



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
EIMERIA SPP. EN OVINOS DE LA REGIÓN SUR-ORIENTE DEL
ESTADO DE MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

M.V.Z. GERARDO TREJO HUITRÓN

COMITÉ DE TUTORES

Dra. LINDA GUILIANA BAUTISTA GÓMEZ

Dr. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA

Dr. CAMILO ROMERO NÚÑEZ

AMECAMECA DE JUÁREZ, ESTADO DE MÉXICO. JUNIO DE 2018.

Dedicatorias

Es mi deseo como sencillo gesto de agradecimiento, dedicarle mi Trabajo de Grado plasmado en la presente Tesis a toda mi familia, en especial a mi amada Madre, que es la persona más amorosa y comprensiva que conozco, a mi hermana Jaqueline, por su ejemplo y consistencia, las cuales han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme la confianza y consejos, oportunidad y recursos para lograrlo, del mismo modo, a mis amigos, roomates y hermanos putativos Manolo y Lucero por estar siempre apoyándome y motivando a seguir en el camino, por esas incontables desveladas de trabajo poniendo a prueba nuestra paciencia e hígado.

A todos ustedes Gracias, Muchas Gracias.

Resumen

Dentro de las granjas de producción pecuaria, las enfermedades entéricas tienen un papel importante debido al impacto que ejercen sobre los factores productivos y económicos. En la producción ovina, las enteropatías son generalmente causadas por agentes parasitarios, entre los que se encuentran *Trichuris* spp., *Nematodirus* spp., *Trichostrongylidae* y *Eimeria* spp., siendo este último el más importante a nivel mundial. La coccidiosis causada por *Eimeria* spp. es una enfermedad de alta morbilidad, en ovinos, se han identificado once especies de *Eimeria*, siendo la microscopía la técnica de elección para la detección de ooquistes, sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitantes que dificultan la identificación precisa de las diferentes especies de *Eimeria*. El objetivo del presente estudio fue identificar morfológicamente las once especies de *Eimeria* que infectan al ganado ovino en la región suroriente del Estado de México, así como obtener la secuencia parcial de la región ITS-1 del ARN ribosomal (ARNr) de cada especie e identificar la diversidad genética que presentan. Se recolectaron 40 muestras fecales procedentes de diversas producciones ovinas ubicadas en la región de estudio, a partir de las cuales se aislaron las once especies de *Eimeria* reportadas en ovinos, las cuales fueron cultivadas in vivo, utilizando once ovinos criollos libres de eimeriosis, a partir del día 26 post-inoculación, los ooquistes de cada una de las once especies fueron recuperados, y caracterizados por microscopía, 100 de cada uno de ellos, fueron procesados para el análisis molecular, un fragmento de ~500pb de la región ITS1, fue amplificado, clonado y secuenciado para cada una de las once especies de *Eimeria*. Las secuencias de las once especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos en México fueron depositadas en el GenBank. El análisis filogenético demostró que las especies reportadas en este estudio se asocian con las reportadas en mamíferos y se separan del grupo de las aves, visualizando el origen monofilético del grupo, es importante señalar que las *Eimerias* de ovinos se dividen en dos clados, los cuales, se sugiere, pueden estar asociados a la presencia o ausencia del cuerpo residual. En cuanto a las características morfométricas, el análisis de conglomerados por el método de Ward, con una distancia euclidiana cuadrada de 100, pudo diferenciar seis clusters de los cuales únicamente el cluster VI contenía

a las muestras correspondientes a *E. intricata*, mientras que las muestras de las diez *Eimerias* restantes se agrupaban indistintamente en los clusters del I-V, conteniendo en promedio seis especies diferentes de *Eimeria* por cluster. En conclusión la identificación específica de las distintas especies de *Eimeria* en ovinos no se puede realizar únicamente con la utilización de técnicas convencionales como la microscopia, debido a la inespecificidad que presenta cada ooquiste de *Eimeria* al evaluar sus características morfométricas, por lo que se propone que la utilización de técnicas moleculares puede ser empleada eficazmente para el diagnóstico específico de cada especie de *Eimeria*, además se puede obtener información acerca de la epidemiología de la infección coccidial. Los resultados obtenidos en este estudio constituyen el primer reporte del aislamiento y cultivo de las once especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos, de la misma manera, por primera vez, se reporta la región ITS-1 de cada una de las especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos a nivel mundial.

Abstract

Within livestock production farms, enteric diseases play an important role due to the impact they exert on productive and economic factors. In sheep production, enteropathies are usually caused by parasitic agents, among which are *Trichuris* spp., *Nematodirus* spp., *Trichostrongylidae* and *Eimeria* spp., The latter being the most important worldwide. Coccidiosis caused by *Eimeria* spp. is a disease of high morbidity, in sheep, eleven species of *Eimeria* have been identified, being microscopy the technique of choice for the detection of oocysts, however, this technique has certain limitations that make difficult the precise identification of the different species of *Eimeria*. The objective of the present study was to identify morphologically the eleven species of *Eimeria* that infect sheep in the southeastern region of the State of Mexico, as well as obtain the partial sequence of the ITS-1 region of the ribosomal RNA (rRNA) of each species and identify the genetic diversity they present. Forty fecal samples were collected from various sheep production located in the study region, from which the eleven *Eimeria* species reported in sheep were isolated, which were cultured *in vivo*, using eleven ovine creoles free of eimeriosis, from day 26 post-inoculation, the oocysts of each of the eleven species were recovered, and characterized by microscopy, 100 of each of them, were processed for molecular analysis, a fragment of ~500 bp of the ITS-1 region, was amplified, cloned and sequenced for each of the eleven species of *Eimeria*. The sequences of the eleven species of *Eimeria* that infect the sheep in Mexico were deposited in the GenBank. The phylogenetic analysis showed that the species reported in this study are associated with those reported in mammals and are separated from the group of birds, visualizing the monophyletic origin of the group, it is important to note that the sheep *Eimeria* are divided into two clades, which, it is suggested, may be associated with the presence or absence of the residual body. Regarding the morphometric characteristics, the cluster analysis by the Ward method, with a square Euclidean distance of 100, could differentiate six clusters of which only cluster VI contained the samples corresponding to *E. intricata*, while the samples of the ten remaining *Eimeria* were grouped indistinctly in the clusters of the IV, containing on average six different species of *Eimeria* per cluster. In conclusion,

the specific identification of the different species of *Eimeria* in sheep can't be done only with the use of conventional techniques such as microscopy, due to the non-specificity of each *Eimeria* oocyst when evaluating its morphometric characteristics, so it is proposed that the use of molecular techniques can be used effectively for the specific diagnosis of each *Eimeria* species, and information about the epidemiology of coccidial infection can also be obtained. The results obtained in this study constitute the first report of the isolation and culture of the eleven species of *Eimeria* that infect the sheep, in the same way, for the first time, the ITS-1 region of each of the *Eimeria* species is reported. that infect sheep worldwide.

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez, directora de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A mis tutores adjuntos, el Dr. Camilo Romero Núñez y el Dr. José Simón Martínez Castañeda, por sus comentarios, enseñanzas y consejos, así como por todo el apoyo que me brindaron a través de toda mi investigación.

Al Biólogo Lauro Trejo del Laboratorio del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria, por brindarme su valioso e importante aportación en el desarrollo de la metodología de la investigación.

A mis compañeros de posgrado Emmanuel, Lucero y Gabriela, por su amistad y consejos, los cuales fueron parte fundamental para amenizar la redacción de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me fue otorgada para hacer posible la realización y satisfactoria conclusión de mis estudios de Maestría.

Índice

Dedicatorias	I
Resumen.....	II
Abstract	IV
Agradecimientos.....	VI
Índice.....	VII
Índice de figuras	X
Índice de cuadros	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1. Ovinocultura	2
2.2. Panorama mundial de la ovinocultura.....	2
2.3. Panorama nacional de la ovinocultura.....	3
2.4. La ovinocultura en el Estado de México	4
2.5. Enteritis.....	4
2.6. Generalidades de protozoarios.....	5
2.6.1. Phylum apicomplexa.....	5
2.6.2. Familia Eimeriidae	6
2.6.3. Género <i>Eimeria</i>	6
2.7. Morfología de <i>Eimeria</i> spp.....	6
2.8. Ciclo Biológico	7
2.8.1. Fase exógena.....	8
2.8.2. Fase endógena.....	8
2.9. Coccidiosis en ovinos	11

2.10.	Prevalencia.....	12
2.11.	Diagnóstico.....	14
2.11.1.	Diagnóstico morfológico.....	15
2.11.2.	Diagnóstico molecular.....	16
2.11.2.1.	Regiones utilizadas en la filogenia del género <i>Eimeria</i>	17
2.12.	Estudios previos en México.....	18
3.	Planteamiento del problema.....	20
4.	Justificación.....	21
5.	Hipótesis.....	22
6.	Objetivos.....	23
6.1.	Objetivo general.....	23
6.2.	Objetivos específicos.....	23
7.	Material y método.....	24
7.1.	Diseño de estudio.....	24
7.2.	Metodología.....	25
7.2.1.	Toma de muestra.....	25
7.2.2.	Aislamiento de Ooquistes de <i>Eimeria</i> spp.....	25
7.2.3.	Cultivo <i>in vivo</i> de <i>Eimeria</i> spp.....	26
7.2.4.	Análisis estadístico de los datos morfométricos.....	27
7.2.5.	Identificación molecular.....	27
7.2.6.	Clonación y secuenciación de región ITS-1.....	28
7.2.7.	Análisis de secuencia.....	28
7.2.8.	Análisis filogenético de la secuencia ITS-1.....	28
8.	Resultados.....	29
8.1.	Análisis morfométrico.....	29
8.2.	Estudio molecular y filogenético.....	32

9. Discusión	¡Error! Marcador no definido.
10. Conclusión	37
11. Bibliografía	38
12. Anexos	49

Índice de figuras

Figura 1	Árbol filogenético del phylum Apicomplexa	7
Figura 2	Esquema de <i>Eimeria</i> spp	7
Figura 3	Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp.	10
Figura 4	Especies de <i>Eimeria</i> que infectan a los ovinos.	30
Figura 5	Análisis de conglomerados.	3331
Figura 6	Amplificación y clonación de la región ITS-1.....	32
Figura 7	Dendrograma de las especies de <i>Eimeria</i> en ovinos.	3533
Figura 8	Dendrograma de las especies del género <i>Eimeria</i>	36

Índice de cuadros

Cuadro 1 Especies de <i>Eimeria</i> en ovinos y su localización.....	13
Cuadro 2 Características morfométricas de <i>Eimeria</i> spp en ovinos.....	16
Tabla 1 Identificación morfométrica de <i>Eimeria</i> spp en ovinos.....	31
Tabla 2 Distancias de Kimura de las secuencias de <i>Eimeria</i> spp.....	38

1. Introducción

La ovinocultura es una de las actividades ganaderas más importantes en el Estado de México, entidad que genera la mayor producción de carne de ovino del país (SEDAGRO, 2013). Una de las principales dificultades que enfrenta la ovinocultura, es la presentación de enfermedades entéricas, las cuales son causadas generalmente por parásitos del género *Eimeria*. Las enfermedades entéricas tienen un papel importante en las granjas de producción pecuaria, debido a que causan severas pérdidas económicas como resultado de la mortalidad y disminución del índice de conversión alimenticia (Kommuru *et al.*, 2014;).

Eimeria spp. es el principal agente causal de enteritis en ovinos, tiene una prevalencia del 80 al 100%, afectando tanto a animales pre-destetados, post-destetados y adultos, siendo los dos primeros los más susceptibles a desarrollar la enfermedad. En ovinos, generalmente ocurren infecciones mixtas, las cuales involucran diversas especies de *Eimeria*. Actualmente, en ovinos se han identificado 11 especies de *Eimeria*: *E. parva*, *E. pallida*, *E. marsica*, *E. ovinoidalis*, *E. weybridgensis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. ahsata*, *E. intricata*, *E. crandallis* y *E. ovina*, siendo estas dos últimas las más patógenas, mientras que *E. ovina* es la más prevalente (Sievers *et al.*, 2012; Lassen, 2013).

Los ovinos se infectan con ooquistes vía orofecal, los cuales se desarrollan y replican de forma sexual o asexual en el interior de las células del epitelio intestinal de los huéspedes. Debido al desarrollo intracelular de las *Eimerias*, estas provocan la destrucción de las células en las que se multiplican y, por consiguiente, su efecto se ve reflejado en la aparición de signología clínica y en pérdidas económicas hacia el productor (Chartier y Paraud, 2012; Reza *et al.*, 2014).

El diagnóstico de la coccidiosis por *Eimeria* spp. se realiza tradicionalmente a través del método de microscopia, donde se observan las características morfológicas de cada ooquiste, y el tiempo de esporulación de los mismos, sin embargo, dicha técnica resulta ser ineficiente cuando se requiere identificar con precisión las

especies de *Eimeria* presentes, debido a que una porción de ooquistes puede diferir de la morfología típica esperada, además, las características biológicas pueden presentar un nivel variable de solapamiento, lo que representa un problema al identificar las especies más patógenas ya que, aunque se encuentren en menor concentración pueden desarrollar una infección grave (Lassen *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2015). Ante dichas limitaciones, se han desarrollado técnicas moleculares como métodos de detección e identificación específica de especies del género *Eimeria* con la utilización de la región ITS-1 ha logrado identificar *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis* y *E. zuerni*, especies que infectan al ganado bovino (Kawahara *et al.*, 2010). En ovinos se ha logrado identificar a *E. crandallis*, *E. ahsata*, *E. ovinoidalis*, *E. weybridgensis* mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando la región 18S de ARN ribosomal (Yang *et al.*, 2014).

En México, se ha reportado la presencia de *Eimeria* spp. en ganado ovino a través de microscopía, sin embargo, no se han realizado estudios que empleen técnicas moleculares para su identificación, por lo que en el presente estudio se llevará a cabo la identificación molecular de *Eimeria* spp., en ovinos a través de la amplificación y análisis de la región ITS-1.

2. Antecedentes

2.1. Ovinocultura

La producción ovina en el mundo proporciona cuatro productos principales: carne, lana o pelo, leche y piel. En diversas partes del mundo, esencialmente en regiones templadas, la carne es el principal producto cuya importancia está incrementándose gradualmente en todo el mundo (Zygoyiannis, 2006). Existen varios sistemas de producción ovina, que se desarrollan en pastoreo, en estabulación o en la combinación de estas dos modalidades. De acuerdo con la intensidad de su régimen de producción se dividen en: intensivo, semi-intensivo y extensivo, y según su propósito fundamental se dividen en comerciales y de autoconsumo. A su vez, los sistemas comerciales pueden ser intensivos, semi-intensivos o extensivos, por lo general, la producción se desarrolla bajo sistemas de pastoreo en sistemas de traspatio. Esta situación constituye una gran ventaja económica por el ahorro en los costos de producción, pues esos sistemas generan la mejor relación costo/beneficio y además dan algunas ventajas comparativas a la calidad nutricional de la carne, pero a su vez son muy susceptibles a las variaciones climatológicas estacionales y altamente vulnerables a las sequías extremas (FAO, 2010).

