

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Evaluación de la presencia de
Babesia sp. en ovinos del municipio
de Montelíbano, Departamento de
Córdoba, Colombia.**

Luis Eduardo Carvajal Navarro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2018

Evaluación de la presencia de *Babesia sp.* en ovinos del municipio de Montelíbano, Departamento de Córdoba, Colombia.

Luis Eduardo Carvajal Navarro

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Microbiología

Director:

MV, Ph.D., Jimmy Jolman Vargas Duarte

Codirector:

Ph.D., Carlos Esteban Suarez Bartolomé

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Control Genético en Salud Animal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2018

Quiero dedicar este trabajo a mi madre Betty Amanda Navarro Álvarez, a mi hermana Ana Milena Carvajal Navarro y a mi padre Luis Eduardo Carvajal Navas quienes con gran esfuerzo han guiado mi camino hasta el día de hoy. A mi vieja por sus grandes consejos, a mi viejo por que más que un papá, es mi amigo y a mi hermana quien me conoce como la palma de su mano.

Agradecimientos

Quiero agradecer por su apoyo académico a mi tutor Jimmy Jolman Vargas Duarte del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, al Doctor Carlos Esteban Suarez y la Doctora Gina Marcela Gallego de Washington State University por el apoyo recibido durante mi proceso de formación especialmente en la consecución del material experimental. Así mismo por sus oportunos consejos y por las sugerencias durante la fase experimental.

A la Doctora Monica Leszkowicz Mazuz del Kimron Veterinary Institute de Israel por su colaboración con el envío del ADN empleado como control positivo de *Babesia ovis* durante los ensayos moleculares.

Al posgrado de Biotecnología quiero extender un agradecimiento sincero por la formación y por apoyar el viaje final para la socialización de este documento.

Al instituto de Genética especialmente al grupo Control Genético en Salud Animal donde llevé a cabo mi proceso formativo y por el apoyo recibido durante la fase experimental.

Del mismo modo agradecer al Doctor Eusebio Suarez y los productores ovino-caprinos del municipio de Montelíbano-Córdoba quienes apoyaron de forma incondicional el trabajo de campo y recolección de muestras.

A Katy, quien en cada ocasión que me encuentre a punto de desfallecer, me animó a seguir adelante.

A Socorro Prieto, una mujer incondicional con cada estudiante, a la profesora Marta Fontanilla, al profesor Daniel Uribe, a todos ustedes mil gracias.

Y a mis compañeros y amigos del posgrado y el laboratorio 8, personas valiosas que me han apoyado y corroboran que uno solo llega rápido, pero acompañado se llega lejos.

Y a quienes de una u otra forma contribuyeron a la realización de este estudio, mi más sincero reconocimiento.

Resumen

En Colombia el conocimiento de la Babesiosis en ovinos es escaso y solo se cuenta con siete reportes de *Babesia spp.* descritos por el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue identificar *Babesia spp.* en muestras de sangre de ovinos del municipio de Montelíbano-Córdoba. Se evaluaron raza, sexo, edad, peso, condición corporal, Famacha[®], temperatura corporal, presencia de ectoparásitos y hematocrito. La mayoría de los animales fueron de la raza denominada Africana (56%) mientras que solo el 19% fueron de razas puras. 46 ovinos presentaron niveles de hematocrito menores a 25% donde los más afectados fueron los animales entre 3 y 11 meses de edad. El valor de Famacha[®] 3 fue el más frecuente (76.04%). Para el diagnóstico directo de babesiosis se realizó extendido de sangre encontrando únicamente 4 muestras (2.4%) con presencia de *Babesia spp.*. No se observó la presencia de garrapatas. El diagnóstico molecular por PCR se llevó a cabo empleando cebadores dirigidos frente a secuencias del gen ssu 18S rRNA (PiroA-PiroB) en piroplásmidos, el gen que codifica para la proteína D de superficie de *Babesia ovis* (BoSPD), el gen de la proteína asociada a las roptrias de *Babesia bigemina* (BiF-BiR) y el gen del antígeno asociado a Rap-1 de *Babesia bovis* (BoF-BoR). Se encontraron 58 muestras positivas para PiroA-PiroB, 39 a BiF-BiR y ninguno a BoSPD ni BoF-BoR. Estos resultados demostraron la baja sensibilidad del frotis sanguíneo comparado con las técnicas moleculares y permitieron establecer la circulación de *B. bigemina* en las poblaciones ovinas del municipio de Montelíbano-Córdoba.

Palabras clave: Babesiosis ovina, *Babesia ovis*, *Babesia bigemina*, Hemoparásito, Piroplasmosis

Abstract

In Colombia, knowledge of Babesiosis in sheep is scarce and there are only 7 reports of *Babesia spp.* described by the Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. For this reason, the objective of this study was to identify *Babesia spp.* in blood samples of 167 sheep from the municipality of Montelíbano-Córdoba. Race, sex, age, weight, body condition, Famacha[®], body temperature, presence of ectoparasites and hematocrit were evaluated. Most of the animals were of the so-called African race (56%) while only 19% were purebred. 46 sheep had hematocrit levels of less than 25%, and the most affected population was lambs between 3 and 11 months. Famacha[®] value 3 was the most frequent (76.04%). For the direct diagnosis of babesiosis, blood smear was performed, finding only 4 samples (2.4%) with the presence of *Babesia spp.*. Surprisingly, ectoparasites were not found. Molecular diagnosis by PCR was carried out using primers directed against sequences of the ssu 18S rRNA (PiroA-PiroB) gene in piroplasmids, the coding gene for *Babesia ovis* surface protein D (BoSPD), the gene of the protein associated with the rhoptrias of *Babesia bigemina* (BiF-BiR) and the *Babesia bovis* Rap-1-associated antigen gene (BoF-BoR). The testing found 58 positive samples for PiroA-PiroB, 39 for BiF-BiR and none for BoSPD or BoF-BoR. These results demonstrated the low sensitivity of the blood smear compared with molecular techniques and allowed to establish the circulation of *B. bigemina* in sheep populations of the municipality of Montelíbano-Córdoba.

Key words: Ovine Babesiosis, *Babesia ovis*, *Babesia bigemina*, Hemoparasite, Piroplasmosis

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
Objetivos	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
1. Enfermedades transmitidas por garrapatas	6
1.1 Babesiosis	7
1.2 <i>Babesia</i> sp.....	8
1.2.1 Clasificación taxonómica	8
1.2.2 Estructura	8
1.2.3 Ciclo de vida	9
1.2.4 Filogenia	10
1.2.5 Diagnóstico	12
1.2.6 Diagnóstico molecular	14
1.2.7 Marcadores moleculares usados en ovinos	17
1.3 Babesiosis ovina	18
1.3.1 Especies de <i>Babesia</i> presentes en ovinos	19
1.3.2 Otras especies de <i>Babesia</i> presentes en ovinos.....	20
2. Metodología	23
2.1 Área y población objeto de estudio	23
2.2 Examen clínico.....	23
2.3 Recolección de la muestra.....	24
2.3.1 Muestra sangre periférica.....	24

2.3.2	Muestra sangre yugular	24
2.4	Técnicas de laboratorio	25
2.4.1	Evaluación del hematocrito	25
2.4.2	Elaboración del frotis sanguíneo	25
2.4.3	Extracción de ADN	26
2.5	Amplificación de ADN	27
2.5.1	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>Babesia spp.</i>	29
2.5.2	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>B. ovis</i>	29
2.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>B. bigemina</i>	29
2.5.4	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>B. bovis</i>	30
2.6	Visualización, Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético...	30
2.7	Análisis estadístico	31
3.	Resultados	33
3.1	Muestreo	33
3.2	Examen clínico	34
3.3	Hematocrito	35
3.4	Frotis sanguíneo	36
3.5	Reacción en cadena de la polimerasa	36
	Amplificación del ADN	36
3.5.1	36	
3.5.2	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>Babesia spp.</i>	37
3.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>B. ovis</i>	38
3.5.4	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>B. bigemina</i>	39
3.5.5	Reacción en cadena de la polimerasa para <i>Babesia bovis</i>	40
3.6	Secuenciación y análisis filogenético	41
3.7	Análisis estadístico	43
4.	Discusión	49
5.	Conclusiones y recomendaciones	55
5.1	Conclusiones	55
5.2	Recomendaciones	57
A.	Anexo: Tabla datos de animales positivos a <i>Babesia bigemina</i>	59

B. Anexo: Formato de ficha técnica individual para el ovino y la muestra	62
C. Anexo: Ovino con garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> Hallazgo Grupo control genético en Salud Animal – Instituto de Genética – Universidad Nacional de Colombia – 2018.....	63
Bibliografía	65

Lista de figuras

Figura 1-1: Morfología de parásitos Apicomplexa.....	8
Figura 2-1: Evaluación de hematocrito con tubo capilar.....	25
Figura 2-2: Extendido de sangre periférica.....	26
Figura 3-1: Distribución del porcentaje de animales respecto a calificación obtenida de Famacha® (n=167).....	34
Figura 3-2: Distribución del porcentaje de ovinos respecto a resultado de hematocrito inferior al 25% (n=46).....	35
Figura 3-3: Extendido de sangre de ovino contaminada con inclusión intraeritrocitaria. .	36
Figura 3-4: Ajuste de las condiciones de PCR cebadores PiroA-Piro B.	36
Figura 3-5: Identificación de ovinos positivos a <i>Babesia spp.</i> mediante PCR cebadores PiroA -PiroB.	37
Figura 3-6: Identificación de ovinos positivos a <i>Babesia ovis</i> mediante PCR cebadores BoSPD.....	38
Figura 3-7: Identificación de ovinos positivos a <i>Babesia bigemina</i> mediante PCR cebadores BiF-BiR.....	39
Figura 3-8: Identificación de ovinos positivos a <i>Babesia bovis</i> mediante PCR cebadores BoF-BoR.	40
Figura 3-9: Árbol filogenético a partir del gen Rap-1c de <i>B. bigemina</i>	43
Figura 3-10: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a <i>B. bigemina</i> respecto a Famacha® (P=0.45).....	44
Figura 3-11: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a <i>B. bigemina</i> respecto al Hematocrito (P=0.79).....	45
Figura 3-12: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a <i>B. bigemina</i> respecto a edad (P=0.77).....	45
Figura 3-13: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a <i>B. bigemina</i> respecto a sexo (P=0.14).....	46
Figura 3-14: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a <i>B. bigemina</i> respecto a condición corporal (P=0.91).....	47
Figura 3-15: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a <i>B. bigemina</i> respecto a raza (P=0.07).....	47
Figura 3-16: Distribución del porcentaje de ovinos mestizos positivos a <i>B. bigemina</i> con respecto a hematocrito, Famacha® y edad.....	48

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: <i>Babesia</i> spp. identificadas en animales domésticos	7
Tabla 2-1: Secuencias de cebadores empleadas en la amplificación de fragmentos de genes asociados a <i>Babesia</i> spp., <i>B. ovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i>	28
Tabla 3-1: Distribución de las razas de los animales del muestreo (n=167)	33
Tabla 3-2: Distribución de las edades de los animales del muestreo (n=167)	33
Tabla 3-3: Secuencias del gen Rap-1c de <i>B. bigemina</i> detectadas en las muestras de sangre de ovinos del estudio	42

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
N	Población Total	N/A	N/A
n	Muestra representativa	N/A	Ver Ecuación 2.2.1
Z α	Nivel de confianza	%	1- α
e	Margen de error admitido	%	$E=Z\alpha/2*(\sigma/\sqrt{n})$
P	Prevalencia esperada	%	$P=Incidencia*Duración*(1-P)$

Superíndice

Subíndice	Término
©	Copyright
®	Registered

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido Desoxi Ribonucleico
AMA	Associated-membrane-antigen
BoSPD	<i>B. ovis</i> Surface Protein D

<i>COX</i>	Cytochrome C Oxidase
<i>ELISA</i>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>F1</i>	Producto del cruce entre 2 razas puras.
<i>HCT</i>	Hematocrite
<i>ICA</i>	Instituto Colombiano Agropecuario
<i>IFAT</i>	immunofluorescence antibody test
<i>IFN</i>	Inteferons
<i>IL</i>	Interleukin
mM	Milimol
<i>NCBI</i>	Nucleotide Center for Biotechnology Inofrmation
Ng	Nanogramo
<i>PBS</i>	Phosphate-buffered saline
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>pH</i>	Potential of hydrogen
<i>RAP</i>	Rhoptry Associated Protein
<i>RFLP</i>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>RLB</i>	Reverse Line Blot
<i>RRA</i>	RAP-1-related antigen
<i>SDS-PAGE</i>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSU 18S rRNA	Small Subunit 18S rRNA
<i>TGF</i>	Transforming growth factor
μL	Microlitro
μM	Micrometro

Introducción

Los ovinos en nuestro país han adquirido relevancia en los últimos años como una especie con cualidades únicas para el sector agropecuario manifestándose en un incremento en la población animal (Ospina, Grajales y Manrique, 2011).

Con respecto a la Babesiosis, es una enfermedad causada por hemoparásitos del género *Babesia* sp. en países de Europa, África, Asia y Australia (Yeruham, Hadani, & Galker, 1998; Stuen, 2012; Stuen, 2013; Stuen, 2016; Guan, et al., 2012). Este parásito, con alrededor de 1 a 2.5 μm de tamaño (Cordero & Rojo, 2000) produce en el animal una sintomatología relacionada con fiebre, hemoglobinuria, ictericia y anemia, la cual se presenta en el 30% al 50% de los casos (Alessandra & Santo, 2012). Su ciclo de vida se relaciona con un huésped intermediario y uno definitivo, donde su principal vector es un Ixódido (Cordero & Rojo, 2000). Babesiosis es una enfermedad aguda, que progresa hacia una infección persistente en aquellos animales que sobreviven. En el estadio persistente, los parásitos residen en huéspedes normalmente asintomáticos por algunos años, en el caso de *B. bigemina*, y durante el resto de la vida, en el caso de *B. bovis* (Romero-Salas et al., 2016). Otra diferencia fundamental entre estos dos parásitos es la habilidad de *B. bovis* de secuestrarse en capilares, especialmente del cerebro y riñón, una manera de evitar el pasaje por el bazo, donde los eritrocitos infectados son eliminados de la circulación (Suarez & Noh, 2011). En ocasiones se han hallado garrapatas en animales donde no es usual encontrarlas, por ejemplo en caninos indicando la posible transmisión de hemoparásitos entre diferentes especies, sin embargo, esto no concluye que sean definitivamente sus huéspedes biológicos (Azmi, et al., 2016).

Conforme avanza la enfermedad en el rebaño, el impacto económico es mayor tanto en el uso de medicamentos como en reducción en los índices productivos (Sevinc *et al.*, 2007). Es así como se han identificado factores de riesgo asociados a la presentación de

la enfermedad como la presencia obligada de un vector biológico y el uso de varias especies de animales en el predio, elevando así la probabilidad de presentación de piroplasmosis (Theodoropoulos, Gazouli, Ikonopoulos, Kantzoura y Kominakis, 2006). En cuanto a las medidas preventivas disponibles, la aparición de babesiosis aguda en bovinos puede prevenirse mediante el uso de vacunas vivas basadas en organismos atenuados. Las vacunas vivas tienen utilidad en regiones endémicas, pero solo pueden administrarse en bovinos menores al año de edad. Actualmente no existen vacunas disponibles para prevenir babesiosis en ovinos. En consecuencia, el control de la enfermedad en esta especie depende en gran parte de disponer métodos de diagnóstico robustos y efectivos, y del uso de fármacos antiparasitarios, como el imdocarb, además del control de los vectores biológicos con acaricidas y otros métodos (Christensen, Suarez, Rodriguez, Flores, & Schnittger, 2014).

Con el fin de evaluar la presencia de este parásito en el rebaño de forma anticipada, se han establecido mecanismos diagnósticos como el examen clínico (Cordero & Rojo, 2000), metodologías sencillas de laboratorio (Aktaş, Altay, & Dumanli, 2005) o técnicas moleculares avanzadas (Theodoropoulos, Gazouli, Ikonopoulos, Kantzoura, & Kominakis, 2006), esto con el objetivo de evaluar el estado sanitario de los animales de forma oportuna. En efecto, metodologías tradicionales como la evaluación de extendidos de sangre por medio de microscopía de luz es económica y eficaz, sin embargo, poco útil en animales con cargas parasitarias bajas, como ocurre en babesiosis persistente. Así mismo, metodologías como las pruebas serológicas son bastante útiles en la detección de infecciones, sin embargo, no discriminan el tiempo de presentación (Niu, 2009) y, finalmente, técnicas moleculares específicas como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa que es altamente sensible (Horta, Barreto, Pepe, Campos, & Oliva, 2014; Erster, Roth, Wollkomirsky, et al., 2016; Niu, 2009), más aún si se implementan metodologías anidadas y semi-anidadas para incrementar su sensibilidad (Mahmoud, et al., 2015). Por este motivo se han evaluado diversas regiones en el genoma de los piroplasmidos como el gen *ssu 18S rRNA*, el cual es una región muy conservada en cepas de diferentes localizaciones geográficas (Rios y Rios, 2011), el gen para la Citocromo C oxidasa que provee una herramienta robusta para la identificación de especies relevantes con propósitos epidemiológicos (Tian, et al., 2013) y el gen de la proteína asociada a las roptrias – RAP, el cual en unguilobabesidos proporciona un nivel de detección óptimo debido a su alto grado de conservación (Suarez, et al., 2003).

En el país se ha reportado babesiosis en los ovinos en departamentos como Valle del Cauca, Tolima, Caldas y Quindío (Osorio *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2013), no obstante, hasta ahora no se han reportado las especies causantes de la babesiosis ovina. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar por medio de una herramienta molecular la especie de *Babesia* circulante en los rebaños ovinos del municipio de Montelíbano, Departamento de Córdoba, Colombia.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la presencia de *Babesia* sp. en muestras de sangre de rebaños ovinos del municipio de Montelíbano, Departamento de Córdoba, Colombia.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de *Babesia* sp. en muestras de sangre periférica de rebaños ovinos del municipio de Montelíbano, Departamento de Córdoba, Colombia.
- Identificar molecularmente especies de *Babesia* sp. en muestras de sangre de rebaños ovinos del municipio de Montelíbano, Departamento de Córdoba, Colombia.
- Enviar a verificación por secuenciación una muestra positiva a *Babesia ovis*.

1. Enfermedades transmitidas por garrapatas

Estas enfermedades se presentan tanto en áreas tropicales como subtropicales y la presencia, dinámica y cantidad de estos organismos presentes en vectores incrementan la posibilidad de transmisión a los animales. Además, existen factores del medio ambiente que favorecen la supervivencia de la garrapata como la abundancia de capa vegetal o factores externos que posiblemente contribuyen a la estabilidad y reemergencia como la evolución genética del vector, cambios sociales, económicos y medioambientales que modifican los ecosistemas, los cuales inducen grandes cambios en la existencia y distribución de la garrapata en campo (Estrada, Ayllón, & de la Fuente, 2012). Debido a la pérdida de sangre en animales afectados, se ha estimado en un 35% el perjuicio económico que se representa en la reducción de la ganancia de peso, la cual se agrava cuando los niveles de infestación de ectoparásitos son superiores a lo normal (L'Hostis & Seegers, 2002)

Los daños causados por la infección de hemoparásitos son en gran medida debido a procesos agudos de la enfermedad, sacrificio prematuro, muerte del animal o rechazo de algunas partes de la canal al momento de la inspección sanitaria. El detrimento generado de forma indirecta comprende la reducción del potencial productivo a consecuencia de un efecto directo en la lactancia manifestándose en corderos con retraso en el crecimiento, reducción de peso que se manifiesta en la baja en la condición corporal en animales jóvenes y, por último, un atraso a la llegada de la edad madura. Adicionalmente, se ha visto un incremento en la susceptibilidad a contraer otras enfermedades. (Ademola & Onyiche, 2013; Jatau, Abdulganiyu, Lawal, Okubanjo, & Yusuf, 2011 ; Brito et al., 2017).

Se ha visto también un incremento en las pérdidas debido al uso de tratamientos de alto costo, reflejándose en daño al bienestar de los productores y sus familias. (Demessie & Derso, 2015).

Las hemoparasitosis tienen un amplio rango de distribución a nivel global, siendo las enfermedades transmitidas por garrapatas, un problema sanitario que comprende una gran variedad de organismos como *Babesia spp.*, *Anaplasma sp.*, y *Theileria sp.* Estos hemoparásitos ocasionan un impacto económico grave que en algunos casos conlleva a

morbilidad y mortalidad en los animales afectando la seguridad alimentaria en las zonas donde la sociedad depende directamente del rebaño (Demessie & Derso, 2015).

