



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro Universitario UAEM Amecameca

Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Análisis de la diversidad genética de las especies de *Eimeria* que afectan la producción cunícola en la región sur oriente del Estado de México.

Tesis

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

M.V.Z. Anahí Jiménez Ramos

Comité tutorial

Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez

Dr. Camilo Romero Núñez

Dr. José Simón Martínez Castañeda

Septiembre 2016

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE GRAFICAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Diversidad genética.....	2
2.1.1 Factores que influyen en la diversidad genética	2
2.1.1.1 Flujo génico y migración	2
2.1.1.2 Mutación	3
2.1.1.3 Deriva genética.....	5
2.1.1.4 Endogamia	6
2.1.1.5 Selección natural	6
2.2 Importancia de la diversidad genética en parásitos	7
2.3 Técnicas para análisis de ADN	8
2.3.1 Enzimas de restricción.....	9
2.3.2 Hibridación de ADN	9
2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	10

2.3.4 Secuenciación de genes.....	10
2.4 Marcadores de ADN.....	12
2.4.1 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	13
2.4.2 Minisatélites (huella digital de ADN) y microsatélites (SSRs)	13
2.4.3 ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	14
2.4.4 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	14
2.4.6 Polimorfismo de la amplificación de secuencias específicas (SSAP), polimorfismo de nucleótidos simples (SNP) y polimorfismo de marcadores de secuencias expresadas (ESTP).....	15
2.5 ADN ribosomal	15
2.5.1 Región ITS-1 de ADN ribosomal del núcleo	16
2.6 Distancias genéticas	17
2.7 Concepto filogenético de especie	18
2.8 Principales causas de mortalidad en granjas cunícolas.....	19
2.8.1 <i>Eimeria</i>	20
2.8.2 Especies de <i>Eimeria</i> en animales domésticos	21
2.8.3 Especies de <i>Eimeria</i> en conejos (<i>Oryctulagus cuniculus</i>).....	22
2.8.4 Eimeriosis	23
2.8.4.1 Eimeriosis en el conejo.....	23

2.8.5 Diagnóstico de <i>Eimeria</i>	24
2.8.5.1 Identificación morfológica	25
2.8.5.2 Identificación molecular	25
2.9 Pérdidas económicas generadas por la eimeriosis a nivel mundial	28
2.9.1 Producción cunícola en México	28
2.9.2 Producción cunícola en el estado de México	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. JUSTIFICACIÓN	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 objetivo general.....	32
5.2 Objetivos específicos	32
6. HIPÓTESIS	33
7. METODOLOGÍA.....	34
7.1 Límites de espacio y tiempo.....	34
7.2 Obtención de las muestras	35
7.3 Tamaño de la muestra	35
7.4 Criterios de inclusión y exclusión	35
8. MÉTODOS	36
8.1 Identificación coproparasitológica	36

8.1.1 Procesamiento de las muestras de heces	36
8.2 Identificación molecular de <i>Eimeria</i>	36
8.2.1 Extracción de ADN.....	36
8.2.2 Amplificación por PCR de la región ITS-1 de <i>Eimeria</i>	36
8.2.3. La clonación y secuenciación de región ITS-1.....	38
8. 2.4. El análisis de secuencia.....	38
8.2.5. El análisis filogenético de la secuencia ITS-1	38
9. RESULTADOS	39
10. DISCUSIÓN	43
11. CONCLUSIÓN	44
12.Resultados concomitantes capitulos de libro publicados formato digital.	46
13. REFERENCIAS.....	80
14. ANEXOS	95
Anexo 1. Técnica de Mc Máster.....	95
Anexo 2. Instrucciones del kit Fecal Microbe DNA de Zymo Research®	95
Anexo 3. Condiciones de amplificación de las 11 especies de <i>Eimeria</i> del conejo.	98
Anexo 4. Instrucciones de Kit the Gel DNA Recovery Zymoclean™	98
Anexo 5. Proceso de clonación de amplicones de PCR	100

Anexo 6. kit ilustra plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare)..... 105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplificación del método de Sanger automatizado.....	12
Figura 2. Esquema de Espaciadores Internos Transcritos (ITS).....	17
Figura 3. Muestras positivas a <i>Eimeria</i> spp. por PCR.....	40
Figura 4. Muestras positivas a diferentes especies de <i>Eimeria</i>	41
Figura 5. Árbol filogenético Neighbor Joining de las especies de <i>Eimeria</i>	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la identificación de <i>Eimeria</i> en el conejo.	37
Tabla 2. Resultado de PCR específicos de las especies que infecta al conejo.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3. Cambios en las secuencias de nucleótidos de <i>Eimeria</i> spp.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. Distancias genéticas de las secuencias de <i>Eimeria</i> que infectan a los conejos.....	42

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfico 1. Frecuencia total de las muestras positivas a <i>Eimeria</i> spp.	39
Grafico 2. Frecuencia de las 11 especies de <i>Eimeria</i> que infectan a los conejos en México.....	¡Error! Marcador no definido.
Grafica 3. Frecuencia total de las especies de <i>Eimeria</i> identificadas en la región sur oriente del Estado de México.	¡Error! Marcador no definido.

1. INTRODUCCIÓN

Eimeria es un protozooario intracelular obligado el cual provoca una grave enfermedad de importancia veterinaria y de distribución mundial (Zoran *et al.*, 2006). Infecta animales domésticos y salvajes, se estima que las pérdidas económicas son de más de 3 mil millones de dólares cada año (Dalloul y Lillehoj, 2006), asociadas a la disminución en el consumo de alimento, baja conversión alimenticia, baja ganancia de peso alta mortalidad y tratamientos inespecíficos, sobre todo en las unidades de producción donde las medidas de prevención son deficientes (Tehrani *et al.*, 2013). El género de *Eimeria* forma parte de uno de los Phylum más diversos que existen llamado Apicomplexa, la identificación de cepas a nivel de especie mediante caracteres morfológicos es difícil y confusa, debido a la similitudes que estas poseen; el empleo de los marcadores moleculares y el análisis de secuencias nucleotídicas específicas, incrementaron las facilidades para la correcta ubicación filogenética, identificación y caracterización de la diversidad de las especies que lo conforman.

La identificación de las especies de *Eimeria* se realiza por métodos basados en la descripción de características morfológicas de los ooquistes esporulados, tiempo de esporulación, período prepatente y lugar de infección, parámetros que algunos autores refieren como limitantes e inespecíficos (Long y Joyner, 1984). En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares que permiten la diferenciación entre especies (Céré *et al.*, 1995; Kvicerová *et al.*, 2008), pero no fue hasta el 2011 en Brasil donde se reportan por primera vez a nivel mundial los iniciadores específicos para las 11 especies que infectan al conejo doméstico (Oliveira *et al.*, 2011). Las secuencias de la región ITS se han utilizado como marcadores genéticos para la identificación de especies en diversos organismos incluyendo *Eimeria* (Mugridge *et al.*, 2000). La secuenciación de la región ITS de aislados de campo de *Eimeria* puede ser útil en la evaluación de la diversidad de las cepas. No existe información sobre la diversidad genética de las especies *Eimeria* que infectan a los conejos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Diversidad genética

La diversidad genética se define como las variaciones heredables que presenta cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie cuyo resultado de las diferencias que existen entre las distintas versiones de alelos de las unidades de herencia (genes) de los individuos de una especie (Halfpeter y Ezcurra. 1992).

Los genes son segmentos de ácido desoxirribonucleico ADN que se encuentran distribuidos en grupos de unidades denominadas cromosomas, cuyo número y forma varía entre especies; es en el ADN donde se encuentra codificada la información a partir de la cual se construyen los seres vivos. Las diferencias heredables constituyen la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas y moldean la variada complejidad de los seres vivos (Piñero *et al.*, 2008).

2.1.1 Factores que influyen en la diversidad genética

La diversidad genética se origina por varios factores que determinan diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de una región a otra, los procesos genéticos más comunes son: el flujo génico y migración, mutación, deriva genética, endogamia y selección natural (Excoffier, 2009).

2.1.1.1 Flujo génico y migración

El flujo génico es el movimiento de alelos entre poblaciones, comprende la inmigración y la emigración (Lowe *et al.*, 2004). Dichos procesos generan cambios en las frecuencias alélicas, cuya magnitud varía dependiendo la proporción de alelos contribuidos por los migrantes, y a la diferencia entre la frecuencia de los inmigrantes y una población original (Nei *et al.*, 1987).

Se estima que si el flujo génico entre las subpoblaciones es elevado, la variación genética de las subpoblaciones tenderá a homogenizarse. Por el contrario, si los

niveles de flujo génico son bajos, la selección natural, la deriva génica y la mutación pueden originar una diferenciación genética mayor entre las subpoblaciones (Nei, 1987).

La cuantificación indirecta del flujo génico se basa principalmente en observar la distribución espacial de los alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones del mismo (Slatkin, 1985).

La mayoría de los modelos teóricos surgen de los conceptos de Wright y suponen que los organismos están formando poblaciones discretas –modelo de islas- que se diferencian por mutación y por deriva genética ó están formando poblaciones con una distribución continua – modelo de aislamiento por distancia- en el cual la probabilidad de flujo génico disminuye al incrementarse la distancia espacial (Wright, 1951).

El modelo usado comúnmente para estimar flujo génico es el modelo de islas infinitas (infinite islands model) de Wright. Este modelo considera condiciones en equilibrio entre un número infinito de islas o subpoblaciones de igual tamaño, que intercambian migrantes entre cualquiera de las islas con igual probabilidad a una tasa constante. Las poblaciones pueden ser tratadas como replicas y el modelo se puede caracterizar con sólo dos parámetros: tamaño poblacional (N) y tasa de migración (m). (Slatkin, 1985).

2.1.1.2 Mutación

La mutación es cualquier cambio en la secuencia de bases de un genoma, dando origen de esta manera a la diversidad genética. Se puede manifestar en distintos niveles, cuando incluyen cambios en los alelos de un locus o en el número de repeticiones (microsatélites). La mayoría de estos cambios ocurre por errores de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN, principalmente la adición, delección o sustitución de las bases nitrogenadas (Frankham *et al.*, 2002).

Los cambios en el ADN pueden ser de cuatro tipos. En ellos pueden participar sustitución de un nucleótido por otro, la delección o la inserción de una secuencia de nucleótidos, y la inversión de nucleótidos (Voss y Thomas, 2001).

Las sustituciones de nucleótidos están divididos en dos clases, transiciones y transversiones.

Una transición es la sustitución de un tipo de purina nitrogenada base (adenina o guanina) por otra purina o sustitución de una base de nitrógeno del tipo pirimidina (timina y citosina) por otra pirimidina. El otro tipo de sustitución de nucleótidos es llamado transversión, cuando una base de pirimidina se sustituye por otro tipo de purina y viceversa (Nei y Kumar, 2000).

El tipo de sustituciones de transición son más frecuentes que las transversiones, debido a que necesitan un cambio menor en la estructura de la base nitrogenada (Page y Holmes, 2001).

Existe una relación entre el número de sustituciones y tiempo divergencia entre dos secuencias. El número de diferencias entre dos secuencias con el aumento de estimación de tiempo se vuelve cada vez menos precisa en relación con el verdadero número de sustituciones que se han producido desde la divergencia de las secuencias de ancestro común (Page y Holmes, 2001). A medida que aumenta la divergencia entre las dos especies, los números de transiciones observadas en relación con las transversiones disminuye (Schneider, 2003).

En el modelo de alelos infinitos o IAM, cada mutación transforma un alelo existente en uno nuevo que no estuvo presente previamente en la población. En este modelo, la homoplasia no es posible y todos los alelos son idénticos por descendencia (heredados por un ancestro en común). En el modelo de un solo paso SMM cada mutación crea un nuevo alelo ya sea por la adición o la delección de una sola unidad de repetición de un microsatélite, con una probabilidad igual en ambos escenarios. En consecuencia, los alelos que difieren en muchos tamaños serán más distantes en relación con los que tienen el tamaño similar (Kimura y Ohta 1973).

Las mutaciones en nucleótidos clave de una secuencia codificadora pueden alterar la composición de aminoácidos de una proteína, y conducir a nuevas variantes funcionales (Beaumont y Balding, 2004). Las nuevas variantes pueden tener una mayor o menor eficiencia metabólica comparadas con el tipo original, pueden perder completamente su funcionalidad, o incluso adquirir una función nueva. Las mutaciones en las regiones reguladoras pueden afectar a los niveles y las pautas de expresión génica; por ejemplo, activar o desactivar genes, o sobreexpresar o infraexpresar proteínas en tejidos concretos en distintos estadios del desarrollo o en distintos estados fisiológicos (Black *et al.*, 2001).

2.1.1.3 Deriva genética

Se define como fluctuaciones debidas al azar en una población, tanto en las frecuencias génicas como las genotípicas, de generación en generación, las variaciones estocásticas de las frecuencias alélicas y genotípicas dependen del tamaño poblacional. Las variaciones esperadas de las frecuencias en las poblaciones descendientes se incrementan con la disminución del tamaño de la población parental. En poblaciones pequeñas, puede haber fluctuaciones amplias e impredecibles de las frecuencias génicas debido a eventos aleatorios, de una generación a otra. En la naturaleza, la mayoría de las poblaciones son relativamente grandes, por lo que los efectos de la deriva pueden no ser importantes en comparación con los efectos de la selección o el flujo génico (Templeton, 2006).

El efecto fundador es la deriva genética que ocurre cuando un grupo reducido se separa de una población para fundar una población nueva. La deriva genética en estos casos es el resultado de muestreo de la población de origen, y una cierta cantidad de generaciones durante las cuales el tamaño de la nueva población permanece reducido. En poblaciones que atraviesan una reducción drástica en su tamaño debido a una fragmentación del hábitat (cuello de botella), pueden incrementarse las fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas. Aun cuando

las poblaciones pueden recuperar su tamaño original, el efecto de la deriva durante el cuello de botella permanece (Freeland, 2005).

2.1.1.4 Endogamia

La endogamia se refiere al apareamiento no aleatorio en donde la probabilidad de que un individuo sea autócigo (con alelos idénticos por descendencia) es mayor que para una población panmíctica. Por lo tanto, la endogamia no cumple con el supuesto de la panmixia, y reduce el número real de individuos con capacidad reproductiva. Además, una endogamia intensa, producida por ejemplo por autofertilización, también reduce la heterocigosis, y el tamaño poblacional es más parecido al de una población haploide (Hedrick, 2005). A mayor endogamia, mayor probabilidad hay en una población de hallar individuos homocigotos para un locus en el cual ambos alelos sean idénticos por ascendencia. La identidad por ascendencia consiste en que dos copias de un gen provengan del mismo gen antecesor.