2.2. Panorama mundial de la ovinocultura

Actualmente, la población mundial de ovinos es de aproximadamente mil millones de cabezas, los cuales producen alrededor de 14 millones de toneladas de carne anualmente. De la misma manera, se ha registrado un consumo mundial de carne ovina de alrededor 2.4 kg per cápita al año, nivel inferior comparada con el consumo mundial anual per cápita de todas las demás carnes 41.6 kg (Morris, 2009).

China es el país que cuenta con el mayor hato ovino, con 16% del total y es el primer productor mundial de carne ovina con el 28% en los últimos años. Se prevé que el crecimiento de su hato y de su producción se mantenga al alza (OECD-FAO, 2012). Australia posee el segundo mayor inventario de borregos en el mundo, con

10% del total y es el segundo productor mundial con 8% del total de carne de ovino, así mismo es el segundo exportador mundial con cerca del 30% de las exportaciones. Nueva Zelanda es el cuarto productor mundial de carne ovina, con apenas 6% del total, pero no obstante es el primer exportador mundial con 40% del total. Al igual que Australia, han desarrollado programas enfocados a incrementar la productividad del ganado ovino, y a aumentar tanto el volumen como el valor de sus exportaciones (FAOSTAT, 2013).

2.3. Panorama nacional de la ovinocultura

México ocupa el cuarto lugar como exportador de carne ovina, con 6% del total. En cuanto a consumo per-cápita, en México se consume un kilogramo de carne de ovino, lo que representa una gran oportunidad de ampliar la producción, comercialización y consumo de esta carne (SIAP, 2014).

De acuerdo con las estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca, (SIAP 2014), en México existen casi 8,600,000 cabezas ovinas, produciendo 58,000 toneladas de carne anualmente, de las cuales el 70.9% se producen en diez estados de la república y el 29.1% se produce en las 21 entidades federativas restantes. La ovinocultura se puede dividir en dos sistemas de producción predominantes, el extensivo e intensivo, aunque en los últimos años la combinación de ambos sistemas ha tenido buenos resultados (Arteaga, 2012).

En México, el sistema predominante es extensivo, donde la alimentación es básicamente mediante el pastoreo de los animales en agostaderos naturales; la inversión de capital en alimentación, sanidad e infraestructura es mínima y la mano de obra es generalmente familiar, lo que permite bajos costos de producción por kilogramo de borrego. Sin embargo, dado que las prácticas de suplementación alimenticia son nulas, la deficiente ingesta de micro minerales, así como la mala condición de los pastizales, aunado a periodos de sequía, provocan desequilibrios nutricionales causantes de mortalidad de corderos, la cual se agudiza debido a malas o escasas prácticas sanitarias (Johnson, 2005; Echavarría *et al.*, 2007; Royo *et al.*, 2008; Esqueda y Gutiérrez, 2009).

Por su parte, en el sistema intensivo, se da un intenso uso de los medios de producción, con una importante inversión de capital en infraestructura y equipos; el valor de la tierra es elevado y la mano de obra es asalariada. La alimentación se caracteriza por realizarse en confinamiento total o parcial, utilizando insumos de alto valor nutritivo, lo que eleva significativamente los costos de producción (Nieto *et al.*, 2010; González *et al.*, 2013).

El consumo de carne de borrego, tradicionalmente, se ha localizado en el centro del país (Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Querétaro y Morelos), donde se concentra el 85% del total de carne consumida y el resto se lleva a cabo en los demás estados de la república (Medrano, 2000).

2.4. La ovinocultura en el Estado de México

En el Estado de México se concentra la mayor parte de la producción, comercio y transformación de carne ovina. Destaca con el 14.8% del total de la población ovina nacional, la cual produce 8,500 toneladas de carne anualmente (SIAP, 2014). El municipio de Amecameca se encuentra en la región sur-oriente del Estado de México, cuenta con un inventario de 2,262 cabezas de ganado ovino, que producen 43 toneladas de carne anuales (SEDAGRO, 2013).

2.5. Enteritis

Uno de los principales problemas que obstaculizan el desarrollo de la producción ovina en la región sur del Estado de México es la presentación de enfermedades entéricas, las cuales son un factor determinante para la práctica de dicha actividad, ya que muchos productores al no controlar dicho problema generan temor para invertir más recursos a esta actividad (Ortíz *et al.*, 2012).

La prevalencia de parásitos intestinales en ovinos es mayor al 90% y la mayoría de los animales presentan una parasitosis múltiple, siendo *Eimeria* spp., el principal agente causal, con una frecuencia que va del 80 al 100% (Roger *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2006; Sieverset *et al.*, 2012).

2.6. Generalidades de protozoarios.

Los protozoarios son organismos eucarióticos, ya que almacenan su información genética en los cromosomas, los cuales están contenidos en una envoltura nuclear, esto los diferencia de las bacterias quienes tienen el cromosoma en el citoplasma. En general, los protozoarios poseen un núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria, aparato de Golgi y lisosomas. Se alimentan principalmente por pinocitosis o fagocitosis y los productos metabólicos son excretados por difusión a través de la membrana celular. (Taylor *et al.*, 2007).

2.6.1. Phylum apicomplexa

Es el más diverso y complicado phylum que parasita a los animales domésticos. A los protozoarios los podemos encontrar en el epitelio intestinal, células sanguíneas y dentro del sistema reticuloendotelial. Su ciclo de vida es complejo y está íntimamente integrado a la fisiología del huésped (Beck *et al.*, 2009). La clasificación taxonómica del phylum Apicomplexa de importancia veterinaria se presenta en la figura 1.

Los parásitos pertenecientes al phylum Apicomplexa poseen una locomoción interna, la cual es imposible ver a simple vista ya que sus organelos se encuentran en el llamado complejo apical, el cual es una característica que define al phylum y está formado por: anillos precoinoidales, anillo polar, microtúbulos, roptrias y conoide, con los cuales se realiza la penetración a la célula. El movimiento es a través de ondulaciones en sentido longitudinal y ocasionalmente por medio de flagelos en el caso de los microgametos (Roberts y Janovy 2009).

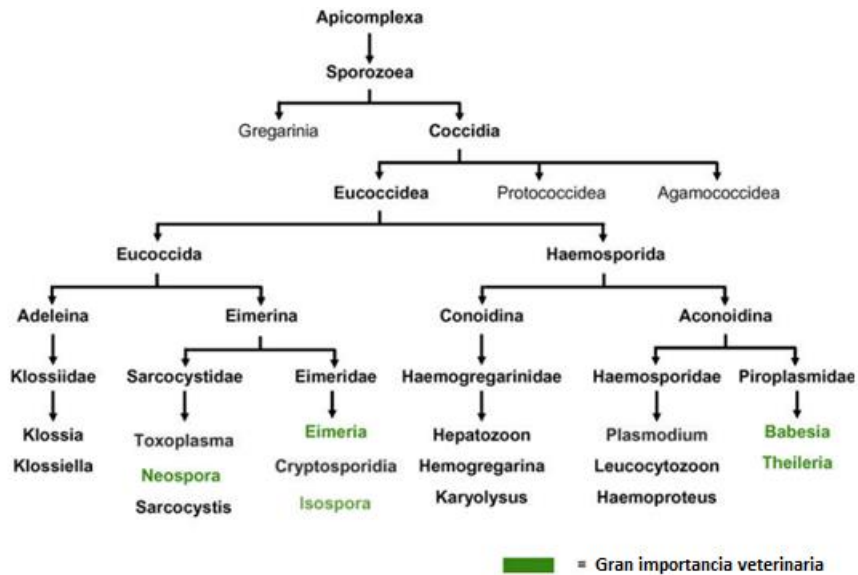


Figura 1 Árbol filogenético del phylum Apicomplexa (Beck *et al.*, 2009).

2.6.2. Familia Eimeriidae

Dentro del phylum Apicomplexa, la familia Eimeriidae, es una de las más grandes está formada por 16 géneros, siendo los más importantes en medicina veterinaria *Eimeria* e *Isospora* y las infecciones con estos géneros se refieren a menudo como coccidiosis (Taylor *et al.*, 2007).

2.6.3. Género *Eimeria*

Este género está compuesto de aproximadamente 1,700 especies, afectando principalmente a mamíferos domésticos y aves. Todos los géneros de *Eimeria* son específicos de especie (Müller and Hemphill, 2013).

2.7. Morfología de *Eimeria* spp.

Los ooquistes de las *Eimerias* están recubiertos por una pared compuesta por una o dos capas y pueden estar revestidos por una membrana. Algunos tienen un micrópilo que puede tener o no un tapón. En los ooquistes esporulados se pueden observar cuatro esporoquistes con dos esporozoitos, un residuo del ooquiste o un residuo del esporoquiste y el esporoquiste. El esporoquiste puede tener una

protuberancia en un extremo denominada cuerpo de stieda, y puede haber un cuerpo substieda debajo de él. Los esporozoítos usualmente son alargados, con el extremo anterior redondeado y el posterior ahusado. Pueden contener uno o más glóbulos proteínicos denominados cuerpos refráctiles y glóbulos eosinofílicos como se muestra en la figura 2 (Levine, 1985).

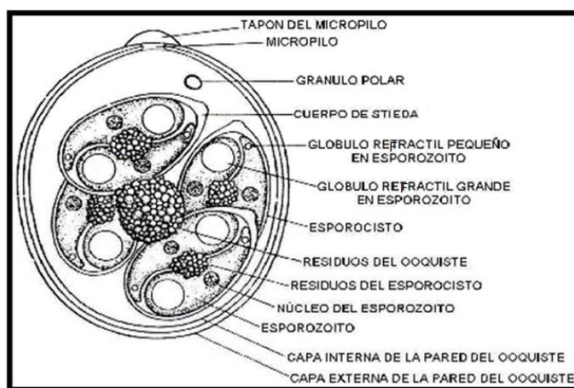


Figura 2 Representación esquemática de un ooquiste esporulado de *Eimeria* spp. (Levine, 1985).

2.8. Ciclo Biológico

Las especies de coccidias que infectan a los ovinos pertenecen al género *Eimeria* (Levine, 1985), los miembros de este género son considerados monoxenos ya que su ciclo de vida es completado en una única especie hospedera, y estenoxeno debido a que cada especie tiene una única especie hospedera, además, poseen un ciclo de vida directo. La infección de los animales se produce después de la ingestión de agua o alimentos contaminados con ooquistes esporulados. El ciclo evolutivo tiene dos fases: una fase exógena y una fase endógena (figura 2). La fase exógena se realiza fuera del cuerpo del hospedero (en el ambiente), y se lleva a cabo la esporulación de los ooquistes. La fase endógena, está dividida en sexual (gametogonia) y asexual (esquizogonia o merogonia) se produce dentro del animal, el parásito sufre numerosas divisiones dentro de las células intestinales generando como producto final un ooquiste sin esporular, el cual es expulsado del hospedero por medio de las heces (Fayer, 1980; Hidalgo y Cordero, 1996; Duszynski y Upon, 2001).

2.8.1. Fase exógena

En la fase exógena los ooquistes no esporulados son eliminados por el animal infectado a través de las heces hacia el ambiente. Con las condiciones ambientales óptimas, tales como la humedad, la temperatura (24 a 32°C) y oxígeno, los ooquistes eliminados esporulan de 2 a 5 días en la mayoría de las especies. Los ooquistes mueren a temperaturas superiores a 40°C y por debajo de -30°C, pero entre estos extremos los ooquistes esporulados y no esporulados permanecen viables en el ambiente por más de un año. Los ooquistes no esporulados son más susceptibles a los cambios climáticos extremos que los ooquistes esporulados. Los ooquistes pueden soportar temperaturas de -5°C a -9°C durante varios meses (Hendrix y Robinson, 2012; Taylor *et al.*, 2007)

La fase endógena del ciclo de vida comienza inmediatamente después de la ingestión de ooquistes esporulados.

2.8.2. Fase endógena

Los ovinos ingieren los ooquistes a través de alimentos y agua contaminados. Una vez llegado al aparato digestivo la presencia de dióxido de carbono (CO₂) provoca un adelgazamiento de la membrana del ooquiste alterando su permeabilidad con lo cual la tripsina y sales biliares ejercen su acción sobre los ooquistes provocando la liberación de los esporozoítos en el lumen intestinal (Belli *et al.*, 2006), una vez libres invaden a los enterocitos, para poder llevar a cabo este paso, hacen contacto con la célula y finalmente la penetran a través de deslizamientos circulatorios, los cuales son producidos por la proteínas de superficie que se encuentran en la porción apical del esporozoíto.

Después de la invasión, continua la invaginación y sellado de la membrana celular del huésped formando la membrana de la vacuola parasitófora. El tiempo que tarda el zoíto en penetrar la célula va de 5 a 10 segundos (Dubremetz *et al.*, 1998). La función principal de la vacuola es proteger al parásito contra la lisis de la célula huésped; posee poros por donde provee canales nutricionales que permiten

la transferencia pasiva de moléculas al parásito (Entzeroth *et al.*, 1998; Oakes *et al.*, 2013). Es aquí donde el esporozoíto se transforma en trofozoíto (Augustine, 2001) por medio de divisiones nucleares múltiples, las cuales comienzan con una fisión binaria (división del ADN) seguida de la división del citoplasma, lo cual da lugar a dos células hijas (Roberts y Janovy, 2009) y se generan los esquizontes, (Taylor *et al.*, 2007).

Cuando los esquizontes maduran, liberan un gran número de organismos nucleados alargados, conocidos como merozoítos de primera generación, que invaden otras células, continuando así el ciclo de vida asexual. Dentro de las nuevas células del huésped, los merozoítos se convierten en trofozoítos y continúan su desarrollo mediante la división del núcleo o división asexual como en la fase anterior, hasta generar la segunda generación de esquizontes y al mismo tiempo la segunda generación de merozoítos. Esta segunda generación de merozoítos puede desarrollar nuevas generaciones de merozoítos (esquizogonia), sin embargo, esta reproducción asexual no continúa indefinidamente. El número de generaciones de merozoítos varía entre dos o más de acuerdo con la especie de *Eimeria* implicada.

La última generación comienza a reproducirse de manera sexual (gametogonia), generándose trofozoítos, que en lugar de repetir la esquizogonia, se diferencian en macrogametocitos (gametocito femenino), y microgametocitos (gametocito masculino), estos sufren múltiples divisiones mitóticas para dar lugar a múltiples microgametos, solo esta fase posee órgano de locomoción, por medio de dos flagelos (Reza *et al.*, 2014).