1.1 Babesiosis

El agente causal de la Babesiosis fue descubierto en 1888 por el biólogo rumano Victor Babeş en eritrocitos de bovino con hemoglobinuria, donde luego detectó el mismo organismo en glóbulos rojos de oveja, al cual, tiempo después, le fue dado el nombre de *Pyrosoma bigeminum*, microorganismo causante de la fiebre de Texas de Estados Unidos en 1893 donde se comprobó que la enfermedad era transmitida por garrapatas. Ya para el año 1893 se asignaron los nombres de *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. ovis* (Uilenberg, 2006). Con el tiempo, se han podido identificar *Babesia* con afinidad usual hacia especies de animales como se observa en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: *Babesia* spp. identificadas en animales domésticos

Especie de <i>Babesia</i>	Especie afectada
<i>Babesia beliceri</i> , <i>Babesia bigemina</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>Babesia jakimovi</i>	Bovinos y Búfalo
<i>Babesia divergens</i> , <i>Babesia major</i> , <i>Babesia occultans</i> , <i>Babesia ovata</i>	Bovinos
<i>Babesia orientalis</i>	Búfalo
<i>Babesia ovis</i> , <i>Babesia motasi</i> , <i>Babesia crassa</i>	Oveja y Cabra
<i>Babesia caballi</i>	Caballo, Asno y Mula
<i>Babesia perroncitoi</i> , <i>Babesia trautmanni</i>	Cerdo
<i>Babesia canis</i>	Perro y Gato
<i>Babesia rossi</i> , <i>Babesia vogeli</i> , <i>Babesia gibsoni</i>	Perro
<i>Babesia (canis) presentii</i> , <i>Babesia felis</i>	Gato

1.2 *Babesia* sp.

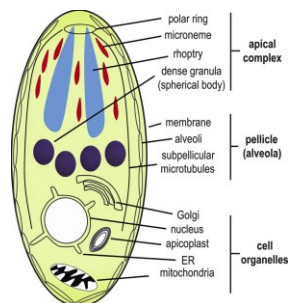
1.2.1 Clasificación taxonómica

Babesia sp. es un hemoparásito transmitido por ixódidos con afinidad intraeritrocítica y morfología piriforme perteneciente al *phylum* Apicomplexa, clase Aconoidasida, subclase Piroplasmaea, orden Piroplasmida, superfamilia Babesioidea, familia Babesiidae y género *Babesia* (NCBI:txid5866). Inicialmente, la clasificación taxonómica de los piroplasmidos se ha basado en mecanismos de transmisión en el vector, tropismo o morfología. Sin embargo conforme se manejan herramientas moleculares, esta clasificación se ha complementado (Schreeg et al., 2016).

1.2.2 Estructura

El estadio de *Babesia* sp. responsable de la invasión de eritrocitos en el huésped vertebrado es el merozoito, el cual posee orgánulos membranosos como se muestra en la Figura 1-1 como el núcleo, retículo endoplásmico, aparato de golgi y mitocondrias. A su vez posee una envoltura llamada “pellicle” la cual se constituye de una membrana celular y dos capas internas con funciones de motilidad e invasión del parásito. También poseen una serie de organelos de invasión presentes en el complejo apical el cual se compone de anillo polar, micronemas y roptrias. A diferencia de otros Apicomplexa estos no poseen el conoide, y los gránulos densos típicos de otras especies, que en *Babesia* spp. se denominan cuerpos esféricos. (Ganzinelli, Rodriguez, Schnittger, & Florin-Christensen, 2018)

Figura 1-1: Morfología de parásitos Apicomplexa



(Ganzinelli et al., 2018)

Los procesos de invasión de parásitos Apicomplexa son posibles en gran medida a la capacidad del merozoito de emplear este complejo apical que interactúa por medio de ligandos protozoarios con receptores de superficie de membrana del eritrocito, en donde ayudado por la presencia de calcio en el medio se da una invasión exitosa (Yokoyama et al., 2002).

Una de las proteínas secretadas es la asociada a las roptrias o Rap-1, la cual está codificada por dos genes idénticos dispuestos en tándem con homología entre especies de *Babesia*. (Suarez et al., 2003), adicionalmente contiene varios epítopes inmunogénicos responsables de evocar la inmunidad humoral en el huésped y es funcional en la invasión de los eritrocitos. Más recientemente, otra molécula de invasión fue descubierta llamada Antígeno de Membrana Apical AMA-1 donde junto con Rap-1 tienen funciones durante la invasión (Yokoyama, Okamura, & Igarashi, 2006). Este antígeno transmembranal es compartido por varios organismos Apicomplexa como sucede con *B. bovis* donde parece participar del mismo modo en el proceso de invasión del huésped. (Torina et al., 2010).

1.2.3 Ciclo de vida

La babesiosis es adquirida cuando una garrapata infectada en estado de larva o ninfa se alimenta de su huésped y transfiere esporozoitos de *Babesia spp.* Estos invaden eritrocitos y se convierten en trofozoitos, los cuales se dividen por fisión binaria y producen merozoitos que continúan la infección y el ciclo de replicación en el huésped. Algunos trofozoitos se convierten en gametocitos que podrían iniciar la infección en la garrapata vector. En los intestinos del vector los gametocitos se desarrollan en *Strahlenkörper* que posteriormente se fusionan para formar un cigoto que se convierte en quineto, estos acceden a la hemolinfa de la garrapata, replicándose e invadiendo varios órganos como glándulas salivales y ovarios. La transmisión transovárica se da solo en miembros del grupo denominado *Babesia sensu stricto* posibilitando la infección de la siguiente generación conllevando a larvas, ninfas y adultos portadores del parásito, contrario a lo manifestado en otros grupos de *Babesia* donde solo se transfiere la infección transestadialmente. Luego de esto, la esporogonia se inicia cuando se invaden glándulas salivales en los estadios larvales de la garrapata, formando un esporoblasto multinucleado. Los esporozoitos recién desarrollados se inocularán en el huésped luego

de la picadura de la garrapata (Hunfeld, Hildebrandt, & Gray, 2008 ; Ganzinelli et al., 2018)

1.2.4 Filogenia

El orden Piroplasmida ha sido usualmente clasificado en 3 géneros (*Babesia* sp., *Theileria* sp. y *Cytauxzoon* sp.) basados en su ciclo de vida, mecanismos de transmisión del vector, tipo de célula hospedera en el huésped vertebrado y en algunos casos su morfología (grande o pequeña) (Lack, Reichard, & Van Den Bussche, 2012). Siendo indudable que este tipo de clasificación no se equipara con la obtenida por medio del análisis de relaciones filogenéticas, ya sea de secuencias obtenidas a partir del gen 18S o del genoma mitocondrial (Schreeg et al., 2016).

Es así como a través del análisis del genoma mitocondrial se han reconocido 5 grupos o clados en el orden Piroplasmida: (I) *Babesia sensu stricto*, (II) *Theileria* y *Cytauxzoon*, (III) *Theileria equi*, (IV) Grupo *Babesia occidental*, (V) Grupo *Babesia microti*. (Schreeg et al., 2016).

El primero, (I) *Babesia sensu stricto*, el cual se refiere a las *Babesia* como han sido definidas clásicamente; parásitos transmitidos transovarialmente en la garrapata vector y solo afecta eritrocitos, es un grupo monofilético clasificado por medio de metodologías tanto biológicas como moleculares. En este grupo se ubican especies de *Babesia* grandes como *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. canis canis*, *B. canis rossii*, *B. canis bogeli* y *Babesia* pequeñas como *B. gibsoni* y *B. bovis*. Es importante destacar que aún mejor que la metodología de clasificación por medio de su morfología, está el tropismo por sus huéspedes, dado que es posible dividir las *Babesia* dentro del clado *sensu stricto*, en las que tienen afinidad por ungulados y las que afectan carnívoros, sin embargo, se ha tenido evidencia de que este grupo de *Babesia* puede infectar múltiples huéspedes vertebrados (Schreeg et al., 2016). En cuanto a su divergencia, es posible afirmar que este clado se separó de los demás piroplasmidos hace aproximadamente 11 millones de años (Lack et al., 2012).

(II) *Theileria* y *Cytauxzoon* (Schreeg et al., 2016) es un clado que tiene una diversidad aproximada de 3 millones de años atrás y es denominado de esta forma debido a sus características de replicación en linfocitos o macrófagos (Lack et al., 2012).

(III) *Theileria equi* fué originalmente llamado *B. equi*, y se reclasificó como *Theileria* a partir del descubrimiento de la invasión de monocitos y linfocitos, sin embargo, por medio de análisis de su filogenia a partir del gen 18S no fue posible incluirlo en el grupo *Theileria* ni en el grupo *Babesia* y es así como se ubicó en un único clado dentro del orden Piroplasmida. Adicionalmente debido a características en su genoma, se reafirmó su diferenciación con base en su estructura ya que es 1.5 Kb más largo que cualquier piroplásmido. (Schreeg et al., 2016).

(IV) Grupo *Babesia* occidental es un clado en donde los organismos localizados en este grupo fueron aislados al occidente de Estados Unidos, de ahí su nombre. Sin embargo, el aislamiento de cepas en diferentes lugares como Suráfrica en un guepardo y Europa propone que organismos de este grupo se distribuyen alrededor del mundo y no ha sido todavía muestreado su rango geográfico (Schreeg et al., 2016 ; Lack et al., 2012).

(V) Grupo *Babesia microti* es un clado que hace parte del grupo *Babesia sensu latu* el cual se originó antes del grupo *Babesia sensu stricto* y *Theileria*, esto corroborado por medio de análisis de secuencias del genoma mitocondrial donde lo sitúa separado del ancestro común mucho antes que todas las especies piroplásmidas. Este grupo tiene una diversidad considerable de huéspedes (Schreeg et al., 2016) al igual como ocurre con el grupo *Babesia sensu stricto*, cuya restricción de especificidad de huésped es baja (Lack et al., 2012 ; Criado-Fornelio, Martínez-Marcos, Bulíng-Saraña, & Barba-Carretero, 2003). A partir del análisis de secuencias, se puede inferir que estos parásitos tienen una diversificación aproximada de 17 millones de años atrás en la era del mioceno en donde los cambios en la fauna y flora coinciden con la aparición de praderas (Lack et al., 2012).

Debido a esto, se han mencionado varias teorías a partir del análisis conjunto de filogenia y ciclos de vida parasitaria, entre estas está la posible diversificación de los ungulados al mismo tiempo que la presentada por los parásitos en África, (Lack et al., 2012) lugar donde se piensa es el origen de los piroplásmidos. (Criado-Fornelio et al., 2003)

Además, se cree que *B. bovis* podría ser derivado de *B. ovis* y este a su vez ser derivado de un ancestro africano representado por *Babesia sp.*, todo en concordancia con la divergencia temprana de los bovinos con respecto a ovinos y caprinos. (Criado-Fornelio et al., 2003)

Sin embargo, se piensa que *B. canis* es posible sea el origen de todos los Babesidos y Ungulobabesidos por su baja especificidad de huéspedes y su fácil transmisión por diferentes géneros de garrapatas, lo que permitiría considerar que su ancestro se adaptó fácilmente en un principio en equinos y luego en ungulados (Criado-Fornelio et al., 2003).

Sumado a esto, también se piensa que los roedores son el huésped del ancestro común de los piroplásmidos, el cual fue adquiriendo capacidades para infectar otros huéspedes como los carnívoros y primates y finalmente infectaron ungulados hace más de 13 millones de años. (Lack et al., 2012).

Estos cambios continuos de huésped pueden resultar en especies de parásitos en ambientes nuevos y por lo tanto resultar en presiones de selección y una elevada tasa evolutiva. De acuerdo a eso, el clado de *Babesia sensu stricto* parece haberse diversificado bajo diferentes condiciones climáticas, en donde ungulados cambiaron su alimentación en el mioceno tardío donde pasaron a ingerir forrajes en las praderas (Lack et al., 2012).

1.2.5 Diagnóstico

Con el fin de identificar los parásitos presentes en muestras de sangre, se requiere de medios diagnósticos para confirmar su presencia sin embargo, no es recomendable dejar de lado datos epidemiológicos y exámenes clínicos que hacen posible la observación integral de la enfermedad con respecto a la ausencia de síntomas o lesiones patognomónicas que permitan reconocerla en campo (Cordero & Rojo, 2000).

En relación al curso agudo de la babesiosis, aproximaciones como la microscopía se emplea en diagnóstico de campo donde el frotis sanguíneo es el más apropiado, no obstante, no es el indicado en estudios epidemiológicos (Aktaş et al., 2005) debido a la dificultad al momento de diferenciación de especies y su baja sensibilidad en muestras de portadores asintomáticos donde las cargas parasitarias son reducidas (Niu et al., 2009 ; Abdel Aziz et al., 2014), así mismo animales que se recuperan de un episodio de babesiosis mantienen el estatus de portador asintomático lo que podría llegar a perpetuar el ciclo en la naturaleza (Abdel Aziz et al., 2014; Blanco, Cardona, & Vargas,

2016) siendo una amenaza considerable para animales susceptibles a la infección en momentos donde se encuentran alimentándose en áreas infestadas de vectores potencialmente transmisores (Abdel Aziz et al., 2014).

Así mismo se emplean técnicas serológicas para detectar anticuerpos específicos (Erster et al., 2016). Estas pruebas serológicas son útiles en estudios epidemiológicos (Emre, Düzgün, Iriadam, & Sert, 2001; Mahmoud et al., 2015), sin embargo, algunas técnicas serológicas son frecuentemente afectadas por la reactividad cruzada de los anticuerpos contra otras especies, lo que puede conllevar a falsos positivos (Theodoropoulos et al., 2006; Abdel Aziz et al., 2014). Adicionalmente, los anticuerpos tardan días o semanas en desarrollarse en un animal infectado, también se detectan luego de ser vacunados o podrían estar presentes después de varios días de haberse presentado la enfermedad (Horta et al., 2014)(Niu et al., 2009) (Abdel Aziz et al., 2014). Un buen ejemplo de especificidad y fácil manejo es la ELISA competitiva, la cual puede ser más práctica que la técnica IFAT y tiene más potencial que la misma ELISA convencional (Abdel Aziz et al., 2014) en donde se usan proteínas del merozoito para la elaboración de las pruebas (Guan et al., 2012).

Finalmente, aproximaciones moleculares como la PCR son realmente útiles y se ha evaluado y demostrado una elevada efectividad capaz de detectar 10 células infectadas por mililitro de sangre (Theodoropoulos et al., 2006), siendo altamente sensible con el fin de detectar ADN del parásito en un animal con 0.00001% de parasitemia (Aktaş et al., 2005), y más aún, técnicas como la PCR anidada o semi-anidada (Abdel Aziz et al., 2014 ; Mahmoud et al., 2015) donde no solo se mejora la sensibilidad de la técnica, también es posible confirmar la especificidad de la primera reacción (Mahmoud et al., 2015 ; Abdel Aziz et al., 2014), la cual, comparada con la PCR convencional, provee características adicionales en cuanto a la diferenciación de especies relacionadas con la enfermedad e incluso permite la identificación del agente causal en cuadros subclínicos donde no se presenta sintomatología a pesar que el ovino sea portador (Horta et al., 2014), no obstante no es posible la correcta identificación de animales positivos con infecciones mixtas (Niu et al., 2009 ; Inci, Iça, Yildirim, & Düzlü, 2010). Más aún, la sensibilidad de la PCR cuantitativa permite la detección del parásito luego de 100 días posteriores a la infección, lo cual es favorable ya que faculta la cuantificación y detección del parásito en bajas cantidades en el organismo (Erster, Roth, Wollkomirsky, et al., 2016).

1.2.6 Diagnóstico molecular

Se han identificado diversos marcadores genéticos de *Babesia sp.* con la finalidad de amplificar genes conservados entre la especie y ser posible la diferenciación entre diferentes zonas geográficas (Ríos & Ríos, 2011).

Es así como el gen de la Subunidad Pequeña Ribosomal (ssu) 18S rRNA, que codifica para un componente pequeño de los ribosomas, es uno de los marcadores moleculares más utilizados debido a su alto grado de conservación en todos los seres vivos y por esto en un principio fue empleado en la elaboración del árbol filogenético metazoario (Halanych, 2004). Con respecto a la detección de especies de *Babesia sp.*, permite la diferenciación entre *B. bovis* y *B. bigemina* por ser conservado entre cepas de diferentes zonas geográficas y por esta razón ha sido empleado en estudios epidemiológicos (Ríos & Ríos, 2011). Así mismo, este marcador molecular al ser de fácil acceso por sus regiones flanqueantes, permite el uso de cebadores universales obteniéndose ADN amplificado incluso en organismos pequeños. (Bermúdez & Gómez, 2017; Meyer, Todt, Mikkelsen, & Lieb, 2010). Sin embargo, se ha descrito que debido a la velocidad lenta de evolución en organismos eucariotas, en estudios de filogenia es necesaria la combinación de este gen nuclear con genes mitocondriales para dar confiabilidad al análisis (Tian et al., 2013).

Este marcador molecular ha sido empleado en bovinos y bubalinos (Alkefari, Al-Gharban, & Ahmed, 2017; Souza et al., 2013), équidos (Qablan et al., 2013), pequeños rumiantes (Aktas, Altay, & Dumanli, 2007; Liu et al., 2007), porcinos (Zobba et al., 2014) y pequeñas especies (Alho et al., 2017; Bermúdez, 2017) en donde se destacan estudios en Colombia (Bermúdez et al., 2017; Ríos et al., 2014), Ecuador (Medina et al., 2017), México (Lira et al., 2017), Brasil (Souza et al., 2013), Inglaterra (Jizhou et al., 2017; Phipps et al., 2016) y China (Luo et al., 2007).

También ha sido posible evaluar el grado de conservación del gen Citocromo B del complejo III (COX3) ya que debido su rápida tasa de evolución comparada con el ADN nuclear lo hace adecuado en estudios filogenéticos de *Babesia sp.*. No obstante,

comparado con este tipo de genes como el ssu 18S rRNA, estudios donde se emplea el gen COB son más eficientes reconociendo linajes cercanos contrario al reconocimiento de ramas profundas en la filogenia, sin embargo, su uso conjunto con genes nucleares complementan esta dificultad (Tian, Luo, et al., 2013). Este marcador molecular fue empleado como herramienta molecular en China, donde se diferenciaron 11 aislados de ***Babesia spp.*** para el establecimiento de relaciones filogenéticas, mostrando ser de utilidad. En conclusión el análisis combinado entre los genes 18S rRNA y COX3 mejora significativamente la confiabilidad de las relaciones filogenéticas obtenido dentro de las especies de *Babesia sp.* (Tian et al., 2013)

La organización del locus del gen rap-1 de *B. bigemina* se ha reportado consiste en 5 copias organizadas en tándem del gen rap-1a intercalados con 5 copias idénticas del gen rap-1b y una sola copia del gen ra-1c en el extremo 3' del locus (Suarez et al., 2003; Mosqueda et al., 2004). Estos marcadores moleculares generan transcritos en los estadios sanguíneos minimizando la posibilidad de variación en la secuencia debido a la presión inmune promoviendo su selección como candidato a ser usado en la elaboración de cebadores gracias a su alto grado de conservación especie-especie entre distintas cepas (Mahmoud et al., 2015). Una característica importante en este gen es el control en la transcripción en la porción Rap-1c del locus. Es decir, el análisis de la transcripción de genes Rap-1a, Rap-1b y Rap-1c sugieren que hay regulación transcripcional y postranscripcional encontrada en el locus de *B. bigemina* rap-1 pudiendo reflejar un mecanismo utilizado por el parásito para adaptarse a las variaciones en el ciclo de vida, como los diferentes entornos de vectores de vertebrados e invertebrados, haciendo que las porciones Rap-1b y Rap-1c se muestren invariables y por lo tanto conservadas (Suarez et al., 2003). Este marcador molecular se empleó en muestras de bovino y bubalino donde fue posible la identificación por medio de PCR anidada la presencia de *B. bovis* en el 14% (Abdel Aziz et al., 2014) y 15% (Mahmoud et al., 2015) de los bovinos y 3.7% en bufalinos y *B. bigemina* en el 28% (Abdel Aziz et al., 2014) y 32.4% (Mahmoud et al., 2015) de los bovinos.

Otros genes empleados como marcadores moleculares son el gen Beta Tubulina y la familia de genes msa-1 y msa-2c (Antígeno de superficie del merozoito) que codifican para proteínas antigénicas localizadas en la superficie de los merozoito (Florin-Christensen et al., 2002). Igualmente, el gen β -Tubulina podría ser utilizado en la amplificación de genes de ***Babesia sp.*** y *Theileria sp.* más comunes ya que pertenece a

uno de los genes de apicomplexas en donde la posición del primer intrón es altamente conservada en la mayoría de las especies. Es así como en un estudio, un fragmento del gen β -Tubulina fue amplificado por medio de PCR-RFLP a partir de ADN genómico de *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. caballi*, *B. equi*, *B. microti*, *Theileria annulata* y *Theileria sergenti* demostrando una adecuada clasificación de las cepas por medio de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción – RFLP (Cacciò, Cammà, Onuma, & Severini, 2000).

Del mismo modo y considerando la limitante al momento de diagnosticar infecciones mixtas por medio de PCR (Niu et al., 2009)(Inci et al., 2010), se emplea también la metodología de Reverse Line Blot (RLB) con el objetivo de identificar diferencias en las secuencias amplificadas con la hibridación en una membrana de los productos obtenidos por PCR. Además su uso como herramienta diagnóstica sirve no solo en portadores sintomáticos, también es posible su uso en infecciones subclínicas y es por esto que es recomendada en monitoreos epidemiológicos de enfermedades transmitidas por vectores ixódidos (Niu et al., 2009). Es por esto que la región hipervariable V4 del gen 18S rRNA ha sido empleada como marcador molecular para la clasificación taxonómica y filogenética dado su alto grado de conservación en esta región (Horta et al., 2014) y de igual modo, usada en la hibridación de productos de PCR en Reverse Line Blot - RLB (Schouls et al., 1999)(Inci et al., 2010)(Aydin, Aktas, & Dumanli, 2015) en un estudio realizado en Turkia en 389 animales donde se obtuvo la identificación de diferentes especies como *T. annulata*, *Theileria buffeli/orientalis*, *B. bigemina* y *B. major*. (Kursat Altay, Aydin, Dumanli, & Aktas, 2008). Esta región V4 del Gen 18S es la más grande y compleja, y en eucariotas, la longitud de esta región es de aproximadamente 230 bases a 520 bases, y es por esto que, para estudios de diversidad, se han sugerido el uso de las regiones V4 y V9 como candidatos más destacados. (Hadziavdic et al., 2014).