2.1.1.5 Selección natural

La selección es una fuerza evolutiva importante que puede afectar las frecuencias alélicas y genotípicas. En cada generación, los genotipos que promueven la supervivencia o la reproducción son los que predominarán entre los individuos reproductores. Asimismo, los alelos que promuevan dicha supervivencia o éxito reproductivo serán los que se encuentren con mayor frecuencia en la población. Por tanto, estos genotipos contribuirán de manera desigual a la progenie de la siguiente generación (Ginnobili, 2009).

Este es el proceso de adaptación por selección natural. Se consideran dos tipos de selección natural: la selección direccional y la selección balanceadora.

En genética de poblaciones, la selección direccional se refiere a los casos en los cuales un alelo (o un genotipo homocigoto) siempre tiene el éxito reproductivo más alto. Y la selección balanceadora se refiere a los casos en los cuales:

a) la combinación de diferentes alelos (por ejemplo un heterocigoto) tiene el más alto éxito reproductivo relativo

b) cuando el éxito reproductivo de diferentes alelos o genotipos depende de las condiciones medio ambientales o de la composición genotípica de una población (Peakall *et al.*, 2003).

2.2 Importancia de la diversidad genética en parásitos

Una de las razones más importantes para conocer la diversidad genética es conocer el potencial evolutivo de las especies pues dicha diversidad representa el reservorio de las posibles respuestas al medio (físico y biológico), posibilitando con ello su adaptación a los cambios del mismo; pero también es importante económicamente dado que es el sustrato biológico sobre el que actúa el proceso de selección que han realizado las especies desde su etapa primitiva en cada organismo se encuentra almacenada información genética la cual proporciona soluciones a varios intereses los cuales se empiezan a vislumbrar.

En los últimos años los marcadores moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), han permitido la exploración de diferentes regiones del genoma las cuales sirven para inferir la estructura genética de las poblaciones, generalmente estos se basan en el grado de polimorfismo presente naturalmente en el material genético de los organismos y se emplean, entre otras, para estudiar la diversidad genética de los organismos intra e interespecífico (Sosa *et al.*, 2014.)

El parasitismo es una de las formas de vida más comunes y exitosas en la Tierra y ha evolucionado de forma independiente al menos 60 veces durante la historia evolutiva de la vida animal. Varios linajes de parásitos se han diversificado mucho con el tiempo geológico. Como resultado, los parásitos superan en número a sus familiares que viven en libertad en algunos grupos taxonómicos del reino animal (Poulin y Morand, 2000).

El estudio de la diversidad de parásitos es importante para al menos 3 razones principales.

En primer lugar, los parásitos juegan un papel importante en la división de los ecosistemas, e influyen en las poblaciones y comunidades de sus anfitriones (Korallo *et al.*, 2007).

En segundo lugar, muchas especies de parásitos son importantes para la medicina y la agricultura. Sin embargo aún se sabe poco sobre sus orígenes evolutivos, varios parásitos pueden haber evolucionado en la transición de cambio de los animales salvajes o domésticos al hombre (Combes, 1990). Además, las interacciones entre especies implican que los parásitos son una clave para entender muchas invasiones biológicas y enfermedades infecciosas emergentes (Hatcher, 2011).

Por último, debido a las muchas transiciones del parasitismo dentro de los grupos taxonómicos, los investigadores pueden estudiar los procesos de evolución como un fenómeno relacionado con las tasas de especiación y diversificación (Poulin y Morand 2000).

Es necesario conocer como la diversidad genética de los parásitos influye tanto en epidemiología, patogenicidad y virulencia como su implicación en las estrategias terapéuticas y de vacunación, para el control de enfermedades. Las similitudes en la biología básica y los patrones de enfermedad o de transmisión entre parásitos puede provocar discusiones, comparación de métodos epidemiológicos y herramientas metodológicas fomentando un estudio más integral que permitan enriquecer ideas y enfoques técnicos (Pérez-Tris, 2009).

2.3 Técnicas para análisis de ADN

La diversidad o variación entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN, se mide a través de marcadores moleculares que corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u

observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente (Ressom *et al.*, 2003).

2.3.1 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son quizás la herramienta más poderosa en biotecnología, debido a que éstas cortan el ADN en una manera predecible y reproducible. El nombre de “enzima de restricción” se originó cuando los científicos observaron que cepas de *Escherichia coli* resistían el ataque de algunos bacteriófagos, debido a la presencia de unas enzimas, las cuales fueron nombradas como enzimas de restricción (Cifuentes *et al.*, 1996).

Las enzimas de restricción tienen la habilidad de “restringir” el crecimiento y la reproducción de estos fagos. Estas enzimas son endonucleasas que cortan el ADN del “fago” en lugares particulares. A la fecha se ha descubierto un número elevado de enzimas de restricción que cortan el ADN en ciertas secuencias palindrómicas; es decir, secuencias de nucleótidos que se leen de la misma manera hacia adelante en una cadena de ADN que hacia atrás en la cadena complementaria. La frecuencia de cortes, o el tamaño de fragmentos de ADN, depende de la longitud de las secuencias de reconocimiento (Markert y Moller, 1959).

2.3.2 Hibridación de ADN

Es la unión de la sonda con su secuencia complementaria. Es una unión muy específica, tanto que la diferencia en un solo nucleótido hace que no se produzca. Las sondas se marcan (sustancia radiactiva, fluorescente o un enzima) para detectar la producción de la hibridación. En la detección también pueden utilizarse anticuerpos marcados frente a la cadena de ADN bicatenario (Graham, 1986).

La hibridación puede llevarse a cabo en solución, en soporte sólido o in situ. Las técnicas en soporte sólido más usadas son Southern blot, Northern blot y dot blot (McDouaall y Galloway, 1982).

2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que habita en las aguas termales, hizo posible el desarrollo de la PCR. *T. aquaticus* es una enzima que se requieren para copiar el ADN, también se requieren iniciadores sintéticos (secuencias cortas de ADN) para iniciar la réplica del ADN estos son secuencias cortas de ADN complementarias a las regiones flanqueantes del ADN que se pretende replicar (White *et al.*, 1996). Para la réplica de ADN, los iniciadores sintéticos se mezclan con una muestra muy pequeña de ADN, nucleótidos libres y la Taq polimerasa durante una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento, el ADN es desnaturalizado, entonces la estructura helicoidal del ADN se rompe y las dos cadenas de ADN se separan, los iniciadores se adjuntan a las regiones flanqueantes del ADN de interés y la polimerasa duplica este ADN, la cantidad de ADN de interés se duplica con cada ciclo para ello cada secuencia recién creada será duplicada junto con la original (Lagally *et al.*, 2001).

La PCR permite que el análisis de ADN se realice en muestras muy pequeñas de ADN. En la actualidad se pueden amplificar secuencias muy grandes, lo cual no era posible al inicio del desarrollo de la técnica de la PCR (Yuan *et al.*, 2006).

2.3.4 Secuenciación de genes

La secuenciación se puede utilizar para comparar segmentos de ADN homólogos entre individuos emparentados, para determinar relaciones filogenéticas. Antes del desarrollo del proceso de la PCR, el mayor problema era el aislamiento de fragmentos homólogos de ADN para comparación. Ahora se pueden sintetizar los iniciadores si se conoce la secuencia de la región flanqueada y se puede producir

una gran cantidad del ADN de interés de una forma rápida y sencilla (Bennet, 2003).

El método de secuenciación de Sanger es el más utilizado esto se debe principalmente a que se han realizado grandes avances en la automatización de esta técnica, el método se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. Las enzimas del tipo de la ADN polimerasa requieren de un templado de ADN de cadena sencilla, y realizan la síntesis de la hebra complementaria extendiéndola a partir de un iniciador en dirección 5' a 3'. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los ddNTPs es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico (Evans, 2000).

En el método de Sanger (1977), la estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, utilizando un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dNTP) y su 21 terminador (ddNTP), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Después, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia (Sanger, 1988).

En 1986 se publica el primer reporte de secuenciación automática de ADN en Applied Biosystems (ABI), el cual se realiza con terminadores fluorescentes como variantes del método Sanger, en esta variante utiliza una molécula fluorescente diferente unida a cada dideoxinucleótido y permite la reacción en un único tubo

(Figura 1). Las secuencias son de entre 500 y 1000 nucleótidos las cuales se leen a través de un computador (Shibata *et al.*, 1988).

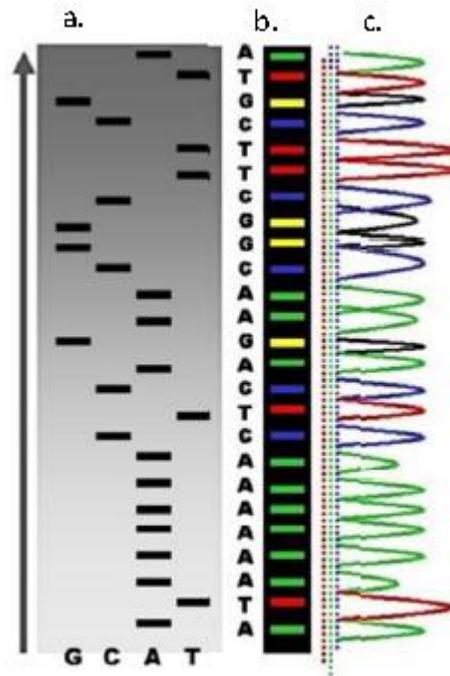


Figura 1. Ejemplificación del método de Sanger automatizado. El lugar de 4 carriles (uno para cada base), a) Se corren todas las reacciones en un único carril del gel (cada color representa una base) b). Se desarrollan algoritmos para convertir esas señales en electroferogramas que representan la secuencia de ADN, c). la flecha a la izquierda indica la dirección de lectura 5´-3´.

2.4 Marcadores de ADN

Los marcadores moleculares en la actualidad poseen un papel importante en los estudios sobre la diversidad genética.

2.4.1 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

La variación del tamaño entre fragmentos de ADN que resulta de la incubación con enzimas de restricción puede ser vista en los geles como distancias diferentes de migración, y se conoce como “polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción” (RFLP por sus siglas en inglés). Comercialmente hay más de 100 enzimas de restricción disponibles. Cada enzima de restricción reconoce una secuencia distinta de ADN, constituida por 4, 5, 6 u 8 bases. Mientras más pequeño es el sitio de reconocimiento, más pequeña es la longitud promedio del fragmento y mayor el número de fragmentos obtenidos (Frankel *et al.*, 1995).

Un uso común de esta técnica es la inspección de la diversidad alélica y la diferenciación entre poblaciones de animales utilizando el ADN mitocondrial. Este ADN produce un número pequeño pero suficientemente de fragmentos que pueden ser interpretados. La diversidad se mide como la presencia o ausencia de sitios de restricción en el ADN. Si un sitio de restricción está ausente, el fragmento esperado no se observa. Si todo el ADN nuclear es digerido, producirá muchos RFLP que aparecen como una mancha y no se pueden distinguir las bandas individuales, por lo que para el análisis de RFLP, primero deben ser identificados los fragmentos de ADN de interés (Frankham *et al.*, 2002).

2.4.2 Minisatélites (huella digital de ADN) y microsatélites (SSRs)

Una cantidad importante del genoma nuclear de muchas especies está constituido por secuencias repetidas en tándem. Al ser observados estos segmentos hechos de secuencias repetidas como bandas oscuras en los tubos de centrifuga, se pensó que esas manchas correspondían a ADN extra nuclear, por lo que se les dio el nombre de “ADN satélite”. Actualmente se conoce que estas secuencias repetidas se esparcen a través del genoma, regularmente dentro de los intrones. El nombre de “satélite” permaneció. Primero se descubrieron los minisatélites, que son secuencias repetidas mayores de 64 pares de bases. Los microsatélites,

conocidos como repeticiones de secuencias cortas (SSR por sus siglas en inglés) o repeticiones en tándem cortas (STR por sus siglas en inglés) son secuencias repetidas muy cortas, que pueden estar constituidas con un número de bases que varía de dos a seis nucleótidos (Chen *et al.*, 2005).

Los microsatélites se pueden encontrar a través del genoma. Estos son muy útiles en el mapeo genético. Las mutaciones son comunes en los sitios de ADN donde se encuentran los microsatélites, debido a que estas secuencias no codifican para proteínas por lo que las mutaciones no tienen efectos negativos sobre la supervivencia de los organismos. Lo anterior hace a los microsatélites útiles como marcadores genéticos (Tapia *et al.*, 2005).

2.4.3 ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

En esta técnica se usa un iniciador corto de diez bases de una secuencia arbitraria en una modificación de la técnica de PCR. Para permitir la unión del iniciador se expone a temperaturas bajas de alineación. El iniciador se une a las secuencias del ADN al azar en muchos lugares en un genoma promedio. En algunas ocasiones, los iniciadores se unen en secuencias lo suficientemente cercanas para permitir la amplificación por PCR. En genomas grandes, el iniciador puede amplificar varios loci, lo cual origina de tres a 20 bandas identificables en el gel. El polimorfismo entre los individuos se detecta como la pérdida o la ganancia de secuencias amplificadas como resultado de mutaciones en los sitios iniciadores, o de grandes inserciones entre sitios haciendo la distancia muy grande como para que ocurra la amplificación (Williams *et al.*, 1990).

2.4.4 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Este método es una combinación de las técnicas de RFLP y PCR. Una muestra de ADN se digiere con dos enzimas de restricción. Dos secuencias “adaptadoras” cortas de doble cadena con bases sobresalientes complementarias a los extremos producidos por las enzimas de restricción, se unen a los fragmentos de restricción.

Se agregan a la reacción los iniciadores utilizados en PCR, los cuales tienen secuencias que se acoplan a los adaptadores. La mezcla antes descrita se sujeta a amplificación por PCR. Los iniciadores de PCR están marcados para permitir la visualización de las bandas; en un ensayo se producen muchas bandas (Vos *et al.*, 1995).