Los macrogametos contienen pequeños gránulos en el núcleo, que luego crecen y se extienden por todo el citoplasma. Estos gránulos se localizan en la periferia de la célula y se llaman "gránulos formadores de pared", que forman la pared del ooquiste después de la fecundación del microgameto. La fecundación del macrogameto por el microgameto da como resultado la formación de un cigoto. El cigoto forma una pared alrededor de él y por lo tanto forma un oocisto. El oocisto sale de la célula, hacia la luz intestinal y se excreta en las heces (Malo, 2013). La pared final del ooquiste es una bicapa electrodensa formada por una capa externa

(predominantemente lipídica) y por una capa interna (glucoproteica). Esta bicapa le confiere una excelente resistencia al ooquiste inmaduro y así puede sobrevivir en el medio ambiente (Belli *et al.*, 2006), pueden sobrevivir en el medio ambiente durante meses, incluso años, sin embargo, la desecación extrema y la exposición directa del sol limita la sobrevivencia del ooquiste. Temperaturas por debajo de los -30°C o por encima de los 63°C son letales. El potencial proliferativo en el huésped es muy alto, ya que, según un cálculo teórico, cada ooquiste ingerido podría dar origen a 30 millones de ooquistes excretados (Chartier y Paraud, 2012). El período prepatente (el tiempo que ocurre entre la ingestión de los ooquistes esporulados y la excreción de ooquistes) es de 15 a 20 días aproximadamente (Tafti y Mansouian, 2008). La representación esquemática del ciclo biológico de *Eimeria* se muestra en la figura 3.

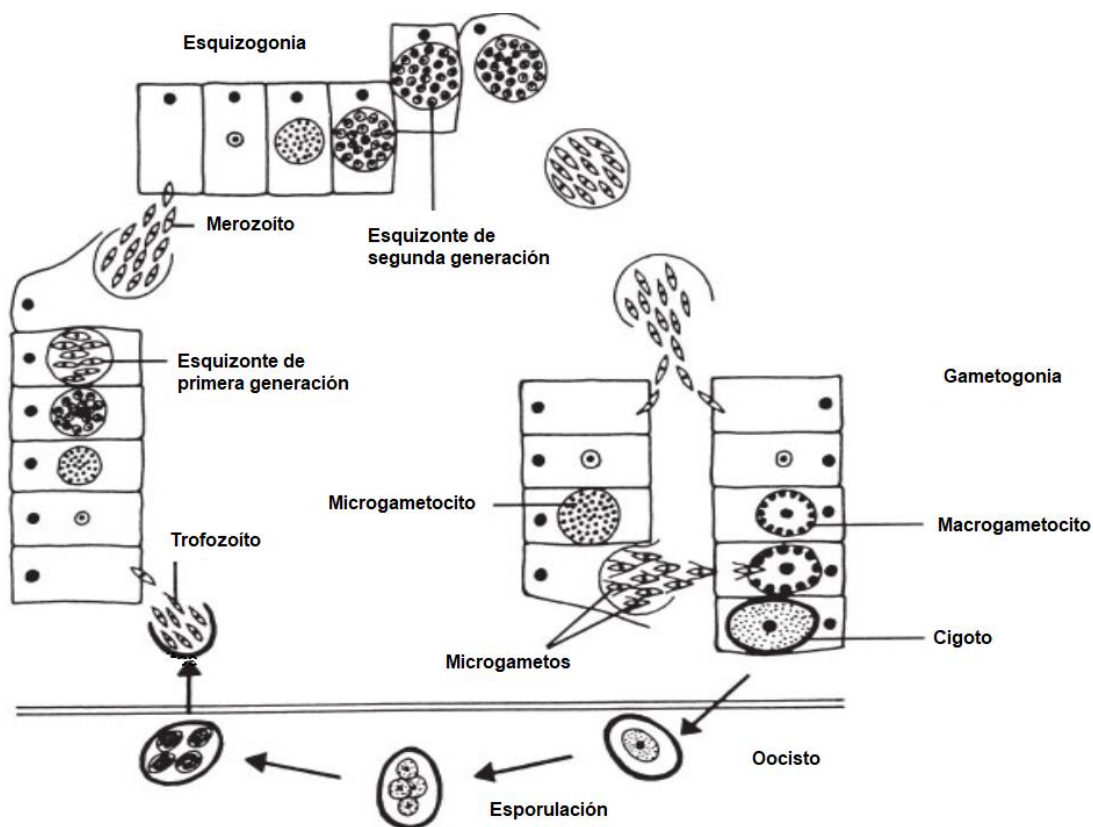


Figura 3 Ciclo biológico de *Eimeria* spp. (Taylor et al., 2007).

2.9. Coccidiosis en ovinos

La coccidiosis (*Eimeriosis sensu stricto*) en ovinos es una enfermedad autolimitante (que comienza y termina en un tiempo programado) la cual afecta principalmente a corderos recién destetados de 3-8 semanas de edad. El estrés que sufren los animales al ser destetados, cambio de alimento, confinamiento, malas condiciones de higiene en el corral, así como estrés por altas/bajas temperaturas, llevan al animal a una depresión de su sistema inmune, induciéndolo a una coccidiosis. La infección ocurre por la ingesta de ooquistes esporulados (Müller y Hemphill, 2013), las manifestaciones clínicas más comunes en los animales son: inapetencia, debilidad, pérdida de peso, diarrea, depresión y anemia (Iqbal et al., 2012). Estas manifestaciones clínicas se deben a que destruyen las células epiteliales intestinales provocando una enfermedad entérica (Bowman, 2014; Harper y Penzhorn, 1999). En un examen patológico se observa inflamación crónica y engrosamiento del intestino grueso, hemorragias en la superficie de la mucosa, nódulos blancos en el intestino delgado (nido de esquizontes) y atrofia de las vellosidades (Andrews, 2013). Esta enfermedad tiene impacto sanitario y económico ya que se desarrolla una enfermedad clínica o subclínica, aunque esta última suele ser más esporádica pero también provoca pérdidas económicas. La mortalidad puede llegar hasta el 20% en corderos, ya que ellos no han adquirido una inmunidad específica (Gjerde y Helle, 1991; Kommuru *et al.*, 2014; Veira, 2002).

Hay dos condiciones que conducen a una coccidiosis clínica: 1) una masiva ingestión de ooquistes esporulados, debido a una alta contaminación del medio ambiente y 2) una multiplicación asexual significativa en el hospedador relacionado con una baja resistencia del animal (Chartier y Paraud, 2012).

Se conocen 11 especies de *Eimeria* que afectan exclusivamente el intestino de los ovinos: *E. parva*, *E. pallida*, *E. marsica*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. weybridgensis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. ahsata*, *E. intricata* y *E. ovina*, (Lassen, 2013) (cuadro 1), sin embargo, *E. ovinoidalis* seguida por *E. crandallis* representan las especies más patógenas; ya que causan diarrea, reducción en la ganancia de peso y una condición de pobre salud en general. En contraste, hay especies como

E. pallida cuya patogenicidad se considera leve o insignificante. El efecto patogénico de *Eimeria* se debe a la destrucción de las células epiteliales del intestino y un masivo cambio en la microbiota digestiva ya que se aumenta el número de bacterias Gram negativas, principalmente *Escherichia coli* (Mohammed *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2015).

Cuadro 2 Especies de *Eimeria* en ovinos y su localización (Hendrix y Robinson 2012; Lassen, 2013).

	Especie	Localización	Periodo prepatente (días)
Patógenas	<i>Eimeria ovinoidalis</i>	Intestino delgado e intestino grueso	12-15
	<i>Eimeria crandallis</i>	Intestino delgado e intestino grueso	15-20
Poco patógenas	<i>Eimeria bakuensis</i>	Intestino delgado	18-29
	<i>Eimeria faurei</i>	Intestino delgado e intestino grueso	13-15
	<i>Eimeria granulosa</i>	ND	ND
	<i>Eimeria intricata</i>	Intestino delgado e intestino grueso	23-27
	<i>Eimeria marsica</i>	ND	14-16
	<i>Eimeria pallida</i>	ND	ND
	<i>Eimeria parva</i>	Intestino delgado e intestino grueso	12-14
	<i>Eimeria weybridgensis</i>	Intestino delgado	23-33
	<i>Eimeria ahsata</i>	Intestino delgado	18-30

*ND, No disponible

2.10. Prevalencia

La infección por coccidios del género *Eimeria* generalmente tiene un carácter multiespecífico (Cavalcante *et al.*, 2012), aunque se han descrito diversas especies que parasitan a las ovejas (Saratsis *et al.*, 2011). Entre las diferentes especies capaces de infectar a las ovejas, solo *E. ovinoidalis* y *E. crandallis* causan la

sintomatología clínica de la eimeriosis; hay poca evidencia de que otras especies sean patógenas (Gregory y Catchpole, 1990).

La prevalencia de los oocistos de *Eimeria* está influenciada por el sistema de cría, que muestra una relación directa entre el nivel de tecnificación y la intensidad de la infección (Cai y Bai, 2009). Estudios previos informaron una prevalencia del 92.7% de *Eimeria* spp. en un sistema intensivo (Saratsis *et al.*, 2011), 78.3% en un sistema semi-intensivo (Hassum y Menezes, 2005) y 25.3% y 58.9% en sistema extensivo (Ahid *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2009). Los factores limitantes relacionados con el ambiente (clima y manejo) o con el animal (estado genético e inmunológico) pueden promover la diseminación y aumentar la prevalencia de coccidios incluso en sistemas extensivos (Chartier y Paraud, 2012).

La edad del animal es un factor significativo que influye en la excreción de oocistos, los animales jóvenes se ven más afectados que los adultos, independientemente de la temporada. La alta susceptibilidad de los animales jóvenes se relaciona con aspectos inmunológicos, la inmunidad específica contra *Eimeria* spp. ocurre después de la infección inicial (Silva *et al.*, 2011).

El sexo también es un factor que influye en la prevalencia de eimeriosis, especialmente en la estación lluviosa. La susceptibilidad del carnero a la infección por *Eimeria* spp. se puede atribuir a la inmunosupresión causada por los niveles plasmáticos elevados de andrógenos, principalmente testosterona, a lo largo de la temporada de reproducción (Bhat *et al.*, 2012).

Los aspectos relacionados con el clima, especialmente la humedad causada por la lluvia en lugares donde el drenaje es deficiente puede influir en la prevalencia de *Eimeria* spp. Un ambiente cálido y húmedo proporciona las condiciones ideales para la esporulación de los oocistos y, por lo tanto, aumenta el potencial de infección (Taylor, 2012). El efecto del clima sobre la esporulación de oocistos puede verse potenciado por variaciones extremas en la pluviometría y la temperatura que se producen a lo largo del año (Khan *et al.*, 2011).

La infección múltiple con cinco especies de *Eimeria* es la más común con un 43% (Khan *et al.*, 2011), seguida por dos especies (36,59%), seguida por la infección mixta con tres especies (34,15%). Las infecciones múltiples con cuatro especies de *Eimeria* (17,07%), y con una sola especie (12,20%) son menos comunes (Toulah, 2007).

Se ha demostrado que en sistemas de estabulación principalmente con un gran número de ovinos por rebaño, en corrales no cementados, con agua estancada la coccidiosis es más prevalente. No se ha encontrado como factor de riesgo el sistema de alimentación, la raza y el estado corporal de los animales (Biu *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2011).

La cantidad de oocistos excretados puede variar dependiendo de la dosis infectiva de los ooquistes (Gregory y Catchpole, 1987, 1990) y el estado inmunológico del animal (Reeg *et al.*, 2005). Por lo tanto, las influencias individuales juegan un papel importante en el grado de infección. Los oocistogramas con valores $> 10^4$ indican una alta intensidad de infección y generalmente están vinculados a síndromes diarreicos típicos de esta endoparasitosis (Cozma y Titilincu, 2007). Sin embargo, el diagnóstico de eimeriosis no puede excluirse cuando la OPG es baja o inexistente. Los animales adultos que excretan pequeñas cantidades de oocistos son importantes en la epidemiología de la eimeriosis; los ooquistes liberados por estos animales suelen ser la causa de infección en animales jóvenes (Platzer *et al.*, 2005).

2.11. Diagnóstico

Se sospecha de coccidiosis cuando hay problemas digestivos en animales jóvenes criados en malas condiciones higiénicas y/o con la presencia de algunos factores de riesgo anteriormente mencionados. En los pequeños rumiantes, la mortalidad repentina durante el período de destete también sugiere coccidiosis. Una tasa de crecimiento baja en un entorno epidemiológico apropiado debe sugerir un diagnóstico de coccidiosis subclínica.

2.11.1. Diagnóstico morfológico

El diagnóstico se basa principalmente con la presencia de ooquistes mediante análisis coprológico por medio de técnicas de flotación que permiten la identificación microscópica de los ooquistes de las diversas especies de *Eimeria* basándose principalmente en el diámetro de los oocistos y su forma como se muestra en el Cuadro 2 (Souza *et al.*, 2015; Lassen *et al.*, 2013). Mediante análisis cuantitativo con el método de McMaster se puede determinar la carga parasitaria expresado en número de ooquistes por gramo de heces (OPG), aunque su relación con la gravedad de la infección depende de la virulencia de cada especie. En este sentido, el recuento puede ser de cientos de miles de ooquistes por gramo de heces con signos clínicos evidentes y por el contrario, la infección puede ser clínicamente leve con recuentos muy superiores, lo cual indica la diferencia en la patogenicidad de las distintas especies y la necesidad de identificar los ooquistes esporulados de acuerdo con sus características morfológicas (Hernández y Mendoza, 2002).

Cuadro 2 Características morfométricas de las once especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos (Souza *et al.*, 2015; Lassen *et al.*, 2013).

Especie	Forma	Largo	Ancho
Con tapón de micrópilo			
<i>E. intricata</i>	Elipsoide	58	41.1
<i>E. ahsata</i>	Elipsoide	40.4	27.1
<i>E. ovina</i>	Elipsoide	33.9	22.5
<i>E. granulosa</i>	Subesferica	33.7	24.7
<i>E. crandallis</i>	Subesferica	27.3	20.8
<i>E. weybidgensis</i>	Elipsoide	21.9	19.1
Sin tapón de micrópilo			
<i>E. faurei</i>	Piriforme	32.5	24.8
<i>E. ovinoidalis</i>	Elipsoide	25.6	21.4
<i>E. pallida</i>	Elipsoide	18.2	16.1
<i>E. parva</i>	Esferica	20.6	18.2
<i>E. marsica</i>	Elipsoide	17	13

2.11.2. Diagnóstico molecular

Como una alternativa a la identificación morfológica, se han desarrollado ensayos de genética molecular, basados en el diseño de sondas de ADN para identificar algunas especies del género *Eimeria*, como lo son: *E. crandallis* y *E. ovinoidalis* a partir de cultivos puros. Para aumentar la sensibilidad de la prueba, se realizó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores de oligonucleótidos específicos con lo cual se pudo realizar con menos de 10 ooquistes la identificación de *E. ovinoidalis*. (Berriatua, 1995).

