi *et al.*, 2017), PCR-semianidada (Baszmani *et al.*, 2018), la técnica Hibridación en Línea Reversa- RLBH (Bilgic *et al.*, 2017; M'ghirbi *et al.*, 2013), PCR-RFLP o polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Rjeibi *et al.*, 2014; Esmailnejad *et al.*, 2014)

2.11.2. Diagnóstico indirecto

Existe un grupo de técnicas de tipo indirecto que permiten la detección de anticuerpos específicos circulantes, para la identificación de bovinos portadores asintomáticos y reservorio. Estas últimas son serológicas y se aplican a grupos de animales. Todas estas pruebas poseen fundamento inmunológico. Las más comunes utilizadas en la actualidad son: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) tal como LabCorp test for *Babesia microti* Antibodies, IgG and IgM y Ensayo Inmunoenzimático (*Babesia* IgG ELISA) tal como InBios *Babesia* Detect™ IgG ELISA (Wright, 1990).

2.12. Hospederos domésticos de *Babesia* spp

Se han identificado distintos hospederos vertebrados del parásito de *Babesia* desde el año 1888 en bovinos, búfalos de agua, caballos, felinos, burros, mulas, cerdos, perros, ovinos y caprinos (Schnittger *et al.*, 2012).

2.13. Generalidades de ovinos y caprinos

Los ovinos y caprinos son mamíferos ungulados, con extremidades acabadas en pezuñas y dotados de un número par de dedos. Rumian la comida, carecen de incisivos superiores, tienen un estómago formado por cuatro cámaras. Algunos poseen cuernos no ramificados permanentes; los del macho suelen ser robustos, curvados en espiral; mientras que en la hembra son cortos y menos curvados. De cuerpo cilíndrico, fuerte, musculoso, cubierto de lana; la cabeza tiene forma de embudo; las orejas son pequeñas, triangulares, ligeramente alargadas; tienen patas cortas (FAO, 2016).

Poseen un labio superior bífido que les permite cortar la hierba casi al ras. Los labios, con los incisivos inferiores y el diastema de la mandíbula superior se combinan para retener la comida. Dada la ausencia de incisivos superiores, hojas y tallos han de ser cortados apretando los incisivos inferiores contra el diastema, por lo cual se exige siempre buena condición de las mandíbulas (Otero, 1997)

Apreciado por su carne y lana. El intestino se industrializa para fabricar catgut, hilo que es utilizado para suturar y ligar en cirugía porque lo absorbe el organismo; con las vísceras se preparan platillos regionales (Otero, 1997)

Los ovinos y caprinos se pueden clasificar de acuerdo con la finalidad de su explotación (Quittet, 1990):

- Producción de carne.
- Producción de lana.
- Producción de leche.
- De doble propósito.

Dentro de sus propósitos zootécnicos más importantes son:

- Fertilidad: capacidad y facilidad de un animal para producir crías.
- Prolificidad: capacidad de un animal para dar más de una cría por parto.
- Habilidad materna: capacidad de una madre para destetar más crías vivas.
- Rusticidad: habilidad que tiene un animal para adaptarse al medio que lo rodea (climáticas y geográficas) (Quittet, 1990).

2.14. Importancia de la actividad ovina y caprina.

Sinaloa produce el 30 % de la carne de ovino y caprino a nivel nacional según datos de INEGI (2017) lo que representa una fuente de alimento y de trabajo, datos de la FAO indican dentro de las tendencias en el contexto mundial que la producción de cordero se mantendrá estable en los próximos años, pero se prevé un aumento en el precio porque habrá más demanda, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Además de la importancia alimentaria los ovinos y caprinos tienen la capacidad de transformar forrajes de diferentes tipos, aún los de mala

calidad como la paja de cereales, residuos y subproductos de la huerta de lo contrario estos serían desperdiciados, tienen una gran capacidad de adaptación al clima (FAO, 2016).

2.15. Estadísticas de ovinos y caprinos

2.15.1. Mundial

Las estadísticas de animales vivos para el año 2016 según datos de la FAO estimaban en 16, 725 491 de ovinos y 5, 825, 581 de caprinos (FAO, 2018).

2.15.2. México

Dentro de la población ganadera en ovinos existían alrededor de 8, 902, 451 cabezas de ovinos y un total de 8, 725, 172 cabezas de caprinos en México (SIAP, 2017). Además se produjeron 2, 861 ton de carne de canal de ovinos y 1, 096 ton de carne de canal de caprinos, siendo el Estado de México el mayor productor en carne de canal de ovinos y Coahuila de Zaragoza en carne de canal de caprinos (INEGI. 2017).