También se han empleado genes que codifican para proteínas implicadas en la invasión diferentes a Rap-1, como lo son el antígeno-1 asociado a la membrana (AMA-1), esta es una proteína de membrana integral de tipo I conservada estructuralmente con un ectodominio N - terminal rico en cisteína, un único dominio transmembrana y un Cola citoplásmica C-terminal (Niu et al., 2017).

Así mismo se han empleado marcadores moleculares como los ITS en donde ITS2 puede ser el más informativo para la identificación a nivel de especie y subespecie, y contiene estructuras secundarias conservadas que pueden usarse para facilitar alineamientos de categorías taxonómicas de género y orden debido a su función en el procesamiento de ARNr (Song et al., 2012).

Finalmente, uno de los marcadores moleculares que ha sido empleado en la detección de *Babesia bovis* es el Antígeno asociado a Rap-1 (RRA) el cual posee características de todos los miembros de la familia de genes de Rap-1 de *Babesia*. Está altamente conservado entre los aislados geográficos de *B. bovis*, contiene epítomos sensibles a la neutralización y se expresa en merozoitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Mahmoud et al., 2015).

1.2.7 Marcadores moleculares usados en ovinos

Estudios en la especie ovina con el objetivo de identificar diferentes piroplásmidos se han realizado por medio del empleo de diferentes marcadores moleculares. Es así como la región hipervariable V4 del gen 18S rRNA fue empleada en muestras de sangre obteniéndose la identificación de los siguientes parásitos *Theileria luwenshuni*-*B. motasi* (Niu et al., 2009) *Theileria ovis* (Kursat Altay, Dumanli, & Aktas, 2007 ; Inci et al., 2010) *B. ovis* (Sevinc et al., 2007 ; Inci et al., 2010 ; Kursat Altay et al., 2007) *Theileria lestoquardi*-*Theileria separata* (Kursat Altay et al., 2007).

Así mismo, con la ayuda de PCR convencional dirigida a amplificar un fragmento del gen 18S rRNA ha sido posible la identificación de *B. ovis* en 52 animales (Esmailnejad et al., 2014) y 16 animales (Theodoropoulos et al., 2006), también fue posible identificar *T. luwenshuni* en 19 animales colectados (Phipps, Hernández-triana, Goharriz, Welchman, & Johnson, 2016).

Del mismo modo, la amplificación de este gen 18S rRNA de *Babesia ovis* se pudo corroborar la correcta identidad de una cepa aislada (K. Altay, Aktas, & Dumanli, 2008) y la identificación de 122 muestras de ovinos los cuales previamente habían sido identificadas por medio de extendido de sangre (Sevinc et al., 2013)

Identificación específica de *B. ovis* en muestras de ovino ha sido posible por medio de la amplificación del gen que codifica para la Proteína D de superficie en muestras de sangre

de animales infectados. En un principio este gen que codifica para la proteína se obtuvo a partir de eritrocitos infectados (Erster, Roth, Wollkomirsky, et al., 2016 ; Erster et al., 2015) en otros estudios enfocados en evaluar la capacidad de transmisión de garrapatas *Rhyncephalus bursa* en ovinos naturalmente infectados en donde se concluyó que esta garrapata transmitía de forma exitosa el parásito y los animales fueron infectados. (Erster, Roth, Wolkomirsky, et al., 2016).

1.3 Babesiosis ovina

Con respecto a la babesiosis ovina, causada por *B. ovis*, *B. motasi* y *B. crassa*, puede presentarse de forma hiperaguda, aguda o crónica, manifestándose en su curso hiperagudo con cuadros de fiebre, hemoglobinuria, ictericia, anemia, y al no ser tratada a tiempo, la muerte (Sevinc et al., 2007). Por otra parte, con respecto a los agentes causales, *B. ovis* es considerada de las tres, la más patógena, mostrando tasas de mortalidad entre el 30% y el 50%, presentándose síntomas como hipertermia de 42°C en el periodo que antecede la presentación de la sintomatología y neumonía aguda, luego cursa con anemia marcada, hemoglobinuria y leucopenia que resulta en la muerte del ovino. En relación con los hallazgos histopatológicos, se evidencia una encefalitis no purulenta, neumonía intersticial, pericarditis hemorrágica y endocarditis, hepatitis necrótica central y necrosis lobular de los túbulos renales, todo esto característico de un síndrome de shock, *B. motasi* parece ser menos virulenta ya que la enfermedad en su forma aguda presenta fiebre, anorexia, taquicardia, mucosas pálidas, ictericia, hemoglobinuria, dolor abdominal, diarrea, postración y muerte. Contrario a la forma crónica donde sólo se manifiestan síntomas como emaciación, tos y edema. *B. crassa* es la tercera especie de *Babesia* que afecta a los ovinos y es de tamaño grande, de baja patogenicidad y recientemente aislada (Alessandra & Santo, 2012).

Al mismo tiempo, hallazgos hematológicos podrían mostrarse alterados debido a la destrucción de los glóbulos rojos por parte del parásito, presentando anemia de tipo microcítica hipocrómica en animales susceptibles y macrocítica hiperocrómica en resilientes (Sevinc et al., 2013), también disminución en la hemoglobina y el conteo de plaquetas revela un problema de coagulopatía intravascular diseminada y vasculitis, concordante con una hemólisis intravascular. (Sevinc et al., 2013) Esta trombocitopenia

puede ser resultado de una activación de macrófagos por parte de citoquinas inflamatorias como el interferón-Gama (IFN- γ) (Mahmoud et al., 2015). No obstante, valores como el plaquetocrito, conteo de linfocitos y el volumen medio de plaquetas se ven incrementados y este último puede ser debido a una respuesta por parte de la médula ósea al descenso de las plaquetas en el organismo. De igual modo, hay un incremento en los niveles de nitrógeno ureico en sangre y bilirrubina total, acorde con el daño renal y hepático (Sevinc et al., 2013). De acuerdo con estudios realizados en ovinos, la gravedad de la enfermedad estaba directamente relacionada con la peroxidación de los lípidos de los eritrocitos, incluyendo daño en la membrana, formación de metahemoglobina, fragilidad osmótica y destrucción total del glóbulo rojo. Concluyendo que el daño provocado por los cambios oxidativos, favorece la hemólisis intravascular y forman parte fundamental de la patogénesis de la anemia (Esmailnejad, et al., 2012) sin embargo el incremento de la eritrofagocitosis por macrófagos activados y la producción de anticuerpos anti-eritrocitos se ha visto puede llegar a ser también causante de la anemia (Mahmoud et al., 2015).

En casos en donde las enfermedades se presentan de forma subclínica, molecularmente se muestra una reducción en los niveles de expresión de genes de IFN- γ y hay un incremento en Interleuquina 1- β (IL-1 β) y citocinas reguladoras de células T como TGF- β 1 (Abdel Aziz et al., 2014).

1.3.1 Especies de *Babesia* presentes en ovinos

En ovinos se presenta *B. ovis* (habitualmente transmitida por garrapatas *R. bursa* (Uilenberg, 2006), *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus*) (Esmailnejad et al., 2014), también *B. motasi* (transmitida por garrapatas de los géneros *Rhipicephalus* sp. y *Dermacentor* sp.). (Cordero & Rojo, 2000) y *B. crassa* que particularmente no se ha especificado su vector, aunque su denominación se debe básicamente a su aspecto morfológico (Uilenberg, 2006).

Así mismo, *B. ovis* es más frecuente en el sur de Europa, diferente a *B. motasi* donde se ha reportado en las islas británicas, Alemania, Países bajos, Suecia (Stuen, 2013), la isla de Gotland (Stuen, 2012) Francia, Italia, España y Turquía (Stuen, 2016). Con respecto a su vector, *R. bursa* se encuentra distribuido en la cuenca del mediterráneo, los balcanes, el sur de la antigua URSS, Irak e Irán (Yeruham et al., 1998). Además, en Europa las

garrapatas encontradas con mayor frecuencia son *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *R. bursa* (dispersa en Europa), *Ixodes ricinus* (siendo altamente localizada en el norte de Europa) (Stuen, 2016).

1.3.2 Otras especies de *Babesia* presentes en ovinos

A pesar de reconocerse parásitos con afinidad específica en cada especie, ha sido posible encontrar hemoparásitos que comúnmente afectan los ovinos en otros animales como los caninos que tiene contacto con el rebaño (Azmi et al., 2016)(Guan et al., 2012)(Azmi et al., 2016) como es el caso en un estudio realizado en Grecia de la garrapata *R. sanguineus* en donde siendo habitual de caninos, se ha visto presente en ovinos (Theodoropoulos et al., 2006) sin embargo esto no es concluyente a pensar que sean vectores biológicos permanentes, no obstante podrían ser factores de riesgo en la transmisión de la babesiosis (Azmi et al., 2016).

Así mismo, ha sido posible la identificación infección cruzada de *B. bovis* y *B. bigemina* en la especie ovina en estudios realizados en muestras de sangre y garrapatas colectadas de las ovejas. Es así como en la región del mar negro en Turquía por medio de la amplificación de la región hipervariable V4 del gen 18S rRNA con PCR-RLB se identificó en 1 de 49 pools de garrapatas *R. bursa* la presencia de *B. bigemina* (Aydin et al., 2015) y en otro estudio realizado en Egipto por medio de una PCR anidada para *B. bovis* dirigida a amplificar un fragmento del gen de la Proteína asociada a las Roptrias – RAP-1 y PCR convencional para *B. bigemina* dirigida a amplificar un fragmento del gen del Antígeno de Membrana Apical – AMA1 dando como resultado una muestra positiva a *B. bovis* y 2 muestras positivas a *B. bigemina* (Elsify et al., 2015).

Con la ayuda de metodología molecular en otro estudio realizado en Irak, fue posible corroborar ovinos que en un principio fueron diagnosticados por medio de metodología serológica, identificando la presencia de *B. bigemina* en 4 ovinos de un total de 59 muestreados donde las especies de garrapatas colectadas fueron *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Hyaloma anatolicum excavatum*, *Hyaloma anatolicum anatolicum*, *Hyaloma marginatum marginatum*, *Hyaloma turanicum*, *Hyaloma dentritum* y *Babesia annulatus* (Ameen & Abdullah, 2012).

Finalmente, debido a los pocos reportes acerca de parásitos hemotrópicos en la especie ovina en Colombia, el presente estudio se encaminó en identificar el agente causal de la babesiosis ovina mediante la implementación de microscopia, técnicas moleculares y secuenciación de ADN con el fin de determinar la especie circulante e instaurar estrategias de control adecuadas ante la enfermedad.

2. Metodología

2.1 Área y población objeto de estudio

Debido a características ambientales, se evaluó la presencia de hemoparásitos del género *Babesia* sp. en 10 predios seleccionados aleatoriamente ubicados en las veredas de Campamento, Santa Rosita, Pica Pica, San José de Uré y La Manuelita en el Municipio de Montelíbano, el cual se encuentra ubicado al sur del departamento de Córdoba-Colombia, entre 7°58'16" latitud Norte y 75°25'05" latitud Oeste donde predomina clima cálido y cuenta con 1.890 km² de superficie, albergando 3.947 ovinos de acuerdo al censo ICA 2016.

Para la asignación del número adecuado de animales requerido para la elaboración del estudio, el tamaño de la muestra se calculó por medio de la ecuación recomendada por Hernández (2006) y Pourhoseingholi, Vahedi y Rahimzadeh (2013) (ver ecuación 2.1.1) para estudios epidemiológicos en poblaciones animales donde N = 3.249 es la población de ovinos del municipio de Montelíbano según censo del ICA (2017), Z_α = 1,96 es el nivel de confianza (95%), e = 5% es el margen de error, P = 10% es la prevalencia esperada y de acuerdo a esto, se seleccionaron 167 ovinos (n).

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1-P)}{e^2 \cdot (N-1) + Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1-P)} \quad 2.1.1$$

2.2 Examen clínico

Inicialmente y con antelación a la toma de muestras, se llevó a cabo un examen clínico al animal con el objetivo de obtener datos relevantes (Anexo B) como el número de identificación, edad, sexo, estado productivo, raza, condición corporal, peso e

información como la temperatura corporal y Famacha[®] que permitiría por medio de análisis determinar la distribución de los grupos con respecto a la presentación de la enfermedad.

2.3 Recolección de la muestra

2.3.1 Muestra sangre periférica

Previa autorización del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia en su resolución N° 022, acta 18 del 21 de Noviembre de 2016 y basados en la metodología descrita y estandarizada en el Centro de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Extensión ovino - CIDTEO se realizó una depilación y desinfección con alcohol al 70% de la zona auricular, se ocluyó la vena con el fin de visualizar su ubicación y se puncionó con aguja calibre 22 en el área media de la vena. Una vez la sangre fue visible, se retiró la aguja y se procedió a realizar presión con algodón y desinfectante. Posteriormente se procedió a la elaboración del extendido de sangre en lámina la cual fue fijada durante 5 minutos con metanol para su adecuado almacenamiento basados en la metodología descrita por Escobar et al., (2013). Así mismo, cada lámina fue marcada con el número de registro individual asignado a cada animal.

2.3.2 Muestra sangre yugular

De cada animal evaluado y previa sujeción de este para garantizar un grado mínimo de invasividad basados en la metodología descrita y estandarizada en el Centro de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Extensión ovino - CIDTEO se procedió inicialmente a la depilación y desinfección de la zona yugular con alcohol al 70%. Luego con ayuda de aguja Vacoutainer de 12-15 mm calibre 20g se puncionó la vena en un ángulo de 30° y con un tubo de colecta con anticoagulante EDTA se obtuvieron 5 ml de sangre hasta terminar su vacío. Estas muestras de sangre fueron almacenadas a 4°C en un sistema triple básico con tres niveles de contención de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para el envío de sustancias infecciosas hasta su procesamiento.

2.4 Técnicas de laboratorio

2.4.1 Evaluación del hematocrito

Inicialmente se llevó a cabo la evaluación del hematocrito según León (2013) por medio de tubo capilar, procediendo a completar las $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con sangre con EDTA. Posteriormente el extremo identificado con un anillo de color azul se obstruyó con plastilina y luego se dispuso en la microcentrífuga con especial cuidado de localizar la zona obstruida hacia el exterior e identificando su ubicación en una tabla. Seguidamente se centrifugó a 12.500 revoluciones durante 5 minutos y como se muestra en la Figura 2-1 se midió el volumen de paquete celular sin incluir la capa de leucocitos y plaquetas con la ayuda de una regla graduada

Figura 2-1: Evaluación de hematocrito con tubo capilar

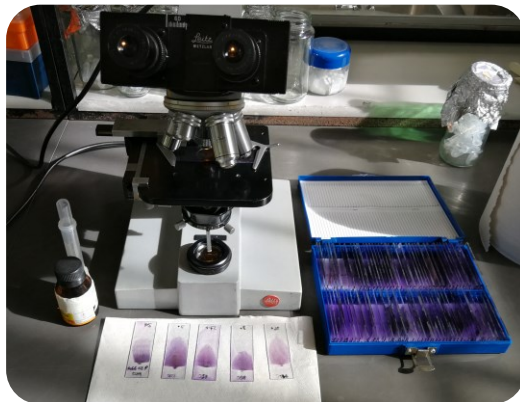


2.4.2 Elaboración del frotis sanguíneo

Posteriormente, se procedió a la elaboración de la tinción de los extendidos de sangre periférica realizados en campo con Eosina-Azul de metileno en solución May-Grunwald modificada (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), basados en la metodología descrita por Castalleto et al., (2018) diluyendo en proporción 3:1 la solución colorante en PBS pH 7.4 durante 40 minutos, luego se descartó la coloración con ayuda de agua destilada y se dejó a temperatura ambiente hasta su lectura en aceite de inmersión en

100X como se muestra en la Figura 2-2 con el objetivo de evaluar formas intraeritrocitarias correspondientes a piroplásmidos del género *Babesia* sp.

Figura 2-2: Extendido de sangre periférica



2.4.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras de sangre completa de ovino. Para ello se empleó el protocolo señalado en el Kit Promega Wizard® Genomic DNA Purification (CAT. # A1125) empleando metodología para extracción de ADN en bacterias intracelulares con lisozima de la siguiente manera: en tubo de 1.5ml esterilizado en UV Crosslinker FB-UXL-1000 se alicuotó 300µl de sangre y se mezcló con 900µl de solución de lisis celular llevándose a incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16.000g por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se reconstituyó el pellet con 480µl de solución EDTA 50mM y 120µl de lisozima (10mg/ml) para ser llevado a incubación por una hora a 37°C. Posteriormente, esta solución se centrifugó a 16.000g por 2 minutos y el sobrenadante fue descartado para reconstituir el pellet con 300µl de solución de lisis nuclear e incubado por 5 minutos a 80°C. Luego se adicionó 3µl de RNAsa y se regresó a incubación por una hora a 37°C. Seguidamente se adicionó 100µl de solución de precipitación de proteínas aplicando vórtex inmediatamente y luego se centrifugó a 16.000 g por 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo graduado de 1.5 que contenía 300µl de Isopropanol y se centrifugó a 20.000 g por 3 minutos. Enseguida se descartó el sobrenadante para adicionar 300µl de etanol al 70% y ser nuevamente centrifugado por 3 minutos a 20.000 g. El sobrenadante fue descartado de nuevo y el tubo se dispuso a secarse a temperatura ambiente durante 12 horas y luego

se conservaría a 4°C hasta su reconstitución y cuantificación en Thermo Scientific™ NanoDrop™.

2.5 Amplificación de ADN

Para la elaboración de las técnicas moleculares de PCR y con el objetivo de identificar los cebadores adecuados para la amplificación de los genes objetivo, se evaluó la especificidad reportada de cada uno en estudios previos y se concluyó que el marcador ideal para identificar muestras positivas a ***Babesia spp.*** es la subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA por su alto grado de conservación y para *B. ovis* el gen que codifica para la proteína D de superficie BoSPD, para *B. bigemina* el gen que codifica para la proteína asociada a las roptrias – RAP-1c y para *B. bovis* la proteína del antígeno asociada a las roptrias – RRA por su alto grado de especificidad. Luego a cada juego de cebadores por medio de la herramienta BLAST disponible en el National Center for Biotechnology Information – NCBI se le evaluó la afinidad con las secuencias reportadas previamente en la base de datos. Estas secuencias junto con los productos de amplificación esperados se muestran en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Secuencias de cebadores empleadas en la amplificación de fragmentos de genes asociados a *Babesia spp.*, *B. ovis*, *B. bigemina*, *B. bovis*

CEBADOR	GEN	SECUENCIAS	Tamaño del fragmento	Autor
PiroA- PiroB	Gen de la Subunidad pequeña ribosomal 18S rRNA de piroplasmidos GenBank KU234526	5'-AATAACCCAATCCTGACACAGGG-3'	423 pb	(Phipps et al., 2016)
		5'-TTAAATAGCAATGCCCCCAAC-3'		
BoSPD	Gen de la proteína D de superficie de <i>Babesia ovis</i> GenBank KR536611	5'-GGCCCATGGGCATGTTGGCCAAGTATCTTGCC-3'	471 pb	(Erster, Roth, Wolkomirsk y, et al., 2015)
		5'-CCGCTGCAGCGCCGTC AATTTGGCCTTGA ACTC-3'		
BiF BiR	Gen de la proteína asociada a las roptrias de <i>Babesia bigemina</i> RAP-1c GenBank AY146983	5'-ATGATTCACACTACGCTTGCCTC-3'	600 pb	(Mahmoud et al., 2015)
		5'-GTCTTGTAGTATATGGCGGTCATGTAG-3'		
BiNF BiNR		5'-TCTCGAAGACAGCGAACAGA-3'	236 pb	
		5'-GTGAAGCTGGTAGGGGTCAG-3'		
BoF BoR	Gen del antígeno relacionado con la proteína asociada a las roptrias de <i>Babesia</i>	5'-ATTGGCATCTGGGCTAAGTG-3'	823 pb	
		5'-CAGCCCATTTACAGGTTTT-3'		
BoNF BoNR	bovis RRA GenBank XM_001610900	5'-TGTTCTGAGCCGCTATCTT-3'	387 pb	
		5'-CAGCCCATTTACAGGTTTT-3'		

Se elaboraron pruebas previas a la evaluación de las muestras con el objetivo de estandarizar temperatura y concentración de reactivos con las muestras de control positivo de *B. bovis* y *B. bigemina* de sangre de terneros inoculados experimentalmente y pertenecientes al banco de ADN del laboratorio de Control Genético en Salud Animal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia y la muestra control de *B. ovis* otorgada por la Doctora Monica Leszkowicz Mazuz del Kimron Veterinary Institute, Israel. Para esta PCR se implementaron las condiciones de amplificación reportadas por Phipps et al. (2016) que amplifican un fragmento de 423 pb del gen 18S rRNA de los miembros del orden Piroplasmida con los cebadores mencionados en la tabla 2-1 bajo las siguientes condiciones de amplificación: una denaturación inicial de 94°C por 3 minutos seguido de 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, gradiente de temperatura de

alineamiento de 50°C - 55°C y 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa para *Babesia* sp.