Nahavandi *et al.*, (2016) caracterizaron genéticamente ooquistes de *E. ahsata* y *E. crandallis* en muestras de aguas residuales de mataderos. El gen 18S rRNA se empleó como marcador molecular para realizar el análisis filogenético y las variaciones de la secuencia de ADN de estas especies. La secuencia del gen 18S puede usarse para identificar oocistos de *Eimeria* en muestras ambientales, sin embargo, puede no resultar útil para examinar con mayor detalle la magnitud de la variación poblacional de una sola especie de *Eimeria*.

Se ha utilizado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para determinar la presencia y prevalencia de *Eimeria spp.* en ovinos, la cual es un método altamente sensible y específico en comparación con la microscopia, utilizando secuencias seleccionadas en el locus 18S de ARN ribosomal. La prevalencia fue mayor en corderos post-destete (1.1×10^3) y antes del sacrificio (1.1×10^3), las especies identificadas fueron: *E. crandallis*, *E. ahsata*, *E. ovinoidalis*, *E. weybridgensis* y *E. cylindrica*, responsables del 58.5% de las infecciones tipadas (Yang *et al.*, 2014).

Para poder identificar especies de *Eimeria* que infectan a los bovinos se han desarrollado ensayos de PCR específicos de especie basados en la amplificación de la región ITS-1. Con lo cual se logró identificar 6 patógenos: *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis* y *E. zuernii*. La región ITS-1 de cada especie de *Eimeria* tenía suficiente variación de secuencia interespecífica adecuada para diseñar los conjuntos de cebadores que amplificaban

diferencialmente cada especie objetivo. Este ensayo de PCR para la detección y diferenciación del parásito *Eimeria* mostró una mayor sensibilidad en comparación con el examen coproparasitoscópico convencional. Utilizando esta región se puede diagnosticar específicamente cada especie del género *Eimeria*, además ayuda a conocer la epidemiología de la infección coccidial (Kawahara *et al.*, 2010).

2.11.2.1. Regiones utilizadas en la filogenia del género *Eimeria*.

Además de la identificación de especies del género *Eimeria* utilizando técnicas moleculares, se han implementado estudios filogenéticos con el fin de dilucidar la diversidad, origen y patrones evolutivos. Molnár *et al.*, (2012) observaron una abundante diversidad evolutiva entre *Eimeria* de peces, en contraste, los atributos compartidos en la región 18S ARNr justifican su historia de descendencia común mostrando un clado monofilético, específicamente relacionado con *Eimeria* de vertebrados terrestres (aves de corral), estos resultados pueden explicar que las especies de *Eimeria* de vertebrados terrestres descienden de las especies que infectan a los peces.

Las relaciones filogenéticas de las once especies de *Eimeria* que infectan a los conejos utilizando secuencias parciales del gen 18S ARNr muestran un grupo monofilético. Este hallazgo implica que estas especies, que varían considerablemente en términos de su morfología y biología, se diversificaron en un único hospedador o en varias especies estrechamente relacionadas. El análisis filogenético dividió dos ramas principales asociadas a la presencia/ausencia del residuo de ooquiste. Otros rasgos morfológicos o biológicos (forma y tamaño del oocisto, presencia/ausencia de estructuras internas del oocisto, patogenicidad, sitio de infección, períodos previos a la patente y patentes, tiempo de esporulación y número de generaciones asexuales) no se correlacionan explícitamente con la filogenia de los coccidios de conejo (Kvičerová *et al.*, 2008).

Khodakaram-Tafti *et al.*, (2013) analizaron las relaciones filogenéticas de *E. arloingi* con otras especies de *Eimeria* en la base de datos GenBank. Lo cual reveló una relación particularmente estrecha entre *E. arloingi* y *Eimeria* spp. del ganado y ovejas. El filograma basado en las secuencias ITS-1 muestra que *E. arloingi*, *E. bovis* y *E. zuernii* formaron un grupo distinto separado de las otras *Eimeria* spp. en ganado y aves de corral. En el alineamiento por parejas, la secuencia de 18S DNAr derivada de *E. arloingi* mostró un 99% de similitud con *E. ahsata*, con diferencias observadas en solo tres nucleótidos. Del mismo modo Silva *et al.*, (2017) amplificaron una secuencia de DNA de *E. arloingi* cepa A (la mayoría de 18S rDNA, secuencias ITS-1 y 5.8S completas, y la ITS-2 parcial) para determinar la relación filogenética con las secuencias más similares disponibles en el GenBank. El árbol filogenético por el método de Neighbor-Joining presentó dos ramas distintas, una rama constituida por especies bovinas de *Eimeria* más *E. arloingi*, y otra exclusivamente poblada por especies de *Eimeria* ovina. Lo cual confirma la estrecha relación de especies de *Eimeria* en rumiantes altamente patógenas, caracterizadas por la formación de macromerontes en células endoteliales del hospedador de los capilares linfáticos centrales del intestino delgado. Estos estudios muestran que las regiones ITS-1 y 18S son marcadores genéticos útiles para la identificación y diferenciación específicas de *Eimeria* spp. en rumiantes. Desafortunadamente en la actualidad no hay datos disponibles de secuencias de la región ITS-1 disponibles de aislados de *Eimeria* de ovinos y caprinos para su posterior análisis.

2.12. Estudios previos en México

En México sólo se han identificado las once especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos por medio de técnicas de flotación y medición de ooquistes por microscopia, y para calcular la carga parasitaria se emplea la técnica de McMaster. Lima *et al.*, (1995) identificaron entre las especies más frecuentes a *E. ovinoidalis* con una frecuencia del 53%, *E. ovina* con 22% y *E. parva* con 15% en 24 ovinos de raza Suffolk, Rambouillet, Pelibuey. Salas *et al.*, (1996) identificaron 9 especies: *E. ahsata*, *E. arlongi*, *E. crandallis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. intricata*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. pallida* y *E. parva*, también reportaron que los corderos

excretaron más oocistos por gramo de heces que las ovejas y que los ovinos de la raza Rambouillet eliminaron mayor cantidad de oocistos por gramo de heces que los de raza Suffolk.

En el periodo de un año Reyes *et al.*, (1996) evaluaron la cantidad de ooquistes e identificaron como especies principales a *E. ovina*, *E. parva*, *E. faurei*, *E. granulosa* y *E. ovinoidalis*. Del mismo modo reportan que los corderos mostraron mayor número de ooquistes en relación con los adultos, además observaron que en los meses de mayo a junio se obtuvieron las cuentas más altas de ooquistes (hasta 70,000 opg).

En un estudio para determinar la eficacia anti-*Eimeria* de un extracto de cascara de pomelo (5mg) y naringenina comercial al 94% en 24 corderos infectados naturalmente, encontraron excreción de oocistos en los grupos tratados y en el grupo control, en los cuales identificaron 10 especies de *Eimeria*: *Eimeria bakuensis*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. pallida*, *E. granulosa*, *E. parva*, *E. weybridgensis*, *E. marsica*, *E. faurei* y *E. intricata* (Pérez-Fonseca *et al.*, 2016).

3. Planteamiento del problema

La ovinocultura es una de las actividades ganaderas más importantes en el Estado de México, cuya producción se ve afectada principalmente por enfermedades de carácter entérico, las cuales son causadas generalmente por coccidias del género *Eimeria*. En granjas de producción ovina, la coccidiosis afecta particularmente a los animales jóvenes, y puede generar severas pérdidas económicas, debido a la mortalidad y a la disminución en la ganancia de peso, teniendo como resultado, la reducción del índice de conversión alimenticia, que ocurre en las infecciones clínicas y subclínicas.

De forma general, el diagnóstico de *Eimeria* spp. se realiza mediante microscopia de muestras fecales, con dicha técnica sólo se pueden identificar los ooquistes que presentan características morfológicas diferenciables, como *E. intricata*, *E. faurei*, *E. pallida* y *E. parva* en ovinos, sin embargo, esto no es suficiente para separar las especies con características morfológicas y estructurales similares como lo son *E. ahsata*, *E. ovina*, *E. crandallis*, *E. weybridgensis*, *E. ovinoidalis*, *E. granulosa* y *E. marsica*. En estudios realizados en diversos representantes del género *Eimeria* se ha demostrado la ineficacia y desventajas que presenta el diagnóstico morfológico. Por tal motivo, para poder caracterizarlas es necesaria la utilización de técnicas moleculares para la identificación específica y del mismo modo poder analizar la variabilidad genética que existe entre ellas.

4. Justificación

Eimeria spp. es el principal agente causal de enteritis en ovinos, afecta a animales pre-destetados, post-destetados y adultos, siendo los dos primeros los más susceptibles a desarrollar la enfermedad. En ovinos, generalmente ocurren infecciones mixtas, las cuales involucran diversas especies de *Eimeria* (Chartier y Paraud, 2012).

En México, la coccidiosis en ovinos causada por *Eimeria* spp. Únicamente ha sido identificada mediante técnicas de microscopía (Pérez-Fonseca *et al.*, 2016), lo cual ha permitido detectar el agente patógeno de forma general, pero no específica. Ante tal panorama, se enfatiza la importancia de realizar estudios moleculares que permitan identificar las especies de *Eimeria* que afectan al ganado ovino en el Estado de México.

Diversos autores señalan que la detección de *Eimeria* spp. a través de microscopía es insuficiente para identificar las especies de *Eimeria* presentes en un determinado hospedero, Heping *et al.*, (2016) identificaron morfológica y molecularmente las especies de *Eimeria* que infectan a los conejos en China. A través de las características morfométricas identificaron ocho especies de *Eimeria*, en contraparte mediante la técnica de PCR caracterizaron seis especies, demostrando lo inespecífica que es la identificación por microscopía. Es por ello que se precisa de técnicas más sofisticadas que complementen la identificación morfológica, lo cual permitiría la identificación insesgada específica de las diferentes especies de *Eimeria*.

Por otro lado, los análisis filogenéticos brindarían la posibilidad de predecir el origen y, a través de las asociaciones observadas, conocer aspectos relacionados a la patogenicidad y virulencia individual de cada especie de *Eimeria* identificada.

5. Hipótesis

En los ovinos de la región sur-oriente del Estado de México estarán presentes las once especies de *Eimeria* reportadas a nivel mundial.

Las variaciones inter e intraespecíficas de la región ITS-1 de *Eimeria* en ovinos permiten la identificación de cada una de las especies y su análisis filogenético.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Identificar las especies de *Eimeria* presentes en ovinos de la región I del Estado de México por medio de técnicas morfológicas y moleculares.

6.2. Objetivos específicos

1. Detectar la presencia de *Eimeria* spp. en heces de ovinos de la región sur-oriente del estado de México a través de coproparasitoscopia.
2. Aislar las especies de *Eimeria* diferenciables por características morfométricas.
3. Amplificar la región ITS-1 de *Eimeria* de las especies aisladas, mediante la técnica de PCR.
4. Realizar la filogenia de los fragmentos amplificados de las especies de *Eimeria* de ovinos en comparación con las reportadas a nivel mundial.

7. Material y método

7.1. Diseño de estudio

Tipo de investigación

Descriptivo, comparativo, transversal.

Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la región I del Estado de México, la cual está integrada por los municipios de Amecameca, Atlautla, Ayapango, Chalco, Cocotitlán, Ecatingo, Juchitepec, Ozumba, Temamatla, Tenango del Aire, Tepetlixpa, Tlalmanalco y Valle de Chalco. Predomina el clima templado sub-húmedo con lluvias en verano, temperatura media entre 10 y 16 °C, y precipitación anual entre 500 y 1500 mm.

Población de estudio

Ovinos procedentes de unidades de producción, ubicadas en la región I del Estado de México, la cual se encuentra conformada por 13 municipios: Valle de Chalco, Chalco, Temamatla, Cocotitlan, Tlalmanalco, Juchitepec, Tenango del Aire, Ayapango, Amecameca, Atlautla, Ozumba, Tepetlixpa y Ecatingo.

Unidad de análisis

Ovinos con sinología entérica de entre 2 meses a 2 años de edad.

Tipo de muestreo

Aleatorio estratificado proporcionado.

Lugar del estudio

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria para el análisis parasitoscópico y en el Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética, para el análisis molecular, ambos pertenecientes al Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y

Zootecnia. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México, de la Universidad Autónoma del Estado de México,

Periodo

El presente estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre el mes de febrero de 2016 al mes de mayo de 2017.

7.2. Metodología

7.2.1. Toma de muestra

De las granjas productoras de la región se recolectó un kilogramo de muestra fecal de ovinos de entre 2 meses a 2 años de edad.

7.2.2. Aislamiento de Ooquistes de *Eimeria* spp.

Las muestras fueron tamizadas utilizando una maya de 50 μm^2 de poro para la separación de los detritos celulares de mayor tamaño, posteriormente fueron lavadas por sedimentación y decantación utilizando agua común cada 8 horas por nueve repeticiones. Después de la última sedimentación las muestras fueron resuspendidas en solución saturada salina (NaCl) al 33% en una proporción 1:3 en tubos de 50 ml, para ser centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, para cuantificar el número de ooquistes por mililitro del sobrenadante se utilizó la técnica de McMaster de flotación en solución saturada salina desarrollada por Gordon & Whitlock (1939) y modificada por Ueno & Gonçalves (1998), con esta también se logró identificar el número de ooquistes de cada una de las diferentes especies de *Eimeria*, presentes en cada una de las muestras recolectadas (Anexo 1).

Las muestras con más de 3,000,000 de ooquistes por ml fueron seleccionadas para el aislamiento de las especies de *Eimeria*; se colocaron en matraz de Erlenmeyer con solución de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) al 3% por siete días, a 30°C con gasificación ambiental para su esporulación (Vieira *et al.*, 1999).

Para el aislamiento de cada una de las especies de *Eimeria* se realizaron diluciones 1:10 en agua destilada hasta la obtención de un ooquiste por gota, cada ooquiste fue aislado en tubos de ensayo de 5 ml de acuerdo a las características morfológicas que cada una presenta tomando en cuenta la forma, tamaño, presencia o ausencia de micrópilo y tapón micropilar, además del tamaño de los esporocistos siguiendo los parámetros reportados para la identificación de las especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos.

7.2.3. Cultivo *in vivo* de *Eimeria* spp.

Se emplearon 11 ovinos de raza criolla, con 4 meses de edad, los cuales no presentaban infección por *Eimeria*. Los animales tenían un peso inicial de 18 kg. Estos fueron alojados individualmente en corrales de 1.5m x 1m con piso de concreto, con un metro de separación entre ellas, cada ovino recibió alimento formulado de acuerdo con sus requerimientos nutricionales para crecimiento y agua *ad libitum*.