2.15.3. Sinaloa

En Sinaloa se estima una población ganadera de 186,222 de cabezas de ovinos y 165, 471 cabezas de caprinos (SIAP, 2017). También, se produjeron 132 ton de carne de canal de caprinos y 111 ton de carne de canal de ovinos (INEGI. 2017).

2.15.4. Culiacán

En Culiacán en el año 2018 se estimaron alrededor de 28, 260 ovinos y 13, 750 caprinos entre vientres, crías, sementales, triponas y engorda (SINIIGA. 2018).

2.16. Enfermedades hemoparásitarias que afectan a ovinos y caprinos

Las enfermedades hemoparasitarias dificultan considerablemente el desarrollo de la ganadería en muchos países en desarrollo. La mayoría de estas enfermedades son causadas por especies de protozoarios y rickettsias transmitidas por diversos vectores (OIE, 2019). Las rickettsiosis de importancia económica son la anaplasmosis, la coudriosis y la ehrlichiosis. Estas enfermedades se encuentran en

36 de los 59 Países miembros de la OIE mencionados. La respuesta inmunitaria a estos organismos hace intervenir al sistema inmunitario humoral y celular. Los estudios realizados hasta el presente en relación con la coudriosis indican que la respuesta inmunitaria celular cumple una importante función (OIE, 2019).

Dentro de los protozoarios de importancia para los rumiantes se encuentran los tripanosomosis, la teilerosis y la babesiosis, de las cuales la primera es la más ampliamente difundida. Se han encontrado en 49 de los 59 Países Miembros de la OIE que respondieron al cuestionario que se les había enviado sobre las enfermedades hemoparasitarias dichos países están situados en América Latina, África, Oriente Medio, Europa meridional y Asia (OIE, 2019).

2.17. Antecedentes directos

Se han identificado especies de *Babesia* en distintas partes del mundo en los últimos años, mediante distintas técnicas moleculares como PCR (Sevinc *et al.*, 2018), PCR-anidado (Niu *et al.*, 2018), PCR-semi-anidada (Bazmani *et al.*, 2018), PCR-RBL (Bilgic *et al.*, 2017), PCR-RFLP (Rjeibi *et al.*, 2014) en ovinos y caprinos. En el cuadro 4 se muestran los estudios realizados de identificación de *Babesia* en ovinos y caprinos en distintos países desde el año 2014.

Cuadro 4. Especies de *Babesia* que infectan a ovinos y caprinos en el mundo.

Año	País	Autor	Especie identificada	Hospedero	Técnica
2018	Túnez	Sevinc <i>et al.</i>	<i>Babesia ovis</i> <i>Theileria ovis</i>	Ovinos	PCR
2018	Noroeste de Irán	Bazmani <i>et al.</i>	<i>Babesia</i> spp. <i>Babesia motasi</i>	Ovinos y caprinos	PCR Y PCR semi-anidada
2017	Irán	Naderi <i>et al.</i>	<i>Babesia</i> spp	Ovinos, Caprinos y Humanos	PCR
2017	Turquía	Bilgic <i>et al.</i>	<i>Babesia motasi</i> , <i>Babesia crassa</i> <i>Theileria separata</i>	Ovinos y caprinos	PCR y RBL
2017	Turquía	Ozubek Aktas y	<i>Babesia</i> nueva especie	Caprinos	PCR-RBL
2017	China	Niu <i>et al.</i>	<i>Babesia</i> sp. <i>xinjiang</i>	Ovinos y caprinos	PCR-anidada
2015	Irán	Esmailnejad <i>et al.</i>	<i>Babesia</i> spp <i>Babesia ovis</i>	Ovinos y caprinos	PCR-RFLP
2014	Africa	Rjeibi <i>et al.</i>	<i>Babesia ovis</i> <i>Theileria ovis</i>	Ovinos y caprinos	PCR- y RFLP
2014	Irán	Esmailnejad <i>et al.</i>	<i>Babesia ovis</i>	Ovinos y caprinos	PCR y RFLP

En el municipio de Culiacán, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia se realizan estudios de diagnóstico morfológico de hemoparásitos en distintas especies de animales, en el cuadro 5 se muestra la frecuencia positiva de *Babesia* en ovinos y en el cuadro 6 se muestran los frecuencia positiva de *Babesia* en caprinos del año 2009 al año 2018.

Cuadro 5. Resultados positivos a *Babesia* spp por microscopía óptica de muestras de sangre de ovinos en el laboratorio de parasitología la FMVZ de la UAS del año 2009 al año 2018.