2.4.6 Polimorfismo de la amplificación de secuencias específicas (SSAP), polimorfismo de nucleótidos simples (SNP) y polimorfismo de marcadores de secuencias expresadas (ESTP)

Los nuevos enfoques para el desarrollo de marcadores incluyen el uso de secuencias conservadas que pueden ser asociadas a genes particulares. El polimorfismo de la amplificación de secuencias específicas (SSAP) utiliza la misma técnica básica que el AFLP, pero con un iniciador específico basado en una secuencia conservada. La variación funcional se puede detectar si se usan secuencias específicas en donde se conoce que afectan caracteres específicos (Sachinandam *et al.*, 2001). La amplificación por PCR se enfoca a familias de genes conocidos. El polimorfismo de un nucleótido simple (SNP) es un sitio polimórfico donde las variantes difieren por la eliminación, inserción o sustitución de un sólo nucleótido. Para ello, primero se deben determinar las secuencias por secuenciación y luego se incorporan a los iniciadores de PCR. Un marcador de secuencia expresada (EST) es una secuencia de ADN construida a partir de un ARNm. Estos marcadores tienen el potencial de incrementar significativamente la capacidad de evaluar la diversidad de genes que tienen significancia adaptativa (Vasemagi y Pimmer, 2005).

2.5 ADN ribosomal

Los organismos eucariontes presentan el ADN ribosomal nuclear organizado en agrupaciones que contienen las subunidades 18s, 5.8s y 28s. Los genes que codifican para dichas subunidades son separados por dos Espaciadores Internos Transcritos (ITS). El ITS-1 que se encuentra separando los genes de las

subunidades 18s y 5.8s y el ITS-2 separa los genes de las subunidades 5.8s y 28s (Devran *et al.*, 2002).

Estas agrupaciones de genes se encuentran en bloques repetitivos o microsatélites en todo el genoma (Solórzano, 2008). Los ITS son unidades de repetición entre uno y cinco pares de bases pb por lo cual se consideran marcadores polimórficos ideales para la diferenciación de las poblaciones entre especies (Baldwin *et al.*, 1995). La función de los espaciadores transcritos internos es la maduración de ARN ribosomal. Las secuencias de la región ITS han permitido la reconstrucción filogenética en angiospermas, algas (Bakker *et al.*, 1995), helechos (Stein *et al.*, 1992), hongos (Vilgalys y Sun, 1994) e insectos (Campbell *et al.*, 1993). Los ITS son regiones muy útiles para la filogenia a nivel familia (Bayer *et al.*, 1996), género (Soltis *et al.*, 1996), además también han sido de utilidad para investigar la relación entre las poblaciones alopátricas, resolver conflictos entre especies y proporcionar soluciones a especies relacionadas (Baldwin, 1995).

2.5.1 Región ITS-1 de ADN ribosomal del núcleo

La región de los ITS por el hecho de ser intrones no codifican para ninguna proteína, el nivel de variación de esta región hace que sea una herramienta muy útil que sirve para detectar la variación genética entre miembros de un género, especies y subespecie como se mencionó anteriormente (Devran *et al.*, 2002).

El ITS-1 de ADNr ha sido utilizado como un marcador molecular en estudios filogenéticos y de sistemática debido principalmente a su rápida evolución, el ITS-1 no posee importancia estructural en el complejo ribosomal. La secuenciación de genes ADNr ha demostrado que estos son altamente conservados, en contraste hay menos conservación dentro de las regiones de los espaciadores Transcritos Internos (Zijlstra *et al.*, 1995 citado en Devran *et al.*, 2002). Las secuencias más conservadas son las que se utilizan para la clasificación de altos niveles taxonómicos como género o tipo, mientras que las secuencias de ITS son

utilizadas a nivel especies y subespecie. Ambos marcadores de ADN mt pueden ser utilizados como pruebas de diagnóstico para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Devran *et al.*, 2002).

El ADNr, cuya estructura se presenta en la Figura 2, es secuenciado para discriminar entre especies y calcular divergencias, especialmente el espaciador transcrito interno (ITS), muy utilizado para el diagnóstico molecular de parásitos, ya que suele ser especie-específico (Dlugosz y Wisniewski, 2006). La región ITS suele ser una región donde se ejerce una presión evolutiva menor, con lo cual, la posible variabilidad nucleotídica entre las secuencias aumenta (Page y Holmes, 1998).

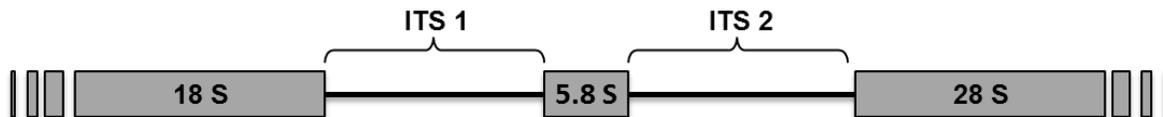


Figura 2. Esquema de Espaciadores Internos Transcritos (ITS).

2.6 Distancias genéticas

La forma más rápida de medir la diversidad genética que existe entre dos o más unidades es a través de las distancias genéticas. Cuando una unidad se separa en dos o más estas evolucionan de forma más o menos independiente lo cual quiere decir que entre mayor distancia exista menor será la transferencia genética entre ambas en el transcurso de las generaciones.

Las fuerzas que actúan sobre cada población (mutación, selección, deriva y migración) irán conformando la composición genética de cada una de ellas y a medida que aumente el tiempo en generaciones desde la escisión más se diferenciarán unas de otras.

Al medir las distancias genéticas entre las poblaciones, razas o especies se obtiene el grado de diferenciación existente en un tiempo determinado. Cuando se desconoce el proceso de escisiones sucesivas o filogenia se puede hacer

inferencia filogenética tanto para conocer la topología en forma de árbol como para estimar el número de generaciones transcurridas hasta encontrar el origen común de dos ramas.

2.7 Concepto filogenético de especie

Durante los últimos años se ha utilizado el término especie con dos propósitos diferentes uno como base para describir y catalogar la diversidad biológica y el otro como base de la teoría evolutiva para representar las relaciones históricas de la diversidad de una manera jerárquica (Cracraft, 1989).

El desarrollo de los análisis evolutivos ha permitido conocer las relaciones filogenéticas entre diferentes organismos, generando con ello nuevas clasificaciones y han conducido a un debate del concepto filogenético de especie Cracraft en 1983, fue el primero en proponer el concepto filogenético de especie definiéndolo como *“la agrupación diagnosticable más pequeña de organismos individuales dentro de la cual existe un patrón de ancestría y descendencia”*.

Nixon y Wheeler 1990 definen una especie filogenética como *“la más pequeña agregación de poblaciones (sexual) o linajes (asexual) diagnosticables por una única combinación de estado de carácter en individuos comparables”*

Existen diferentes métodos para la delimitación de especies entre los cuales se encuentran los que analizan la presencia o ausencia de flujo génico (Porter, 1990), los que estudian las distancias genéticas (Good y Wake, 1992), la fijación o ausencia de alelos (Doyle, 1995) y análisis de agregación de poblaciones AAP (Davis y Nixon 1992).

En la actualidad los métodos más utilizados para la delimitación de especies se basan en las topologías de árboles filogenéticos, los cuales requieren de la construcción de genealogías siendo especies delimitadas mediante a nodos resueltos, dichos métodos pueden utilizar tanto secuencias de ADN como morfología, separando poblaciones por divergencia de caracteres (Wiens y Penkrot, 2002). Brower en 1999 presenta un método que comprueba o rechaza

la hipótesis a priori sobre la delimitación de especies el cual consiste en la agregación cladística de haplotipos ACH para identificar haplotipos de diferentes individuos por comparación. Es decir se puede saber si dos poblaciones pertenecen a una misma especie o a diferente especie, si las poblaciones de cada especie presentan apomorfias ya sea morfológicamente o molecularmente y a través del análisis de secuencias de ADN se colocan juntas formando un grupo monofilético pertenecen a la misma especie, pero si las poblaciones de cada especie no comparten apomorfias pero forman un grupo parafiletico, pueden corresponder también a una misma especie (Olmstead, 1995). Sin embargo si dos especies putativas ocurren en partes distintas de la filogenia (grupo polifilético) se consideran especies diferentes (Brower, 1999).

2.8 Principales causas de mortalidad en granjas cunícolas

Las enteropatías, son procesos patológicos que comprometen al aparato digestivo, existen diferentes agentes causales, los cuales pueden provocar una gran variedad de cuadros patológicos, aun siendo de un mismo origen etiológico, el cual puede generar diferentes presentaciones clínicas, aparte de los procesos inflamatorios del intestino, denominados originalmente como enteritis y que son los de mayor importancia y frecuencia (Marlier *et al.*, 2003).

La diarrea es el signo clínico que predomina con un 95% de las enteropatías en conejos, por lo tanto, presenta una importancia económica grave, especialmente en conejos jóvenes después del destete. En general, las causas de la enteritis son dos, una es la intervención directa del agente patógeno como los virus, bacterias y/o parásitos, y la segunda es por trastornos en las funciones digestivas influenciados por factores que favorecen su presentación como por ejemplo; la predisposición genética del animal, el tipo de alimento y estrés (Licois *et al.*, 2006).

Los principales agentes patógenos asociados con estas patologías digestivas son, los de origen parasitario, infección por *Eimeria* spp, y/o de origen bacteriano principalmente *Escherichia coli*, algunas veces *Clostridium spiroforme* y *Klebsiella*,

infrecuentemente *Clostridium piliforme*. También se pueden observar algunos virus, principalmente rotavirus. El resto de los casos de diarrea no se pueden atribuir a una etiología exacta y se clasifican generalmente bajo el término de enteritis inespecífica (Pérez y Betancourt, 2011).

Gran parte de los procesos entéricos del conejo no están provocados por un solo agente causal, sino por la asociación de dos o más de ellos (Ventura *et al.*, 2004),

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en FAO 2010, reporto que las eimerias son los mayores agentes específicos de las diarreas, en el conejo dado que producen una de las enfermedades parasitarias más importantes y prevalentes. En las explotaciones industriales provoca importantes pérdidas económicas, debido al retraso en el crecimiento. Cuando no se siguen medidas sistemáticas de control con coccidiostatos, en unidades de producción tradicionales es una de las principales causas de mortalidad. En ambos casos la elevada prevalencia de esta enfermedad está relacionada principalmente con la carencia de instalaciones y condiciones higiénico sanitarias adecuadas (González-Redondo *et al.*, 2008).

2.8.1 Eimeria

Es un protozooario intracelular obligado del género *Eimeria* (Pakandl y Hlášková, 2007, Kumar *et al.*, 2014.). Se encuentra clasificado dentro del phylum *Apicomplexa* quien destaca por su diversidad y tamaño en la actualidad existen más de 300 géneros reconocidos de *Apicomplexa*, los cuales se distribuyen en por lo menos 60 familias (Perkins *et al.*, 2000) y 1 800 especies de *Eimeria* (Sapleta *et al.*, 2003). Se encuentran en amplia variedad en animales salvajes y domésticos (Zhao *et al.*, 2001, Heitlínger *et al.*, 2014).

Los parásitos como *Eimeria* causan una grave enfermedad de importancia veterinaria y de distribución mundial (Zoran *et al.*, 2006). Se estima que las pérdidas económicas son de más de 3 mil millones de dólares al año (Clark y Blake, 2012), asociados a la disminución en el consumo de alimento, baja

conversión alimenticia, baja ganancia de peso alta mortalidad y tratamientos inespecíficos, sobre todo en las unidades de producción donde las medidas de prevención son deficientes (Tehrani *et al.*, 2013).

2.8.2 Especies de *Eimeria* en animales domésticos

A continuación se mencionan las principales especies de *Eimeria* que infectan a los animales domésticos.

Se reconocen 7 especies de *Eimeria* que infectan a las aves de corral: *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. brunetti*. Cada especie produce afecciones con localización particular en el tracto intestinal, la única relativamente benigna para las aves de producción es *E. praecox*. (Sahar *et al.*, 2015)

En los bovinos se han descrito más de 20 especies de *Eimeria*, (Radostits *et al.*, 2005) las principales son: *Eimeria zuernii*, *E. bovis* y *E. ellipsoidalis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis* y *E. wyomingensis* (Tamasaukas *et al.*, 2010).

En las infecciones de porcinos por parásitos del género *Eimeria* se han descrito 12 especies en las cuales destacan las más patógenas que son *debliecki*, *E. scabra*, *E. suis*, *E. perminuta*, *E. spinosa*, *E. polita*, *E. porci* y *E. neodebliecki* después del destete (Ruttkowski *et al.*, 2001).

Entre las parasitosis que pueden afectar a los caprinos y que además constituyen una enfermedad con alta morbilidad y mortalidad, se encuentran las ocasionadas por el género *Eimeria*, donde se pueden mencionar las siguientes especies *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. jolchijevi*, *E. hirci*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. alijevi*, *E. apsheronica*, *E. caprina*, *E. caprovina*. Las especies que se consideran patógenas para las cabras son: *E. arloingi*, *E. faurei*, *E. gilruthi*, *E. caprovina* y *E. ninakohlyakimovae* (Hernández y Mendoza, 2012).

Una de las parasitosis más frecuentes en el ganado ovino es la eimeriosis, afectan de manera importante al rendimiento productivo de las explotaciones. De las 16

especies de *Eimeria* que parasitan al ganado ovino, las más patógenas son *E. ovinoidalis* y *E. crandalis*, aunque generalmente se producen infecciones mixtas por varias especies (Vázquez *et al.*, 2014).

2.8.3 Especies de *Eimeria* en conejos (*Oryctulagus cuniculus*)

La primera vez que se observó un ooquiste de *Eimeria* en conejos fue en 1674 por Leeuwenhoek. Sin embargo, fue hasta el siglo XIX cuando las eimerias principalmente *E. stiedai* fue el tema de mayor importancia en este tipo de investigaciones. Leuckart en 1879, distinguió dos formas de localización anatómica, la primera en el hígado y la segunda en el intestino de los conejos, llamándolos coccidios oviformes, en la actualidad conocidos como *E. stiedai* y *E. perforans*. En el siglo XX, muchos investigadores, como Yakimoff, Pellérdy, Cheissin, Rose, Scholtyseck, Coudert, Norton y Gregory entre otros estudiaron a las eimerias en conejos (Pakandl, 2009).