A cada animal se le administró una dosis de 1000 ooquistes aislados de una de las once especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos, el protocolo utilizado fue aprobado por el comité de Ética del CU UAEM Amecameca (CBE/16/20).

A partir del día de inoculación, las heces de los ovinos fueron recolectadas semanalmente para el análisis de la presencia de *Eimeria* por microcopia, hasta la excreción de ooquistes. Para recolectar el material fecal de cada ovino se implementaron colectores, a fin de evitar contaminación con orina, las muestras fueron colectadas durante 3 días después de la primera excreción.

Los ooquistes de *Eimeria* fueron recuperados como se describió en la toma de muestra, y se almacenaron a -4°C en viales estériles para la posterior identificación molecular.

7.2.4. Análisis estadístico de los datos morfométricos

Una base de datos fue creada, a partir de las medidas de la distancia polar y ecuatorial de cada una de las especies de *Eimeria* aisladas. Para comparar los datos obtenidos, se utilizó un análisis de conglomerados con el método de Ward con una distancia euclidiana cuadrada de 100, utilizando el software Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.18 (© Statpoint Technologies, Inc. 1982-2012).

7.2.5. Identificación molecular

Las muestras aisladas fueron procesadas para la extracción del ADN total, utilizando el kit comercial ZR Fecal DNA MiniPrep™, siguiendo instrucciones del fabricante (Anexo 2), el ADN obtenido se visualizó por electroforesis (100 v por 30 min) en gel de agarosa al 1% en un transiluminador.

La PCR fue realizada bajo las siguientes condiciones: 1 U de Taq DNA Polimerasa (PROMEGA), 5ul de Buffer, 100 mM de DNTP's (PROMEGA), 2.5 nM de MgCl₂, 10 pmol de cada uno de los oligos iniciadores, 5ul de DNA y agua libre de nucleasas para alcanzar el volumen final de 25ul. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: etapa inicial de desnaturalización a 96°C por 10 minutos, 30 ciclos de, desnaturalización por 45 segundos a 96°C, hibridación 45 segundos a 61°C y elongación 1 minuto a 72°C con una etapa de elongación final de 5 minutos a 72 °C. Los primers utilizados, fueron los descritos por Oliveira (2011), Forward (5' GGG AAG TTG CGT AAA TAG A 3') y Reverse (5' CTG CGT CCT TCA TCG AT 3'), para la amplificación de un fragmento de 500 pb de la región ITS-1 de *Eimeria* spp, los amplicones obtenidos se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en un transiluminador UV.

Los fragmentos amplificados fueron purificados a partir de gel utilizando el Kit Gel DNA Recovery Zymoclean (Anexo 3) y secuenciados en un ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA).

7.2.6. Clonación y secuenciación de región ITS-1

Se realizó la clonación de los amplicones de PCR en el Vector pGEM-T Systems y se propago en células competentes de *Escherichia coli* de la cepa JM109 (Anexo 4), Las clonas positivas se confirmaron mediante PCR de colonias, usando los primers generales del género. Los plásmidos fueron purificados de las células transformadas utilizando el ilustra plasmid Prep Mini Spin Kit GE Healthcare y secuenciados en el ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems).

7.2.7. Análisis de secuencia

Se realizó una alineación múltiple de secuencias con todas las secuencias de la región ITS-1 obtenidas en este estudio comparándolas con secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank.

7.2.8. Análisis filogenético de la secuencia ITS-1

Se construyó un dendrograma de asociación genética utilizando las secuencias obtenidas en este estudio y secuencias de diferentes especies de *Eimeria* que infectan a los conejos, bovinos y aves de corral (Anexo 5). El análisis filogenético se realizó utilizando el método Neighbor joining con 1000 bootstrap en el software MEGA 7, (PSU, USA) (Kumar *et al.*, 2016).

8. Resultados

8.1. Análisis morfométrico

Se recolectaron 40 muestras de los 13 municipios que comprenden la región I del Estado de México, de las cuales se logró identificar las 11 especies de *Eimeria*, que infectan a los ovinos, de acuerdo a las características morfológicas, tomando en cuenta la forma, tamaño, presencia o ausencia del micrópilo y del tapón de micrópilo de los ooquistes esporulados (Figura 4).

Figura 4 Once especies de *Eimeria* identificadas en heces de corderos recién destetados, infectados naturalmente en granjas de pastoreo de la región suroriente del Estado de México. Fotos tomadas a través de un microscopio de luz Primotech (Carl Zeiss, Center Valley, PA, EE.UU.) con un aumento de 50x, con una cámara digital con mejora de detalles (modelo E-330; Olympus Corporation, Tokio, Japón).

Los ovinos inoculados con ooquistes infectivos de *Eimeria* excretaron ooquistes entre el día 26 al día 29 post inoculación, después de realizar el análisis coproparasitoscópico se logró recuperar de 3000 a 9000 ooquistes por gramo de heces de cada especie de *Eimeria*, cien de ellos fueron analizados morfométricamente, tomando en cuenta la distancia polar y ecuatorial de los ooquistes, los esporocistos, presencia y ausencia del micrópilo y tapón micropilar, se calculó el índice morfométrico de cada especie, Tabla 1.

Tabla 1. Identificación morfométrica de las once especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos.

Especie	Forma	Diametro del oocisto (μm)			Diametro del esporocisto (μm)			Micropilo
		Polar	Ecuatorial	MI	Polar	Ecuatorial	MI	
Con tapón del micrópilo								
<i>E. weybridgensis</i>	Elipsoide a subesférica	26.14 \pm 1.17	18.02 \pm 1.01	1.45 \pm 0.06	10.75 \pm 1.06	7.01 \pm 0.39	1.53 \pm 0.14	+
<i>E. crandallis</i>	Subesférica	26.46 \pm 1.74	19.56 \pm 1.34	1.35 \pm 0.04	10.19 \pm 1.22	7.46 \pm 0.50	1.37 \pm 0.18	+
<i>E. granulosa</i>	Elipsoide a subesférica	31.32 \pm 3.40	22.53 \pm 2.24	1.38 \pm 0.05	12.92 \pm 2.10	7.86 \pm 0.98	1.66 \pm 0.30	+
<i>E. ovina</i>	Elipsoide	29.77 \pm 1.1	19.33 \pm 0.99	1.54 \pm 0.1	10.82 \pm 1.03	7.18 \pm 0.64	1.51 \pm 0.19	+
<i>E. ahsata</i>	Elipsoide	34.80 \pm 1.97	23.34 \pm 1.23	1.49 \pm 0.06	14.27 \pm 1.84	7.88 \pm 0.69	1.82 \pm 0.29	+

<i>E. intricata</i>	Elipsoide	44.29±2.24	31.96±1.54	1.38±0.07	21.4±2.3	12.6±1.1	1.7±0.2	+
Sin tapón del micrópilo								
<i>E. pallida</i>	Elipsoide a subesférica	22.65±0.88	17±0.76	1.33±0.04	10.02±1.62	6.38±0.60	1.58±0.32	-
<i>E. parva</i>	Subesférica	22.69±2.07	20.04±2.60	1.14±0.11	9.77±2.26	7.1±0.72	1.37±0.25	-
<i>E. marsica</i>	Elipsoide	24.16±1.88	17.13±1.31	1.41±0.08	10.04±1.39	6.71±0.42	1.5±0.23	+
<i>E. ovinoidealís</i>	Elipsoide	25.36±2.17	17.61±1.33	1.44±0.13	10.08±1.54	7±0.56	1.44±0.22	+
<i>E. faurei</i>	Piriforme	27.83±1.32	19.22±1.20	1.45±0.09	11.01±0.97	7.42±0.75	1.49±0.18	+

MI: Índice Morfométrico = $\text{Ø polar}/\text{Ø equatorial}$.

El análisis de conglomerados por el método de Ward con una distancia euclidiana cuadrada de 100 agrupa las especies de *Eimeria* en 6 clusters de los cuales el cluster VI es exclusivo de las muestras correspondientes a *E. intricata*. En el cluster V se agrupan muestras pertenecientes a 2 especies: *E. granulosa* y *E. ahsata*. El cluster IV es el más pequeño, agrupa muestras de *E. marsica*, *E. ovinoidealís*, *E. weybridgensis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. ovina* y *E. intricata*. El cluster III es el que agrupa un mayor número de muestras correspondientes a *E. marsica*, *E. ovinoidealís*, *E. weybridgensis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. ovnia* y *E. ahsata*. En el cluster II se agrupan muestras de *E. pallida*, *E. parva*, *E. marsica*, *E. ovinoidealís*, *E. crandallis* y *E. granulosa*. En el cluster I se agrupan muestras de *E. pallida*, *E. marsica*, *E. ovinoidealís*, *E. weybridgensis*, *E. crandallis*, *E. faurei*, *E. granulosa* y *E. ovina*. (Figura 5).

Dendrograma

Método de ward, euclidean cuadrada

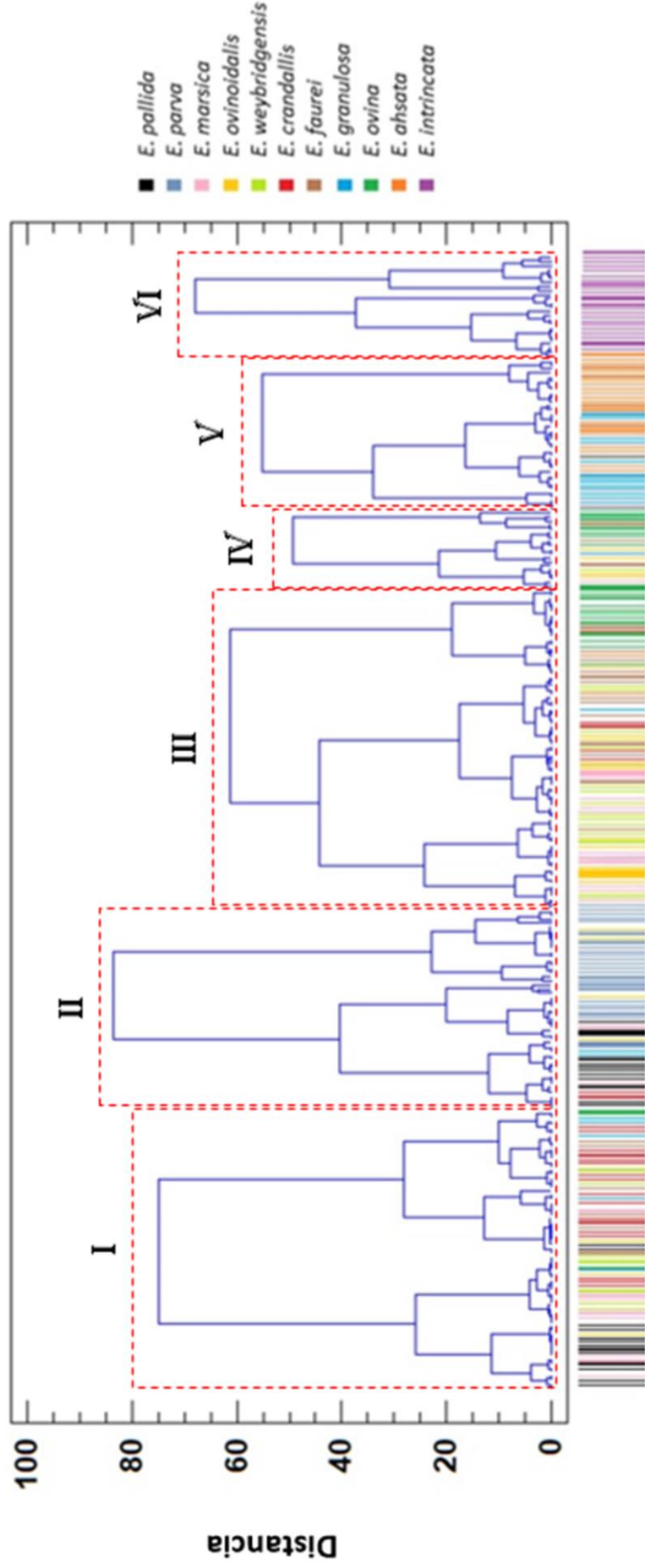


Figura 5 Análisis de conglomerados, dendrograma calculado utilizando los datos de las distancias polar y ecuatorial de cada una de las diferentes especies de *Eimeria*, usando el método de Ward.

8.2. Estudio molecular y filogenético

El DNA total fue extraído de los ooquistes caracterizados morfológicamente para cada especie, del aislado de *E. granulosa* se amplificó un fragmento de 502 pares de bases (pb), correspondientes a la región ITS 1 ARNr, de *Eimeria* spp., posteriormente los amplicones fueron purificado y clonados (Figura 6.).

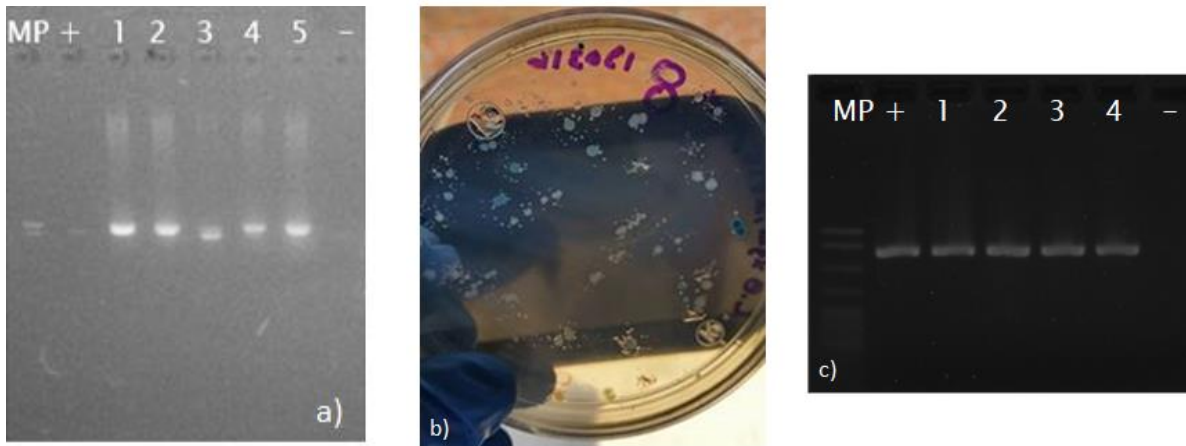


Figura 6 a) Amplicones de la región ITS-1 de las especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos. Marcador de peso molecular (MP), control positivo (+), muestras ADN fecal (1,...5), control negativo (-). b) Crecimiento de colonias con el inserto de la region ITS-1 (colonias blancas) c) amplificación del fragmento clonado de la region ITS-1. Marcador de peso molecular (MP), control positivo (+), clones (1,...4), Control negativo (-).