Año	Frecuencia de <i>Babesia</i> spp
2009	16.39% (10/61)
2010	39.83% (49/123)
2011	21.21% (7/33)
2012	43.39% (45/106)
2013	33.33% (28/84)
2014	23.84% (31/130)
2015	24.58% (44/179)
2016	33.33% (55/165)
2017	36.00% (18/50)
2018	38.66% (29/75)
Total	31.14% (316/1006)

Cuadro 6. Resultados positivos a *Babesia* spp por microscopía óptica de muestras de sangre de caprinos en el laboratorio de parasitología de la FMVZ de la UAS del año 2009 al año 2018.

Año	Frecuencia de <i>Babesia</i> spp
2009	06.81% (3/44)
2010	25.64% (20/78)
2011	23.07% (9/39)
2012	60.00% (15/25)
2013	25.58% (11/43)
2014	18.75% (6/32)
2015	11.57% (11/95)
2016	20.96% (13/62)
2017	26.66% (16/60)
2018	29.41% (20/68)
Total	22.71% (124/546)

III. HIPÓTESIS

Babesia ovis está presente en pequeños rumiantes del Estado de Sinaloa.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar molecularmente *Babesia ovis* en pequeños rumiantes en el Estado de Sinaloa.

4.2 Objetivos específicos

- Detectar morfológicamente *Babesia* spp en pequeños rumiantes.
- Identificar molecularmente *Babesia ovis* en pequeños rumiantes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

El abordaje para este estudio es observacional, descriptivo, transversal y por conveniencia (Manterola *et al.*, 2014).

5.2 Área de estudio

En el mapa se muestran por coordenadas geográficas los sitios muestreados de ranchos cooperantes pertenecientes al estado de Sinaloa.



Figura 4. Georreferenciación de ovinos y caprinos muestreados.

5.3 Universo de estudio

En el presente estudio se extrajo sangre de ovinos y caprinos con y sin signos clínicos, desde los 6 meses hasta 4 años de edad, pertenecientes al Estado de Sinaloa en los meses de septiembre de 2018 a junio de 2019 de los 4 sitios cooperantes y su análisis se procesó en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México; geográficamente ubicada entre los paralelos 24° 02' y 25° 17' de latitud norte; los meridianos 106° 52' y 107° 50' de longitud oeste; altitud entre 0 y 1 800 m, temperatura media anual de 18°C - 26°C,

precipitación de 400-1200 mm, clima seco muy cálido y cálido (37.40%), semiseco muy cálido y cálido (31.96%), cálido subhúmedo con lluvias en verano (INEGI, 2017).

5.4 Tamaño de muestra

Se obtuvieron 51 muestras de sangre de pequeños rumiantes, 39 ovinos (29 hembras y 10 machos) y 12 caprinos (10 hembras y 2 machos) del municipio de Culiacán, del estado de Sinaloa, como se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Número de muestras por especie y sexo.

Especie	Número de muestras		Total
	Hembras	Machos	
Ovinos	29	10	39
Caprinos	10	2	12
Total	33	13	51

5.5 Toma de muestra

Las muestras sanguíneas se extrajeron de la vena yugular de ovinos y caprinos.

5.6 Almacenamiento y transporte de muestras

Las muestras sanguíneas se almacenaron en tubos con anticoagulante EDTA y se transportaron en contenedor frío, posteriormente se trasladaron al laboratorio de parasitología, se realizaron los frotis sanguíneos y se almacenaron a -20°C hasta la extracción de ADN.

5.7 Detección morfológica de *Babesia* spp

Después de la extracción se realizaron los frotis sanguíneos a cada muestra de sangre obtenida por la técnica de tinción de Wright y posteriormente se tiñeron con Giemsa (Razmi *et al.*, 2002).

5.8 Extracción de ADN de sangre de ovinos y caprinos

El ADN se extrajo por medio de la técnica fenol-cloroformo, utilizando 300 μl de sangre completa de ovino y caprino, se agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100

mM y EDTA 10mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubó a 37°C con calor seco y a 56°C a calor húmedo por una h respectivamente. Se agregó fenol (1:1), se centrifugó por dos min a 12,000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se añadió cloroformo (1:1), se centrifugó por dos min a 12,000 RPM se obtuvo el sobrenadante y se agregó etanol absoluto, se almacenó a -20°C. Pasadas 24 h se centrifugó por 15 min a 12,000 RPM y se decantó el sobrenadante. La pastilla obtenida se le agregó 50 µl de agua inyectable estéril (Green y Sambrook, 2012).