Para la identificación molecular de muestras infectadas con *Babesia* spp. se implementaron las condiciones de amplificación reportadas por Phipps et al. (2016) que amplifican un fragmento de 423 pb del gen 18S rRNA de los miembros del orden Piroplasmida con los cebadores mencionados en la tabla 2-1. bajo las siguientes condiciones de amplificación: denaturación inicial de 94°C por 3 minutos seguido de 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineamiento a temperatura de 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

2.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa para *B. ovis*

Posteriormente las muestras fueron procesadas mediante cebadores BoSPD acorde a las condiciones descritas por Erster et al. (2016) que amplifican un fragmento de 471 pb con los cebadores mencionados en la tabla 2-1, bajo las siguientes condiciones de amplificación: denaturación inicial de 94°C por 3 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 40 segundos, alineamiento a temperatura de 58°C por 40 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa para *B. bigemina*

Adicionalmente, las muestras se evaluaron en una PCR anidada dirigida a amplificar un fragmento del gen de la proteína asociada a las roptrias (*rap-1c*) de *B. bigemina* mediante cebadores BiF-BiR según las condiciones descritas por Mahmoud, et al., (2015) que amplifican un fragmento final de 236 pb usando los cebadores mencionados en la tabla 2-1, bajo las siguientes condiciones de amplificación: para la primera ronda de PCR la temperatura de denaturación inicial fue de 95°C por 3 minutos seguido de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, alineamiento a temperatura de 61.2°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Las condiciones de amplificación para la PCR anidada fueron: una denaturación inicial de 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, alineamiento a

temperatura de 63.1°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

2.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa para *B. bovis*

Finalmente, las muestras fueron evaluadas en una PCR semi-anidada dirigida a amplificar un fragmento del gen del antígeno relacionado con la proteína asociada a las roptrias (rra) de *B. bovis* mediante cebadores BoF-BoR según las condiciones descritas por Mahmoud, et al., (2015) que amplifican un fragmento de 387 pb usando los cebadores mencionados en la Tabla 1. bajo las siguientes condiciones de amplificación: En la primera PCR una denaturación inicial de 95°C por 3 minutos seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineamiento a temperatura de 60°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Las condiciones de amplificación para la PCR semi-anidada fueron: denaturación inicial de 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineamiento a temperatura de 60°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

2.6 Visualización, Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético

Los amplificados de PCR fueron separados a partir del tamaño del fragmento en gel de agarosa al 1.5% conteniendo SYBRsafe y visualizados en Transiluminador Safe Imager™ 2.0 Invitrogen. Posteriormente se seleccionaron amplicones de PCR Rap-1c que fueron purificados con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Zymo Research de acuerdo con las instrucciones del fabricante transfiriendo el fragmento a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 ml disuelto con 3 volúmenes de solución ADB por cada volumen de gel de agarosa. Luego se envió a incubación por 10 minutos a 55°C y el contenido se transfirió a columna Zymo-Spin™. Se centrifugó por 60 segundos a 14.000g y se adicionaron 200 µL de solución buffer de lavado para centrifugar por 30 segundos a 14.000g, realizando de nuevo este último paso. Luego se adicionaron 15µL de agua ultra pura y se centrifugó a 14.000g por 1 minuto. Posteriormente se adicionó 1.2µL de cebador a cada muestra y se enviaron los fragmentos al servicio de secuenciación del

Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia – SSiGMOL donde las muestras son procesadas empleando la química BigDye Terminator y procesadas en un Analizador Genético Applied Biosystems 3500.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas manualmente en el programa *Biological Science Alignment Editor* (Bioedit®, Carlsbad, California, USA) y alineadas con la ayuda del software *Molecular Evolutionary Genetic Analysis 7* (MEGA 7®, DNASTar Inc., Madison, Wisconsin, USA) donde posteriormente se procedió a realizar el análisis filogenético con la metodología de distancias *neighbor-joining* y el algoritmo *bootstrap test* para generar 1000 réplicas de alineamientos a partir de la original.

El alineamiento se realizó con 11 secuencias reportadas en el Genbank a partir del gen Rap-1c de *B. bigemina* (KM212998.1 - XM_012911170.1 - AY146983.1 - AY146987.1 - AY146986.1 - AY146985.1 - AY146984.1 - L77326.1 - KF267247.1 - M91173.1 - M91169.1), 8 secuencias obtenidas a partir de cebador Rap-1c de ovinos de Montelíbano y 2 secuencias de muestras control positivo de *B. bigemina*. Luego, empleando la metodología *neighbor joining-bootstrap* se realizó el análisis filogenético.

2.7 Análisis estadístico

Previamente con la ayuda del programa estadístico RStudio (Versión 3.4.4 15/03/2018) se realizó un análisis descriptivo evaluando las variables hematocrito, edad, sexo, estado productivo, raza, condición corporal, peso, temperatura y famacha (Anexo A) y posteriormente, con los datos obtenidos se realizó una regresión logística para determinar la contribución de estos factores frente al resultado obtenido bajo la técnica molecular de PCR dirigida a amplificar un fragmento del gen Rap-1c de *Babesia bigemina* donde se consideró como significantes aquellos valores de P inferiores a 0.1 ($P < 0.1$).

3. Resultados

3.1 Muestreo

Se evaluaron 26 machos (15%) y 141 hembras (85%), agrupados en las razas Africana (55%), Razas puras (19%) y Mestizos (26%) como se muestra en la Tabla 2-1. Las edades de los animales fueron agrupadas entre los rangos de 3 a 11 meses de edad (35%), 12 a 23 meses de edad (19%) y 24 o más meses de edad (46%) como se muestra en la Tabla 2-1. y su estado fisiológico al momento del muestreo fue 9% machos reproductores, 3% corderos en destete y 32% en levante, 3% hembras en lactancia, 47% vacías (47%) y 6% en gestación como se muestra en la Tabla 2-2.

Tabla 3-1: Distribución de las razas de los animales del muestreo (n=167)

	SEXO	RAZA	NÚMERO	%
n = 167	HEMBRAS 85%	Africana	84	50%
		Puro	25	15%
		Mestizo	32	20%
	MACHOS 15%	Africana	9	5%
		Puro	7	4%
		Mestizo	10	6%

Tabla 3-2: Distribución de las edades de los animales del muestreo (n=167)

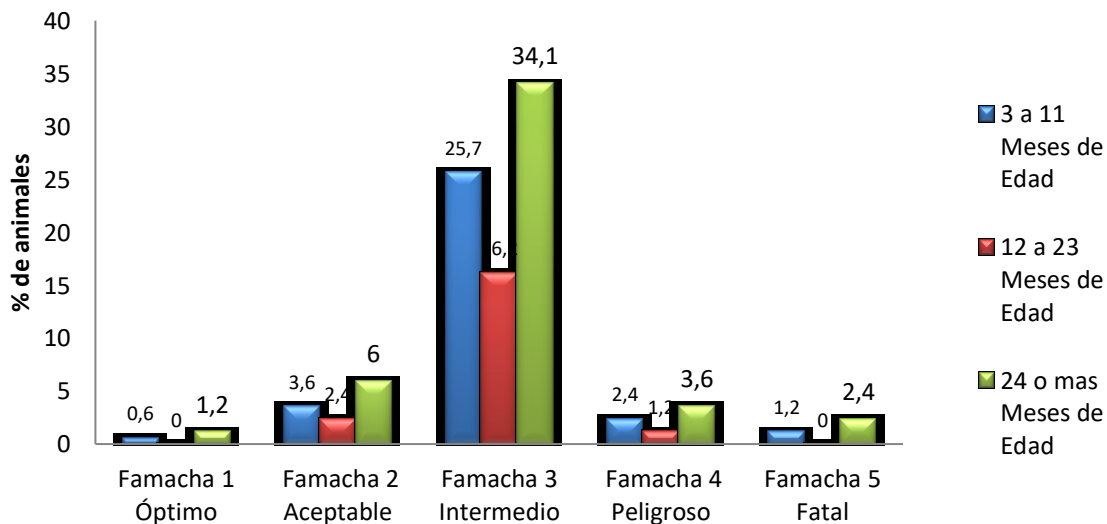
	EDAD	ESTADO	NÚMERO	%
n = 167	3 A 11 MESES DE EDAD	Corderos destetos	5	3%
		Corderos en levante	53	32%
	12 A 23 MESES DE EDAD	Hembras vacías	28	17%
		Machos reproductores	3	2%
	24 O MAS MESES DE EDAD	Hembras vacías	51	30%
		Hembras gestantes	10	6%
		Hembras lactantes	5	3%
		Machos reproductores	12	7%

3.2 Examen clínico

Los ovinos muestreados fueron evaluados previa colecta de sangre con la finalidad de evidenciar parámetros relacionados con enfermedad causada por hemoparásitos. De esta manera, datos como la temperatura rectal fue evaluada inicialmente con la intención de no ser alterada por la manipulación, mostrando parámetros no superiores a 40.1 °C siendo normales (Pezzanite, Neary, Hutchens, & Scharko, 2009), teniendo en cuenta la hora del muestreo (12:30 pm) y la localización de los predios en zona trópico cálido.

La coloración de la mucosa palpebral nos indicó el posible grado de anemia de los animales de acuerdo al protocolo reportado por Malan, Van Wyk, y Wessels (2001), donde los ovinos categorizados en edades entre 3 a 11 meses de edad y mayores a 24 meses de edad fueron los grupos de animales con categorías 4 y 5 de acuerdo a la técnica Famacha® como se muestra en la Figura 3-1. De acuerdo a esto, animales de 3 a 11 meses de edad en categoría 4 de Famacha® (2.4%) fueron 1 ejemplar de la raza denominada Africana y 3 mestizos. En categoría 5 de Famacha® (1.2%) fue 1 ejemplar de la raza denominada Africana y 1 mestizo. Con respecto a los ovinos agrupados en 24 o más meses de edad, se encontraron en categoría 4 de Famacha® (3.6%) a 2 animales de la raza Africana, 2 Katahdin y 2 mestizos y en categoría 5 de Famacha® (2.4%) a 2 animales de la raza Dorper, 1 mestizo y 1 de la raza denominada Africana.

Figura 3-1: Distribución del porcentaje de animales respecto a calificación obtenida de Famacha® (n=167)

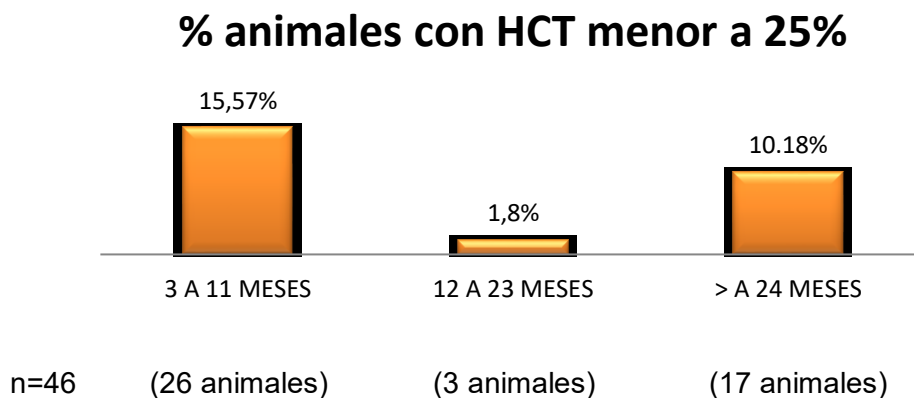


El estado de condición corporal en los ovinos se encontraba agrupado en 21% de los animales en calificación 2.0, 77.2% en calificación 3.0 y 1.8% en calificación 4.0. Finalmente, solo 1 animal presentó alteración en el tiempo de coagulación posterior a la punción y no fue posible obtener vectores ixódidos de la totalidad de los animales al momento de la inspección clínica.

3.3 Hematocrito

La valoración del paquete celular es un parámetro que se ve influenciado por diversas manifestaciones, entre ellas la presencia de piroplásmidos en eritrocitos. Es así como 46 ovinos (27.1%) del estudio se identificaron con Hematocrito (HCT) inferior al 25%, 97 (58.1%) entre el 25% al 35% de HCT y 24 (14.4%) se encontraban con valores superiores al 35% HCT. Siendo los animales entre 3 a 11 meses de edad (15.57%) el grupo de animales con conteos más bajos con respecto al resto del grupo muestreado como se puede apreciar en la Figura 3-2.

Figura 3-2: Distribución del porcentaje de ovinos respecto a resultado de hematocrito inferior al 25% (n=46)

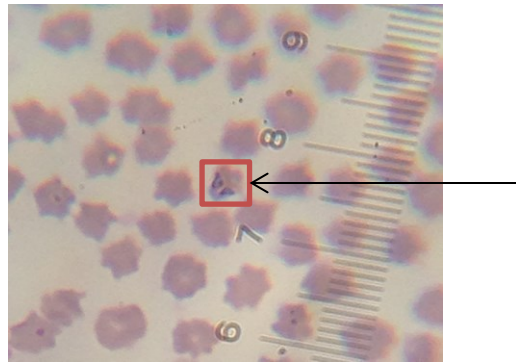


Aquellos animales agrupados en 3 a 11 meses de edad con porcentaje de hematocrito menor al 25% correspondieron a 10 ovinos de la raza denominada Africana y 17 mestizos.

3.4 Frotis sanguíneo

El examen microscópico de los extendidos de sangre mostró parasitemia correspondiente según morfología a *Babesia spp.* en 4 muestras como se puede observar en la Figura 3-3. representando el 2.4% del total de animales colectados correspondientes a 1 macho de 4 meses de edad y 3 hembras de 3, 5 y 24 meses de edad. Estos ovinos se ubicaron en dos predios diferentes donde 3 ejemplares se localizaron en la vereda La manuelita y uno en la vereda San José de Uré.

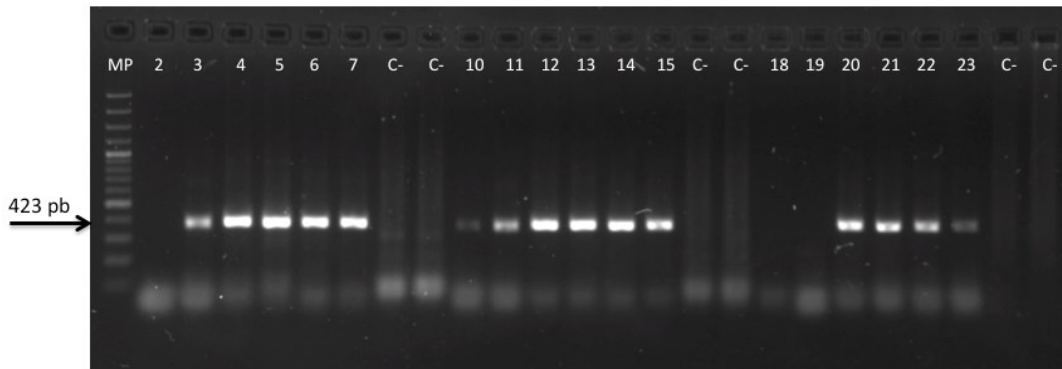
Figura 3-3: Extendido de sangre de ovino contaminada con inclusión intraeritrocitaria.



3.5 Reacción en cadena de la polimerasa

3.5.1 Amplificación del ADN

Figura 3-4: Ajuste de las condiciones de PCR cebadores PiroA-Prio B.



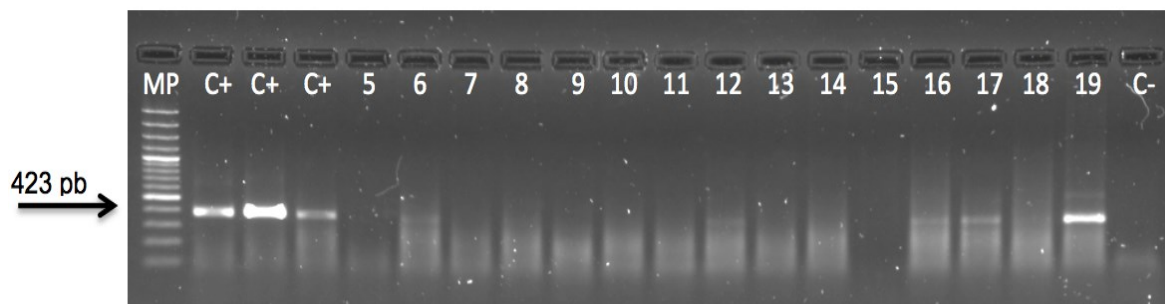
Gel de agarosa al 1,5% que muestra una PCR gradiente de temperatura de alineamiento de 50°C (carriles 2 al 9), 58°C (carriles 10 al 17) y 55 °C (carriles 18 al 25) bajo condiciones reportadas por Phipps et al. (2016) que amplifican un fragmento de 423 pares de bases. Con una mix de 15µL de volumen final de reacción (2µL de muestra de ADN) que contenían 50-100 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50mM KCl) 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4mM de cada cebador y 0,45 UI/µL de Taq polimerasa (ThermoFisher, Cat S33102).

Las muestra evaluadas fueron: control *B. bovis* extraída con kit Promega Wizard® sin lisozima en los carriles 2, 3, 10, 11, 18 y 19. Muestras *B. bigemina* kit Promega Wizard® sin lisozima en los carriles 4, 5, 12, 13, 20 y 21; Muestras *B. bigemina* kit Promega Wizard® con lisozima en los carriles 6, 7, 14, 15, 22 y 23 y el control negativo en los carriles 8, 9, 16, 17, 24 y 25. Observándose que *B. bovis* kit Promega Wizard® sin lisozima no amplificó a 58° C y *B. bigemina* amplifica a las 3 temperaturas con cualquiera de los métodos de extracción. Teniendo en cuenta esto, en las condiciones de amplificación de la totalidad de las muestras, estas fueron evaluadas a una temperatura de alineamiento de 58°C.

3.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa para *Babesia* spp.

Por medio de cebadores PiroA-PiroB fue posible obtener amplificación en 58 muestras como se muestra en la Figura 3-5.

Figura 3-5: Identificación de ovinos positivos a *Babesia* spp. mediante PCR cebadores PiroA -PiroB.



Gel de agarosa al 1,5% donde muestra una PCR que amplifica un fragmento de 423 pares de bases bajo las condiciones descritas por Phipps et al. (2016). Con una mix de 15µL de volumen final de reacción (2µL de muestra de ADN) que contenían 50-100 ng de

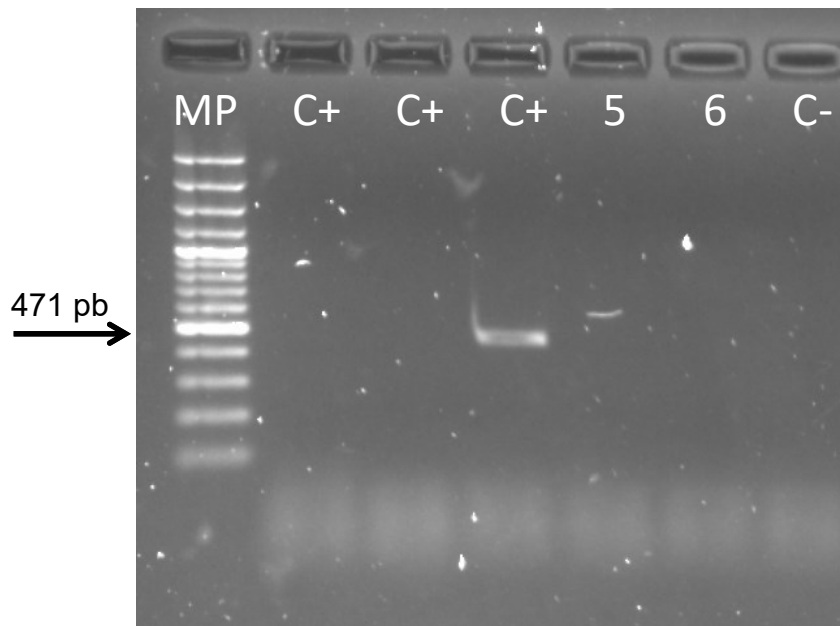
ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50mM KCl) 2.5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4mM de cada cebador y 0,45 UI/ μ L de Taq polimerasa (ThermoFisher, Cat S33102).

Las muestras evaluadas fueron: *B. bovis* en el carril 2, *B. bigemina* en el carril 3 y *B. ovis* en el carril 4. Las muestras de ovinos corresponden a los carriles 5 al 19 y el control negativo en el carril 20. Se observó amplificación en las muestras correspondientes a los carriles 12, 16, 17 y 19.