Las secuencias obtenidas fueron registradas en la base de datos del Genbank bajo los números de acceso: *E. ovinoidalis* MG774397, *E. faurei* MG774398, *E. weybridgensis* MG774399, *E. crandallis* MG774400, *E. ahsata* MG774401, *E. granulosa* MG836231, *E. marsica* MG836232, *E. parva* MG836233, *E. ovina* MG836234, *E. intricata* MG836235, *E. pallida* MG836236. Las cuales se compararon con las reportadas, obteniendo una similitud del 99% como valor máximo de *E. ovinoidalis* con *E. arloingi* aislada de cabras de Portugal (MF356556.1) y la menor de 89% con *E. arloingi* aislada de cabras de Irán (KC507793.1).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas por alineación múltiple para desarrollar análisis moleculares y filogenéticos utilizando el software MEGA 7 software (PSU, USA) (Kumar *et al.*, 2016)., se construyó un dendrograma de

asociación utilizando el método neighbor joining con 1000 repeticiones de bootstrap, en la figura 7 se aprecia el origen monofilético de las secuencias de este estudio, las cuales se ramifican en 2 linajes hermanos, en uno de ellos se asocia *E. crandallis*, *E. faure* y *E. weybridgensis* y en el otro el resto de las especies de *Eimeria*. Utilizando el mismo método se construyó un dendograma en el cual se observa la asociación de las especies de *Eimeria* reportadas en este estudio con las reportadas en conejos, bovinos y aves, los cuales se aprecian separados en dos clusters mamíferos y aves (Figura 8).

Figura 7 Dendrograma de asociación generado por el método Neighbor-Joining utilizando secuencias parciales de la región ITS1 de las especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos, se muestra el consenso de 1000 repeticiones de bootstrap y la especie representativa de cada secuencia.

Figura 8 Árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining utilizando secuencias parciales de la región ITS1 de las especies de *Eimeria* que infectan a los ovinos y 18 secuencias similares representativas de otras especies de *Eimeria* disponibles en el GenBank, se muestra el consenso de 1000 repeticiones de bootstrap y la especie huésped de cada parásito.

En cuanto a las relaciones filogenéticas entre las especies de *Eimeria* en ovinos, se observa la distancia máxima 0.71 entre *E. granulosa* y *E. parva*, mientras que la distancia mínima es de 0.1 entre *E. Weybridgensis* y *E. faurei*. Con respecto a las especies que infectan a los bovinos *E. weybridgensis* mostró menor distancia con *E. bovis* con 2,928 y mientras que *E. pallida* mostró una distancia máxima con *E. zuernii* de 3,596. Con las especies que infectan a los conejos se observó una distancia menor entre *E. ovinoidalis* y *E. parva* con *E. media* de 2.529 y una distancia máxima de 2.907 entre *E. intricata* y *E. stiedai*. Con las especies que infectan a las aves se observó una distancia mínima de 3.546 entre *E. praecox* y *E. ahsata*, *E. granulosa*, *E. crandallis* y *E. pallida* y una distancia máxima entre *E. parva* y *E. acervulina* de 4.280. (Tabla 2).

Tabla 2. Distancias de Kimura de 2 parámetros con el método de máxima verosimilitud compuesto. las secuencias se agruparon de acuerdo con los huéspedes de la especie *Eimeria*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<i>E. intricata</i>																
2	<i>E. ahsata</i>	0,211															
3	<i>E. ovina</i>	0,028	0,204														
4	<i>E. granulosa</i>	0,211	0,000	0,204													
5	<i>E. faurei</i>	0,034	0,211	0,005	0,211												
6	<i>E. crandliss</i>	0,211	0,000	0,204	0,000	0,211											
7	<i>E. weybridgeensis</i>	0,196	0,017	0,182	0,017	0,189	0,017										
8	<i>E. ovinoidealis</i>	0,017	0,196	0,011	0,196	0,017	0,196	0,181									
9	<i>E. marsica</i>	0,211	0,000	0,204	0,000	0,211	0,000	0,017	0,196								
10	<i>E. pallida</i>	0,017	0,196	0,011	0,196	0,017	0,196	0,181	0,000	0,196							
11	<i>E. parva</i>	0,234	0,039	0,226	0,039	0,234	0,039	0,045	0,218	0,039	0,218						
12	<i>E. zuernii</i>	3,439	3,082	3,422	3,082	3,422	3,082	2,946	3,596	3,082	3,596	3,209					
13	<i>E. bovis</i>	3,181	3,066	3,164	3,066	3,164	3,066	2,928	3,318	3,066	3,318	3,209	0,185				
14	<i>E. media</i>	2,638	2,753	2,638	2,753	2,654	2,753	2,663	2,529	2,753	2,529	2,818	3,338	3,612			
15	<i>E. stiedai</i>	2,907	2,678	2,892	2,678	2,877	2,678	2,619	2,793	2,678	2,793	2,796	3,008	2,805	0,494		
16	<i>E. praecox</i>	3,789	3,546	3,800	3,546	3,800	3,546	3,615	3,654	3,546	3,654	3,875	4,185	4,214	2,801	4,036	
17	<i>E. acervulina</i>	4,200	3,840	4,204	3,840	4,204	3,840	3,989	4,049	3,840	4,049	4,280	3,371	3,374	3,368	4,987	0,278

Artículo

This screenshot shows a Yahoo! Mail inbox with a selected email titled "Submission Confirmation". The email is from "Int J Parasitol" and is addressed to "lin_bag@yahoo.com.mx". The content of the email includes a greeting to Dr. Bautista, a confirmation that the submission "Morphological characterization and first molecular identification of the eleven Eimeria species that infect sheep from Mexico" has been received by the International Journal for Parasitology. It provides instructions on how to log in to the Elsevier Editorial System, including the URL <https://ees.elsevier.com/ijpara/>, the username lin_bag@yahoo.com.mx, and a link to retrieve password details. It also states that a manuscript reference number will be assigned and provides contact information for editorial assistance: editor@ijp.org.au and a technical support site at <http://help.elsevier.com/aso/answers/list/67923>. The email is dated "1 mar a las 15:46".

This screenshot shows a Yahoo! Mail inbox with a selected email titled "A manuscript number has been assigned: IJPara18_086". The email is from "Int J Parasitol" and is addressed to "lin_bag@yahoo.com.mx". The content includes a greeting to Dr. Bautista, a confirmation that the submission "Morphological characterization and first molecular identification of the eleven Eimeria species that infect sheep from Mexico" has been assigned the manuscript number "IJPara18_086". It provides the same login instructions as the previous email, including the URL <https://ees.elsevier.com/ijpara/>, the username lin_bag@yahoo.com.mx, and a link to retrieve password details. It also provides contact information for editorial assistance: editor@ijp.org.au and a technical support site at <http://help.elsevier.com/aso/answers/list/67923>. The email is dated "1 mar a las 16:25".

9. Conclusión

En este trabajo se ha reportado por primera vez a nivel mundial la secuencia de la región ITS1 de las once especies de *Eimeria* que afectan a los ovinos

La región ITS1 permite la identificación específica y la elaboración de estudios filogenéticos de las once especies de *Eimeria* en ovinos.

Las diferencias morfométricas de los ooquistes de *Eimeria* no permiten la identificación específica de cada especie como se corrobora al realizar un estudio de conglomerados por el método de Ward.

10. Bibliografía

- Ahid, S. M. M., Medeiros, V. M. C., Bezerra, A. C. D. S., Maia, M. B., Xavier, V. M., & da Silva Vieira, L. (2009). Espécies do gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) em pequenos ruminantes na mesorregião oeste do estado do rio grande do norte, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, 10(3), 984-989.
- Ajayi, J., Todd, A., (1977) "Prevalence of ovine coccidian in two University of Wisconsin farms and the prepatent periods of eight species" en *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*. V. 25 N.3 pp. 257-261.
- Andrade Júnior, A. L. F. D., Silva, P. C. D., Aguiar, E. M. D., & Santos, F. G. D. A. (2012). Use of coccidiostat in mineral salt and study on ovine eimeriosis. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*, 21(1), 16-21.
- Andrews, a. H., 2013. Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 110, 93–95. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.11.011
- Arru, E., Leoni, A., Garippa, G., (1984) "Coccidiosis in small ruminants. Atti della Societa Italiana delle" en *Scienze Veterinarie*. Vol 38 755-758.
- Arteaga, C.,(2012) "Situación actual de la ovinocultura en México" en *VII Foro Ovino del Estado de México. INIFAP. ICAMEX*.
- Augustine, P.C., 2001. Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1–8.
- Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Bush AO, Fernandez JC, Esch GW, Seed JR (2001) Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Chapter 3, the Protozoa. Cambridge University Press, Cambridge, pp 42–102
- Beck, H. P., Blake, D., Dardé, M. L., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Bautista, M., Mora, L., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir, W., 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 39, 175–89. doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.001

- Belli, S.I., Smith, N.C., Ferguson, D.J.P., 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends Parasitol.* 22, 416–423. doi:10.1016/j.pt.2006.07.004
- Berriatua, E., Gibson, W., Morgan, K., (1995) “Development of DNA probes for the ovine *Eimeria* species *E. crandallii* and *E. ovinoidalis*” en *ParasitolRes.* V. 81 N. 3 pp. 222-229.
- Berriatua, E., Green, L., Morgan, K., (1994) “A descriptive epidemiological study of coccidiosis in early lambing housed flocks” en *Vet. Parasitol* V. 54 pp. 337-351.
- Blake, D.P., Qin, Z., Cai, J., Smith, A.L., 2008. Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. *Avian Pathol.* 37, 89–94.
- Bowman, D.D., 2014. *Georgis’ Parasitology for Veterinarians*, 10th ed. Elsevier, China.
- Catchpole, J., Norton, C.C., Joyner, L.P. 1976. Experiments with defined multispecific coccidial infections in lambs. – *Parasitology* 72 (2), p.137–147.
- Chartier, C., 2009. In: *Le Point Vétérinaire* (Ed.), *Pathologie caprine: du diagnostic à la prévention*. Wolters-Kluwer France, Rueil-Malmaison, p. 325
- Chartier, C., Paraud, C., 2012. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Rumin. Res.* 103, 84–92. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.10.022
- Chroust, K., Horak, F., Zizlavsky, J., Zizlavsla, S., (1998) “The course and control of parasitoses in mixed grazing of sheep and cattle” en *Vet. Med. (Praque)*, V. 43 N. 5pp. 153-159.
- Díez, C., Martínez, A., Hidalgo, M., (2006) “Estudio parasitológico del ganado ovino en la provincia de león (españa) mediante análisis coprológico” en Díez, P. (coord) *actas del XIV Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes*, Lugo-Santiago de Compostela, 12-15 de julio de 2006. pp. 380-383.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N., 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28, 1007–13.

- Duszynski, D., Upton, S., (2001) “*Cyclospora, Eimeria, Isospora, and Cryptosporidium* spp. en *Samuel W.M., Pybus, M., Kocan, A. Editions. Parasitic Diseases of Wild Mammals. Iowa State University Press. pp. 416-459.*
- Echavarría, Ch., Serna, P., Bañuelos, V., (2007)“Influencia del sistema de pastoreo con pequeños rumiantes en un agostadero del semiárido Zacatecano: II cambios en el suelo”en *Tec Pecu Mex. V. 45 N. 2 pp.177-194.*
- Entzeroth, R., Mattig, F.R., Werner-Meier, R., 1998. Structure and function of the parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. *Int. J. Parasitol.* 28, 1015–8.
- Esqueda, C., Gutiérrez, R., (2009)“Producción de ovinos de pelo bajo condiciones de pastoreo extensivo en el norte de México” en Libro Técnico N. 3 Centro de Investigación Regional del Norte Centro INIFAP.
- Fayer, R., (1980) “Epidemiology of protozoan infections: The coccidia” en *Vet Parasitol. V. 6 pp. 75-103*
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. OECD-FAO Agricultural Outlook 2012-2021.
- Foreyt, W., (1986) “Epidemiology and control of coccidian in sheep”en *Veterinary Clinics of North America: Food animal Practice. V. 2 N. 2 pp. 383-388.*
- Gjerde, B., Helle, O., 1991. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet. Parasitol.* 38, 97–107.
- Gómez, M., (2013) “Red de valor para la industria de la carne ovina en México: Integración Productiva” en *Memoria del I Foro Panamericano Ovino. Santiago de Querétaro, Qro.*
- Gómez, S., Gozal, A., Lopez-Guerrero, E., Rojo-Vazquez, F., (1998) “A parasitological survey of sheep flocks on Mallorca island” en *Medicina Veterinaria V. 15 N. 9 pp. 483-489.*
- Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir,
- González, G., Blardony, R., Ramos, J., Ramírez, H., Sosa, R., Gaona, P., (2013) “Rentabilidad de la producción de carne de ovinos Katahdin x Pelibuey

con tres tipos de alimentación” en *Avances en Investigación Agropecuaria* V. 17 N. 1 pp. 135-148.

- Gordon HMcl, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res* 1939; 12: 50-52.
- Gorski, P., Niznikowski, R., Popielarczyk, D., Strzelec, E., Gajewska, A., Wedrychowicz, H., (2004) “Prevalence of protozoan and internal parasite infections in goat and sheep flocks in Poland” en *Arch. Tierz., special issue* pp. 43-49.
- Gul, A. (2007) “The prevalence of *Eimeria* species in goats in Igdir” en *Turk J Vet Anim Sci.* V. 31 N. 6 pp. 411-414.
- Harper, C.K., Penzhorn, B.L., 1999. Occurrence and diversity of coccidia in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Vet. Parasitol.* 82, 1–9.
- Helle, O., (1970) “Winter resistant oocysts in the pasture as a source of coccidial infection in lambs” en *Acta Vet. Scand.* V.11 pp. 545-564.
- Hendrix, C.M., Robinson, E., 2012. *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*, 4th ed. Elsevier, United States of America.
- Hernández, I., Mendoza, N., (2002) “Time of Sporulation for Several Species of *Eimeria* in Goats: an In Vitro Assessment” en *Rev Cient FCV-LUZ.* V. 12 N. 1 pp. 24-28.
- Hidalgo, M., Cordero, M., (1996) “Coccidiosis: biological cycle and epidemiology” en *Med. Vet.* V. 22, pp. 453-466.
- Hovarti, G., Varga, I., (1986) “A survey of ovine coccidiosis in Hungary” en *Magyar Allatorvosok Lapja*, V. 41 N. 5 pp.3297-3300.
- Iqbal, a., Tariq, K. a., Wazir, V.S., Singh, R., 2012. Antiparasitic efficacy of *Artemisia absinthium*, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. *J. Parasit. Dis.* doi:10.1007/s12639-012-0137-9
- Johnson. D.,(2005)“Evaluating the Profitability of Hair Sheep Production on Texas Rangelands”en *North American Hair Sheep Symposium. Texas Coop. Ext. Texas A & M Univ. San Angelo, TX.*

- Jolley, W., Bardsley, K., (2006) "Ruminant coccidiosis" en *Vet Clin North Am Food Anim PractV.* 22 pp. 613-21.
- Kawahara, F., Zhang, G., Mingala, C.N., Tamura, Y., Koiwa, M., Onuma, M., Nunoya, T., 2010. Genetic analysis and development of species specific PCR assays based on ITS1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. *Vet. Parasitol.* 174, 49–57.
- Kaya, G., (2004) "Prevalence of *Eimeria* species in lambs in Antakya province" en *Turk J Vet Anim Sci.* V. 28 pp. 687-692.
- Khodakaram-Tafti, A., Hashemnia, M., Razavi, S. M., Sharifiyazdi, H., & Nazifi, S. (2013). Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Eimeria arloingi* in Iranian native kids. *Parasitology research*, 112(9), 3187-3192.
- Kommuru, D.S., Barker, T., Desai, S., Burke, J.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Miller, J.E., Mosjidis, J. a, Kamisetti, N., Terrill, T.H., 2014. Use of pelleted sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) for natural control of coccidia and gastrointestinal nematodes in weaned goats. *Vet. Parasitol.* 204, 191–198. doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.017
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kvičerová, J., Pakandl, M., & Hypša, V. (2008). Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp.(Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology*, 135(4), 443-452.
- Lassen, B., Jarvis, T., & Mägi, E. (2013). gastrointestinal parasites of sheep on estonian islands. *Agraarteadus*, 24(1).
- Levine N. (Ed.). 1985. In: *Veterinary Protozoology*. Iowa. The Iowa University State Press, p. 130–232.
- Li, H., Shen, M., Hou, Z., Yin, X. (2016). Morphology and Molecular Identification of the *Eimeria* spp. in Domestic Rabbits. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(1), 289-291.