La especie *E. perforans* es introducida por Leuckart 1879, *E. coecicola* por Cheissin, 1947; *E. exigua* por Yakimoff, 1934; *E. flavescens* por Marotel y Guilhon, 1941; *E. intestinalis* por Cheissin, 1948; *E. irresidua* por Kessel y Jankiewicz, 1931; *E. magna* por Pérard, 1925; *E. media* por Kessel, 1929; *E. piriformis* por Kotlán y Pospesch, 1934; *E. vej dovskyi* por Pakandl, 1988 y *E. stiedai*, la cual es la única *Eimeria* presente en el hígado (Kisskalt y Hartmann, 1907). *E. neoleporis* es una especie de conejos silvestres (*Sylvilagus floridanus*) pero un estudio realizado por Carvalho en 1942 describe que puede infectar también al conejo doméstico (*Oryctulagus cuniculus*). Sin embargo los ooquistes de esta especie son muy similares a los de *E. coecicola* y dada esta razón Pellérdy en 1974 consideró el nombre de *E. coecicola* como sinónimo de *E. neoleporis*, sin embargo, en 1968 Cheissin demostró esta hipótesis al validar la similitud de ambas especies utilizando los datos relativos a la morfología de oocistos, así como a las etapas endógenas y también demostrando que *E. neoleporis* no se produce de forma espontánea en los conejos domésticos como se creía. Lo mismo ocurrió con otras especies otras especies como: *E. nagpurensis* por Gill y Ray, 1960; *E. oryctolagi*

por Ray y Banik, 1965 y *E. matsubayashi* por Tsunoda, 1952, demostrado que estas especies son idénticas a las especies ya descritas.

Actualmente, solo se aceptan once especies de *Eimeria* en conejos, las cuales se mencionaron anteriormente y fueron validadas por Coudert *et al.*, 1995, mediante técnicas morfológicas y por Ceré *et al.*, 1995 con técnicas moleculares.

2.8.4 Eimeriosis

La enfermedad que originan las diferentes especies de *Eimeria* es conocida como eimeriosis, se describen dos presentaciones; clínica y subclínica (Ogedenbe *et al.*, 2014). Es considerada una enfermedad de gran importancia económica en todo el mundo, debido a que compromete la producción y el bienestar animal, resultando en bajas tasas de conversión, retraso en el crecimiento, alta morbilidad y mortalidad de los animales infectados (Kumar *et al.*, 2014). Provoca lesiones en las células del intestino, lo que se traduce en desnutrición, enteritis, diarrea y hematoquecia, en muchos casos la muerte es muy común (Vrba y Pakandl 2014). Existen varias especies patógenas de *Eimeria* que infectan a una gran cantidad de animales de granja, como pollos, vacas, ovejas, conejos y recientemente también se describen nuevas especies en currucas (Pereira *et al.*, 2014), murciélagos (McAllister *et al.*, 2014) y serpientes (Kamir *et al.*, 2014). Las especies de *Eimeria* son altamente específicas de hospedero, se piensa que existen pocas posibilidades de que los humanos u otros animales, que se mantienen junto con los animales infectados se infecten, aunque aún no se descarta por completo la transmisión a otros animales (Jeong *et al.*, 2012).

2.8.4.1 Eimeriosis en el conejo

Las once especies de *Eimeria* que infectan al conejo han sido clasificadas según el grado de virulencia como; a virulentos (*E. coeciola*), ligeramente virulentos (*E. perforans*, *E. exigua* y *E. vej dovskyi*) moderadamente virulentos (*E. media*, *E. magna*, *E. ir residua*, *E. piriformis*) muy virulentos (*E. intestinalis*, *E. flavescens* y *E.*

stiedae) (Coudert *et al.*, 1995, Bhat *et al.*, 1996). Según estudios realizados en provincias de Taiwán un solo ooquiste esporulado de las especies de *Eimeria* podría infectar con éxito a un conejo, lo que demuestra no sólo la alta especificidad del huésped, sino también un muy alto potencial las especies de *Eimeria* para infectar (Ming-Hsien *et al.*, 2010, Jithendran 2010).

Las eimerias se encuentran regularmente en todas las granjas de conejos, independientemente del manejo y las condiciones sanitarias practicadas por los criadores, además de que la infección es de forma mixta (Almeida *et al.*, 2006, Al-Mathal 2008, Razavi *et al.*, 2010, El-Shahawi *et al.*, 2011). Los conejos jóvenes son más susceptibles a la infección, presentándose especialmente en edades de dos a tres meses, una vez recuperados estos adquieren inmunidad a la enfermedad pero son considerados portadores sin signología aparente (Gres *et al.*, 2003).

La identificación y caracterización genética de las diferentes especies y género de *Eimeria* son centrales para la prevención, vigilancia y control de la eimeriosis. Esto es particularmente importante con respecto a la aparición de una amplia resistencia de las especies *Eimeria* a los coccidiostatos y a los problemas asociados con residuos de medicamentos (Hamidinejat *et al.*, 2013).

De las especies que infectan al conejo solo *E. stiedae* es causante de la eimeriosis hepática, la cual provoca retrasos en el crecimiento, las otras diez especies son causantes de la eimeriosis en su manifestación intestinal, causando mortalidad, incluso con un grado de infección bajo (Cam *et al.*, 2008).

2.8.5 Diagnóstico de *Eimeria*

El diagnóstico para la eimeriosis generalmente se realiza con métodos convencionales basados principalmente en características morfológicas, ciclo de vida, signos clínicos y lesiones a la necropsia (Long y Joy 1984). Y recientemente gracias al advenimiento de la biología molecular se puede identificar de manera precisa a *Eimeria*, favoreciendo con ello también el estudio de la variabilidad

genética y evolución a partir de un solo ooquiste (Schnitzler *et al.*, 1998, Fernández *et al.*, 2003). El uso de estas técnica ha permitido el diagnóstico rápido y eficaz de especies de *Eimeria* en otras especies (Lien *et al.*, 2007).

2.8.5.1 Identificación morfológica

La identificación de las especies de *Eimeria* se realiza a través de la descripción morfológica de los ooquistes, el tiempo de esporulación y la localización de las lesiones en el intestino (Coudert *et al.*, 1995).

Los ooquistes de las diferentes especies de *Eimeria* presentan diferencias de tamaño (área, de diámetro), contorno (elíptica, ovoide, circular), estructura interna, grosor y color de la pared de ooquistes, entre otras variaciones morfológicas (Joyner 1982). La discriminación correcta de las especies mediante inspección visual está severamente restringida por las diferencias morfológicas ligeras que existen entre las distintas especies y la superposición de características en infecciones mixtas, además el tiempo mínimo para su esporulación es mínimo de una semana (Long y Joyner 1984, Su *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2014). Para resolver dichas limitaciones durante los últimos años, se han producido avances significativos en el desarrollo de herramientas de diagnóstico con el cual ha surgido un nuevo método de identificación morfológica de tendencia informática el cual es ofrecido a través de un software gratuito disponible en línea llamado COCCIMORPH, diseñado para la identificación de ooquistes de *Eimeria* en aves de granja y conejos, mediante el uso de fotografías realiza mediciones con algoritmos de onda de las longitudes estandarizadas al tamaño de las diferentes estructuras morfológicas de las especies de *Eimeria* (Castañón *et al.*, 2007, Thenmozhi *et al.*, 2014).

2.8.5.2 Identificación molecular

Los primeros reportes de identificación molecular de eimerias fueron realizados en pollos de engorda, donde se describe el uso de los ITS1 e ITS2 (Schnitzler *et al.*,

1999, Woods *et al.*, 2000, Gasser *et al.*, 2001). Se describe también el uso de PCR en tiempo real y PCR múltiple, técnicas que permiten la identificación y al mismo tiempo la cuantificación de las diferentes especies de *Eimeria* en una sola muestra (Morgan *et al.*, 2009, Myung-Jo 2014).

En 2008, Kvicerová y colaboradores realizaron un estudio filogenético donde a través de la obtención de la secuencia parcial del fragmento 18S rDNA de las 11 especies de eimerias que infectan a los conejos, determinó que existe monofilia en ellas, hallazgo que resulta importante porque indica que estas especies estrechamente relacionadas se han diversificado en un solo hospedero, y se dividen en dos linajes hermanos, los cuales corresponden a la presencia y ausencia del residuo del ooquiste. Los autores mencionan que la relación filogenética de los diversos rasgos biológicos de las eimerias puede proporcionar información importante para comprender la historia de la evolución y además sirvan como marcadores adecuados para fines de diagnóstico y/o taxonómico (Kvicerová *et al.*, 2008).

El diseño de 12 iniciadores altamente específicos para la detección y discriminación de las 11 especies de *Eimeria* que infectan al conejo pueden ser implementados en el diagnóstico convencional, estos son basados en secuencias de la región ITS1 de ADNr. Los iniciadores contienen un nivel alto de Adenina y Timina superior a 55 %, ofreciendo alta especificidad y sensibilidad, detectando de 500 fg a 1 pg de ADN o bien 0.8 a 1.7 ooquistes (Oliveira *et al.*, 2011).

La PCR cuantitativa en tiempo real, detecta 45 genes de *E. coecicola* en el día 7 pos-infección. Mostrando un incremento dramático que revelo citoquina pleiotrópica e interleucina 6 anti-inflamatoria (IL-6) 50 veces, mientras que la mayor disminución fue de aproximadamente 13 veces donde se detectó que para ARNm codifican la PAD, SULT3A1, CRP y glutamato S-transferasa. Además, se encontró la regulación de genes que codifican regiones de anticuerpos. Los resultados obtenidos arrojaron que la IL-6 juega un papel central en la infección de

conejos por *E. coecicola* especie que se encuentra presuntamente implicada en lesiones tanto intestinales como hepáticas (Mohamed *et al.*, 2012).

Secuencias completas de la región ITS1-5.8S-ITS2 ARNr de seis especies de *Eimeria* en conejos; *E. stiedae*, *E. intestinalis*, *E. flavescens*, *E. media*, *E. magna* y *E. irresidua*, han sido reportadas utilizando los iniciadores diseñados por Oliveira *et al.*, (2011) revelando que ambas secuencias ITS1 e ITS2 fueron específicas para cada una de las especies de *Eimeria* en conejos. Posterior a ello se desarrolló un ensayo de PCR múltiple, específico y sensible para el diagnóstico basado en sitios polimórficos de ITS1 e ITS2, donde identificaron a tres especies altamente patógenas de los conejos, *E. stiedae*, *E. intestinalis*, y *E. flavescens*. Esta prueba, es una poderosa herramienta para la diferenciación clínica de alta patogenicidad de las especies *Eimeria* en conejos y el estudio de la genética de poblaciones de eimerias en el conejo (Yan *et al.*, 2013).

Un estudio realizado con aislados de *Eimeria intestinalis* de conejo en China, permitió la identificación de la subunidad 18S de los genes de ARN ribosomal el tamaño del fragmento amplificado fue 1521 pb, el cual comparte 99% de secuencia con las *E. intestinalis* aisladas de Francia y la República Checa (Shi *et al.*, 2014).

La secuencia completa del ADN mitocondrial (ADNmt) de *E. magna* en conejos tiene un tamaño de 6249 pb, y consta de 3 genes codificantes de proteínas (cyt b, cox 1 y cox 3), más 12 fragmentos de genes de la subunidad grande (LSU) ARNr, y 7 fragmentos de gen para la subunidad pequeña (SSU) ARNr, sin genes de ARN de transferencia, coincidiendo con las secuencias de *Eimeria* spp en pollos. El contenido de Adenina y Timina es de 65,16% para el genoma mitocondrial de *E. magna* (29.73% A, 35.43% T, 17.09 G y 17.75% de C). Esta secuencia proporciona nuevos marcadores de ADNmt para el estudio de la epidemiología y la genética molecular de *Eimeria* spp por lo tanto tiene implicaciones en el diagnóstico molecular de la eimeriosis en el conejo (Ogedengbe *et al.*, 2014).

2.9 Pérdidas económicas generadas por la eimeriosis a nivel mundial

En el mundo se estima que las pérdidas económicas de la eimeriosis tienen un valor estimado en más de US \$ 3 mil millones anuales (Dalloul y Lillehoj de 2006). Estas pérdidas económicas totales debidas a la coccidiosis para el año 2010 en Rumania pueden haber sido al menos € 28, 971,818.18. Las cuales en comparación, con la India, el costo para el período 2003-2004 se estimó en Rs1.089.170.162 (~ € 15, 210,694.20) (Bera *et al.*, 2010), y en el Reino Unido, para el año 1995, a eso de GB £ 38.588.795 (~ € 44, 643,989.69) (Williams, 1999). En Etiopía, las pérdidas totales medios se estimaron en 898,8 y 5,301.8 Birr etíope por explotación en las granjas de pequeña y gran escala, respectivamente (Kinunghi *et al.*, 2004).

En general, se asume que el 70% de los costes estimados se deben a la coccidiosis subclínica, por el impacto sobre la ganancia de peso y la conversión alimenticia (Gussem, 2007), y la importancia económica de la eimeriosis subclínica varía con la composición de las poblaciones de *Eimeria* (Haug *et al.*, 2008).

2.9.1 Producción cunícola en México

La producción cunícola en México es de traspatio constituyéndose por un 90 % de la producción cunícola nacional, mientras que el 5% está dedicado a la producción semi tecnificada y el otro 5% de la producción tecnificada (Godínez, 1987).

Actualmente, a través de los programas de rescate y promoción de la cunicultura se tienen censos por entidad federativa, y el total nacional cunícola está cifrado en 929,000 vientres. Las explotaciones cunícolas se encuentran en mayor concentración en los estados del centro del país: Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Morelos, Aguascalientes, Guanajuato y parte de Jalisco. Se reportan 594 granjas cunícolas tecnificadas (SENASICA, 2006).

Uno de los problemas que con mayor frecuencia presentan los cunicultores en sus explotaciones, son las diarreas identificadas como la primera causa de muerte, afectando severamente la producción y la economía de los productores (Juárez y Morales, 2002).

En México la cunicultura a nivel industrial se ha aprovechado apenas en un 10 por ciento de su potencial, es importante mencionar que a nivel nacional se carece de información actualizada sobre la producción, consumo, comercialización y también de leyes que regulen el sacrificio, la venta o comercialización del conejo (SAGARPA, 2016).