5.9 Electroforesis

Se preparó la mezcla para el gel de agarosa al 1% se realizó la mezcla de agarosa con TAE al 1x, a continuación se calentó la mezcla a 250 °C hasta quedar cristalina. Se agrega a la mezcla gel red, una vez gelificado el gel de agarosa se añadió el ADN obtenido mezclado con azul de bromofenol, finalmente se corrió el gel en la cámara de electroforesis horizontal a 100v, 240 mA. Pasados los 15 min visualizó el gel de agarosa en el transluminador con luz ultravioleta (Huang, 2010), con la finalidad de corroborar la integridad del ADN obtenido.

5.10 PCR

El material genético extraído formó parte de la mezcla de reacción para PCR a un volumen de la reacción total de 25 µl que contenía 12.5 de taq ADN polimerasa (promega), 50 nM µl de cada oligonucleotido, H₂O, 200 nM de MgCl₂ y 5 ng de ADN. Se llevó a cabo en un termociclador (BIORAD T100). Se utilizaron los oligonucleótidos de *Babesia ovis* 18S-rRNA: forward (5´-TGG GCA GGA CCT TGG TTC TTC T-3´) Y reverse (5´-CCG CGT AGC GCC GGC TAA ATA-3´) con un tamaño de 549 pb, las condiciones de los ciclos fueron 94° C durante 5 min seguidos de 40 ciclos de 94° C durante 30 seg, 60° C durante 30 seg, 72° C durante 1 min con una extensión final de 72° C durante 10 min (Aktas *et al.*, 2005). Los productos de PCR se revelaron en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red y se visualizaron en un transluminador con luz ultravioleta utilizando marcador molecular de tamaño de 100 pares de bases (Huang, 2010).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación morfológica de *Babesia* spp

La tinción por giemsa es una de las técnicas más comunes para diagnosticar babesiosis clínica en pequeños rumiantes (Razmi *et al.*, 2002). El examen microscópico de frotis de sangre mostró parasitemia en animales infectados, detectados dentro de los glóbulos rojos, clasificándose como *Babesia* spp. El parásito de *Babesia* spp se observó en el 37.25% de las muestras es decir 19/51 correspondiendo al 33.3% de ovinos 13/39 y 50 % de caprinos 6/12 como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Resultados de la identificación morfológica de *Babesia* spp en ovinos y caprinos.

Especie	Muestras	Positivas
Ovinos	39	13 (33%)
Caprinos	12	6 (50%)
Total	51	19 (37%)

Los resultados del presente estudio muestran que el porcentaje de cabras infectadas es mayor de acuerdo al número de ovejas, es decir el 50% de las cabras presentaban el parásito de *Babesia* en contraste con lo obtenido en el presente estudio Friedhoff (1997) quien difiere con el resultado ya que en su investigación las ovejas en el campo fueron más susceptibles a la enfermedad clínica causada por la infección de *Babesia* que las cabras, de acuerdo de mayor a menor frecuencia en los sitios muestreados, en el sitio 1 se observó el 50% (5/10) de ovinos positivos, en el sitio 2 el 40% (8/20) en ovinos positivos, así mismo en caprinos en el sitio 3 el 60% (6/10) de los caprinos fueron positivos. De los 3 sitios muestreados se encontró mayor incidencia en sitio 3 con el 60% de las muestras positivas al parásito en caprinos esta diferencia podría ser al número menor de caprinos muestreados ya que a menor cantidad de muestras es mayor el porcentaje como se observó en el estudio de Friedhoff (1997) y que probablemente esté relacionada con el efecto de las condiciones bioclimáticas en la distribución de los vectores de garrapatas duras (Zangana *et al.*, 2011). Para la identificación

morfológica del parásito dentro del eritrocito (figura 5) que puede ser de forma ameboidea o piriforme se utilizó la descripción por Kawai *et al.* (1986).

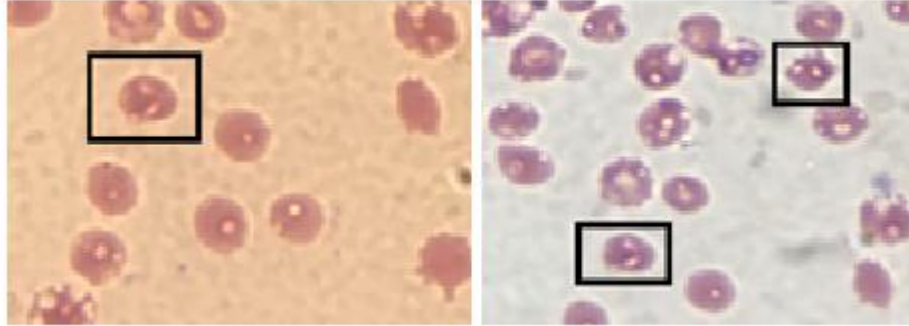


Figura 5. Eritrocitos parasitados por *Babesia* spp de ovinos y caprinos, observadas al microscopio óptico a 100 x.