- Lima Melo, A., Romero Callejas, E., & Tapia Perez, G. (1995). Diagnostics and identification of the different *Eimeria* species in sheep of the Valley of Mexico. *Veterinaria Mexico* (Mexico).
- Long, P.L., Joyner, L.P., 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J. Protozool.* 31, 535–541.
- Mage, C., (1995) “Coccidiose subclinique chez des agneaux de bergerie prevention avec le décoquinate” en *GTVN*. 171 pp. 59-64.
- Malo, E. del C., 2013. Coccidiosis : La enfermedad , consecuencias y tratamiento, in: Congreso Científico de Avicultura.
- Maratea, K.A., Miller, M.A., 2007. Abomasal coccidiosis associated with proliferative abomasitis in a sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 118–121
- McKenna, P., (1972) “The identity and prevalence of coccidia species in sheep and cattle in New Zealand” en *New Zealand Veterinary Journal* N. 20 N. 12 pp. 225-228.
- Medrano, J., (2000) “Recursos animales locales del centro de México” en *Arch. Zootec.* V. 49 pp. 385-390.
- Mohammed, R.A., Idris, O.A., el Sanousi, S.M., Abdelsalam, E.B., 2000. The effect of coccidian infection on the gut microflora of Nubian goat kids. *DTW. Dtsch. tier{ä}rztliche Wochenschrift* 107, 414–416.
- Molnár, K., Ostoros, G., Dunams-Morel, D., & Rosenthal, B. M. (2012). *Eimeria* that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. *Infection, genetics and evolution*, 12(8), 1810-1815.
- Morgan, J.A., Morris, G.M., Wlodek, B.M., Byrnes, R., Jenner, M., Constantinoiu, C.C., Anderson, G.R., Lew-Tabor, A.E., Molloy, J.B., Gasser, R.B., Jorgensen, W.K., 2009. Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. *Mol. Cell. Probes.* 23, 83–89.
- Morris, S., (2009) “Economics of sheep production” en *Small. Ruminant Research.* V. 86 pp. 59-62.

- Müller, J., Hemphill, A., 2013. In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 43, 115–24. doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.004
- Nahavandi, K. H., Mahvi, A. H., Mohebbali, M., Keshavarz, H., Rezaei, S., Mirjalali, H., ... & Rezaeian, M. (2016). Molecular typing of *Eimeria* ahsata and *E. crandallis* isolated from slaughterhouse wastewater. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(4).
- Nahed-Toral, J., Lopez, Q., Mendoza, G., Aluja, A., Frigo, F., (2003) “Epidemiology of parasitosis in the Tzotzil sheep production system” en *Small Ruminant Research* V. 49 N. 2 pp. 199-206.
- Nieto, R., Sánchez, M., Mejía, O., Olivares, L., Peralta, J., Cordero, J., Molina, P., Cárdenas, M., (2010) “Grasa de sobrepeso con diferente espesor de grasa dorsal, respuesta hormonal y principales variables reproductivas” en *Revista Científica FCV*. 20N. 6 pp. 665-673.
- Oakes, R.D., Kurian, D., Bromley, E., Ward, C., Lal, K., Blake, D.P., Reid, A.J., Pain, A., Sinden, R.E., Wastling, J.M., Tomley, F.M., 2013. The rhoptry proteome of *Eimeria* tenella sporozoites. *Int. J. Parasitol.* 43, 181–8. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.024
- Oliveira, U.C., Fraga, J.S., Licois, D., Pakandl, M., Gruber, A., 2011. Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Parasitol.*, 176, 275-280.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), FAOSTAT. 2014. Producción, Consumo, Comercio. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/S> Consultado 10 de octubre de 2015.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2010. http://www.3tres3.com/buscando/fao-evolucion-mundial-delconsumo-de-carne_30869/ Consultado 10 de octubre de 2015.
- Ortíz, M., Hernández, J., Rebollar, S., Guzmán, E., González, F., (2012) “La producción y comercialización de los ovinos en el sur del Estado de México”

en 13er. Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria.

- Pérez-Fonseca, A., Alcalá-Canto, Y., Salem, A. Z., & Alberti-Navarro, A. B. (2016). Anticoccidial efficacy of naringenin and a grapefruit peel extract in growing lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. *Veterinary parasitology*, 232, 58-65.
- Pfister, K., Flury, B., (1985). "Kokzidiose beim Schaf" en *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde* V. 127 pp. 433-441.
- Platzer, B., Prsol, M., Cieslicki, A., Joachim, L., (2005) "Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril" en *Vet. Parasitol.* V. 129 pp. 1-9.
- Reeg, K., Gauly, M., Bauer, C., Mertens, C., Erhardt, G., Zahner, H., (2005) "Coccidial infections in housed lambs: oocyst excretion, antibody levels and genetic influences on the infection" en *Vet. Parasitol* V.127 pp. 209-219.
- Reyes, I., Benitez, R., Martinez, P., Lucas Tron, J. D., & Perez Razo, M. A. (1996). Coccidiosis study in transhumance flocks of Xalatlaco, Mex., Mexico. In Reunion Nacional de Investigacion Pecuaria, Cuernavaca, Morelos,(Mexico), 2-4 Dic 1996.
- Reza, K., Saeid, R., Zeinab, P., Yadegari, S., (2014) "Prevalence and pathology of coccidiosis in goats in southeastern Iran" en *J Parasit Dis.* V. 38 N. 1 pp. 27-31.
- Roberts, L.S., Janovy, J.J., 2009. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology, EIGHTH. ed. McGraw Hill, New York, USA.
- Roger, I., Rodríguez, V., Ligia, A., Galera, J., Domínguez, L., (2001) "Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México" en *Rev Biomed* Vol. 12 pp. 19-25.
- Royo, M., Sierra, J., Morales, C., Carrillo, R., Melgoza, A., Jurado, P., (2008) "Estudios Ecológicos de Pastizales. En: Rancho Experimental la Campana 50 años de Investigación y Transferencia de Tecnología en Pastizales y Producción Animal" en *Libro Técnico No. 2. INIFAP. Centro de*

Investigación Regional Norte-Centro. Sitio Exp. Campana-Madera. Chihuahua, Méx. Cap III pp. 23-70.

- Salas, G., Quiroz Romero, H., Ortiz, H., Ramirez, G., & Ochoa Galvan, P. (1996). [Prevalence and intensity of *Eimeria* spp in sheep in CEIEPO Morelos State [Mexico]]. In Reunion Nacional de Investigacion Pecuaria, Cuernavaca, Morelos,(Mexico), 2-4 Dic 1996
- Schneider, D., Ayeni, A., Dürr, U., (1972) “Sammelreferat: Zur physikalischen Resistenz der Kokzidienoocysten. Physical resistance of coccidian oocysts” en *Dtsch. tierärztl. Wschr.* V. 79 pp. 545-572.
- Schnitzler, B.E., Thebo, P.L., Tomley, F.M., Uggla, A., Shirley, M.W., 1999. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathol.* 28, 89–93.
- Secretaria de desarrollo agropecuario SEDAGRO. (2013). [http://sedagro.edomex.gob.mx/sites/sedagro.edomex.gob.mx/files/files/Productores%20y%20Comercializadores/009%20Amecameca\(1\).pdf](http://sedagro.edomex.gob.mx/sites/sedagro.edomex.gob.mx/files/files/Productores%20y%20Comercializadores/009%20Amecameca(1).pdf) Consultado 10 de octubre de 2015.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca (SIAP). 2014. Fuente: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/> Consultado 22 de octubre de 2015
- Sievers, G., Jara, M., Cardenas, C., Nuñez, J., (2002) “Estudio anual de la eliminación de huevos y ooquistes de parásitos gastrointestinales y larvas de nemátodos pulmonares en ovinos de una estancia en Magallanes, Chile” en *Arch. Med. Vet.* V.34 N.1 pp. 37-47.
- Silva FRC, Souza JD, Fialho CG, Escopeli KS, Araújo FAP. Identificação das espécies de *Eimeria* spp. em ovinos no município de Mostardas/RS. *Vet Foco* 2008; 6(1): 16-20.
- Silva, L. M., Chávez-Maya, F., Macdonald, S., Pegg, E., Blake, D. P., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2017). A newly described strain of *Eimeria arloingi* (strain A) belongs to the phylogenetic group of ruminant-infecting pathogenic species, which replicate in host endothelial cells in vivo. *Veterinary parasitology*, 248, 28-32.

- Silva, T., Facury, E., Ferreira, P., Carvalho, A., (2008) “Dynamics of *Eimeria* spp natural infections in Santa Inês lambs reared under semi-intensive exploitation condition at the north of Minas Gerais State, Brazil” en *World Buiatrics Congress 2008, Budapest, Hungary*, July pp. 6-11.
- Souza, L. E. B. D., Cruz, J. F. D., Neto, T., Rezende, M., Albuquerque, G. R., Melo, A. D. B., & Tapia, D. M. T. (2015). Epidemiology of *Eimeria* infections in sheep raised extensively in a semiarid region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(4), 410-415.
- Tafti, A., Mansourian, M., (2008) “Pathologic lesions of naturally occurring coccidiosis in sheep and goats” en *Comp Clin Pathol*. V. 17 N. 2 pp. 87-91.
- Taylor, M., (1995) “Diagnosis and control of coccidiosis in sheep” en *Pract VetV*. 17 pp. 172-177.
- Taylor, M., Coop, R., Wall, R., (2007) “Veterinary Parasitology” en *Sheep coccidia. Third Edition*. Pp. 175-184.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Veterinary Parasitology*, Third. ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Toulah, F. H. (2007). Prevalence and comparative morphological study of four *Eimeria* sp. of sheep in Jeddah area, Saudi Arabia. *J Biol Sci*, 7(2), 413-416.
- Ueno H, Gonçalves PC. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4nd ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998.
- Veira, L. da S., 2002. Eimeriose de pequenos ruminantes- panorama da pesquisa no Nordeste do Brasil. *Embrapa Caprinos* 1–23.
- Vieira, L. S.; Cavalcante, A, C. R.; Ximenes, L. J. F. Evolution of infection with *Eimeria* species in hair sheep reared in Sobral, Ceara State, Brazil. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 150, n. 6, p. 547-550, 1999.
- Woods, W.G., Richards, G., Whithear, K.G., Anderson, G.R., Jorgensen, W.K., Gasser, R.B., 2000. High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation. *Electrophoresis* 21, 3558–3563.
- Yan, W., Wang, W., Wang, T., Suo, X., Qian, W., Wang, S., Fan, D., 2013. Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in

rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments. *Vet. Parasitol.* 193, 284-288.

- Yang, R., Jacobson, C., Gardner, G., Carmichael, I., Campbell, A., Ryan, U. (2014) “Longitudinal prevalence, oocyst shedding and molecular characterisation of *Eimeria* species in sheep across four states in Australia” en *Experimental Parasitology* V. 145 pp. 14-21.
- Zygoiannis, D., (2006)“Sheep production in the world and in Greece”en *Small Ruminant Research*V. 62 pp. 143-147.

11. Anexos

Anexo 1. Técnica de Mc Máster

Procedimiento

- 1.- Se pesaron 2 g de las heces de diferentes partes de la muestra.
- 2.- Se agregó solución salina saturada de cloruro de sodio NaCl hasta obtener un volumen de 30 ml.
- 3.- Se agito y mezclo la muestra con la solución saturada de cloruro de sodio NaCl.
- 4.- Se homogenizo utilizando un agitador.
- 5.- Se tomó con el gotero una muestra del sobrenadante y se colocó en la cámara de Mc Máster evitando la formación de burbujas de aire.
- 6.- Se dejó reposando durante cinco minutos, para que los ooquistes flotaran hacia la parte superior y se pegaran al cubreobjetos de la cámara.
- 7.- Se observaron al microscopio con el objetivo 10X.

Anexo 2. Instrucciones del fabricante del kit Fecal Microbe DNA (Zymo Research®)

Procedimiento

Paso 1

Agregue hasta 250 mg de muestra de suelo a un tubo de lisis.

Añadir 750 µl de Solución de Lisis el tubo.

Paso 2

Asegurarse de que el tubo de 2 ml este perfectamente cerrado y se agita a velocidad máxima durante 5 minutos.

Paso 3

Se centrifuga el tubo de lisis (ZR BashingBead™) en una micro centrífuga a 10.000 rpm durante 1 minuto.

Paso 4

Se transfieren 400 µl sobrenadante a una columna con tapa color naranja (Zymo - Spin™ IV) en un tubo de recolección y se centrifuga a 7000 rpm durante 1 minuto.

Paso 5

Añadir 1200 µl de Buffer unión de DNA al filtrado del tubo de recolección.

Paso 6

Transferir 800 µl de la mezcla del paso 5 a columna transparente (Zymo-Spin™ CII) y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto.

Paso 7

Deseche el filtrado y repita el paso 6.

Paso 8

Añadir 200 µl de Buffer prelavado ADN al Zymo -Spin™ IIC columna en y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto.

Paso 9

Añadir 500 µl de tampón de lavado de ADN a la Zymo -Spin™ CII columna y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto.