2.9.2 Producción cunícola en el estado de México

El Estado de México en los últimos años ha destacado a nivel nacional como el estado de mayor producción y consumo de carne de conejo, por ello en los últimos años se creó el comité Sistema de Producto Cunícola (SPC) del Estado de México, el cual tiene como propósito reforzar este sector productivo, así como también dar inicio a la organización de cunicultores independientes bajo el contexto legal y con ello generar una mayor representatividad en el eslabón ganadero. En el 2015 el estado de México reportó un inventario de 65 mil vientres y una producción aproximada de 54 mil 600 toneladas de carne. Las zonas de mayor producción y comercialización son el oriente, contemplando principalmente los municipios de Amecameca, Texcoco y Teotihuacán; la zona del Valle de Toluca, el municipio de Jilotepec y Atlacomulco. Mil 500 familias mexiquenses se dedican a esta actividad destacando que la carne de conejo es un 20% más barata que la carne de res (SAGARPA, 2015).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los parásitos del género *Eimeria* son considerados patógenos de gran importancia económica en todo el mundo, afectando gravemente al sector ganadero. En México el sector cunícola es relativamente nuevo, sin embargo se dice que este tiene un gran potencial de desarrollo intensivo, en los últimos años se ha reportado que el problema que presentan con mayor frecuencia los cunicultores son las enfermedades digestivas. Según la FAO en la última década las eimerias son la principal causa de mortalidad en las unidades de producción cunícolas originando la rápida pérdida del 20 % del peso vivo en un lapso de 2 a 3 días asociado principalmente a diarrea presentadas en los animales infectados. En los últimos años con el desarrollo de las nuevas técnicas moleculares se ha logrado identificar las especies de *Eimeria* que infectan al conejos sin embargo aún se desconocen las relaciones evolutivas entre las poblaciones las cuales pueden contribuir estudio de las eimerias.

4. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de analizar la variación genética de *Eimeria* spp. es reconocida como un factor fundamental para comprender la dinámica de la distribución y control de la eimeriosis (Morris y Gasser, 2006). Los estudios sobre diversidad genética dentro y entre las poblaciones de especies de *Eimeria* son elementales para el desarrollo de vacunas universalmente aceptables contra la eimeriosis (Kumar *et al.*, 2015). Por lo tanto, la secuenciación de la región ITS de los aislados de campo de *Eimeria* pueden ser útiles en la evaluación de la diversidad de las cepas. En México no existe información sobre la diversidad genética de la especies *Eimeria* que infectan a los conejos por ello se planeó realizar el presente estudio en la región donde se registran mayor producción cunícola a nivel nacional.

5. OBJETIVOS

5.1 objetivo general

Analizar la diversidad genética de las especies de *Eimeria* que afectan la producción cunícola en la región sur oriente del Estado de México.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Diagnosticar *Eimeria* spp utilizando la técnica de Mc Master.
- 2.- Amplificar la región ITS1 de *Eimeria* por PCR.
- 3.- Comparar las secuencias de *Eimeria* con las reportadas a nivel mundial.
- 4.- Analizar de la diversidad genética de *Eimeria* en la región sur oriente del estado de México.

6. HIPÓTESIS

Existe diversidad genética entre las poblaciones de *Eimeria* que infectan a conejos de la región sur oriente del Estado de México.

7. METODOLOGÍA

7.1 Límites de espacio y tiempo

El presente trabajo se realizó en las unidades de producción cunícola de la región sur oriente del Estado de México, la cual se encuentra delimitada al oriente con el estado de Puebla, al poniente con el Distrito Federal, al sur con el Estado de Morelos y al norte con los municipios de Ixtapaluca y los Reyes, se conforma por los municipios de: Chalco de Díaz Covarrubias, Solidaridad Valle de Chalco, Cocotitlán, Temamatla, Tlalmanalco de Velázquez, Tenango del Aire, Ayapango de Gabriel Ramos Millán, Juchitepec de Mariano Rivapalacio, Amecameca de Juárez, Ozumba de Alzate, Tepetlixpa, Atlautla de Victoria y Ecatzingo de Hidalgo (INEGI, 2015).

La temperatura media anual es de 14.1°; el mes más frío es enero con 2.4° promedio, pero en febrero o diciembre la temperatura puede descender hasta -8°. El mes más caluroso es abril con 24° en promedio, pero la máxima temperatura extrema puede llegar hasta 34° en mayo o de 32° en octubre y diciembre. La precipitación anual es de 935.6 milímetros, febrero es el mes más seco (6.2 mm), seguido por diciembre (6.5 mm) y marzo (7.0 mm) Julio es el más lluvioso (341 mm), le sigue agosto (338 mm) y junio (321.4 mm), el régimen de lluvias es de mayo a octubre (Secretaría de Medio Ambiente, 2015). En el periodo comprendido de agosto 2014 a marzo 2016.

7.2 Obtención de las muestras

Fueron recolectadas muestras heces de conejo con diarrea y sin signología aparente, las cuales se almacenaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas, se transportaron en hielera a 4°C para su procesamiento inmediato en Anfiteatro de la Licenciatura del Centro Universitario UAEM Amecameca.

7.3 Tamaño de la muestra

La fórmula para la determinación del tamaño de la muestra de una población infinita o desconocida se muestra a continuación (Murray e Larry, 2009):

Dónde:

n= tamaño

z= 1.96 (5% de confianza)

p= Frecuencia esperada (p =0.5)

q: 1 – p

I = Error (10 %, i = 0.1)

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{i^2}$$

$$N = \frac{(1.96)^2 \times 0.5 \times 0.5}{0.1^2} = 96.04$$

$$0.1^2$$

7.4 Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron animales que presentaban signología entérica y sin signología aparente, de 1 a 3 meses de edad, sin importar sexo, raza o tipo de unidad de producción y fin zootécnico.

8. MÉTODOS

8.1 Identificación coproparasitológica

8.1.1 Procesamiento de las muestras de heces

Se utilizó la Técnica de Mc Máster para detectar cualitativamente y cuantitativamente, los ooquistes de *Eimeria* existentes en la muestra los resultados obtenidos se expresaron en ooquistes por gramo de heces (OPG) (Procedimiento anexos 1).

8.2 Identificación molecular de *Eimeria*

8.2.1 Extracción de ADN

De las muestras positivas realizadas por diagnóstico coprológico, se procedió a realizar la extracción de DNA a partir de 200 mg de heces, utilizando el kit Fecal Microbe DNA de Zymo Research® siguiendo las instrucciones del fabricante (Procedimiento anexo 2).

8.2.2 Amplificación por PCR de la región ITS-1 de *Eimeria*

Se realizó la amplificación de fragmentos de 150-300 pb de la región ITS1 del ADNmt utilizando los 11 iniciadores reportados Oliveira *et al.*, 2011 (Tabla 1). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos, 35 ciclos: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos de 52 a 60 °C según la TM de cada especie de *Eimeria* y 30 segundos a 72 °C con una etapa de extensión final de 5 minutos a 72 °C. (Anexo 3). Los productos obtenidos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio y se corrieron a 100 volts en una cámara de electroforesis Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad®) durante 30 minutos. Posteriormente se observaron en un transiluminador Ultravioleta UVP

Los fragmentos amplificados fueron purificados a partir de gel utilizando el Kit the Gel DNA Recovery Zymoclean (Anexo 4) y secuenciados en un ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los reportados a nivel mundial.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la identificación de *Eimeria* en el conejo.

Especies de <i>Eimeria</i>	Nombre del iniciador	Secuencias
<i>Eimeria</i> spp. (todas las especies del conejo)	ITS1-FITS1-F	GGGAAGTTGCGTAAATAGA
	ITS1-FITS1-R	CTGCGTCCTTCATCGAT
<i>E. coecicola</i>	Ecoe-ITS1-F	AGCTTGGTGGGTTCTTATTATTGTAC
	Ecoe-ITS1-R	CTAGTTGCTTCAACAAATCCATATCA
<i>E. exigua</i>	Eexi-ITS1-F	GAATAAGTTCTGCCTAAAGAGAGCC
	Eexi-ITS1-R	TATATAGACCATCCCCAACCCAC
<i>E. flavescens</i>	Efla-ITS1-F	GAATATTGTTGCAGTTTACCACCAA
	Efla-ITS1-R	CCTCAACAACCGTTCTTCATAATC
<i>E. intestinalis</i>	Eint-ITS1-F	TGTTTGTACCACCGAGGGAATA
	Eint-ITS1-R	AACATTAAGCTACCCTCCTCATCC
<i>E. irresidua</i>	Eirr-ITS1-F	TTTGGTGGGAAAAGATGATTCTAC
	Eirr-ITS1-R	TTTGCATTATTTTTAACCCATTCA
<i>E. magna</i>	Emag-ITS1-F	TTTACTTATCACCGAGGGTTGATC
	Emag-ITS1-R	CGAGAAAGGTAAAGCTTACCACC
<i>E. media</i>	Emed-ITS1-F	GATTTTTTTTCCACTGCGTCC
	Emed-ITS1-R	TTCATAACAGAAAAGGTAAAAAAGC
<i>E. perforans</i>	Eper-ITS1-F	TTTTATTTTCATTCCCATTGTCATCC
	Eper-ITS1-R	CTTTTCATAACAGAAAAGGTCAAGCTTC
<i>E. piriformis</i>	Epir-ITS1-F	ACGAATACATCCCTCTGCCTTAC
	Epir-ITS1-R	ATTGTCTCCCCCTGCACAAC
<i>E. stiedai</i>	Esti-ITS1-F	GTGGGTTTTCTGTGCCCTC
	Esti-ITS1-R	AAGGCTGCTGCTTTGCTTC
<i>E. vej dovskiy</i>	Evej-ITS1-F	GTGCTGCCACAAAAGTCACC
	Evej-ITS1-R	GCTACAATTCATTCCGCC

8.2.3. La clonación y secuenciación de región ITS-1

Se realizó la clonación de amplicones de PCR primaria en el Vector pGEM-T Systems y se propago en células competentes *E. coli* de la cepa JM109 (PROMEGA), Los clones positivos se confirmaron mediante PCR de colonias usando cebadores específicos del género (Anexo 5). Los plásmidos fueron purificados de las células transformadas utilizando el ilustra plasmid Prep Mini Spin Kit GE Healthcare (Anexo 6).

8. 2.4. El análisis de secuencia

Todas las secuencias de ITS-1 región de *Eimeria* generados en el presente estudio, se compararon entre sí y con secuencias publicados disponibles en GenBank por programa BLAST del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

8.2.5. El análisis filogenético de la secuencia ITS-1

Las secuencias generadas en este estudio fueron analizados para diversidad genética utilizando las secuencias publicadas en Brasil y China de aislados de republica Checa y Francia de las diferentes especies de *Eimeria* que infectan al conejo. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando MEGA6, (Tamura *et al.*, 2011).

9. RESULTADOS

Un total de 220 muestras de heces de conejos de 60 a 90 días de edad, fueron recolectadas en granjas cunícolas ubicadas en el Estado de México en el periodo comprendido de mayo del 2014 a mayo de 2016. Se identificó a *Eimeria* spp. en un 37% (82 muestras) por microscopia (Gráfico 1).

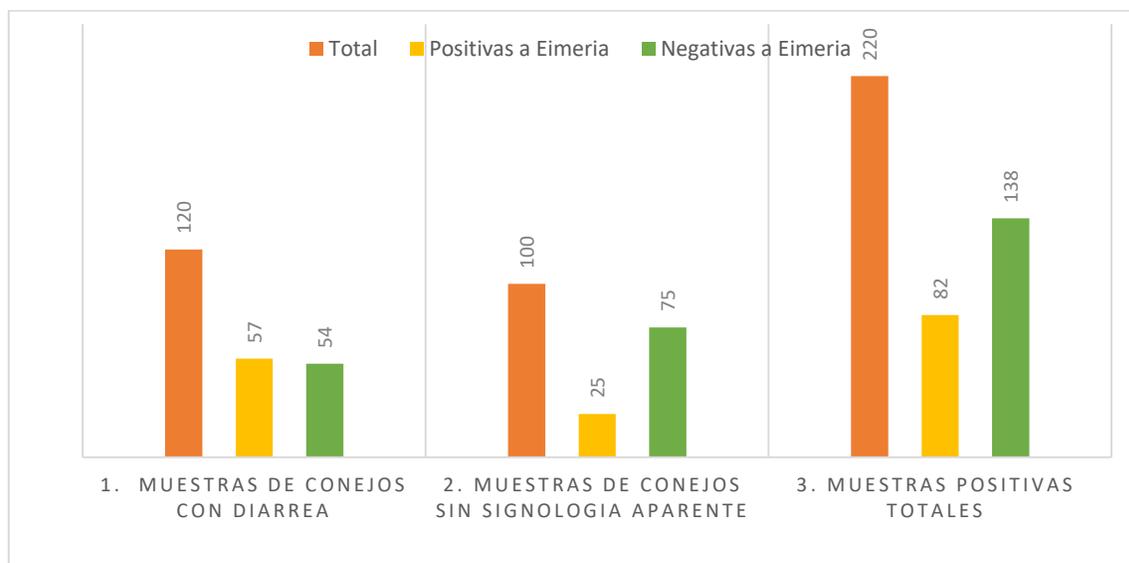


Gráfico 1. Total de las muestras positivas a *Eimeria* spp. identificadas con la técnica de Mc Master. La identificación de *Eimeria* en conejos con diarrea fue del 48%, y en conejos sin signología en un 25%.

Después de obtener las muestras positivas se procedió a extraer el ADN de todas las muestras positivas y realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se obtuvo el ADN de las muestras positivas a *Eimeria* spp. de estos el 11.37 % (25/220) eran conejos sin signología aparentemente sanos y el 54.54 % (120/220) presentaba cuadros entéricos.

La signología observada en este estudio fue variada identificándose diarrea en 52%, seguida de distensión abdominal 50 % el 22% presento anorexia y solo el 5% estreñimiento.

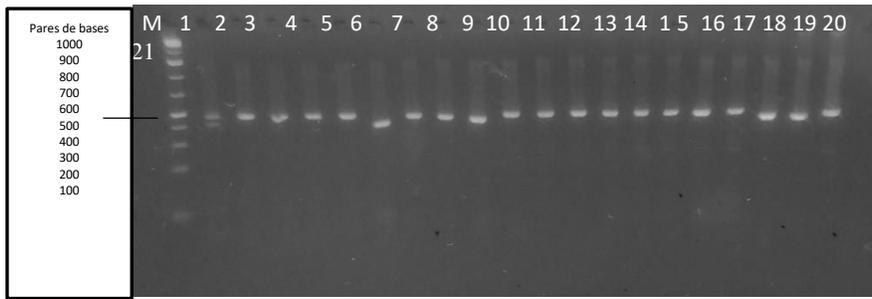


Figura 3. Muestras positivas a *Eimeria* spp. por PCR. Se utilizaron iniciadores generales en el carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2; control positivo y del 3 al 20; muestras obtenidas de conejos dentro de la región sur oriente del Estado de México y en carril 21; control negativo, observados en gel de agarosa al 2X.