6.2 Identificación molecular de *Babesia*

Las técnicas moleculares cuentan con las condiciones de especificidad y sensibilidad (Aktas *et al.*, 2005; Esmailnejad *et al.*, 2015). Con base a lo anterior se obtuvo la amplificación del gen de *Babesia ovis* de 549 pb aproximadamente (figura 6) en una de las muestras analizadas (1/51) de caprinos por PCR resultado que coincide con Esmailnejad *et al.* (2015), quienes identificaron *Babesia ovis* en 16 muestras ovinos y caprinos en el Oeste de Irán, en Túnez Sevinc *et al.*, (2018) encontraron que *B. ovis* fue el patógeno dominante sugiriendo que *Babesia ovis* es la especie de *Babesia* mas patógena para ovinos y caprinos, resultado que coincide con otro grupo de investigadores Rjeibi *et al.* (2014) en el cual la prevalencia de los hemoparásitos de *Babesia* fue mayor que otros hemoparásitos estudiados, en todos los estudios se usaron la misma secuencia de oligonucleótidos de 549 pb que en el presente estudio.

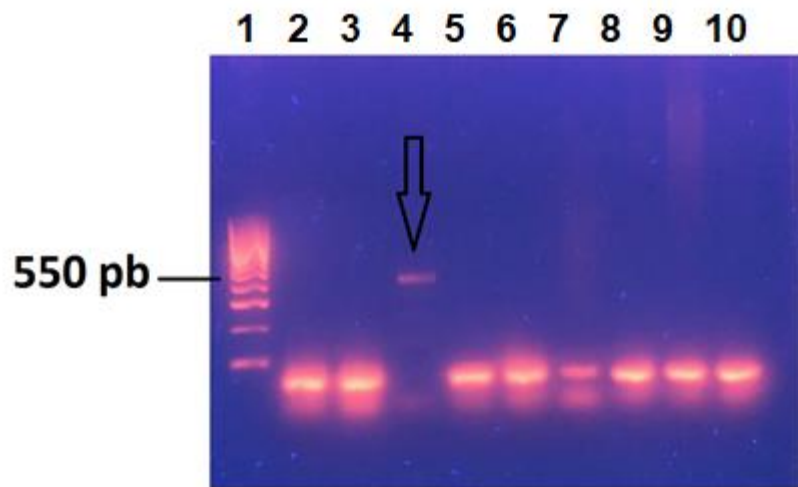


Figura 6. Amplicón de *Babesia ovis* en caprinos carril 3. Marcador molecular de 100 pb situado en el carril 1.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran la presencia morfológica de *Babesia* spp y la identificación molecular de *Babesia ovis* en pequeños rumiantes pertenecientes al Estado de Sinaloa. Este es el primer estudio de identificación molecular del hemoparásito de *Babesia ovis* en Sinaloa y en México.

VIII. LITERATURA CITADA

- Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Sparagano, & Estrada-Pena, A. 2001. First report of *Babesia bovis* in Spain. *Vet Rec.* 149(23): 716-717. DOI:10.1136/vr.149.23.716.
- Allsopp, M.T.E.P., Cavalier-Smith, T., de Wall, D.T., Allsopp, B.A. 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology.* 108: 147–152. DOI: 10.1017/S0031182000068232.
- Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2006. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1081, 509–517.
- Aktas, M., Altay K., Dumanli N. 2005. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Vet Parasitol.* 133: 277–281. DOI: 10.1111/tbed.12139.
- Babes V. 1888. Sur l'hémoglobulinurie bactérienne du boeuf. *C.R. Acad. Sci., Ser. III Sci. vie* 107: 692–694.
- Babes V. 1892. L'étiologie d'une enzootie des moutons, dénommée Carceag en Roumanie. (The etiology of an enzootic disease of sheep, called Carceag, in Romania) (in French). *C. R. Hebd. Acad. Sci.* 115: 359–361.
- Bai, Q., Liu, G., Liu, D., Ren, J., Li, X., 2002. Isolation and preliminary characterization of large *Babesia* sp. from sheep and goats in the eastern part of Gansu Province. *Chin. Parasitol. Res.* 13 (Suppl. 1), 16–21.
- Bazmani, A., Abolhooshyar, A., Imani-Baran, A., & Akbari, H. 2018. Semi-nested polymerase chain reaction-based detection of *Babesia* spp. in small ruminants from Northwest of Iran. *Vet World.* 11(3): 268-273. DOI:10.14202/vetworld.2018.268-273.
- Bilgic HB, Bakırcı S, Kose O, Unlu AH, Hacılarlıoğlu S, Eren H, Weir W, Karagenc T. 2017. Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. *Parasit Vectors.* 10(1):211. doi: 10.1186/s13071-017-2151-3.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129 Suppl, S247-269. DOI: 10.1017/S0031182004005190.