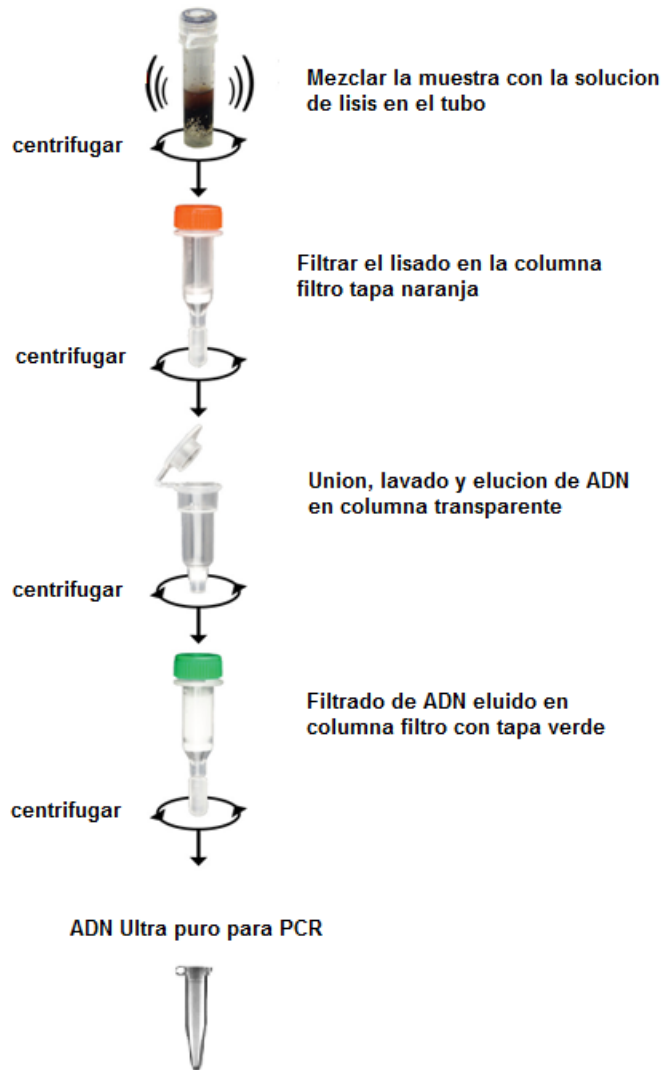
Paso 10

Transferir el Zymo -Spin™ IIC columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio y nuevo, se añade 100 µl (25 µl mínimo) de tampón elución de ADN directamente a la matriz de la columna. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos para eluir el ADN.

Paso 11

Transferir el ADN eluido del paso 10 a columna verde (Zymo-Spin™ IV–HRC) dentro de un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml limpio y nuevo, se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto. El ADN filtrado es ahora adecuado para las aplicaciones posteriores de PCR.

Procedimiento de extracción de ADN CON kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep



Anexo 3. Instrucciones del fabricante del Kit Gel DNA Recovery Zymoclean™

Procedimiento

Paso 1

Se realiza a partir de la extracción del fragmento de ADN en el gel de agarosa utilizando una cuchilla de bisturí, escalpelo u otro dispositivo, se transfiere en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.

Paso 2

Añadir 3 volúmenes de ADB por cada volumen de gel de agarosa.

Paso 3

Se incuba a 37-55 ° C durante 5-10 minutos hasta que la porción de gel este completamente disuelto. Para fragmentos de ADN > 8 Kb, después de la etapa de incubación, añadir un volumen adicional (igual a la de la porción de gel) de agua a la mezcla para una mejor recuperación de ADN (por ejemplo, 100 µl de agarosa, 300 µl ABD, y 100 µl de agua).

Paso 4

Transfiera la solución de agarosa fundida a una columna Zymo-Spin™ en un tubo de recolección.

Paso 5

Centrifugar durante 30-60 segundos.

Deseche el filtrado.

Paso 6

Añadir 200 µl de tampón de lavado de ADN a la columna y centrifugar durante 30 segundos.

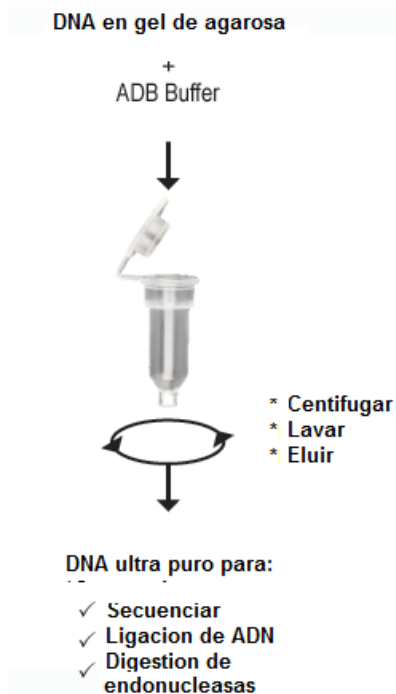
Deseche el filtrado.

Repetir la etapa de lavado.

Paso 7

Colocar la columna en un tubo de 1,5 ml y centrifugar durante 30-60 segundos para eluir el ADN. Añadir $\geq 6 \mu\text{l}$ de buffer elución de ADN directamente a la matriz de la columna.

ADN ultra puro ahora está listo para su uso.



Anexo 4. Proceso de clonación de amplicones de PCR

1.- Se realiza gel de agarosa 2x para la obtención de amplicones que se utilizaran en el proceso de purificación (el tamaño es específico por fragmento). Se cargan de 20 a 40 µl del producto de PCR por pozo y se realiza la electroforesis.

Posteriormente se visualiza el gel en lámpara U.V y se tiñe con bromuro de etidio.

Los fragmentos amplificados se cortan con una navaja de bisturí y se colocan en un vial eppendorf de 2 ml.

2.- Purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa instrucciones según Kit de purificación de ADN Zymoclean™.

3.- Ligación

*Kit PGEM-T Easy vector System I

3.1.- Se realiza cálculos de concentración para calcular el mix, con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Kb inserto}}{\text{Kb vector}} \times \text{ng del vector}$$

Donde:

Kb inserto: tamaño del amplicón

Kb vector: tamaño de vector (referirse a la hoja)

ng del vector: concentración (pGEM-T Easy Vector)

$$\frac{0.3 \text{ kb}}{3 \text{ kb}} \times 50 \text{ ng del vector} = 5 \text{ ng (ng de inserto necesario 1:1)}$$

Proporción 1:3 es decir 50 ng vector – 15 ng de inserto.

+Las bandas que se observan intensas necesitan aproximadamente 2µl, para bandas más tenues pueden utilizarse hasta 5µl.

*El buffer se encuentra muy diluido por lo que el porcentaje del agua es aprovechado para sustituirlo.

3.2.- Incubar 12-24 horas a 37.5 °C con movimiento.

4.- Transformación

4.1.- Descongelar en hielo las células competentes.

4.2.- Agregar 6µl del ligado y 100µl de células.

Porque:

50 ng/µl = 5 ng/µl

30 ng del ligado del DNA= 6 µl

4.3.- Se les da un golpecito a los viales y se incuban 30 minutos en hielo.

4.4.- El shock térmico se realiza a 42°C durante 1 minuto en baño maría.

4.5.- Se deja en hielo 2 minutos.

4.6.- Se ajusta a 1 ml (900 µl de medio LB o Luria Bertani líquido y 100µl del ligado). Colocar el medio LB con las muestras en el hielo.

4.7.- Incubar 1 hora a 37.5°C en movimiento.

4.8.- Se centrifuga 10 minutos a 3,600 rpm.

4.9.- El pellet se resuspende en 200µl del mismo medio, lo demás es desechado.

4.10.- Se plaquean 100 µl en una placa con LB, IPTG'S, X-Gal y ampicilina.

4.11.- Incubar de 12-24 horas.

5. Se crea un stock de clonas (colonias blancas) en una sola placa de LB, en este caso se seleccionaron 5 colonias.

6.- Se toma ½ colonia de un lado y ½ de la misma con una punta de 20 µl. La primera mitad se siembra en la placa y la otra mitad se sumerge en 900µl de agua inyectable.

7.- Mezclar los viales por pipeteo.

8.- Lisar mediante calor con un ciclo de 94°C por 10 minutos y 4α.

9.- Realizar mix con 5 μl de células lisadas.

10.- Cálculo de concentración y mix para PCR.

Mix	1 Rx
DNA	5 μl
Taq pol	0.2 μl
d'NTPS	2 μl
Primers	0.4 μl x 2= 0.8 μl
Buffer	2 μl
MgCl ₂	1 μl
Agua L.N.	9 μl

Programa de PCR

94°C x 5 minutos
94°C x 30 seg } 30 ciclos
T.M x 30 seg }
72 °C x 40 seg }
72 °C x 5 minutos }

10.1 Se visualiza en gel de agarosa 3x.

11.- Preparación del stock.

11.1.- Se escogen las colonias que mejor se visualizan en el gel de agarosa que en este caso se elige una.

11.2.- Se crecen en LB líquido y ampicilina, que para este caso se tiene un volumen de 230 ml y requiere de 345 μl.

11.3.- Se adiciona 7 ml de LB por colonia y se incuban de 12 a 24 horas, con los tubos inclinados.

11.4.- En el caso del stock se toma 1.5 μl de LB que se quedó incubando, se coloca en un vial y se centrifuga a 3,600 rxm durante 8 minutos, se decanta y se coloca nuevo medio LB y ampicilina con glicerol al 16% y se almacena (-4°C).

12.- Preparación de la miniprep.

* Se procesa con el kit Vivantis GF1-Plasmid DNA Extraction Kit, según las instrucciones del fabricante.

13.- Realizar electroforesis en un gel 3x para visualizar el plásmido.

Mix de carga:

2 μ l de colorante 5x

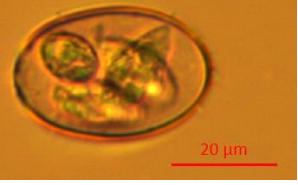

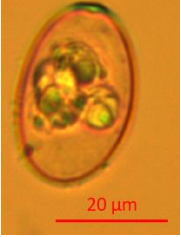

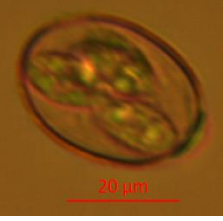
4 μ l de muestra

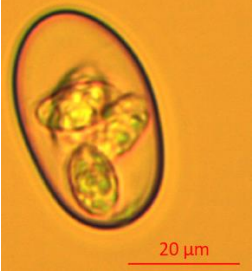
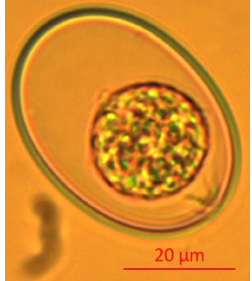
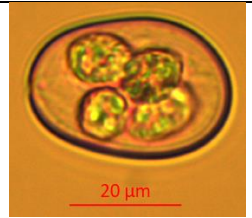
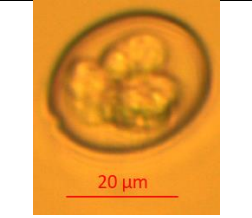
2 μ l de Agua libre de nucleasas

Anexo 5. Secuencias utilizadas para el análisis filogenético de la secuencia ITS-1.

Nº de acceso	Especie	Hospedero	País	Autor
JX406875	<i>Eimeria irresidua</i>	Conejo	China	Yan <i>et al.</i> , 2013
JX406874	<i>Eimeria intestinalis</i>	Conejo	China	Yan <i>et al.</i> , 2013
JX406876	<i>Eimeria magna</i>	Conejo	China	Yan <i>et al.</i> , 2013
JX406877	<i>Eimeria media</i>	Conejo	China	Yan <i>et al.</i> , 2013
JQ328190	<i>Eimeria stiedai</i>	Conejo	China	Yan <i>et al.</i> , 2013
AB557610	<i>Eimeria auburnensis</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
AB557626	<i>Eimeria sp.</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
AB557620	<i>Eimeria ellipsoidalis</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
AB557627	<i>Eimeria sp.</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
AB557616	<i>Eimeria cylindrica</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
AB557613	<i>Eimeria bovis</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
AB557624	<i>Eimeria zuernii</i>	Bovino	Japón	Kawahara <i>et al.</i> , 2010
KU351714	<i>Eimeria illinoisensis</i>	Bovino	Turquía	Yildirim <i>et al.</i> , 2016
AF027726	<i>Eimeria maxima</i>	Aves	EE.UU.	Martin <i>et al.</i> , 2001
AF027722	<i>Eimeria maxima</i>	Aves	EE.UU.	Martin <i>et al.</i> , 2001
AF026384	<i>Eimeria acervulina</i>	Aves	Suecia	Schnitzler <i>et al.</i> , 1998
AF065092	<i>Eimeria praecox</i>	Aves	Suecia	Schnitzler <i>et al.</i> , 2002
AF026383	<i>Eimeria brunetti</i>	Aves	Suecia	Schnitzler <i>et al.</i> , 1998
JQ235842	<i>Toxoplasma gondii</i>	Aves	China	Wang <i>et al.</i> , 2012
JN634857	<i>Neospora caninum</i>	Bovino	China	Yang <i>et al.</i> , 2012
HM538253	<i>Theileria parva</i>	Caprino	China	Wang <i>et al.</i> , 2010
AB112337	<i>Babesia microti</i>	Hamster	Taiwán y Japón	Saito-Ito <i>et al.</i> , 2009

Anexo 6. Especies del género *Eimeria* sin clasificación taxonómica en ovinos.

Especie	Diámetro polar	Diámetro ecuatorial	Esquema
<i>Eimeria</i> sp. 1	38.46	26.51	
<i>Eimeria</i> sp. 2	41.90	27.58	
<i>Eimeria</i> sp. 3	34.16	21.60	
<i>Eimeria</i> sp. 4	37.90	27.13	
<i>Eimeria</i> sp. 5	37.57	26.40	

<i>Eimeria</i> sp. 6	40.87	24.83	 Micrograph showing a single oocyst of <i>Eimeria</i> sp. 6. The oocyst is oval-shaped and contains four distinct sporozoites, each with a visible nucleus and flagella. A red scale bar at the bottom right indicates 20 μm.
<i>Eimeria</i> sp. 7	47.72	34.37	 Micrograph showing a single oocyst of <i>Eimeria</i> sp. 7. The oocyst is oval-shaped and contains a single, large macrogamete with a granular internal structure. A red scale bar at the bottom right indicates 20 μm.
<i>Eimeria</i> sp. 8	38.70	27.45	 Micrograph showing a single oocyst of <i>Eimeria</i> sp. 8. The oocyst is oval-shaped and contains four distinct sporozoites, each with a visible nucleus and flagella. A red scale bar at the bottom right indicates 20 μm.
<i>Eimeria</i> sp. 9	30.18	24.64	 Micrograph showing a single oocyst of <i>Eimeria</i> sp. 9. The oocyst is oval-shaped and contains four distinct sporozoites, each with a visible nucleus and flagella. A red scale bar at the bottom right indicates 20 μm.