3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa para *B. ovis*

Por medio de cebadores BoSPD no fue posible identificar muestras positivas a *B. ovis* como se muestra en la Figura 3-6

Figura 3-6: Identificación de ovinos positivos a *Babesia ovis* mediante PCR cebadores BoSPD



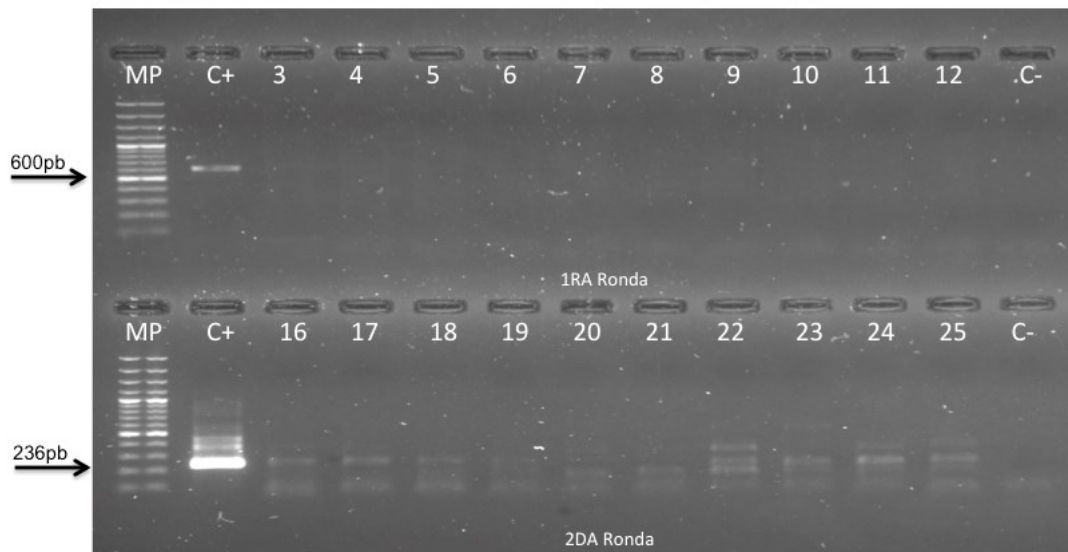
Gel de agarosa al 1,5% donde muestra una PCR que amplifica un fragmento de 471 pares de bases bajo las condiciones descritas por Erster et al. (2016). Con una mix de 15 μ L de volumen final de reacción (2 μ L de muestra de ADN) que contenían 50-100 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50mM KCl) 1.5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4mM de cada cebador y 0,45 UI/ μ L de Taq polimerasa (ThermoFisher, Cat S33102).

Las muestras evaluadas fueron: *B. bovis* en el carril 2, *B. bigemina* en el carril 3 y *B. ovis* en el carril 4 y las muestras de ovinos corresponden a los carriles 5 – 6 y el control negativo en el carril 7. Se observó amplificación solo en la muestra control positivo de *B. ovis* correspondiente al carril 4.

3.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa para *B. bigemina*

De acuerdo con los resultados negativos obtenidos por la técnica de PCR-BoSPD, se elaboró PCR anidada con cebadores BiF-BiR logrando obtener amplificación en la segunda ronda de PCR en 39 muestras sanguíneas como se muestra en la Figura 3-7.

Figura 3-7: Identificación de ovinos positivos a *Babesia bigemina* mediante PCR cebadores BiF-BiR.



Gel de agarosa al 1,5% donde muestra una PCR que amplifica un fragmento de 236 pares de bases en segunda ronda bajo las condiciones descritas por Mahmoud, et al., (2015). Con una mix de 15µL de volumen final de reacción (2µL de muestra de ADN) que contenían 50-100 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50mM KCl) 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4mM de cada cebador y 0,45 UI/µL de Taq polimerasa (ThermoFisher, Cat S33102). En la segunda ronda de PCR la concentración del MgCl₂ se disminuyó a 2.5mM.

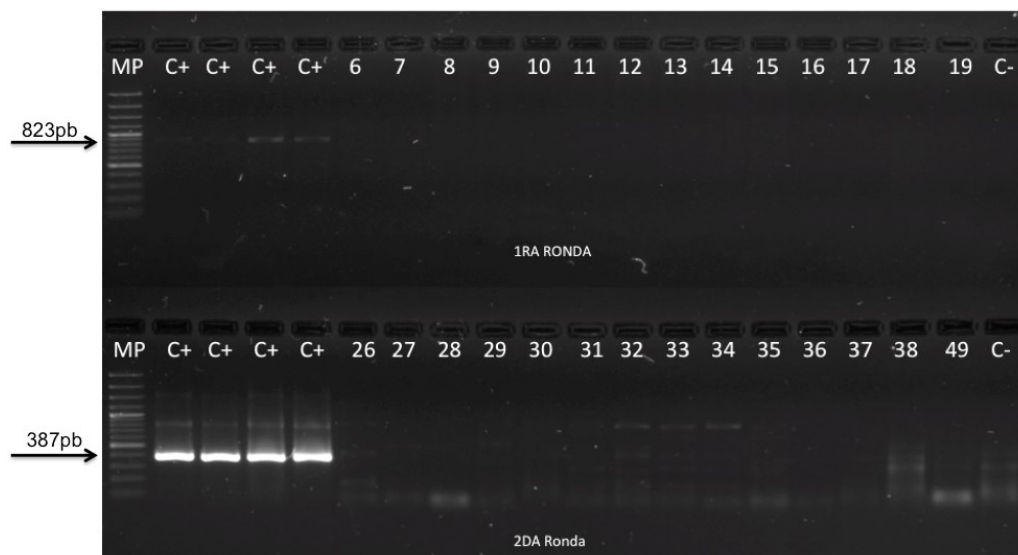
Las muestras evaluadas fueron: *B. bigemina* en el carril 2 y las muestras de ovinos corresponden a los carriles 3 al 12. El control negativo corresponde al carril 13. En la

primera ronda de PCR se observó amplificación de la muestra control *B. bigemina* correspondiente al carril 2. En la segunda ronda de PCR se observó amplificación de la muestra control *B. bigemina* correspondiente al carril 15 y en las muestras de ovinos correspondientes a los carriles 16 al 25 donde se procedió a la purificación de bandas para ser enviadas a secuenciación.

3.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa para *Babesia bovis*

De acuerdo con los resultados negativos obtenidos por la técnica de PCR-BoSPD, se elaboró PCR semi-anidada con cebadores BoF y BoR como se muestra en la Figura 3-8.

Figura 3-8: Identificación de ovinos positivos a *Babesia bovis* mediante PCR cebadores BoF-BoR.



Gel de agarosa al 1,5% donde muestra una PCR que amplifica un fragmento de 387 pares de bases en segunda ronda bajo las condiciones descritas por Mahmoud, et al., (2015). Con una mix de 15 μ L de volumen final de reacción (2 μ L de muestra de ADN) que contenían 50-100 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50mM KCl) 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4mM de cada cebador y 0,45 UI/ μ L de Taq polimerasa (ThermoFisher, Cat S33102). En la segunda ronda de PCR la concentración del MgCl₂ se disminuyó a 2.5mM.

Las muestras evaluadas fueron: *B. bovis* en los carriles 2 y 3 y las muestras de ovinos en los carriles 6 al 19. El control negativo corresponde al carril 20. En la primera ronda de PCR se observó amplificación de la muestra control *B. bovis* correspondiente a los carriles 2, 3, 4 y 5. En la segunda ronda de PCR se observó amplificación de la muestra control *B. bovis* al pozo 22, 23, 24 y 25 y las diferentes bandas resultado de la amplificación en las muestras de ovinos de los carriles 32, 33 y 34 se purificaron y se enviaron a secuenciación.

3.6 Secuenciación y análisis filogenético

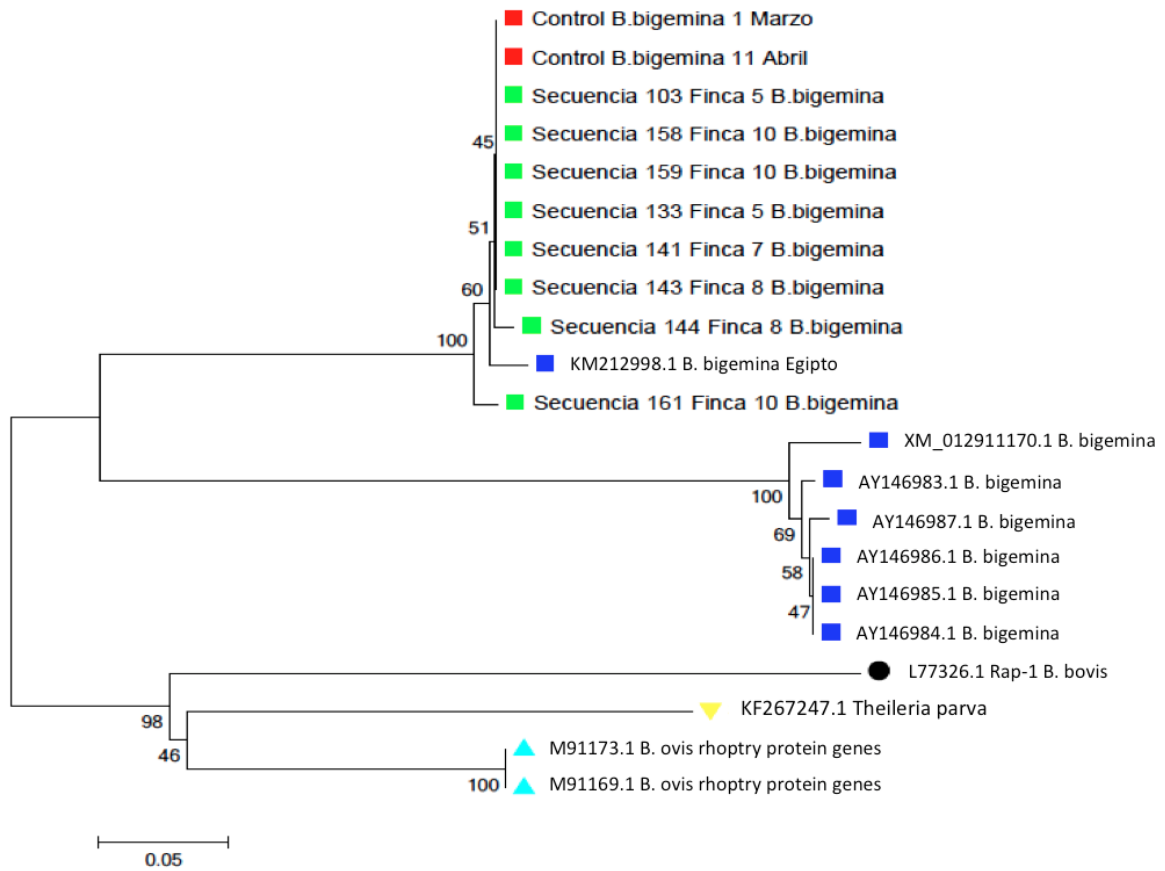
Ningún producto de PCR analizado con los cebadores BoF-BoR tiene secuencias similares a *B. bovis*. A partir de los fragmentos obtenidos bajo cebadores Bif-BiR se obtuvieron 8 secuencias las cuales fueron comparadas mediante BLAST con el objetivo evaluar similitud con secuencias previamente reportadas las cuales correspondieron en un 100% a *B. bigemina* como se muestra en la Tabla 3-1. para el gen Rap-1c de *B. bigemina*.

Posteriormente, mediante edición manual de las secuencias en Bioedit® y alineamiento en MEGA 7® se obtuvo árbol filogenético para el gen Rap-1c de *B. bigemina* (Figura 3-9) donde se observa un agrupamiento de las secuencias obtenidas en el presente estudio con las secuencias de los controles positivo a *B. bigemina*. y una secuencia previamente reportada en GenBank (KM212998) por Mahmoud et al., (2015) en Egipto. Adicionalmente se observa un agrupamiento diferencial con las secuencias reportadas en GenBank por Suarez et al., (2003) de cepas vacunales de *B. bigemina*. Finalmente podemos observar como estos dos grupos se encuentran lejanos a organismos diferentes a *B. bigemina*.

Tabla 3-3: Secuencias del gen Rap-1c de *B. bigemina* detectadas en las muestras de sangre de ovinos del estudio

ID	SECUENCIA
Control 1 <i>B. bigemina</i>	CACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGAT TTGCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCA TCGCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGAG AA
Control 2 <i>B. bigemina</i>	CACGGCATTTCGATGGTGAAGGCAGTTGCCCTTCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGC GATTTGCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGAT TCATCGCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTC
Muestra ovino 103	CACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGAT TTGCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCA TCGCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGAG A
Muestra ovino 133	ACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGATTT GCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCATC GCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGAGAA
Muestra ovino 141	ACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGATTT GCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCATC GCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGAGAA
Muestra ovino 143	CACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGAT TTGCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCA TCGCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGA
Muestra ovino 144	CGGCATCGATCCCTGCAGCGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGA TTTGGCTCTGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATT CATCGCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCC AGAA
Muestra ovino 158	ACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGATTT GCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCATC GCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGAGAA
Muestra ovino 159	ACGGCATCGATGGTGAGGCAGTTGCCCTCCTTGCAACGCGCAACGTAGGCAGCGATTT GCGATGCGCAATGGTGCTCGTCCTTGCTGCCGAGGCACATTTGCGCAATGGATTCATC GCTGATCAGTCCGATTTCTCCTGCATGGCCTTCTCAATCTGTTGCTGTCTTCGAGAA

Figura 3-9: Árbol filogenético a partir del gen Rap-1c de *B. bigemina*

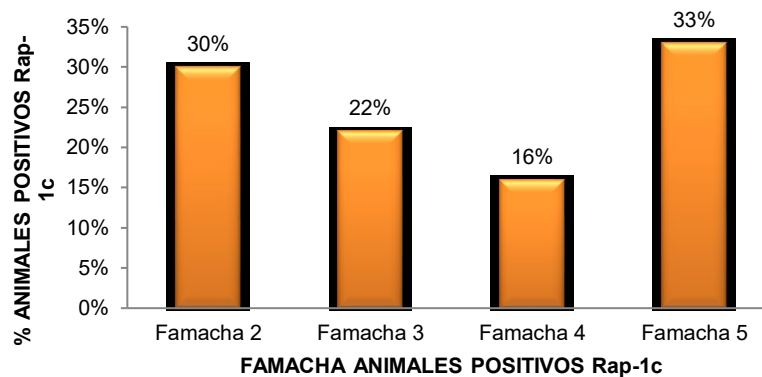


3.7 Análisis estadístico

Acerca de los resultados obtenidos bajo el análisis estadístico es posible afirmar que no existe diferencia significativa ($P < 0.1$) con respecto al resultado obtenido bajo la técnica “PCR *Babesia bigemina* Rap-1c” y las variables Famacha[®] ($P = 0.45$), hematocrito ($P = 0.79$), estado productivo (Reproductor ($P = 0.59$), Hembra gestante ($P = 0.24$), Hembra vacía ($P = 0.6$) y Hembra lactante ($P = 0.18$)), Condición corporal calificación 2 ($P = 0.91$), edad ($P = 0.77$), Sexo (Macho ($P = 0.14$)) y peso ($P = 0.48$). Sin embargo, si es posible afirmar que existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido en PCR Rap-1c y animales mestizos - raza ($P = 0.07$) donde es 5.91 veces más probable que se presenten animales positivos a *B. bigemina* en animales cruzados con respecto a la raza local.

Respecto a la calificación de los ovinos obtenida bajo la técnica Famacha® (P=0.45), se observa que no existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo PCR-Rap-1c en donde en el estudio, ovinos con calificación 2 el 30% fue positivo a *B. bigemina*, ovinos con calificación 3 el 22% fue positivo a *B. bigemina*, ovinos con calificación 4 el 16% fue positivo a *B. bigemina* y ovinos con calificación 5 el 33% fue positivo a *B. bigemina* como se muestra en la Figura 3-10.

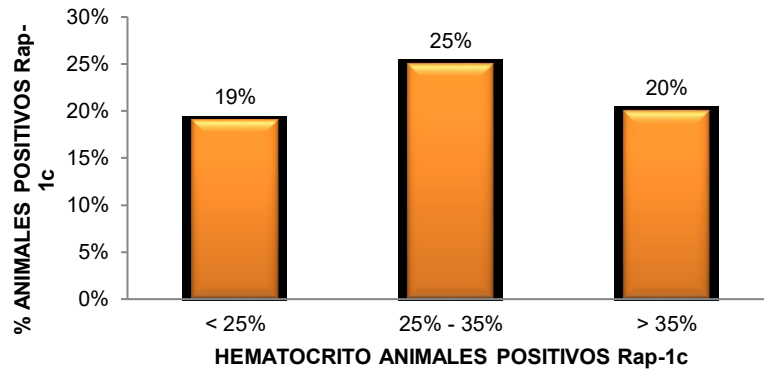
Figura 3-10: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a *B. bigemina* respecto a Famacha® (P=0.45)



n= 39 (6 animales) (29 animales) (2 animales) (2 animales)

En relación a la valoración del hematocrito de los animales (P=0.79), se observa que no existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo PCR-Rap-1c en donde en el presente estudio, ovinos con valores inferiores al 25% de hematocrito el 19% fue positivo a *B. bigemina*, ovinos con valores entre el 25% y 35% de hematocrito el 25% fue positivo a *B. bigemina* y ovinos con valores superiores al 35% de hematocrito el 20% fue positivo a *B. bigemina* como se muestra en la figura 3-11.

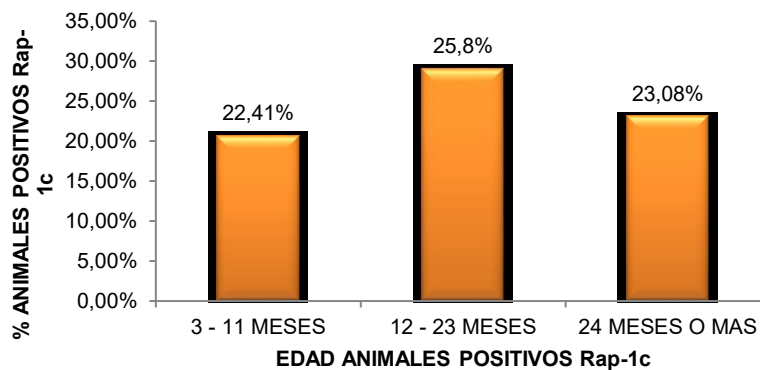
Figura 3-11: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a *B. bigemina* respecto al Hematocrito (P=0.79)



n= 39 (9 animales) (25 animales) (5 animales)

En cuanto a la edad de los animales (P=0.77), se observa que no existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo PCR-Rap-1c en donde ovinos agrupados en 3 a 11 meses de edad el 20.68% fue positivo a *B. bigemina*, de los agrupados en 12 a 23 meses de edad el 29.03% fue positivo a *B. bigemina* y de los agrupados con 24 o más meses de edad el 23.08% fue positivo a *B. bigemina* como se muestra en la Figura 3-12.

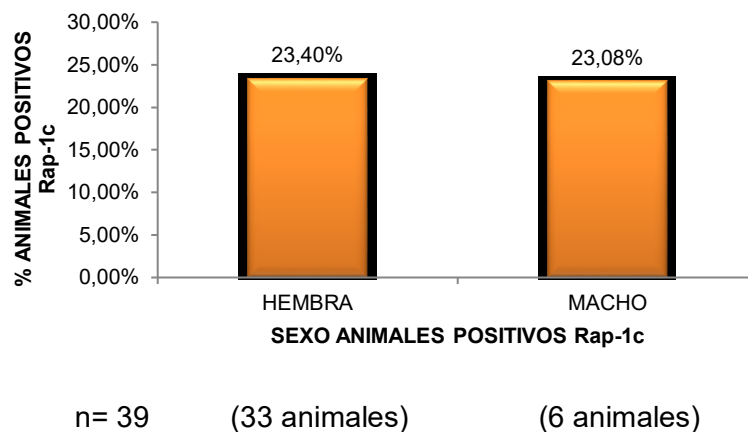
Figura 3-12: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a *B. bigemina* respecto a edad (P=0.77)



n= 39 (13 animales) (8 animales) (18 animales)

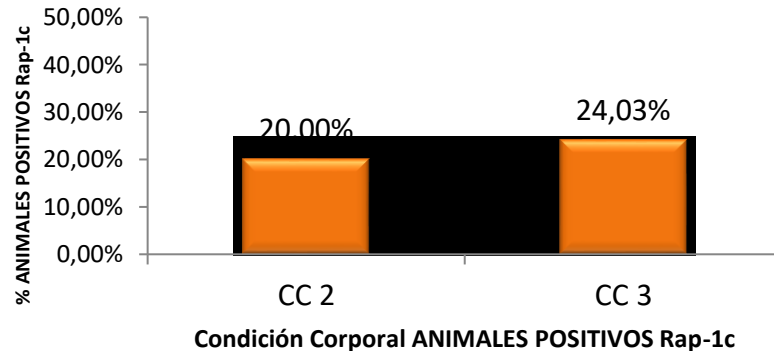
Respecto a la distribución entre ovinos machos y hembras positivos a *B. bigemina* ($P=0.14$) en el estudio se encontró que no existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo PCR-Rap-1c en donde se evidenció que de las hembras muestreadas el 23.4% fue positivo a *B. bigemina* y de los machos muestreados el 23.08% fue positivo a *B. bigemina* como se muestra en la Figura 3-13.

Figura 3-13: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a *B. bigemina* respecto a sexo ($P=0.14$)



En relación con la condición corporal (CC) de los ovinos positivos a *B. bigemina* ($P=0.91$) se encontró que no existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo PCR-Rap-1c donde se encontró que de los 35 animales muestreados en CC2 el 20% eran positivos y de los 129 animales en CC3 el 24.03% fueron positivos a *B. bigemina* como se muestra en la Figura 3-14.