Se realizaron 231 reacciones de PCR de 21 muestras seleccionadas al azar en las que se emplearon los 11 iniciadores específicos de cada una de las especies que infectan al conejo. (Figura 4)

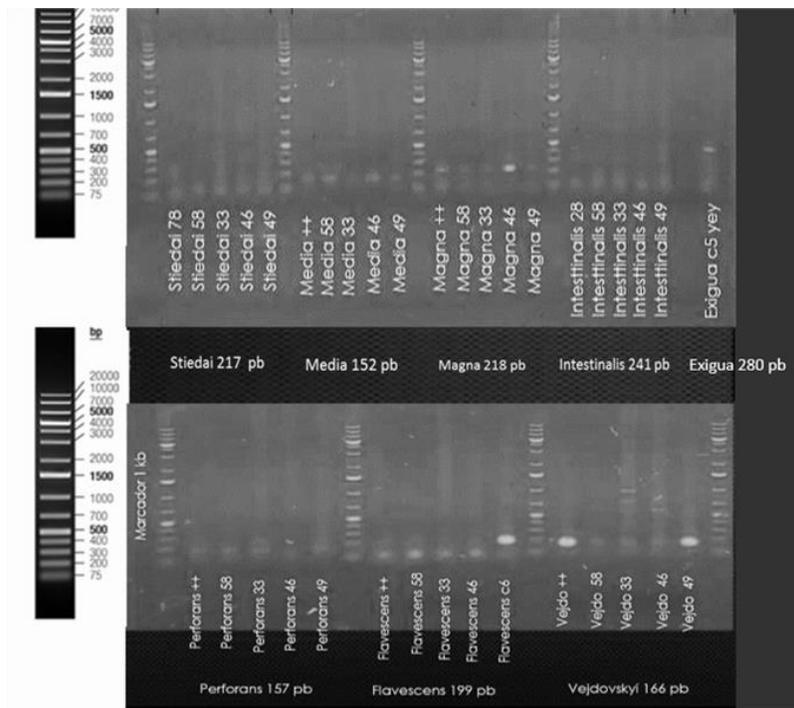


Figura 4. Muestras positivas a diferentes especies de *Eimeria* realizadas por PCR utilizando iniciadores específicos reportados por Oliveira *et al.*, 2011., observados en geles de agarosa al 2X.

En los resultados del análisis de PCR específicas de las 11 especies de conejos se encontró a *Eimeria Vejdovskyi* como la especie más frecuente (85%), seguida de *E. magna* (66%), *E. stiedai* (47%), *E. media* y *E. perforans* (42%), mientras que *E. irrasidua* fue la de menor frecuencia (4.7%) (Grafico 2). En la identificación por muestra se identificó desde una hasta nueve especies de *Eimeria* (Tabla 4).

Las secuencias obtenidas a partir de los productos amplificados poseen una identidad del 89 al 100 % con las reportadas en el Genbank, para las especies de *Eimeria* que infectan a los conejos tabla 2.

Tabla 4. Distancias genéticas de las secuencias de *Eimeria* que infectan a los conejos.

HM768 891.1	MX1_ Evej	JQ071 391.1	MX5_ Emag	HM768 890.1	MX1_ Esti	JQ071 392.1	MX2_ Emed	HM768 888.1	MX6_ Eperf	JX406 873.1	MX2_ Eflav	HM768 882.1	MX5_ Eexi	HM768 881.1	MX03_ Ecoe	HM768 884.1	MX3_E intes	HM768 889.1	MX1_ _Pir	JX406 875.1	MX1_E irres
MX1_E vej	0.00																				
JQ071 391.1	0.41	0.41																			
MX5_E mag	0.41	0.41	0.00																		
HM768 890.1	0.19	0.19	0.43	0.43																	
MX1_E sti	0.22	0.22	0.45	0.45	0.04																
JQ071 392.1	0.41	0.41	0.14	0.14	0.44	0.47															
MX2_E med	0.41	0.41	0.14	0.14	0.44	0.46	0.01														
HM768 888.1	0.41	0.41	0.13	0.13	0.43	0.45	0.05	0.06													
MX6_E perf	0.40	0.40	0.13	0.13	0.43	0.44	0.06	0.07	0.01												
JX4068 73.1	0.54	0.54	0.53	0.53	0.48	0.50	0.55	0.54	0.58	0.57											
MX2_E flav	0.57	0.57	0.53	0.53	0.49	0.50	0.55	0.54	0.58	0.57	0.02										
HM768 882.1	0.51	0.51	0.53	0.53	0.53	0.54	0.52	0.51	0.51	0.52	0.31	0.32									
MX5_E exi	0.49	0.49	0.52	0.52	0.51	0.50	0.54	0.53	0.53	0.52	0.34	0.34	0.16								
HM768 881.1	0.37	0.37	0.44	0.44	0.39	0.37	0.42	0.42	0.43	0.44	0.52	0.51	0.59	0.53							
MX03_ Ecoe	0.37	0.37	0.41	0.41	0.37	0.35	0.40	0.40	0.39	0.39	0.60	0.61	0.56	0.53	0.15						
HM768 884.1	0.42	0.42	0.17	0.17	0.41	0.44	0.18	0.17	0.17	0.18	0.49	0.50	0.47	0.52	0.43	0.39					
MX3_E intes	0.41	0.41	0.21	0.21	0.39	0.42	0.24	0.24	0.22	0.21	0.53	0.53	0.52	0.54	0.47	0.42	0.13				
HM768 889.1	0.54	0.54	0.54	0.54	0.46	0.49	0.58	0.57	0.59	0.58	0.08	0.09	0.33	0.37	0.49	0.59	0.48	0.52			
MX1_P ir	0.61	0.61	0.57	0.57	0.54	0.55	0.54	0.54	0.53	0.53	0.39	0.37	0.43	0.49	0.58	0.59	0.50	0.52	0.45		
JX4068 75.1	0.54	0.54	0.57	0.57	0.51	0.51	0.53	0.52	0.50	0.50	0.62	0.61	0.61	0.62	0.55	0.52	0.48	0.51	0.60	0.57	
MX1_E irres	0.56	0.56	0.58	0.58	0.52	0.55	0.61	0.62	0.58	0.57	0.64	0.63	0.67	0.67	0.61	0.57	0.54	0.47	0.61	0.54	0.37

Con las secuencias obtenidas se realizó la alineación y el análisis filogenético con el software Mega 6 como reporta Tamura *et al.*, (2007) y finalmente se construyó un árbol filogenético Neighbor Joining como se muestra a continuación en la figura 9.

10. DISCUSIÓN

Rodríguez- De Lara *et al.*, 2008 publica que las diarreas en los conejos representan un factor importante al influir en la producción de conejos rentable en México, en este estudio *Eimeria* spp se encuentro presente en un 48% de los conejos que presentaron diarrea difiriendo con la FAO en 2010, en México las eimerias no son la principal causa de diarreas en conejos.

En México no existen reportes actuales sobre la identificación de las especies de *Eimeria* que infectan al conejo, por morfología ni moleculares, por lo que los resultados obtenidos son el primer reporte de la identificación molecular de las 11 especies de *Eimeria* que infectan al conejo en México, a partir de muestras obtenidas de campo.

En contraste a los resultados publicados por Li *et al.*, 2016 en Harbin al Noroeste de China, que también reporta el uso de iniciadores diseñados por Oliveira *et al.*, 2011 en este estudio, encuentran solo seis de las 11 especies reportadas (*Eimeria vej dovskyi*, *E. piriformis*, *E. flavescens*, *E. magna*, *E. media*, and *E. stiedae*) lo cual difiere de los resultados obtenidos por morfología ya que en estos reporta ocho especies diferentes a las identificadas por PCR, sin embargo estos resultados coinciden con los reportes en aves debido a que como menciona Güven *et al.*, 2013, los métodos tradicionales basados en mediciones o características morfológicas, presentan limitaciones debidas al solapamiento de las mismas, y la identificación puede ser poco confiable.

Es importante mencionar que las especies de *Eimeria* poseen diferente grado de virulencia como menciona previamente Coudert *et al.*, 1995 donde realizan la evaluación de lesiones sobre el epitelio, sin embargo esto ha originado algunas

controversias en cuanto al grado de virulencia de cada especie de *Eimeria* donde se identifican hallazgos histopatológicos que en ocasiones no se correlacionan con la virulencia tal como lo reportan Shi *et al.*, 2014 donde demuestran que existe diferente grado de virulencia entre aislados de *E. intestinalis* de China con los de Francia y Republica Checa donde se reportan como altamente virulentos, las diferencias encontradas en esta clasificación presentan inconvenientes al momento de querer generalizar la virulencia de las especies de *Eimeria* en el mundo.

Los resultados filogenéticos coinciden con Kvicerova *et al.*, 2008 quien describe monofilia de los 11 especies de *Eimeria* de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y la diferenciación de 2 linajes hermanos de las especies de *Eimeria*, los cuales corresponden a la presencia y ausencia del residuo de oocistos. Liu *et al.*, 2015 corrobora la monofilia que presentan las 11 especies y además aporta que las especies de *Eimeria* del conejo difieren en un solo clado independiente de las especies reportadas en otras especies animales como aves lo cual se corrobora en este estudio. Finalmente en el árbol filogenético se observa que existe una gran diversidad de *E. magna*.

11. CONCLUSIÓN

Este es el primer reporte de la identificación molecular de las 11 especies de *Eimeria* que infectan al conejo en México.

Los análisis filogenéticos entre las especies de *Eimeria* demuestran monofilia de las especies de *Eimeria* que infectan al conejo y además se demostró que existe una variabilidad genética en las cepas de *E. magna* circulantes en nuestro país y resaltando también que es la especie que más se identificó en muestras de México.

Los diferentes perfiles encontrados permitieron el cálculo de las distancias genéticas entre las especies de *Eimeria*, lo cual permitió la elaboración del dendrograma correspondiente.

Finalmente las técnicas basadas en PCR son las que a diferencia de otras metodologías moleculares, permiten la aplicación de método de identificación más sensible y además aportan al estudio de la diversidad genética de los microorganismos.

12.Resultados concomitantes capitulos de libro publicados formato digital.



Director General: Dr. Adrián Trueba Espinosa
Editor sponsor: M. en C. C. Juan Carlos Moreno Sánchez
Coordinador editorial: M. en C. C. Juan Carlos Moreno Sánchez
Editora de desarrollo: Dra. Rebeca Teja Gutiérrez
Supervisora de producción: Dra. María Luisa Quintero Soto

Cuerpos Académicos de la DES Oriente en Búsqueda de la Implementación de la Ciencia y la Tecnología 2014
Primera edición

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio, sin la autorización escrita del editor.



Universidad Autónoma del Estado de México.

DERECHOS RESERVADOS © 2015, respecto a la primera edición por
Universidad Autónoma del Estado de México
Instituto Literario #100 Col. Centro
Toluca, Estado de México
C.P.: 50000

Libro electrónico:

ISBN: 978-607-422-595-2
México.

Toda la información vertida en este libro es responsabilidad única y exclusiva de los autores.
Los editores, compiladores, Centros Universitarios y la UAEM no se hace responsable de la información vertida aquí.

CONTENIDO

Prólogo	16
Ciencias Agropecuarias	17
<i>Detección de ROTAVIRUS en conejos domésticos por RT-PCR</i>	18
Virginia G. García ¹ , Linda G. Butista ² , José S. Martínez ³ y Camilo Romero ²	18
Resumen	18
Palabras Clave	18
Abstract	18
Keys words	19
I Introducción	19
II Material y método	23
III Resultados	24
IV Discusión	25
V Conclusiones	25
VI Trabajos futuros	26
VII Referencias	26
VIII Agradecimientos	29
<i>Desarrollo Agrícola sustentable y su resistencia al cambio climático</i>	30
Armando Hernández Hernández ¹ , Erick a Michelle Soria Orozco ²	30
Palabras Clave	30
Introducción:	30
Metodología:	40
Resultados y Discusión:	42
Conclusiones	43
Referencias:	46
<i>Identificación y frecuencia de las Especies de Eimeria presentes en unidades de producción cunícola de la zona sur-oriente del Estado de México</i>	49
Anahí Jiménez Ramos ¹ , Linda Guiliana Bautista Gomez ² , Camilo Romero Núñez ³ , José Simón Martínez Castañeda ⁴	49
Resumen	49
Palabras clave	50
Abstract	50
Keywords	50
I. Introducción	50

IDENTIFICACIÓN Y FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *EIMERIA* PRESENTES EN UNIDADES DE PRODUCCIÓN CUNÍCOLA DE LA ZONA SUR-ORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO

Anahí Jiménez Ramos¹, Linda Guiliانا Bautista Gomez², Camilo Romero Núñez³, José Simón Martínez Castañeda⁴

- 1 ihanazenemij@outlook.com, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca.
- 2 lin_bag@gmail.com, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca.
- 3 cromeron@uaemex.mx, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca.
- 4 josesimonmc@hotmail.com, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Resumen

Esta investigación se realizó de mayo a octubre del 2013, periodo en que se obtuvieron 72 muestras de conejos que presentaron signos entéricos de 1 a 3 meses de edad, de la zona sur-oriente del Estado de México. Las muestras positivas fueron identificadas a través de la técnica de Mc Master con la cual se obtuvo frecuencia de 8,64% y posterior a esto se realizó la extracción de ADN utilizando dos kit's comerciales en los cuales no se observó diferencia en la integridad, se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificar en la región ITS1 con los iniciadores reportados por Oliveira *et al.*, (2011). Fueron seleccionados los fragmentos amplificados que oscilaron entre 400 a 600 pb los cuales fueron purificados y secuenciados, para la identificación de específica y encontramos 5 especies de *Eimeria* que la literatura describe como patógenas donde prevalece una asociación mixta de *E. magna*, *E. stiedae* e *E. perforans*. Además de identificar a las especies presentes se observa que existe diversidad genética en el Estado de México de *E. perforans* e *E. stiedae* a diferencia de las reportadas a nivel mundial.

TÍTULO DE LA OBRA:

INVESTIGACIÓN EN LA CUNICULTURA DE LAS AMÉRICAS

RABBITRY RESEARCH IN THE AMERICAS

© 1ª. Edición, 2015

EDICIÓN PUBLICADA POR:

© Universidad Autónoma del Estado de México, UAEM

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus “El Cerrillo”

© Rama Americana de la Asociación Mundial de Cunicultura, AB- WRSA

American Branch of the World Rabbit Science Association

COMPILADORA Y EDITORA:

Yazmín Elizabeth Felipe Pérez

MVZ., Dra. en C., Departamento de Reproducción Animal,

Laboratorio de Biología de la Reproducción,

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,

Universidad Autónoma del Estado de México

PROPIEDAD DE:

© Universidad Autónoma del Estado de México, UAEM

Instituto Literario 100. Colonia Centro.