- Bosman, A.M., Oosthuizen, M.C., Peirce, M.A., Venter, E.H., Penzhorn, B.L., 2010. *Babesia lengau* sp. nov., a Novel *Babesia* Species in Cheetah (*Acinonyx jubatus*, Schreber, 1775) Populations in South Africa. J. Clin. Microbiol. 48 (Suppl. 8): 2703–2708.
- Buscher, G., Friedhoff, K. T., & el-Allawy, T. A. 1988. Quantitative description of the development of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* (hemolymph, ovary, eggs). Parasitol Res. 74(4), 331-339. DOI: 10.1007/BF00539454.
- Criado-Fornelio, A., González-del-Río, M.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C. 2004. The “expanding universe” of piroplasms. Vet. Parasitol. 119, 337–345.
- Esmailnejad, B., Tavassoli M., Asri-Rezaei S., Dalir-Naghadeh B., Mardani K., Jalilzadeh-Amin G., Golabi M. & Arjmand J. 2014. PCR-Based Detection of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* and Small Ruminants. J Parasitol Res. DOI: [10.1155/2014/294704](https://doi.org/10.1155/2014/294704).
- Esmailnejad, B., Tavassoli M., Asri-Rezaei S., Dalir-Naghadeh B., Mardani K., Golabi M., Arjmand J., Kazemnia A. & Jalilzadeh G. 2015. Determination of Prevalence and Risk Factors of Infection with *Babesia ovis* in Small Ruminants from West Azerbaijan Province, Iran by Polymerase Chain Reaction. J Arthropod Borne Dis. 9 (2): 246-52. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0345-2>.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A., 2006. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small *Babesia* identified in California. Vet. Parasitol. 138, 103–111.
- FAO 2016. Anuario estadístico de pesca y agricultura de la FAO. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2016_USBcard/index.htm.
- FAO 2018. Perspectivas Alimentarias. Anuario estadístico de la faofast. <http://www.fao.org/3/CA0910ES/ca0910es.pdf>
- Friedhoff K, T. 1997. Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. Parasitología 39: 39-109. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530692>

- Gaxiola, C. S. M, Borbolla I. J. E, Castro del C. N, Cárcamo A. N. M, Sosa G. C, Meza T. M, Barraza T. C, Rodríguez G. M. A. 2006. Frecuencia de presentación de *Anaplasma* spp en ovinos en pastoreo en el municipio de Culiacán, Sinaloa. XXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y X Reunión Bienal del Grupo Norte Mexicano de Nutrición Animal. 17, 18, 19 y 20 de octubre. Mazatlán, Sinaloa, México. P 387-388
- Gaxiola, C. S M, Quintero M. M. T, Borbolla I. J. E. 1996. Hemoparásitos en pequeñas especies. Memorias del curso, diagnóstico y control de enfermedades parasitarias de los animales domésticos, Culiacán, Sinaloa 10-13.
- Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Davey, R.B., George, J.E. 2007. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in south Texas. Vet. Parasitol. 145, 156–163. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.11.014
- Green, R. M., Sambrook J. 2012. Molecular cloning. Laboratory manual. 4ta. Edition. Cold spring Harbor, New York. P 2028 p. ISBN 9781936113422.
- Gray, J.S., Weiss, L.M., 2008. *Babesia microti*. In: Khan, N. (Ed.), Emerging Protozoan Pathogens. Taylor and Francis, Abingdon, UK, pp. 303–349.
- Habela, M., Gragera-Slikker A, Moreno A, Fruto J. 2003. Piroplasmosis en pequeños rumiantes [Internet]. Universidad de Extremadura. 11-25. <http://www.exopol.com/seoc/docs/tt736kj8.pdf>.
- Huang, Q., Baum L, Fu WL, 2010. Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarosa Gel Electrophoresis. Clin Lab 56: 149 – 152. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476647>
- INEGI. 2017. Anuario estadístico y geográfico de Sinaloa 2017 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía.-- México: INEGI, c2017. p 475. ISBN 978-607-739-976-6.
- INEGI. 2017. El ganado ovino en México. Censo Agropecuario 2017. <https://www.inegi.org.mx/programas/amca/2016/default.html> (consultado el día 03 de marzo de 2019).