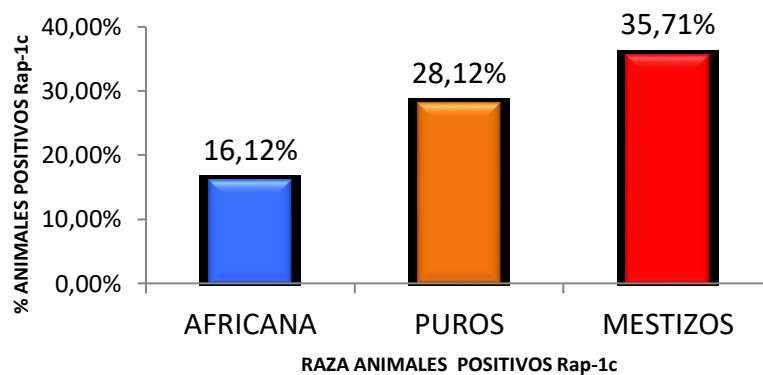
Figura 3-14: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a *B. bigemina* respecto a condición corporal (P=0.91)



n= 39 (7 animales) (31 animales)

Finalmente, la variable raza (P=0.07), la cual fue la única donde se encontró diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo PCR-Rap-1c, se muestra que de los ovinos mestizos del estudio el 35.7% fueron positivos a *B. bigemina*, de los ovinos puros el 28.1% fueron positivos a *B. bigemina* y de los animales de raza Africana solo el 16.1% fueron positivos como se muestra en la Figura 3-15.

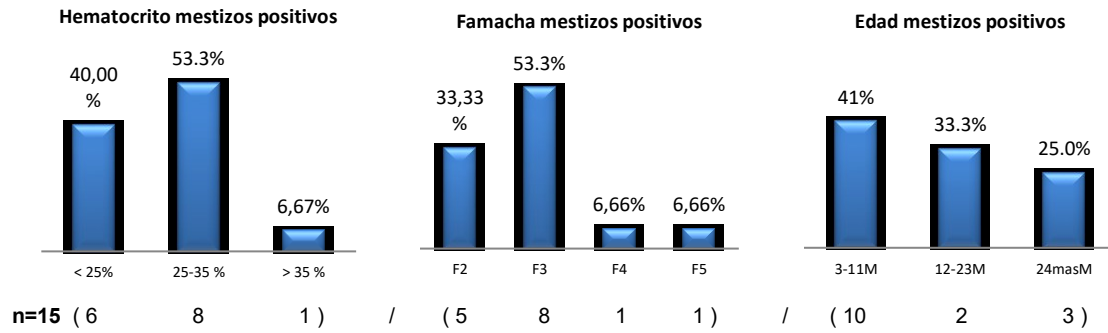
Figura 3-15: Distribución del porcentaje de ovinos positivos a *B. bigemina* respecto a raza (P=0.07)



n=39 (15 animales) (9 animales) (15 animales)

De estos animales mestizos se pueden observar en la Figura 3-14 parámetros como hematocrito y Famacha[®] agrupados en valores normales, a excepción de la edad donde la mayoría de los animales mestizos afectados con *B. bigemina* tenían de 3 a 11 meses de edad.

Figura 3-16: Distribución del porcentaje de ovinos mestizos positivos a *B. bigemina* con respecto a hematocrito, Famacha® y edad



4. Discusión

La babesiosis es una enfermedad transmitida por garrapatas en climas tropicales y subtropicales causante de pérdidas económicas en la producción animal. Comparado con la información acerca de la presencia de hemoparásitos en otros países, es muy poca la encontrada a nivel nacional, donde la babesiosis se conoce solo en la especie bovina y en los ovinos se cuenta con reportes emitidos por el ICA en los años 2012 y 2013 de 7 muestras positivas a ***Babesia spp.*** por medio de frotis (Osorio Martínez et al., 2012 ; Araujo et al., 2013). Es por esto que se buscó identificar bajo metodología molecular el agente infeccioso responsable de la babesiosis ovina en el municipio de Montelíbano-Córdoba, Colombia y para tal objetivo se emplearon frotis de sangre, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR y secuenciación de ADN a partir de muestras de sangre completa.

En el presente estudio, la temperatura corporal en los animales mostró niveles normales como lo reportado por Rahbari, Nabian, Khaki, Alidadi y Ashrafihelan (2008) donde en una evaluación de la infección experimental se vio un pico de fiebre entre los días 2 y 4 post inoculación y posteriormente disminuye a niveles normales.

Los ovinos agrupados entre 3 a 11 meses de edad mostraron una calificación menor bajo la técnica Famacha® comparado con los demás grupos de animales evaluados, lo cual es usual según lo reportado por Vargas (2006) donde menciona que animales jóvenes son un grupo afectado por parásitos a temprana edad.

Así mismo, el grupo de animales con mayor perjuicio en su hematocrito fue el conformado por ovinos entre 3 a 11 meses de edad (58,69%), lo cual aunque no concuerda con el porcentaje en animales reportados por Orunç Kiliñç et al., (2015) de un 21.92%, refleja la hemólisis registrada en los animales probablemente debido a la presentación de patologías asociadas a hemoparásitos o nematodos gastrointestinales.

La prevalencia obtenida por medio de extendido de sangre del 2.4% del total de ovinos muestreados en el municipio de Montelíbano-Córdoba, es similar a la reportada en Colombia por Blanco, Cardona y Álvarez, (2016) en el departamento de Córdoba donde informaron un 3% de prevalencia de ***Babesia spp.*** en bovinos, así mismo, reportes realizados por Herrera et al., (2008) en un 1.1% en el Bajo Cauca antioqueño y 1.7% en el Alto de San Jorge en Córdoba. La prevalencia de este estudio aunque es mayor, se podría también comparar con la reportada por Adejimini et al., (2004) en Nigeria en un 1.9% y Esmailnejad et al., (2014) en Irán en un rango de 0.01-3%. Esta baja prevalencia en muestras de sangre con respecto a otro tipo de pruebas ha sido descrita por Bal, Mahajan, Folia, Kaur, & Singh, (2016) debido a la baja sensibilidad de la técnica, donde en ejemplares asintomáticos es posible se presenten falsos negativos o contrario a esto, a causa de artefactos en la coloración se den falsos positivos (Amorim, Wenceslau, Carvalho, Carneiro, & Albuquerque, 2014).

En cuanto a la identificación molecular, se inició con la implementación de cebadores PiroA-PiroB que amplifican un fragmento de la región 18S del rRNA del orden Piroplasmida del mismo modo en que ha sido empleada en varios estudios a nivel mundial como el reportado en ovinos por Phipps et al., (2016) en Inglaterra. Así mismo reportado en bovinos por Medina et al., (2017) en Ecuador, Jizhou et al., (2017) en Inglaterra y Ranjan, Rani, Patel, & Devrajbhai, (2018) en India. También reportado en caninos por Bermúdez & Gómez (2017) en Colombia, De Marco et al., (2017) en Inglaterra, O'dwyer et al., (2009) en Brasil, Kamani et al., (2013) en Nigeria y Lira et al., (2017) en México. A su vez, el uso de este marcador molecular fue reportado en Pakistán por Iqbal et al., (2004) donde a pesar de no haber implementado el mismo juego de cebadores y haber descrito amplificación del 50% en muestras de ovinos, es comparable con la obtenida en los extraídos de ADN del presente estudio. Además, cabe resaltar que, en Colombia, hasta la fecha no se han realizado estudios de tipo molecular en ovinos.

Posteriormente, se realizó una PCR específica enfocada a identificar *Babesia ovis* por medio de la amplificación de un fragmento del gen de la proteína D de superficie como lo reportado en ovinos por Erster et al., (2015). De esta PCR no se obtuvieron amplificadas probablemente por la ausencia del vector natural *Rhipicephalus bursa* en Colombia, similar a lo reportado por Mazyad & Khalaf, (2002) en Egipto en donde debido a el

resultado obtenido respecto a la baja prevalencia del 2.73%, lo atribuye también a la reducida existencia del vector que pueda transmitir la enfermedad, siendo confirmada esta hipótesis por Alkische, Peterson, & Samy, (2017) quienes afirman que la presencia del vector se encuentra directamente relacionada a la distribución geográfica de la enfermedad.

Posteriormente se implementó una PCR anidada enfocada a amplificar un fragmento del gen de la proteína asociado a las roptrias de *B. bigemina* y se obtuvieron 39 amplificados los cuales se purificaron y, en algunas ocasiones fue necesario realizar extracción de bandas de tamaños inespecíficos, esto posiblemente debido a la necesidad de emplear elevadas concentraciones de cloruro de magnesio en la mezcla de reactivos de la PCR con el fin de obtener banda extraíble lo que probable pudo provocar la inespecificidad como lo describen Schmidt, Stiverson, Angen, & Yu, (2014) donde reportan funciones de especificidad y sensibilidad de este componente en la amplificación y en efecto niveles elevados de cloruro de magnesio a pesar de incrementar la eficiencia en la amplificación, reduce su especificidad. Este marcador molecular es el mismo reportado por Hilpertshouser et al., (2006) y Molad et al., (2015) y la prevalencia obtenida en este estudio es comparable con la descrita por Mahmoud et al., (2015) de 32.4% y Niu et al., (2015) de 16.2% de prevalencia de *B. bigemina*.

Respecto a la presencia de *B. bigemina* en ovinos del estudio podría ser a causa del favorecimiento de diversos factores como el pastoreo mixto entre bovinos y ovinos en Colombia como lo reportó Galeano, Gómez, & Gómez, (2015). También a la presencia de la garrapata vector *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en corderos de clima cálido como lo manifiesta el Grupo de Control Genético y Salud Animal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en un reporte no publicado (Anexo C) y finalmente la capacidad de transmisión de ***Babesia* spp.** por parte de *R. microplus* en bovinos de Colombia como lo manifiestan Vecino, Echeverri, Cárdenas, & Herrera, (2010). Adicionalmente y teniendo en cuenta el ciclo de vida del vector, este desarrolla sus fases en un solo huésped como lo reporta Bastos, Ueti, Knowles, & Scoles, (2010) y una de las formas de infección de *B. bigemina* es la vía transovárica (Ganzinelli et al., 2018) donde la progenie de la garrapata resulta infectada y esta probablemente se adhiere al ovino en estado larval inoculando el hemoparásito.

Referente a la ausencia de garrapatas en los animales al momento del muestreo, es posible explicar debido a la fluctuación estacional de estos vectores en el departamento de Córdoba-Colombia como lo reporta Otte, (1989) donde durante los meses de Junio a Septiembre, el régimen de lluvias aumenta y las tasas de infestación disminuye, lo cual concuerda con la fecha del muestreo realizado para el presente estudio.

Con respecto a la PCR enfocada a amplificar de forma específica el gen del antígeno relacionado con la proteína asociada a las roptrias de *Babesia bovis* - *RRA*, fue el mismo marcador molecular empleado por Mahmoud et al., (2015) y con respecto a la inespecificidad en la ronda semi-anidada es probable sea de igual manera a lo sucedido en la anterior PCR anidada por la elevada concentración de cloruro de magnesio como lo reportan Schmidt, Stiverson, Angen, & Yu, (2014) donde elevados niveles de este componente en la reacción reduce la especificidad de la PCR. En relación a la ausencia de este parásito obtenida en este estudio, se puede correlacionar con lo reportado por Bolaños, Hernandez, & Álvarez, (2017) donde también obtuvieron animales positivos a *B. bigemina* y ninguno a *B. bovis*. Esto podría ser por factores como la baja tasa de inoculación de *B. bovis* en bovinos en Córdoba (Otte, 1989), el secuestro en capilares cerebrales y renales por parte de *B. bovis* (Suarez & Noh, 2011), la especificidad de especie donde se manifiesta un tropismo de *B. bovis* por eritrocitos de bovino e incluso humano (Gaffar, Franssen, & De Vries, 2003) y el favorecimiento de estadios del vector en donde *B. bigemina* es transmitido por larva y ninfa (Hodgson, 1992) y *B. bovis* solo por larva (Howell, Ueti, Palmer, Scoles, & Knowles, 2007).

Acerca de los resultados obtenidos bajo el análisis estadístico donde no existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido bajo la técnica "PCR *Babesia bigemina* Rap-1c" y las variables estado productivo, Condición corporal, edad, Sexo y peso, puede ser correlacionado con lo reportado por Mekibib et al., (2010) referente a la edad y condición corporal y Egbe, Sherrif, & Paul, (2018) referente a la variable sexo de los animales. Adicionalmente, parámetros obtenidos con respecto a Famacha y Hematocrito fueron de igual manera no significativos. Lo cual podría ser correlacionado con lo descrito por Ademola & Onyiche, (2013) donde reportan no significancia entre animales sanos e infectados con hemoparasitos frente a valores referentes al volúmen de paquete celular. Lo cual podría deberse a que estos valores se ven en su mayoría afectados por

organismos diferentes como los nematodos gastrointestinales como lo describen Abay, Demissie, Fekadu, & Teklue, (2015).

Contrario a esto, es posible afirmar que existe diferencia significativa con respecto al resultado obtenido en PCR Rap-1c y la variable “animales mestizos” lo cual es posible correlacionarlo con lo reportado en Colombia por Otte et al., (1989) y Gonzales, (2016) en bovinos donde se muestra una mayor infección por parte de parásitos del género *Babesia* en ejemplares mestizos comparado con animales puros. Así mismo, de acuerdo a los datos obtenidos de ovinos mestizos positivos a *B. bigemina*, estos indican que el grupo de animales más infectado es el agrupado entre 3 a 11 meses de edad lo cual es posible correlacionarlo con lo descrito por Venu, Sailaja, Srinivasa, Jayasree, & Vara, (2015) donde afirman que los hemoparásitos afectan en su mayoría a animales jóvenes, sin embargo estos poseen un sistema inmune fuerte, lo cual podría también explicar porque el grupo jóvenes mestizos del estudio muestran parámetros normales referentes al grado de anemia.

En cuanto al árbol filogenético resultado del análisis de las secuencias obtenidas bajo la PCR de *B. bigemina* Rap-1c mostrado en la Figura 3-9 se evidencia cómo las muestras amplificadas se agrupan en un mismo clado con las muestras control positivo, demostrando que las secuencias en las muestras del presente estudio son semejantes a los aislados obtenidos de bovinos. Cabe resaltar que una de las secuencias publicadas previamente en la base de datos GenBank (KM212998.1) se encuentra relacionada con los aislados del estudio. Este aislamiento fue realizado por Mahmoud et al., (2015) en bovinos de la región de Egipto, mostrando una relación de los aislados de Colombia con el continente Africano de la misma forma como fue descrito por Adjou et al., (2015) donde los aislados identificados en su estudio en Kenia se agruparon en el mismo clado con los reportados previamente en Egipto. Finalmente, el agrupamiento diferencial de los aislados de campo obtenidos en el presente estudio y los reportados en la base de datos GenBank (AY146983.1 - AY146987.1 - AY146986.1 - AY146985.1 - AY146984.1) correspondientes a cepas vacunales publicados y empleados previamente por Suarez et al., (2003) para la descripción completa del locus de rap-1 de *B. bigemina*, muestran diferencias en su composición genética como lo describen Christensen, Suarez, Rodriguez, Flores, & Schnittger, (2014) donde manifiestan que existe una complejidad génica diferencial entre cepas vacunales y cepas de campo debido tanto al proceso de atenuación o a las características propias de las cepas elegidas con baja patogenicidad.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El presente estudio logró obtener muestra de sangre de 167 ovinos presentes en el municipio de Montelíbano-Córdoba de los cuales el 55.6%% correspondió a la raza denominada Africana donde confluyen los fenotipos Sudán, Etíope y Abisinio. El 19.16% correspondió a razas introducidas, específicamente Katahdin, Santa Inés, Dorper, Pelibuey, Black Belly y el 25.14% correspondió a animales mestizos. De estos ovinos evaluados el 33.53% correspondió a ovinos con edades entre 3 y 11 meses de edad, el 19.76% a ovinos entre 12 y 23 meses de edad y el 46.7% a ovinos con 24 o más meses de edad.

El examen clínico mostro que el 10.8% de los animales se ubicaron en rangos de Famacha[®] 4 y 5; valores considerados críticos y que pueden estar relacionados a procesos anémicos asociados a helmintos gastrointestinales pero podrían estar también alterados por la presencia de hemoparásitos. También el 27% de los animales presentó hematocrito inferior al 25% y de dicho grupo el 56% fueron animales menores de 11 meses de edad. Adicionalmente, no fue posible obtener Vectores ixódidos en los animales al momento del muestreo, probablemente por la temporada de lluvia durante la colecta de sangre.

Los extendidos realizados con sangre capilar mostraron el 2.4% de prevalencia a **Babesia spp.** en los animales muestreados, lo que permite demostrar la presencia del parásito en este tipo de población. Ninguno de los animales positivos por frotis fue de razas introducidas y el 75% de estos fueron animales jóvenes menores de 11 meses de edad.

La evaluación molecular enfocada en la amplificación de un fragmento del gen de la subunidad 18S rRNA de piroplásmidos obtuvo amplicones en el 34.7% de la población

evaluada, de estos el 24% fueron ovinos de raza introducida o pura y el 32.7% fueron animales menores 11 meses de edad. Adicionalmente no fue posible identificar la presencia de *B. bovis* ni *B. ovis* empleando cebadores BoF-BoR ni BoSPD respectivamente.

Los cebadores, las condiciones implementadas en la amplificación del gen de la proteína asociada a las roptrias de *Babesia bigemina* - RAP-1c y los análisis realizados en el presente estudio fueron definitivos para descartar productos de amplificación inespecíficos y concretar la detección de secuencias parciales de nucleótidos en las muestras de sangre colectadas de los ovinos del Municipio de Monteñibano-Córdoba. Posteriormente el uso de herramientas informáticas como BLAST, Bioedit® y Mega 7® facilitaron la comparación, alineamiento y análisis de las secuencias obtenidas con las reportadas previamente en GenBank determinando que las secuencias del estudio tienen una identidad del 100% correspondiente a *B. bigemina* en el 23.4% de la población evaluada donde el 23.1% fueron animales introducidos y el 5.1% eran animales jóvenes menores a 11 meses de edad. Cabe resaltar que frente a la técnica molecular PCR Rap-1c, solo fue posible detectar mediante el extendido de sangre el 10,4 % de los ovinos infectados y adicionalmente, animales mestizos son quienes se ven afectados en su mayoría por parásitos del género *Babesia*.

Por último, las secuencias obtenidas para *B. bigemina* se agruparon en un mismo clado con las secuencias de muestras control positivo obtenidas en bovinos y un aislamiento previamente reportado en GenBank (KM212998.1) de Egipto. Las demás secuencias (XM_012911170.1 - AY146983.1 - AY146987.1 - AY146986.1 - AY146985.1 - AY146984.1) se agruparon en un clado relacionado debido a que son sepas vacunales esto las ubica en un grupo diferente por su baja patogenicidad contrario a las cepas de campo.

Finalmente, este estudio aporta información trascendente con la finalidad de entender la posible relación que tendrían los ovinos en la epidemiología de los hemoparásitos.

5.2 Recomendaciones

1. Se recomienda ampliar este tipo de muestreos a otras regiones del país donde la posibilidad de este tipo de parásitos hemotrópicos pueda tener efecto sobre la producción ovino-caprina.
2. Dado que este es un estudio de tipo descriptivo de corte transversal, se recomienda llevar a cabo ensayos de corte longitudinal de tipo prospectivo donde se tenga en cuenta variables mensuales a lo largo de un año que permitan establecer la dinámica de los ectoparásitos asociados a la transmisión por *Babesia* spp. en pequeños rumiantes, así como la dinámica de la babesiosis en esta especie.
3. Se recomienda llevar a cabo estudios epidemiológicos que establezcan el papel de los pequeños rumiantes en la ecología, transmisión y el mantenimiento de la babesiosis, teniendo en cuenta que las producciones en el municipio de Montelíbano Córdoba son mixtas, lo que implica la mezcla de bovinos, bubalinos y pequeños rumiantes.
4. Con el objetivo de reducir la inespecificidad encontrada en la segunda ronda de la PCR anidada, se sugiere a partir del mismo gen Rap-1c de *B. bigemina* ajustar el diseño de cebadores para la segunda ronda teniendo en cuenta parámetros de especificidad y eficiencia al momento del diseño basados tanto en secuencias de campo obtenidas en este estudio como cepas vacunales de *B. bigemina*.
5. Se sugiere implementar metodología molecular reportada por Rjeibi, Darghouth, & Gharbi, (2016) y Naderi, Nayebzadeh, & Gholami, (2017) enfocadas a amplificar genes específicos de *Babesia motasi*, *Babesia crassa* y *Theileria* spp con el fin de identificar las muestras negativas obtenidas mediante cebadores PiroA-PiroB.