Toluca Estado de México. México. C.P. 5000

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción total o parcial de este libro, sin el permiso previo y por escrito del titular del copyright.

ISBN: 978-607-422-594-5

Hecho en México

- 168 **EVALUATION OF ANXIETY OF GROWING RABBITS IN ENRICHED CAGES**
THAIS FMBOZICOVICH, PAMELA A GELIER, SIMONE FERNANDES, EDSON R.
SIQUEIRA, ANA SILVIA A.M.T. MOURA
- 172 **PERFORMANCE OF RABBITS BORN IN NESTS LINED WITH DIFFERENT
MATERIALS**
OLIVEIRA MC, SILVA TR, LIMA SCO, SILVA JA, MESQUITA SA, MACHADO LA,
OLIVEIRA JC, OLIVEIRA ES
- 176 **ANALYSIS OF SEASON EFFECTS ON WEIGHT GAIN ON MEAT RABBITS**
CORDIVIOLA CA, CALONGE FS, TRIGO MS, ARIAS RO, MARTINO P, ANTONINI AG
- 180 **EFFECT OF DIFFERENT MATERIALS FOR BED OF NEST TO PREGNANT DOES
ON THE NEST BUILDING PATTERN**
OLIVEIRA MC, LIMA SCO, SILVA TR, SILVA JA, MESQUITA SA, OLIVEIRA HC,
OLIVEIRA JC, OLIVEIRA ES

GENÉTICA GENETICS

- 186 **PERFORMANCE OF NEW ZEALAND WHITE, CALIFORNIA, CHINCHILLA AND
BLACK AZTEC AT CENTRO NACIONAL DE CUNICULTURA, MEXICO.**
MAGAÑA R. JOSÉ DE JESÚS, GUERRERO C. EMILIA MAGDALENA, ALBERTOS A.
PEDRO J., MENDOZA C. MARIO, MARTÍNEZ Y. ROSARIO, PARADA H. ROCÍO
- 196 **DEVELOPMENT OF MOLECULAR TESTS FOR IDENTIFICATION AND STUDY
OF GENETIC DIVERSITY OF EIMERIA SPP. IN RABBITS FROM THE SOUTH
EAST OF MEXICO STATE**
JÍMENEZ RA, BAUTISTA GL, MARTINEZ CJ, GARCÍA RV,
ROMERO NC, HUITRÓN TG
- 202 **MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETICS ANALYSIS OF
PASTEURELLA SPP. IN RABBITS FROM THE SOUTH EAST OF MEXICO
STATE**
BAUTISTA G.L., GARCÍA R.V., MARTINEZ C.J., ROMERO N.C., JIMENEZ R.A.,
REYNOSO U.E., LOPEZ AUGADO A.G., HUITRON T.G
- 208 **MOLECULAR DIAGNOSTICS OF ROTAVIRUS IN RABBITS, IN THE SOUTH-
EAST OF MEXICO STATE**
REYNOSO UE, GARCÍA RV, MARTINEZ CJ, ROMERO NC,
LOPEZ-AGUADO AG, BAUTISTA GL
- 218 **IDENTIFICATION AND CULTURE OF *Eimeria spp* FROM RABBITS WITH
GASTROENTERIC SIGNS IN SOUTH-EAST OF MEXICO STATE**
TREJO HG, BAUTISTA GL, MARTINEZ CJ, GARCÍA RV, ROMERO NC
- 222 **IDENTIFICATION OF ASTROVIRUS IN RABBITS BY MOLECULAR
DIAGNOSTICS, IN THE SOUTH-EAST OF MEXICO STATE.**
LOPEZ AGUADO. A. G., MARTINEZ C.J., GARCÍA R. V., ROMERO N. C.,
REYNOSO U. E., BAUTISTA G. L

GESTIÓN SOCIAL Y ECONÓMICA MANAGEMENT, SOCIAL & ECONOMICS

- 228 **THE SMALL-SCALE RABBIT PRODUCTION MODEL: A GUIDE TO HUMAN
DEVELOPMENT**
LUKEFAHR SD

DEVELOPMENT OF MOLECULAR TESTS FOR IDENTIFICATION
AND STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF *Eimeria* spp., IN
RABBITS IN THE SOUTH EAST OF MEXICO STATE

^{1*}JIMENEZ RA, ^{1*}BAUTISTA GL, ²MARTINEZ CJ, ¹GARCÍA RV,
³ROMERO NC, ¹HUITRÓN TG

1. Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

2. Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, C.P. 50090, Estado de México, México.

3. Clínica Veterinaria de Animales de Compañía. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

*Corresponding author: lin_bag@yahoo.com.mx; ihazanemij@msn.com

Abstract

Poverty is one of the great challenges to be solved by the State, 47 % of the Mexican population is in some degree of food poverty, capacity or equity, SEDESOL (2008) mentions that more than 86% of the poor are in rural areas. Rabbitry is a livestock activity that has been shown to be important in the last four decades, has established itself as an alternative to solve problems of food and poverty in rural and suburban society. Production of rabbit noted for its easy productive and reproductive management, quality of derivative products and the beneficial characteristics of meat. However, there are significant economic losses in the rabbit production, due to the presence of infectious agents causing a great number of diseases, one of the most important, Coccidiosis are infections caused by obligatory intracellular protozoan parasites belonging to the genus *Eimeria* and considered as major causes of significant morbidity and mortality in rabbits. The eimeriosis has two presentations; hepatic and intestinal infections caused by eleven species of *Eimeria*, of which only *E. stiedae* is causing liver eimeriosis which causes stunted growth and loss of weight, the other species are causing the eimeriosis in the intestinal manifestation, causing mortality even with a low level of infestation.

linda, busca en tu buzón de correo

Buscar en Mail Buscar en la Web

Resultados de búsqueda [ERA] Acuse de recibo de envío

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro <ecosistemasaera@gmail.com>

Para Linda Guiliانا Bautista Gómez

Linda Guiliانا Bautista Gómez:

Gracias por enviar el manuscrito "ASPECTOS MOLECULARES DE EMERIA SPP EN EL CONEJO (Oryctolagus cuniculus)" a Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podía iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial.

URL del manuscrito: http://132.248.10.25/era/index.php/era/author/submission/1153

Nombre de usuario/ra: lin_bag

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro Ecosistemas y Recursos Agropecuarios

Recursos Agropecuarios http://132.248.10.25/era/index.php/era

Jul 7 a las 4:56 P.M.

Gente

SBM®-MTW Grinding Mill. Easier installation, longer life, larger production. MTW mill sale. Contact Us. Shop now.

ASPECTOS MOLECULARES DE *EIMERIA* SPP EN EL CONEJO (*Oryctulagus cuniculus*)

MOLECULAR ASPECTS OF *EIMERIA* SPP IN RABBITS (*Oryctulagus cuniculus*)

Anahí Jiménez-Ramos¹, Linda Guiliana Bautista-Gomez^{1*}, Camilo Romero-Nuñez¹, José Simón
Martínez-Castañeda², Enrique Espinosa Ayala¹

*Autor Correspondiente; lgbautistag@uaemex.com

¹Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Amecameca, Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, CP. 56900, Estado de México, México.

²Universidad Autónoma del Estado de México. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Toluca, C.P. 50090, Estado de México, México.

RESUMEN

El presente artículo de revisión resume conocimientos actuales sobre la identificación de las especies de *Eimeria* que infectan al conejo y las cuales ocasionan una enfermedad de alta importancia por las pérdidas económicas que genera en el sector agropecuario, incluyendo la cunicultura actividad que tiene un alto potencial de desarrollo en el mundo, en México el Sistema Producto Cunicola (SPC) presidido por la SAGARPA ha presentado como una de sus líneas estratégicas: “El diagnóstico de la situación de los problemas sanitarios para emitir recomendaciones

de prevención y profilaxis"; por lo que tipificar el medio ambiente sanitario cunícola del país puede ayudar a tomar acciones correctas que apoyen al desarrollo de una cunicultura rentable, debido a la importancia del tema, en este artículo se dará a conocer los avances recientes sobre la identificación molecular en las diferentes especies de *Eimeria* en conejos. Abordando desde el diagnóstico convencional el cual se establece dependiendo de la morfología que presentan los ooquistes esporulados, y su problemática referente a su imprecisión, debido a las características relativas, superfluas o sobrelapadas que cada especie de *Eimeria* posee, en contraste con el diagnóstico molecular y la caracterización genética, que permiten realizar una identificación específica lo cual ayuda a la prevención, vigilancia y control de la eimeriosis. Los avances biotecnológicos son considerados hoy en día como una alternativa altamente específica, dirigida hacia la mejora y control de esta importante enfermedad.

Palabras clave: *Eimeria*, *Oryctolagus cuniculus*, diagnóstico molecular, México

ABSTRACT

This review summarizes current knowledge on the identification of species of *Eimeria* that infect rabbit and which cause a disease of high importance for economic losses generated in the agricultural sector, including rabbitry, activity that has a high development potential in the world, in Mexico, the Cunicola Product System (SPC), chaired by SAGARPA has presented as one of its strategic lines: "the diagnosis of the situation of health problems issuing recommendations for prevention and prophylaxis"; so typify the sanitary environment cunícola of the country can help take correct actions to support the development of a rabbitry profitable, due to the importance of the topic, this article will be released recent advances on molecular identification of the different *Eimeria* species in rabbits. Addressing from the conventional diagnosis which is established depending on the

morphology presented in sporulated oocysts, and the problems concerning that this imprecision due to the superfluous characteristics or overlapping from each *Eimeria* species has, in contrast to the molecular diagnostic and genetic characterization, which allow specific identification which helps prevention, surveillance and control of eimeriosis. Biotechnological advances are considered today as a highly specific alternative directed towards the improvement and control of this important disease.

Key words: *Eimeria*, *Oryctolagus cuniculus*, molecular diagnosis, México.

INTRODUCCIÓN

La eimeriosis es una enfermedad parasitaria altamente contagiosa que resulta en importantes pérdidas económicas para el sector cunícola (Varga 1982, Jing et al. 2012). Durante la última década México, ha impulsado de manera importante la actividad cunícola, debido al fácil manejo de la especie y la recuperación de la inversión en corto tiempo, gracias a la fertilidad y fecundidad de la misma; además presenta una fuente de proteína de alta calidad y fácil digestión, con un precio 20% menor que el de la carne de bovino, motivo por el cual se contribuye a abatir la pobreza alimentaria, generar empleos y disminuir los índices de pobreza, sobre todo en zonas rurales (SAGARPA 2015). Sin embargo este sector se ve afectado por el alto índice de mortalidad en las granjas cunícolas, con rangos que van del 20 al 30 % a nivel de granja, motivo por el cual la SAGARPA preside el Sistema Producto Cunícola (SPC) teniendo como líneas estratégicas: “El diagnóstico de la situación de los problemas sanitarios para emitir recomendaciones de prevención y profilaxis”, y el proyecto de “solicitar a instituciones educativas de investigación, gubernamentales y no gubernamentales

estudios e investigación sobre control de enfermedades”; por lo que tipificar el medio ambiente sanitario cunícola del país puede ayudar a tomar acciones correctas que apoyen al desarrollo de una cunicultura rentable (SAGARPA 2012).

El diagnóstico de la eimeriosis se realiza convencionalmente por medio de identificación microscópica y consiste básicamente en observar las características de los ooquistes de *Eimeria* esporulados, es un método económico, que requiere de una semana de esporulación mínima, además es complicado por la similitud morfológica que cada una de las especies presenta, lo que resulta en una técnica poco fiable y confusa cuando existe asociación mixta (Blake et al. 2008, Kawahara et al. 2010). Para afrontar estos inconvenientes se han desarrollado herramientas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), las cuales han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico y caracterización de *Eimeria* (Cere et al. 1996, Kvicerová et al. 2008, Oliveira et al. 2011, Yan et al. 2013).

EIMERIA

Es un protozooario intracelular obligado del género *Eimeria* (Pakandl and Hlásková, 2007, Kumar et al. 2014,). El cual se encuentra clasificado dentro del *phylum Apicomplexa* quien destaca por su diversidad y tamaño en la actualidad existen más de 300 géneros reconocidos de *Apicomplexa*, los cuales se distribuyen en por lo menos 60 familias (Perkins et al. 2000) y 1 800 especies de *Eimeria* (Sapleta et al. 2003). Se encuentran en amplia variedad en animales salvajes y domésticos (Zhao et al. 2001, Heitlinger et al. 2014).

El ciclo de vida

Las eimerias son parásitos monoxenos, cuyo ciclo comienza cuando los animales ingieren los ooquistes esporulados en el medio ambiente los cuales pueden encontrarse en las heces, alimento y agua contaminada, éstos pasan por el tracto intestinal donde desenquistan dentro de la luz intestinal, este proceso es ayudado por la tripsina, la bilis, y CO₂ (Gordon y Jordan 1982, Allen y Fetterer 2002). Los esporozoitos liberados penetran en las células epiteliales de las vellosidades donde crecen y se transforman en trofozoitos o merozoitos, produciéndose en su interior los esquizontes (McDougald 2003). Los esquizontes experimentan de dos a cuatro generaciones de reproducción asexual; estas fases de replicación dan como resultado el daño celular en el epitelio, particularmente las etapas posteriores de esquizontes que se forman en la lámina propia (Long 1993; Lindsay y Todd 1993). Después de al menos dos generaciones de reproducción asexual intracelular y haber agotado las posibilidades, los esquizontes evolucionan pasando a una fase sexuada denominada gametogonia donde se realiza una diferenciación celular de gametos masculinos llamados microgametos (móviles) que fecundan a los macrogametos femenino (inmóvil) en el exterior de la célula, se fusionan y luego se produce un cigoto, este madura y se convierte en un ooquiste que se excreta posteriormente en las heces. Con las condiciones ambientales correctas temperatura, humedad y oxigenación los ooquistes esporulan para ser infectivos (Morris y Gasser 2009).