- Kawai, S, Takahashi K, Sonoda M, & Kurosawa T. 1986. Ultrastructure of intra-erythrocytic stages of *Babesia ovata*. Nihon Juigaku Zasshi. 48: 943-949. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.001>
- Koch, R. 1904. Rhodesian investigations. Cape Agricultural Journal. 24, 33–45.
- Lack, J.B., Reichard, M.V., van den Bussche, R.A. 2012. Phylogeny and evolution of the piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. Int. J. Parasitol. 42: 353– 363. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>
- Levine, N.D. 1971. Taxonomy of piroplasms. Trans. Am. Microscop. Soc. 90: 2–33. DOI: 10.2307/3224894
- Manterola C., Otzen T. 2014. Estudios Observacionales. Los Diseños Utilizados con Mayor Frecuencia en Investigación Clínica. Int. J. Morphol. 32(2):634-645.
- Meléndez, R. 1998. Revisión integral de los factores epidemiológicos que inciden en la relación *Boophilus microplus* – bovino – *Babesia* spp. Rev. Científ. FCV-LUZ. VIII (1): 25 – 34.
- Mihalca, A.D. 2010. The quest for piroplasms: from Babes to Smith to molecules. Sci. Parasitol. 11, 14–19.
- M'ghirbi, Y., Ros-Garcia A., Iribar P., Rhaim A., Hurtado A., Bouattour A. 2013. A molecular study of tick-borne haemoprotozoan parasites (*Theileria* and *Babesia*) in small ruminants in Northern Tunisia. Vet Parasitol. 198: 72-7. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.08.005.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & Canto, G. J. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. Curr Med Chem. 19(10):1504-1518. DOI:10.2174/092986712799828355
- Naderi, A., Nayebzadeh H. & Gholami S. 2017. Detection of *Babesia* infection among human, goats and sheep using microscopic and molecular methods in the city of Kuhdasht in Lorestan Province, West of Iran. J Parasit Dis. 41: 837-842. DOI: 10.1007/s12639-017-0899-1.
- Niu, Q., Liu Z., Yang J., Gao S., Pan Y., Guan G., Luo J., Yin H. 2017. Genetic characterization and molecular survey of *Babesia* sp. *Xinjiang* infection in

- small ruminants and *Ixodid* ticks in China. *Infect Genet Evol.* 49: 330-335. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.01.025.
- Nijhof, A.N., Penzhorn, B.L., Lynen, G., Mollel, J.O., Morkel, P., Bekker, C.P.J., Jongejan, F. 2003. *Babesia bicornis* sp. nov. and *Theileria bicornis* sp. nov.: tick-borne parasites associated with mortality in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *J. Clin. Microbiol.* 41 (Suppl. 5), 2249–2254.
- OIE. 2019. Sanidad animal en el mundo, lista de enfermedades. <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>
- Otero, E.S. 1977. Ovinos y Caprinos. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba. 104pp.
- Ozubek, S., Aktas M. 2017. Molecular evidence of a new *Babesia* sp. in goats. *Vet Parasitol.* 233: 1-8. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.11.016.
- Penzhorn, B.L., Kjemtrup, A.M., López-Rebollar, L.M., Conrad, P.A., 2001. *Babesia leo* N. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other Small piroplasms. *J. Parasitol.* 87 (Suppl. 3), 681–685.
- Penzhorn, B. L. 2006. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Vet Parasitol.* 138: 11-21. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.036.
- Pérez de Leon, A.A., Strickman, D.A., Knowles, D.P., Fish, D., Thacker, E., de la Fuente, J. 2010. One-Health approach to identify research needs in bovine and human babesioses: workshop report. *Parasite Vectors* 3, 36.
- Quittet, E. y J. Delahaye. 1990. La cabra: guía práctica para el ganadero. Mundi-Prensa, p 318. ISBN: 8471140691, 9788471140692.
- Ranjbar-Bahadori S., Eckert B., Omidian Z., Shirazi N. S. & Shayan P. 2012. *Babesia ovis* as the main causative agent of sheep babesiosis in Iran. *Parasitol Res.* 110: 1531-6. DOI: 10.1007/s00436-011-2658-z
- Razmi, G. R, Naghibi A, Aslani M, Fathivand M. and Dastjerdi K. 2002. An epidemiological study on ovine babesiosis in the Mashhad suburb area, province of Khorasan, Iran. *Vet. Parasitol.* 108: 109-115.
- Reichard, M.V., Van Den Bussche, R.A., Meinkoth, J.H., Hoover, J.P., Kocan, A.A., 2005. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cat caught in Mongolia and

comments on the systematic and taxonomy of piroplasmids. *J. Parasitol.* 91, 420–426.