A. Anexo: Tabla animales.

ID	PCR				HCT %	Extendido de sangre	Edad Meses	Sexo	Estado	Raza	CC	Peso	T°	Famacha®
	PiroAB	BoSPD	Rap-1c	rra										
1001	SI	NO	NO	NO	25,4	Negativo	5	Hembra	Levante	Africana	3	18	38,8	3
1002	SI	NO	NO	NO	36	Negativo	5	Macho	Levante	Africana	3	15	38,7	3
1003	SI	NO	SI	NO	29	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	2	35	38,3	5
1004	NO	NO	NO	NO	15,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	2	28	37,9	5
1005	NO	NO	NO	NO	33,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	2	27	37,3	3
1006	SI	NO	NO	NO	28,2	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Africana	3	28	38,3	3
1007	SI	NO	SI	NO	28,5	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	2	30	37,8	3
1008	NO	NO	NO	NO	30,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	2	35	37,6	3
1009	SI	NO	NO	NO	32,2	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	2	25	38,6	3
1010	NO	NO	NO	NO	32,1	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	27	38,3	3
1011	NO	NO	NO	NO	32,1	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	13	38,1	3
1012	NO	NO	NO	NO	16	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	29	38	2
1013	NO	NO	NO	NO	30,1	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	30	38,6	3
1014	SI	NO	NO	NO	30,9	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	24	38	3
1015	SI	NO	SI	NO	32,7	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	28	38,1	3
2016	SI	NO	SI	NO	27,5	Negativo	7	Hembra	Levante	Mestizo	3	24	39,8	3
2017	SI	NO	NO	NO	29,3	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	3	24	40	3
2018	SI	NO	SI	NO	19,6	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	3	18	40	4
2019	NO	NO	NO	NO	21,5	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	2	17	39,6	4
2020	SI	NO	SI	NO	20	Negativo	4	Macho	Levante	Mestizo	2	12	39,7	2
2021	NO	NO	NO	NO	15	Negativo	3	Macho	Levante	Africana	2	8	40,1	2
2022	NO	NO	NO	NO	12,9	Negativo	6	Hembra	Levante	Mestizo	3	23	39,9	4
2023	SI	NO	SI	NO	14,5	Negativo	7	Hembra	Levante	Mestizo	3	24	39,6	5
2024	NO	NO	NO	NO	20	Negativo	9	Hembra	Levante	Mestizo	3	17	39,5	3
2025	NO	NO	NO	NO	22	Negativo	6	Hembra	Levante	Mestizo	2	15	39,5	3
2026	NO	NO	NO	NO	15,3	Negativo	4	Hembra	Desteto	Mestizo	2	7	39,1	3
2027	NO	NO	NO	NO	20	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	3	14	39,8	3
2028	NO	NO	NO	NO	33,3	Negativo	10	Macho	Levante	Africana	3	25	40	3
2029	SI	NO	NO	NO	32,7	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	40	39,6	3
2030	SI	NO	NO	NO	17,5	Negativo	3	Hembra	Desteto	Africana	2	9	40	1
3031	NO	NO	NO	NO	32	Negativo	24	Macho	Reproductor	Africana	3	30	38,1	3
3032	NO	NO	NO	NO	31,3	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	2	25	39,2	3
3033	NO	NO	NO	NO	25,4	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Mestizo	2	30	38,4	3
3034	SI	NO	SI	NO	36,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	24	38,9	3
3035	NO	NO	NO	NO	29	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	25	39,1	3
3036	SI	NO	SI	NO	28	Negativo	11	Macho	Reproductor	Mestizo	3	40	38,8	3
4037	NO	NO	NO	NO	38,5	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	24	38,7	2
4038	NO	NO	NO	NO	41,1	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	3	25	38,2	2
4039	NO	NO	NO	NO	25	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	25	38,7	3
4040	NO	NO	NO	NO	38,1	Negativo	24	Hembra	H. Lactante	Africana	3	32	38,7	3
4041	NO	NO	NO	NO	26,8	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	3	22	39,1	3
4042	NO	NO	NO	NO	38,1	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	35	39,6	3
4043	NO	NO	NO	NO	27,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	35	39,1	2
4044	NO	NO	NO	NO	28,5	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	2	28	38,9	2
4045	NO	NO	NO	NO	25,4	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	2	24	38,2	3

4046	NO	NO	NO	NO	25,4	Negativo	10	Hembra	Levante	Africana	3	15	38	3
4047	NO	NO	NO	NO	28,5	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	22	39,4	4
4048	NO	NO	NO	NO	31,2	Negativo	3	Hembra	Desteto	Africana	3	12	38,8	3
4049	NO	NO	NO	NO	40	Negativo	4	Hembra	Levante	Africana	3	12	39,5	4
4050	NO	NO	NO	NO	31,4	Negativo	24	Macho	Reproductor	Mestizo	3	55	38,7	3
5051	SI	NO	SI	NO	25,4	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Pelibuey	3	35	38,9	3
5052	SI	NO	SI	NO	26,8	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Pelibuey	3	45	39,2	3
5053	SI	NO	SI	NO	25	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Pelibuey	3	40	38,9	3
5054	NO	NO	NO	NO	25,8	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Pelibuey	3	40	38,2	3
5055	NO	NO	NO	NO	13,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Pelibuey	3	40	39,6	2
5056	NO	NO	NO	NO	25,9	Negativo	24	Macho	Reproductor	Pelibuey	3	50	39,3	3
5057	NO	NO	NO	NO	30	Negativo	24	Hembra	H. Lactante	Katahdin	3	26	39,4	3
5058	NO	NO	NO	NO	26,7	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Pelibuey	3	36	39,7	3
5059	SI	NO	NO	NO	26,6	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Pelibuey	3	30	39,5	3
5060	NO	NO	NO	NO	43	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Katahdin	3	63	39,4	3
5061	NO	NO	NO	NO	29,4	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Katahdin	2	67	39,2	3
5062	NO	NO	NO	NO	28,5	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Katahdin	2	49	39,1	4
5063	NO	NO	NO	NO	29	Negativo	24	Macho	Reproductor	Katahdin	4	70	39,2	3
5064	SI	NO	NO	NO	21,7	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Katahdin	3	47	39,1	3
5065	SI	NO	NO	NO	24,4	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Katahdin	3	44	39,5	3
5066	NO	NO	NO	NO	29	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Katahdin	3	63	39,2	3
5067	NO	NO	NO	NO	24,5	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Katahdin	3	65	38,8	3
5068	NO	NO	NO	NO	30	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Katahdin	3	45	38,5	3
5069	SI	NO	NO	NO	30,1	Negativo	24	Macho	Reproductor	Katahdin	3	65	39,2	4
5070	NO	NO	NO	NO	15	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	45	39,9	3
5101	SI	NO	SI	NO	18	Negativo	24	Hembra	H. Lactante	Pelibuey	3	32	38,1	3
5102	NO	NO	NO	NO	22,6	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	2	30	39,4	3
5103	SI	NO	SI	NO	23,5	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	35	38,7	3
5104	NO	NO	NO	NO	20	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	30	39,7	3
5105	SI	NO	NO	NO	22,1	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	35	39,1	3
5106	NO	NO	NO	NO	17,5	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	2	30	39,8	2
5107	SI	NO	NO	NO	27,2	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	37	39,5	3
5108	NO	NO	NO	NO	35,5	Negativo	11	Macho	Levante	Africana	3	20	39,9	3
5109	NO	NO	NO	NO	26	Negativo	10	Hembra	Levante	Africana	3	20	38,9	3
5110	NO	NO	NO	NO	22,2	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	3	25	39,9	3
5111	NO	NO	NO	NO	27,2	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	25	38,9	3
5112	NO	NO	NO	NO	22,6	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	25	38,7	3
5113	NO	NO	NO	NO	22,6	Negativo	10	Hembra	Levante	Africana	3	20	39,1	3
5114	NO	NO	NO	NO	21,4	Negativo	9	Hembra	Levante	Africana	3	29	39,4	3
5115	NO	NO	NO	NO	27,4	Negativo	8	Hembra	Levante	Africana	2	15	39,5	3
5116	NO	NO	NO	NO	25,4	Negativo	9	Hembra	Levante	Africana	3	18	38,5	3
5117	SI	NO	SI	NO	17,5	Negativo	10	Hembra	Levante	Africana	2	20	40	3
5118	NO	NO	NO	NO	20	Negativo	9	Hembra	Levante	Africana	2	20	40	3
5119	NO	NO	NO	NO	25,9	Negativo	8	Hembra	Levante	Africana	3	15	39,9	3
5120	NO	NO	NO	NO	27,2	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	2	20	38,7	3
5121	NO	NO	NO	NO	17,8	Negativo	6	Macho	Levante	Mestizo	3	12	40	3
5122	NO	NO	NO	NO	11,7	Negativo	4	Macho	Levante	Mestizo	3	10	39,2	3
5123	NO	NO	NO	NO	21,4	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	3	12	39	3
5124	SI	NO	NO	NO	30,7	Negativo	4	Hembra	Levante	Mestizo	3	9	39,2	3
5125	NO	NO	NO	NO	16,3	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	2	12	38,6	3
5126	SI	NO	SI	NO	28,2	Positivo	4	Macho	Levante	Mestizo	3	9	38,7	3
5127	SI	NO	SI	NO	25	Negativo	4	Hembra	Levante	Mestizo	2	10	39,2	3
5128	SI	NO	SI	NO	14	Negativo	4	Macho	Levante	Mestizo	2	9	37,9	2
5129	NO	NO	NO	NO	19,6	Negativo	3	Hembra	Levante	Mestizo	3	8	38,9	3
5130	NO	NO	NO	NO	15,5	Negativo	5	Hembra	Levante	Mestizo	2	10	38,6	2
5131	SI	NO	SI	NO	30	Negativo	4	Hembra	Levante	Mestizo	3	8	38,2	3
5132	SI	NO	SI	NO	20,8	Positivo	3	Hembra	Desteto	Mestizo	3	7	38,7	3
5133	SI	NO	SI	NO	28	Positivo	5	Hembra	Levante	Mestizo	3	8	38,9	3
6071	NO	NO	NO	NO	47	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	3	25	38,1	3
6072	SI	NO	NO	NO	27,2	Negativo	24	Hembra	H. Lactante	Africana	3	26	38,6	3

6073	NO	NO	NO	NO	33,3	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	28	38	3
6074	NO	NO	NO	NO	25,9	Negativo	24	Hembra	H. Lactante	Africana	3	25	38	3
6075	NO	NO	NO	NO	40	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	3	24	39,1	3
6076	NO	NO	NO	NO	29,3	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	3	20	38,2	2
6077	SI	NO	NO	NO	35,1	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	2	25	38	3
6078	SI	NO	NO	NO	24,1	Negativo	11	Hembra	Levante	Africana	2	20	38,5	3
6079	SI	NO	SI	NO	27,6	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	30	38,8	2
6080	NO	NO	NO	NO	34	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	30	38	3
6081	SI	NO	SI	NO	27,7	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	32	38	3
6082	NO	NO	NO	NO	8,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	37	38,4	3
6083	NO	NO	NO	NO	29,4	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	35	38,5	3
6084	NO	NO	NO	NO	33,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	37	38	3
6085	NO	NO	NO	NO	36,3	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	25	38	3
6086	NO	NO	NO	NO	28,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	2	36	38,6	3
6087	NO	NO	NO	NO	27,7	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	37	38	3
6088	NO	NO	NO	NO	32,7	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	27	38,5	3
6089	NO	NO	NO	NO	25	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	26	38,2	3
6090	SI	NO	SI	NO	37	Negativo	5	Hembra	Levante	Africana	3	15	38,5	3
6091	NO	NO	NO	NO	29,4	Negativo	4	Hembra	Levante	Africana	3	12	38,7	3
6092	NO	NO	NO	NO	26,7	Negativo	4	Macho	Levante	Africana	3	15	38,3	3
6093	NO	NO	NO	NO	29,1	Negativo	24	Macho	Reproductor	Mestizo	3	45	39,2	3
6094	NO	NO	NO	NO	31,4	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	30	38	4
6095	NO	NO	NO	NO	32,1	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	40	38	3
6096	SI	NO	SI	NO	34,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	38	38,2	3
6097	NO	NO	NO	NO	38,5	Negativo	3	Macho	Desteto	Africana	3	10	38	3
6098	NO	NO	NO	NO	28,8	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	29	39	3
6099	NO	NO	NO	NO	32,6	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	26	38,7	3
6100	SI	NO	SI	NO	25	Positivo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	40	38,7	3
7134	SI	NO	SI	NO	34	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	15	39	4
7135	NO	NO	NO	NO	22,4	Negativo	7	Hembra	Levante	Africana	3	12	38,1	5
7136	NO	NO	NO	NO	40,3	Negativo	18	Macho	Reproductor	Mestizo	3	23	38	3
7137	NO	NO	NO	NO	19	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	2	40	39,1	4
7138	NO	NO	NO	NO	36,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	35	38,4	3
7139	SI	NO	SI	NO	32	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Africana	3	24	39,3	3
7140	NO	NO	NO	NO	29,8	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Africana	3	25	38,5	3
7141	SI	NO	SI	NO	41,5	Negativo	12	Macho	Reproductor	Africana	3	24	38,3	3
7142	NO	NO	NO	NO	23,2	Negativo	24	Macho	Reproductor	Africana	3	37	38,9	3
8143	SI	NO	SI	NO	29,8	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	2	35	38,5	2
8144	SI	NO	SI	NO	24,1	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	35	38,5	2
8145	NO	NO	NO	NO	37,9	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	27	38,7	3
8146	NO	NO	NO	NO	31,6	Negativo	12	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	24	38	3
8147	NO	NO	NO	NO	37	Negativo	24	Macho	Reproductor	Mestizo	3	50	38,9	4
8148	NO	NO	NO	NO	29,8	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	34	39,5	2
8149	SI	NO	SI	NO	29,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	42	38,4	2
8150	NO	NO	NO	NO	37,5	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	32	38,6	2
8151	SI	NO	SI	NO	35,1	Negativo	18	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	25	39,5	3
8152	NO	NO	NO	NO	40	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Mestizo	3	28	38,3	4
9153	NO	NO	NO	NO	7,4	Negativo	24	Macho	Reproductor	Dorper	2	50	38,7	5
9154	NO	NO	NO	NO	33,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Santa Inés	3	50	39,3	2
9155	NO	NO	NO	NO	29,4	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	42	38,6	3
9156	NO	NO	NO	NO	25,4	Negativo	24	Macho	Reproductor	Black Belly	3	52	38,6	2
9157	NO	NO	NO	NO	29,3	Negativo	4	Hembra	Levante	Africana	3	15	38	3
10158	SI	NO	SI	NO	29,5	Negativo	24	Macho	Reproductor	Dorper	3	65	38,2	3
10159	SI	NO	SI	NO	29,1	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Africana	3	42	39,9	3
10160	SI	NO	SI	NO	33,9	Negativo	24	Hembra	H. Gestante	Dorper	3	55	39,7	3
10161	SI	NO	SI	NO	28	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Dorper	3	55	39,5	3
10162	NO	NO	NO	NO	7,1	Negativo	24	Macho	Reproductor	Dorper	2	40	39,9	5
10163	NO	NO	NO	NO	28,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Dorper	4	70	39,8	3
10164	SI	NO	SI	NO	40,2	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Dorper	3	48	38,2	3
10165	SI	NO	SI	NO	33,3	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Pelibuey	3	45	39,2	3
10166	SI	NO	NO	NO	26	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Dorper	3	42	40	3
10167	NO	NO	NO	NO	30,1	Negativo	24	Hembra	H. Vacía	Dorper	4	50	39,3	1

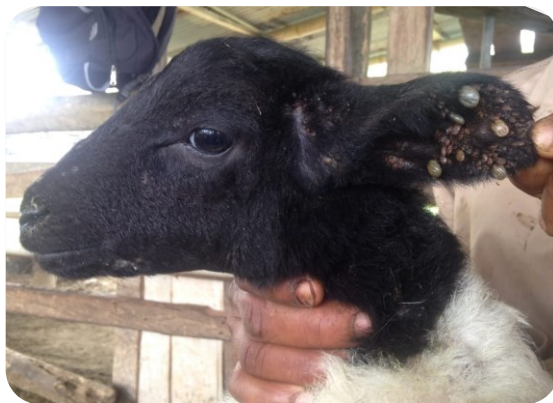
B. Anexo: Formato de ficha técnica individual para el ovino y la muestra

1. Fecha de muestreo: _____ DD/MM/YY
2. ID del ovino _____; Edad en meses _____; Sexo: Hembra O; Macho O
3. Estado:
Cordero lactante O; Cordero desteto O; Cordero levante O; Hembra lactante O; Hembra vacía O; Hembra gestante O; Macho reproductor O
4. Raza: Africana O; Raza pura O; Mestizos O
5. Condición corporal: 1 O; 2 O; 3 O; 4 O; 5 O;
6. Peso: _____ Kg
7. Temperatura: _____ °C;
8. Famacha[®]: 1 O; 2 O; 3 O; 4 O; 5 O
9. Alteraciones en el tiempo de coagulación: Si O; No O

c. **Anexo: Ovino con garrapata**

Rhipicephalus microplus

Hallazgo Grupo Control Genético en Salud Animal – Instituto de Genética – Universidad Nacional de Colombia – 2018.



Bibliografía

- Abay, G., Demissie, T., Fekadu, A., & Teklue, T. (2015). Sheep Infection by Haemonchus Species: Effect on Haematocrit and Evaluation of the FAMACHA Method in Arsi Negele District, Oromia, Ethiopia. *Animal and Veterinary Sciences*, 3(2), 74–79. <http://doi.org/10.11648/j.av.s.20150302.17>
- Abdel Aziz, K. B., Khalil, W. K. B., Mahmoud, M. S., Hassan, N. H. A., Mabrouk, D. M., & Suarez, C. E. (2014). Molecular characterization of babesiosis infected cattle: Improvement of diagnosis and profiling of the immune response genes expression. *Global Veterinaria*, 12(2), 197–206. <http://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.02.81277>
- Adejimni, J., Sadiq, N., Fashanu, S., Lasisi, O., & Ekundayo, S. (2004). Studies on the Blood Parasites of Sheep in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biomedical Research*, 7(January), 41–43. <http://doi.org/10.4314/ajbr.v7i1.54066>
- Ademola, I. O., & Onyiche, T. E. (2013). Haemoparasites and haematological parameters of slaughtered ruminants and pigs at Bodija abattoir, Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biomedical Research*, 16(2), 101–105.
- Adjou Moumouni, P. F., Aboge, G. O., Terkawi, M. A., Masatani, T., Cao, S., Kamyngkird, K., ... Xuan, X. (2015). Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–14. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-1106-9>
- Aktaş, M., Altay, K., & Dumanli, N. (2005). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 133(4), 277–281. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.057>
- Aktas, M., Altay, K., & Dumanli, N. (2007). Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 100(4), 797–802. <http://doi.org/10.1007/s00436-006-0345-2>
- Alessandra, T., & Santo, C. (2012). Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research*, 106(SUPPL.), S6–S11.

<http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.026>

- Alho, A. M., Lima, C., Latrofa, M. S., Colella, V., Ravagnan, S., Capelli, G., ... Otranto, D. (2017). Molecular detection of vector-borne pathogens in dogs and cats from Qatar. *Parasites and Vectors*, *10*(1), 1–5. <http://doi.org/10.1186/s13071-017-2237-y>
- Alkefari, O., Al-Gharban, H., & Ahmed, T. (2017). Microscopic , serological and molecular detection of *Babesia bigemina* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Wasit province , Iraq Introduction : Material and Methods : *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, *16*, 123–130.
- Alkishe, A., Peterson, A., & Samy, A. (2017). Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS ONE*, *12*(12), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0189092>
- Altay, K., Aktas, M., & Dumanli, N. (2008). Detection of *Babesia ovis* by PCR in *Rhipicephalus bursa* collected from naturally infested sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, *85*(1), 116–119. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.08.002>
- Altay, K., Aydin, M. F., Dumanli, N., & Aktas, M. (2008). Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, *158*(4), 295–301. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.025>
- Altay, K., Dumanli, N., & Aktas, M. (2007). Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Veterinary Parasitology*, *147*(1–2), 161–165. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.001>
- Ameen, K. A. H., & Abdullah, B. A. (2012). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil , Iraq, *26*(1), 109–114.
- Amorim, L., Wenceslau, A., Carvalho, F., Carneiro, P., & Albuquerque, G. (2014). Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *23*(3), 328–336. <http://doi.org/10.1590/S1984-29612014064>
- Araujo, A. J., Patiño, A., Linares, C., Santander, A., Barón, J. P., & Botero, A. (2013). Colombia, Sanidad Animal 2013. *Igarss 2014*, (1), 1–5. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Aydin, M. F., Aktas, M., & Dumanli, N. (2015). Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in ticks collected from sheep and goats in the Black Sea region of Turkey. *Parasitology Research*, *114*(1), 65–69. <http://doi.org/10.1007/s00436-014-4160-x>

- Azmi, K., Ereqat, S., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Baneth, G., & Abdeen, Z. (2016). Molecular detection of *Theileria*, *Babesia*, and *Hepatozoon* spp. in ixodid ticks from Palestine. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 734–741. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.003>
- Bal, M., Mahajan, V., Filia, G., Kaur, P., & Singh, A. (2016). Diagnosis and management of bovine babesiosis outbreaks in cattle in Punjab state. *Veterinary World*, 9(12), 1370–1374. <http://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1370-1374>
- Bastos, R., Ueti, M., Knowles, D., & Scoles, G. (2010). The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites and Vectors*, 3(1), 111. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-3-111>
- Bermúdez, A., & Gómez, A. (2017). Detección de cepas de *Babesia canis* en caninos con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo a través de herramientas moleculares.
- Blanco, R., Cardona, J., & Vargas, M. (2016). Prevalencia de parásitos hematópicos endoglobulares en bovinos gyr puros en Córdoba, Colombia. *Rev. Med. Vet. N°*, 31, 67–74.
- Bolaños, I., Hernandez, D., & Álvarez, L. (2017). Archivos de Zootecnia. *Archivos de Zootecnia*, 66(253), 113–120.
- Brito, P. D. de, Lima, T. D. S., Oliveira, A. F. de, Façanha, D. A. E., Freitas, C. I. A., Braga, A. D. P., & Batista, J. S. (2017). Evaluation of animal performance, feed intake, and economic losses in sheep experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(3), 1323. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n3p1323>
- Cacciò, S., Cammà, C., Onuma, M., & Severini, C. (2000). The β -tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *International Journal for Parasitology*, 30(11), 1181–1185. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00105-3](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00105-3)
- Christensen, M., Suarez, C., Rodriguez, A., Flores, D., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12), 1563–1592. <http://doi.org/10.1017/S0031182014000961>
- Cordero, M., & Rojo, F. A. (2000). *Parasitología Veterinaria* (Primera ed). Madrid, España: McGraw - Hill. Interamericana.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Bulging-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C.