- Rjeibi, M. R., Gharbi, M., Mhadhbi, M., Mabrouk, W., Ayari, B., Nasfi, I., Darghouth, M. A. 2014. Prevalence of piroplasms in small ruminants in North-West Tunisia and the first genetic characterisation of *Babesia ovis* in Africa. *Parasite*, 21, 23. DOI:10.1051/parasite/2014025
- Rojas R. E., Mosqueda G. J., Álvarez M. J., Hernández O. R., Ramos A.J., Rojas M. C., Cantó A. G., Vega y Murguía. C., & Figueroa M. J. 2011. Transmissibility of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* attenuated strains by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus ticks *Revista Mexicana de ciencias pecuarias*, 2(3), 267-281.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor – joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406 – 425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sevinc, F., Turgut, K., Sevinc, M., Ekici, O.D., Coskun, A., Koc, Y, Erol M, Ica, A. 2007. Therapeutic and prophylactic efficacy of imidocarb dipropionate on experimental *Babesia ovis* infection of lambs. *Vet Parasitol.* 149: 65–71.
- Sevinc, F., Zhou, M., Cao, S., Ceylan, O., Aydin, M. F., Sevinc, M., & Xuan, X. 2018. Haemoparasitic agents associated with ovine babesiosis: A possible negative interaction between *Babesia ovis* and *Theileria ovis*. *Vet Parasitol*, 252, 143-147. DOI:10.1016/j.vetpar.2018.02.01
- SIAP. 2017. Estadísticas de Población ganadera: ovino y caprino. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP).
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/412568/Ovino_2017.pdf
- SIAP. 2018. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP).Atlas agroalimentario 2012-2018. Primera edición 2018.
- SINIIGA. 2018. Estadísticas de ovinos y caprinos en Sinaloa.
<https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>.
- Schnittger L., Yin H., Gubbels M.J., Beyer D., Niemann S., Jongejan F., Ahmed J.S. 2003. Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. *Parasitol Res.* 91(5):398-406. DOI: 10.1007/s00436-003-0979-2

- Schnittger, L., Rodríguez, A.E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D.A. 2012. *Babesia*: a world emerging. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 12 (8) 1788-809. DOI: [10.1016/j.meegid.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004)
- Smith, T., Kilbourne, E.L. 1893. Investigation into the nature causation and prevention of southern cattle fever. US Dept. Agri. Bur. Anim. Ind. Bull. 1, 1–311.
- Starcovici, C. 1893. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), des Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). Zbl. Bakt. I. Abt. 14, 1–8.
- Uilenberg, G. 2006. *Babesia*--a historical overview. Vet Parasitol, 138(1-2): 3-10. DOI:[10.1016/j.vetpar.2006.01.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035)
- Wright, I. G. 1990 Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot., 9: 345-356.
- Zangana, I. K., Naqid, I. A., 2011. Prevalence of Piroplasmosis (Theileriosis and Babesiosis) among goats in Duhok Governorate College of Veteri-nary Medicine/University of Duhok Al-Anbar. J. Vet. Sci. 4,50–57.

IX. ANEXOS

Materiales

Material para la toma de muestra:

- 51 tubos con anticoagulante EDTA.
- 51 vacutainers
- Guantes de latex.
- Hielera

Material de laboratorio:

- Portaobjetos
- Palillos
- Tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Refrigerador de -20°C.
- Centrifuga
- Termociclador
- Gradilla
- Puntillas
- Tinción de Giemsa
- Tinción de Writh
- Micropipetas: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl.
- Agua destilada
- Tris Base
- EDTA
- TAE: tris 100 mM y EDTA 10mM)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS)
- Vaso de precipitado de 500 ml y 1000 ml.
- Vórtex mexer
- Buffer 10X MgCl₂,
- dNTPs
- H₂O inyectable estéril
- Taq Polimerasa

- oligonucleótidos (*Babesia* spp y *Babesia ovis*)
- DNA (ovinos y caprinos)
- Marcador molecular