- (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, 114(3), 173–194. [http://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00141-9](http://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00141-9)
- De Marco, M., Hernández, L., Phipps, L., Hansford, K., Mitchell, E., Cull, B., ... Johnson, N. (2017). Emergence of *Babesia canis* in southern England. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–9. <http://doi.org/10.1186/s13071-017-2178-5>
- Demessie, Y., & Derso, S. (2015). Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants : A Review, 9(4), 210–224. <http://doi.org/10.5829/idosi.abr.2015.9.4.9516>
- Egbe, T., Sherrif, G., & Paul, B. (2018). Prevalence of tick-borne haemoparasitic diseases (TBHDS) and haematological changes in sheep and goats in Maiduguri abattoir. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 10(1), 28–33. <http://doi.org/10.5897/JVMAH2017.0623>
- Elsify, A., Sivakumar, T., Nayel, M., Salama, A., Elkhtam, A., Rizk, M., ... Yokoyama, N. (2015). An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitol Int.* 2015 Feb;64(1):79-85. doi: 10.1016/j.parint.2014.10.002
- Emre, Z., Düzgün, A., Iriadam, M., & Sert, H. (2001). Seroprevalence of *Babesia ovis* in Awassi sheep in Urfa, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(5), 759–762.
- Erster, O., Roth, A., Wolkomirsky, R., Leibovich, B., Savitzky, I., & Shkap, V. (2016). Transmission of *Babesia ovis* by different *Rhipicephalus bursa* developmental stages and infected blood injection. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(1), 13–19. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.017>
- Erster, O., Roth, A., Wolkomirsky, R., Leibovich, B., Savitzky, I., Zamir, S., ... Shkap, V. (2015). Molecular detection of *Babesia ovis* in sheep and ticks using the gene encoding B. ovis surface protein D (BoSPD). *Veterinary Parasitology*, 214(3–4), 282–288. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.013>
- Erster, O., Roth, A., Wolkomirsky, R., Leibovich, B., Savitzky, I., Zamir, S., ... Shkap, V. (2016). Quantitative analysis of *Babesia ovis* infection in sheep and ticks. *Veterinary Parasitology*, 221, 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.004>
- Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S., & Dalir-Naghadeh, B. (2012). Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia*

- ovis*. *Veterinary Parasitology*, 185(2–4), 124–130.
<http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.001>
- Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Asri-rezaei, S., Dalir-naghadeh, B., Mardani, K., Jalilzadeh-amin, G., ... Arjmand, J. (2014). PCR-Based Detection of *Babesia ovis* in Rhipicephalus bursa and Small Ruminants. *Journal of Parasitology Research*, 2014.
- Estrada, P., Ayllón, N., & de la Fuente, J. (2012). Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in Physiology*, 3 MAR(March), 1–12.
<http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00064>
- Estrada-Peña, A., & Salman, M. (2013). Current Limitations in the Control and Spread of Ticks that Affect Livestock: A Review. *Agriculture*, 3(2), 221–235.
<http://doi.org/10.3390/agriculture3020221>
- Fernández de Marco, M., Brugman, V. A., Hernández-Triana, L. M., Thorne, L., Phipps, L. P., Nikolova, N. I., ... Johnson, N. (2016). Detection of *Theileria orientalis* in mosquito blood meals in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 229, 31–36.
<http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.012>
- Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W. C., & McElwain, T. F. (2002). The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infection and Immunity*, 70(7), 3566–3575.
<http://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3566-3575.2002>
- Gaffar, F., Franssen, F., & De Vries, E. (2003). *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. *International Journal for Parasitology*, 33(14), 1595–1603.
[http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00254-6](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00254-6)
- Galeano, L., Gómez, M., & Gómez, J. (2015). Caracterización de los sistemas de pastoreo de pequeños rumiantes en el sur del Tolima. *Revista Universidad Del Tolima*, (November), 75–85.
- Ganzinelli, S., Rodriguez, A., Schnittger, L., & Florin-Christensen, M. (2018). *Babesia* in Domestic Ruminants. *Springer International Publishing AG*, (July), 438.
<http://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5>
- Gonzales, J. (2016). Babesiosis humana en regiones epidemiológicamente aptas para la trasmisión de malaria y babesia humana: Estudio molecular de garrapatas, bovinos

- y humanos. Universidad De La Salle Facultad De Ciencias Agropecuarias Programa De Medicina Veterinaria. Retrieved from <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5784/T14.10U2p.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, *9*(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>
- Herrera, M., Soto, A., Urrego, V., Rivera, G., Zapata, & Ríos, L. (2008). Frequency of Hemoparasites of Bovines From Cauca and San Jorge Rivers, 2000-2005. *Revista MVZ Córdoba*, *13*(3), 1486–1494.
- Hilpertshauer, H., Deplazes, P., Schnyder, M., Gern, L., & Mathis, A. (2006). *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in Southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(10), 6503–6507. <http://doi.org/10.1128/AEM.00823-06>
- Hodgson, J. L. (1992). Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Annals of the New York Academy of Science*, *653*(1), 42–51.
- Horta, S., Barreto, M. C., Pepe, A., Campos, J., & Oliva, A. (2014). Highly sensitive method for diagnosis of subclinical *B. ovis* infection. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *5*(6), 902–906. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.005>
- Howell, J. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., & Knowles, D. P. (2007). Transovarial Transmission Efficiency of *Babesia bovis* Tick Stages Acquired by Rhipicephalus (Boophilus) microplus during Acute Infection □, *45*(2), 426–431. <http://doi.org/10.1128/JCM.01757-06>
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., & Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, *38*(11), 1219–1237. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- ICA. (2016). Censo Pecuario Nacional 2016. Dirección Técnica de Vigilancia Epidemiológica. Retrieved from <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2008.aspx>
- Iqbal, F., Fatima, M., Shahnawaz, S., Naeem, M., Shaikh, R. S., Ali, M., ... Aktas, M. (2004). Study on the Determination of Risk Factors Associated With Babesiosis.
- Inci, A., Iça, A., Yildirim, A., & Düzlülü, Ö. (2010). Identification of *Babesia* and *Theileria*

- species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. *Turkey Journal of Veterinary and Animal Science.*, 34(2), 205–210. <http://doi.org/10.3906/vet-0902-15>
- Jatau, I. D., Abdulganiyu, A., Lawal, A. I., Okubanjo, O. O., & Yusuf, K. H. (2011). Gastrointestinal and haemoparasitism of sheep and goats at slaughter in Kano , northern-Nigeria, 9(1), 7–11.
- Jizhou, L., Marco, M. F. De, Phipps, L. P., Macrelli, M., Otter, A., Inman, B., ... Johnson, N. (2017). Molecular Detection of *Babesia divergens* from an Outbreak of Babesiosis in Holstein Cows , England.
- Kamani, J., Sannusi, A., Egwu, O. K., Dogo, G. I., Tanko, T. J., Kemza, S., ... Gbise, D. S. (2010). Prevalence and significance of haemoparasitic infections of cattle in North- Central, Nigeria. *Veterinary World*, 3(10), 445–448. <http://doi.org/10.5455/vetworld.2010.445-448>
- Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K., Waziri, N., Eyal, O., Guthmann, Y., & Harrus, S. (2013). Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>
- L'Hostis, M., & Seegers, H. (2002). Tick-borne parasitic diseases in cattle: Current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Veterinary Research, BioMed Central*, 2002, 33 (5), Pp.599-611., 33(5), 599–611. <http://doi.org/10.1051/vetres>
- Lack, J. B., Reichard, M. V., & Van Den Bussche, R. A. (2012). Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 42(4), 353–363. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>
- León Lara, L. (2013). *Manual De Prácticas De Laboratorio De Patología Clínica*. Retrieved from [http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/606_967_MP Patología Clínica.pdf](http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/606_967_MP_Patología_Clinica.pdf)
- Lira, J., Rojas, C., Alvarez, A., Pelaez, A., Martinez, F., Rosa, D., & Figueroa, J. (2017). First Molecular Detection of *Babesia canis vogeli* in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* from Mexico, 2, 2–5.
- Liu, A. H., Yin, H., Guan, G. Q., Schnittger, L., Liu, Z. J., Ma, M. L., ... Luo, J. X. (2007). At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China. *Veterinary Parasitology*, 147(3–4), 246–251.

<http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.032>

- Luo, J., Yin, H., Guan, G., Yang, D., Liu, A., Ma, M., ... Chen, P. (2005). A comparison of small-subunit ribosomal RNA gene sequences of bovine *Babesia* species transmitted by *Haemaphysalis* spp. in China. *Parasitology Research*, 95(2), 145–149. <http://doi.org/10.1007/s00436-004-1268-4>
- Ma, M., Chen, Z., Liu, A., Ren, Q., Liu, J., Liu, Z., ... Yin, H. (2016). Biological Parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Fed on Rabbits, Sheep, and Cattle, 54(3), 301–305.
- Mahmoud, M., Kandil, O., Nasr, S., Hendawy, S., Habeeb, S., Mabrouk, D., ... Suarez, C. (2015). Serological and molecular diagnostic surveys combined with examining hematological profiles suggests increased levels of infection and hematological response of cattle to babesiosis infections compared to native buffaloes in Egypt. *Parasites & Vectors*, 1–15. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0928-9>
- Malan, F. S., Van Wyk, J. a, & Wessels, C. D. (2001). Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(3), 165–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11769347>
- Martins, J., & Benavides, E. (2003). Resistencia a los Antiparasitarios: *Estado Actual con Énfasis en América Latina*.
- Mazyad, S., & Khalaf, S. (2002). Studies on *Theileria* and *Babesia* infecting live and slaughtered animals in Al Arish and El Hasanah, North Sinai Governorate, Egypt. *Egypt Soc Parasitol*, 32(2), 601–610.
- Medina, V., Reyna, A., Tavares, L., Campos, A., Ron, J., Moyano, J., ... Chavez, M. (2017). Diagnosis of hemotropics *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by elisai and pcr techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, XXVII(1), 162–171.
- Mekibib, B., Manegerew, M., Tadesse, a., Abuna, F., Megersa, B., Regassa, a., ... Abebe, R. (2010). Prevalence of Haemoparasites and Associated Risk Factors in Working Donkeys in Abigudem and Kwiha Districts of Tigray Region, Northern Ethiopia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. <http://doi.org/10.3923/javaa.2010.2249.2255>
- Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N., & Lieb, B. (2010). Fast evolving 18S rRNA sequences

- from *Solenogastres (Mollusca)* resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1). <http://doi.org/10.1186/1471-2148-10-70>
- Molad, T., Erster, O., Fleiderovitz, L., Roth, A., Leibovitz, B., Wolkomirsky, R., ... Markovics, A. (2015). Molecular characterization of the Israeli *B. bigemina* vaccine strain and field isolates. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 147–155. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.022>
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 21–38. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21>
- Mosqueda, J., Ramos, J. A., Falcon, A., Alvarez, J. A., Aragon, V., & Figueroa, J. V. (2004). *Babesia bigemina*: Sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 222–231. <http://doi.org/10.1196/annals.1307.034>
- Naderi, A., Nayebezhadeh, H., & Gholami, S. (2017). Detection of *Babesia* infection among human, goats and sheep using microscopic and molecular methods in the city of Kuhdasht in Lorestan Province, West of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(3), 837–842. <http://doi.org/10.1007/s12639-017-0899-1>
- Niu, Q., Luo, J., Guan, G., Ma, M., Liu, Z., Liu, A., ... Yin, H. (2009). Detection and differentiation of ovine *Theileria* and *Babesia* by reverse line blotting in China. *Parasitology Research*, 104(6), 1417–1423. <http://doi.org/10.1007/s00436-009-1344-x>
- Niu, Q., Liu, Z., Yu, P., Yang, J., Abdallah, M., Guan, G., ... Yin, H. (2015). Genetic characterization and molecular survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Babesia ovata* in cattle, dairy cattle and yaks in China. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–13. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-1110-0>
- Niu, Q., Lui, Z., Yang, J., Guan, G., Pan, Y., Luo, J., & Yin, H. (2017). Molecular cloning, characterization and antigenicity of *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) (*Babesia cf. motasi*) apical membrane antigen-1 (AMA-1). *Parasitology*, 144(05), 641–649. <http://doi.org/10.1017/S0031182016002304>
- O'dwyer, L., Lopes, V., Rubini, A., Paduan, K., & Ribolla, P. (2009). *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(02), 23–26. <http://doi.org/10.4322/rbvp.01802005>

- Orunç Kiliñç, Ö., Göz, Y., Yüksek, N., Başbugan, Y., Yılmaz, A. B., & Ataş, A. D. (2015). Determination of serum cardiac biomarkers and plasma D-dimer levels in anemic sheep with babesiosis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(5), 606–610. <http://doi.org/10.3906/vet-1501-105>
- Osorio Martinez, F. J., Patiño Álvarez, A., Linares Chaparro, C., Romero González, L. A., Ortiz Cardozo, J., Reina Beltrán, J. F., & González G., P. M. (2012). Colombia Sanidad Animal 2012, 150.
- Otte, M. (1989). Epidemiology of *T. vivax* and its effects on cattle productivity in the Northern tropical zone of Colombia. University of Reading Dissertation (*PhD*).
- Pezzanite, L., Neary, M., Hutchens, T., & Scharko, P. (2009). Common Diseases and Health Problems in Sheep and Goats. *Animal Sciences*, 1–11.
- Phipps, L., Hernández, L., Goharriz, H., Welchman, D., & Johnson, N. (2016). Detection of *Theileria luwenshuni* in sheep from Great Britain. *Parasites & Vectors*, 1–4. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1486-5>
- Qablan, M. A., Oborník, M., Petrželková, K. J., Sloboda, M., Shudiefat, M. F., Hořín, P., ... Modrý, D. (2013). Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: Epidemiology and genetic diversity. *Parasitology*, 140(9), 1096–1103. <http://doi.org/10.1017/S0031182013000486>
- Rahbari, S., Nabian, S., Khaki, Z., Alidadi, N., & Ashrafihelan, J. (2008). Clinical , haematologic and pathologic aspects of experimental ovine babesiosis in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9(1), 59–64.
- Ranjan, B., Rani, B., Patel, J., & Devrajbhai, N. (2018). Parasitological and Molecular Based Detection of Cerebral Babesiosis in Kankrej Bullock and its Successful Therapeutic Management. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13(2), 122–127. <http://doi.org/10.3923/ajava.2018.122.127>
- Ríos, S., Gutiérrez, L., & Ríos, L. (2014). Assessing bovine babesiosis in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks and 3 to 9-month-old cattle in the middle Magdalena region, Colombia. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 34(4), 313–319. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400002>
- Ríos, S., & Ríos, L. (2011). Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2470–2483. Retrieved from <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz->

162/V16N2A4.pdf

- Rjeibi, M. R., Gharbi, M., Mhadhbi, M., Mabrouk, W., Ayari, B., Nasfi, I., ... Darghouth, M. A. (2014). Prevalence of piroplasms in small ruminants in North-West Tunisia and the first genetic characterisation of *Babesia ovis* in Africa. *Parasite*, 21, 23. <http://doi.org/10.1051/parasite/2014025>
- Rjeibi, M., Darghouth, M., & Gharbi, M. (2016). Prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in Tunisian sheep. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83(1), a1040. <http://doi.org/10.4102/ojvr.v83i1.1040>
- Romero-Salas, D., Mira, Mosqueda, J., García-Vázquez, Z., Hidalgo-Ruiz, M., Vela, N., ... Schnittger, L. (2016). Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, 217, 101–107. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.030>
- Schmidt, G., Stiverson, J., Angen, Ø., & Yu, Z. (2014). Number of PCR Cycles and Magnesium Chloride Concentration Affect Detection of tet Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins in Swine Manure. *Advances in Microbiology*, 04(12), 780–787. <http://doi.org/10.4236/aim.2014.412086>
- Schouls, M., Gubbels, J. M., Vos, a P. De, Weide, M. Van Der, Viseras, J., Vries, E. De, & Jongejan, F. (1999). Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization, 37(6), 1782–1789.
- Schreeg, M., Marr, H., Tarigo, J., Cohn, L., Bird, D., Scholl, E., ... Birkenheuer, A. (2016). Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. *PLoS ONE*, 11(11), 1–27. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0165702>
- Sevinc, F., Sevinc, M., Ekici, O. D., Yildiz, R., Isik, N., & Aydogdu, U. (2013). *Babesia ovis* infections: Detailed clinical and laboratory observations in the pre- and post-treatment periods of 97 field cases. *Veterinary Parasitology*, 191(1–2), 35–43. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.025>
- Sevinc, F., Turgut, K., Sevinc, M., Ekici, O. D., Coskun, A., Koc, Y., ... Ica, A. (2007). Therapeutic and prophylactic efficacy of imidocarb dipropionate on experimental *Babesia ovis* infection of lambs. *Veterinary Parasitology*, 149(1–2), 65–71.

<http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.014>

- Song, J., Shi, L., Li, D., Sun, Y., Niu, Y., Chen, Z., ... Chen, S. (2012). Extensive Pyrosequencing Reveals Frequent Intra-Genomic Variations of Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA. *PLoS ONE*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043971>
- Souza, F., Braga, J., Pires, L., de Carvalho, C., Costa, É., Ribeiro, M., ... Silva, S. (2013). Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33(9), 1057–1061. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000900002>
- Stuen, S. (2012). Ticks and tick-borne infections in sheep in the Nordic countries. *Small Ruminant Research*, 106(1), 14–15. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.013>
- Stuen, S. (2013). Tick-borne infections in small ruminants in northern Europe. *Small Ruminant Research*, 110(2–3), 142–144. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.022>
- Stuen, S. (2016). Haemoparasites in small ruminants in European countries: Challenges and clinical relevance. *Small Ruminant Research*. <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.005>
- Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), 109–125. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>
- Suarez, C. E., Palmer, G. H., Florin-Christensen, M., Hines, S. A., Hötzel, I., & McElwain, T. F. (2003). Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(2), 101–112. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00311-0](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00311-0)
- Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), 109–125. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>
- Suarez, C. E., Palmer, G. H., Florin-Christensen, M., Hines, S. A., Hötzel, I., & McElwain, T. F. (2003). Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(2), 101–112. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00311-0](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00311-0)

- Theodoropoulos, G., Gazouli, M., Ikonopoulou, J. A., Kantzoura, V., & Kominakis, A. (2006). Determination of prevalence and risk factors of infection with *Babesia* in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.021>
- Tian, Z., Liu, G., Yin, H., Luo, J., Guan, G., Xie, J., ... Wang, H. (2013). Cytochrome c oxidase subunit III (COX3) gene, an informative marker for phylogenetic analysis and differentiation of *Babesia* species in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 13–17. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.002>
- Tian, Z., Luo, J., Zheng, J., Xie, J., Shen, H., Yin, H., ... Liu, G. (2013). Phylogenetic analysis of *Babesia* species in China based on cytochrome b (COB) gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 13(1), 36–40. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.09.001>
- Torina, A., Agnone, A., Sireci, G., Mosqueda, J. J., Blanda, V., Albanese, I., ... Caracappa, S. (2010). Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of *Babesia bigemina*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(1–2), 52–56. <http://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01118.x>
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*-A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 3–10. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>
- Vargas, C. (2006) FAMACHA® Control de haemonchosis en caprinos. *Agronomía mesoamericana*, 17(1): 79-88. 2006, ISSN: 1021-7444
- Vecino, J., Echeverri, J., Cárdenas, J., & Herrera, L. (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 73. http://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:197
- Venu, R., Sailaja, N., Srinivasa, K., Jayasree, N., & Vara, W. (2015). *Babesia bigemina* infection in a 14-day old Jersey crossbred calf: a case report. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2), 264–265. <http://doi.org/10.1007/s12639-013-0338-x>
- Yeruham, I., Hadani, A., & Galker, F. (1998). Some epizootiological and clinical aspects of ovine babesiosis caused by *Babesia ovis* - A review. *Veterinary Parasitology*, 74(2–4), 153–163. [http://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00143-X](http://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00143-X)
- Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 22–32. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>

- Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., & Igarashi, I. (2002). Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infection and Immunity*, 70(10), 5822–5826. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5822-5826.2002>
- Zobba, R., Nuvoli, A. M., Sotgiu, F., Lecis, R., Spezzigu, A., Dore, G. M., ... Alberti, A. (2014). Molecular Epizootiology and Diagnosis of Porcine Babesiosis in Sardinia, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(10), 716–723. <http://doi.org/10.1089/vbz.2014.1648>