El ciclo completo de las eimerias es aproximadamente de 4-6 días, dependiendo de la especie. Este ciclo de vida es muy corto, y combinado con el potencial o la capacidad reproductiva masiva de las especies durante la fase intracelular, hace de este grupo un problema en las condiciones de producción intensiva ocasionando pérdidas económicas superiores a los \$3 000 000.00 de dólares

anuales a nivel mundial, a pesar de esto, los mecanismos bioquímicos y genéticos que controlan el desarrollo dentro de las células del huésped aún se desconocen (Chapman 2008).

EIMERIOSIS

Las especies de *Eimeria* producen una enfermedad conocida como eimeriosis, la cual es originada por múltiples especies de este parásito, se describe en dos presentaciones; clínica y subclínica (Ogedenbe et al. 2014). Es considerada una enfermedad económicamente importante en todo el mundo, debido a que compromete la producción y el bienestar animal, resultando en bajas tasas de conversión, retraso en el crecimiento, alta morbilidad y mortalidad de los animales infectados (Kumar et al. 2014). Provoca lesiones en las células del intestino, lo que se traduce en desnutrición, enteritis, diarrea y hematoquecia, en muchos casos la muerte es muy común (Vrba y Pakandl 2014). Existen varias especies patógenas de *Eimeria* que infectan a una gran cantidad de animales de granja, como pollos, vacas, ovejas, conejos y recientemente también se describen nuevas especies en currucas (Pereira et al. 2014), murciélagos (McAllister et al. 2014) y serpientes (Kamir et al. 2014). Las especies de *Eimeria* son altamente específicas de hospedero, se piensa que existen pocas posibilidades de que los humanos u otros animales, que se mantienen junto con los animales infectados se infecten, aunque aún no se descarta por completo la transmisión a otros animales (Jeong et al. 2012).

Eimeriosis en el conejo

En el conejo se han descrito hasta 15 especies de *Eimeria* que infectan al conejo, sin embargo solo 11 se han validado (Tabla 1) (Pakandl 2009) debido al grado de virulencia se clasifican de la siguiente manera; poco virulentos (*E. coeciola*), ligeramente virulentos (*E. perforans*, *E. exigua* y *E. vej dovskiyi*) moderadamente virulentos (*E. media*, *E. magna*, *E. irresidua*, *E. piriformis*) y muy virulentos (*E. intestinalis*, *E. flavescens* y *E. stiedae*) (Coudert et al. 1995, Bhat et al. 1996). Además de la patogenicidad es importante mencionar que un solo ooquiste esporulado de las especies de *Eimeria* podría infectar con éxito a un conejo, lo que demuestra no sólo la alta especificidad del huésped, sino también un muy alto potencial las especies de *Eimeria* para infectar (Ming-Hsien et al. 2010, Jithendran 2010).

Las eimerias se encuentran regularmente en todas las granjas de conejos, independientemente del manejo y las condiciones sanitarias practicadas por los criadores, además de que la infección es de forma mixta (Almeida et al. 2006, Al-Mathal 2008, Razavi et al. 2010, El-Shahawi et al. 2011). Los conejos jóvenes son más susceptibles a la infección, presentándose especialmente en edades de dos a seis meses, una vez recuperados estos adquieren inmunidad a la enfermedad pero son considerados portadores sin signología aparente (Gres et al. 2003).

La identificación y caracterización genética de las diferentes especies y género de *Eimeria* son centrales para la prevención, vigilancia y control de la eimeriosis. Esto es particularmente importante con respecto a la aparición de una amplia resistencia de las especies *Eimeria* a los coccidiostatos y a los problemas asociados con residuos de medicamentos (Hamidinejat et al. 2013).

De las 11 especies que infectan al conejo solo *E. stiedae* es causante de la eimeriosis hepática, la cual provoca retrasos en el crecimiento y pérdidas de peso, las otras especies son causantes de la

eimeriosis en su manifestación intestinal, causando mortalidad, incluso con un grado de infección bajo (Cam et al. 2008).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA EIMERIOSIS

En la actualidad existen diferentes métodos de diagnóstico para la eimeriosis generalmente los más utilizados o convencionales son los métodos basados principalmente en las características morfológicas, ciclo de vida, signos clínicos y lesiones a la necropsia (Long y Joy 1984). Aunque también existen técnicas moleculares que permiten una identificación precisa de *Eimeria*, favoreciendo el estudio de la variabilidad genética y evolución a partir de un solo ooquiste (Schnitzler et al. 1998, Fernández et al. 2003). El uso de estas técnica ha permitido el diagnóstico rápido y eficaz de especies de *Eimeria* en otras especies (Lien et al. 2007).

Identificación convencional de las especies de *Eimeria* en el conejo

La identificación de las especies de *Eimeria* se realiza a través de la descripción morfológica de los ooquistes, el tiempo de esporulación y la localización de las lesiones en el intestino (Levine 1962, Cére et al. 1996).

Los ooquistes de las diferentes especies de *Eimeria* presentan diferencias de tamaño (área, de diámetro), contorno (elíptica, ovoide, circular), estructura interna, grosor y color de la pared de ooquistes, entre otras variaciones morfológicas (Joyner 1982) (Figura 1.) Sin embargo, la discriminación correcta de las especies mediante inspección visual está severamente restringida por las diferencias morfológicas ligeras que existen entre las distintas especies y la superposición de

características en infecciones mixtas, además el tiempo mínimo para su esporulación es mínimo de una semana (Long y Joyner 1984, Su et al. 2003, Wang et al. 2014). Para resolver dichas limitaciones durante los últimos años, se han producido avances significativos en el desarrollo de herramientas de diagnóstico con el cual ha surgido un nuevo método de identificación morfológica de tendencia informática el cual es ofrecido a través de un software gratuito y disponible en línea conocido como COCCIMORPH, el cual fue diseñado originalmente para la identificación de ooquistes de *Eimeria* en aves de granja y posteriormente en conejos, permite la identificación de los ooquistes, mediante el uso de microfotografías, realiza mediciones con algoritmos de onda de las longitudes estandarizadas al tamaño de las diferentes estructuras morfológicas de las especies de *Eimeria* (Castañón et al. 2007, Thenmozhi et al. 2014). Además del reciente desarrollo de varios ensayos de técnicas moleculares basados en marcadores moleculares, dirigidos a diferentes regiones del genoma de *Eimeria*, principalmente a la región ITS1 e ITS2 los cuales se mencionan más adelante.

Identificación molecular de las *Eimeria* en el conejo

Para realizar la identificación molecular de las especies de *Eimeria* con la técnica de PCR, se ha utilizado el Espacio Transcrito Interno ribosomal 1 y 2, conservados en las células eucariontas. El rRNA contiene la Secuencia Transcrita Externa (ETS 5', 18, ITS1, 5.8S, ITS2, 26S, 3'ETS). Las regiones ITS son ampliamente utilizadas para clasificar la taxonomía y filogenia molecular, esto porque permiten amplificar pequeñas cantidades de ADN y tienen alto grado de variación entre especies estrechamente relacionadas (Schnitzler et al. 1999, Samarasingue et al. 2008).

Los primeros reportes de identificación molecular de eimerias fueron realizados en pollos, donde se describe el uso de los ITS1 e ITS2 (Schnitzler et al. 1999, Woods et al. 2000, Gasser et al. 2001). Se describe también el uso de PCR en tiempo real y PCR múltiple, técnicas que permiten la identificación y al mismo tiempo la cuantificación de las diferentes especies de *Eimeria* en una sola muestra (Morgan et al. 2009, Myung-Jo 2014).

Kvícerova et al. (2008) realizaron un estudio filogenético donde a través de la obtención de la secuencia parcial del fragmento 18S rDNA de las 11 especies de eimerias que infectan a los conejos, determinó que existe monofilia en ellas. Este hallazgo es importante porque indica que estas especies estrechamente relacionadas se han diversificado en un solo hospedero, y se dividen en dos linajes hermanos, los cuales corresponden a la presencia y ausencia del residuo del ooquiste. En esta investigación los autores mencionan que la relación filogenética de los diversos rasgos biológicos de las eimerias puede proporcionar información importante para la comprensión de la historia de la evolución, que sirva como marcadores adecuados para fines de diagnóstico y/o taxonómico.

Oliveira et al. (2011) diseñaron 12 iniciadores para la detección y discriminación de las 11 especies de *Eimeria* descritas por Coudert (1989), basándose en secuencias ITS1 de ADNr, (Tabla 2). Estos iniciadores contienen un nivel relativamente alto de contenidos A + T, el cual es superior a 55%, por ello ofrece alta especificidad y sensibilidad, detectando de 500 fg a 1 pg de ADN o bien 0.8 a 1.7 ooquistes.

En el año 2013, Yan et al., reportaron seis secuencias completas de la región ITS1-5.8S -ITS2 del rRNA de *E. stiedae*, *E. intestinalis*, *E. flavescens*, *E. magna* y *E. irresidua*, utilizando iniciadores universales del género *Eimeria*.

Mohamed et al. (2012) desarrollaron una PCR cuantitativa en tiempo real, esta detecto 45 y 36 genes, de *E. coecicola* en el día 7 pos- infección. El incremento más dramático revelo citoquina pleiotrópica e interleucina 6 anti-inflamatoria (IL-6) 50 veces, mientras que la mayor disminución fue de aproximadamente 13 veces donde se detectó que para mRNAs codifican la PAD, SULT3A1, CRP y glutamato S-transferasa. Además también, se encontró la regulación de los genes que codifican regiones de anticuerpos. Los resultados obtenidos arrojaron que la IL-6 juega un papel central en la infección de conejos por *E. coecicola* especie que se encuentra presuntamente implicada en lesiones tanto intestinales como hepáticas.

Yan et al. (2013) al estudiar las secuencias completas de la región ITS1-5.8S ITS2 rRNA de seis especies de *Eimeria* en conejos; *E. stiedae*, *E. intestinalis*, *E. flavescens*, *E. media*, *E. magna* y *E. irresidua*, utilizando los iniciadores reportados por Oliveira et al., (2011) revelo que ambas secuencias ITS1 e ITS2 fueron específicas para cada una de las especies de *Eimeria* en conejos. Posteriormente desarrollaron un ensayo de PCR múltiple, específico y sensible para el diagnóstico basado en sitios polimórficos de ITS1 e ITS2, donde identificaron a tres especies altamente patógenas de los conejos, *E. stiedae*, *E. intestinalis*, y *E. flavescens*. Esta prueba, es una poderosa herramienta para la diferenciación clínica de alta patogenicidad de las especies *Eimeria* en conejos y el estudio de la genética de poblaciones de coccidios en el conejo.

Shi et al. (2014) realizaron un estudio con aislados de *Eimeria intestinalis* de conejo en China, identificando por primera vez la amplificación de la subunidad 18S de los genes de ARN ribosomal. El tamaño del fragmento amplificado fue 1521 pb, el cual comparte 99% de secuencia con las *E. intestinalis* aisladas de Francia y la República Checa.

Ogedengbe et al. (2014) reportan por primera vez la secuencia completa del ADN mitocondrial (ADNmt) de *Eimeria magna* en conejos y compararon el contenido genético y las organizaciones del genoma con siete especies de *Eimeria* en pollos domésticos. El tamaño de la secuencia completa del genoma de *E. magna* es 6249 pb, y consta de 3 genes codificantes de proteínas (cyt b, cox 1 y cox 3), más 12 fragmentos de genes de la subunidad grande (LSU) rRNA, y 7 fragmentos de gen para la subunidad pequeña (SSU) rRNA, sin genes de RNA de transferencia, coincidiendo con las secuencias de *Eimeria* spp en pollos. El contenido de A + T es de 65,16% para el genoma mitocondrial de *E. magna* (29.73% A, 35.43% T, 17.09 G y 17.75% de C). Esta secuencia proporciona nuevos marcadores de ADNmt para el estudio de la epidemiología y la genética molecular de *Eimeria* spp por lo tanto tiene implicaciones en el diagnóstico molecular de la eimeriosis en el conejo.

CONCLUSIÓN

El avance en el estudio del genoma y el desarrollo de técnicas moleculares para el estudio de diversas especies incluidos los protozoarios del género *Eimeria*, ha permitido la identificación de marcadores moleculares que favorezcan la realización de un diagnóstico certero, para el estudio del ciclo biológico, epidemiología, análisis del genoma y evolución de estas especies.

LITERATURA CITADA

1. Allen P and Fetterer R (2002) Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry. *Clinical Microbiology* 15: 58–65.
2. Almeida A J, Mayen FL and Oliveira FC (2006) Espécies do gênero *Eimeria* observadas em fezes de coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) criados no uncipio de campos dos goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brazil. *Brasileña. Parasitology Veterinary* 5:163-166.
3. Al-Mathal E (2008) Hepatic Coccidiosis of the Domestic Rabbit *Oryctolagus cuniculus domesticus* L. in Saudi Arabia. *World Journal of Zoology* 3: 30-35.
4. Bath TK, Jithendram KP, Kurade NP (1996) Rabbit coccidiosis and its control: a review. *World Rabbit Science* 4: 37-41.
5. Blake DP, Qin Z, Cai J, Smith AL (2008) Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. *Avian Pathology* 37:89–94.
6. Çam Y, Atasever A, Eraslan G, Kibar M, Atalay Ö, Beyaz L, İnci A, Liman BC (2008) *Eimeria stiedae*: Experimental infection in rabbits and the effect of treatment with toltrazuril and ivermectin. *Experimental Parasitology* 119:164-172.
7. Castañón A, Fraga S, Fernandez S, Gruber A, Cost L (2007) Biological characterization shape for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence* 40: 1899-1910.
8. Cere N, Humbert JF, Licois D, Corvione M, Afanassieff M, Chanteloup N (1996) A New Approach for the Identification and the Diagnosis of *Eimeria media* Parasite of the Rabbit. *Experimental Parasitology* 82:132-138.

9. Coudert P, Licois D Drouet-Viard F (1995) *Eimeria* and Isospora. *Eimeria* species and strains of rabbits. In Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P (Ed). Biotechnology. Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research. Office for official publications of the European communities. Luxembourg. 52-73.
10. Chapman H (2008) Coccidiosis in the turkey. *Avian Pathology* 37: 205–223.
11. Cheissin EM (1947) New species of rabbit intestinal coccidium. *Dokl. AN SSSR* 55: 181–183. (In Russian.)
12. Cheissin EM (1948) Development of two rabbit intestinal coccidia *Eimeria piriformis* and *E. intestinalis* nom. Nov. *Uch. Zap. Karelo-Finsk. Univ.* III, 3: 179–187. (In Russian.)
13. Danforth HD, Hammond DM (1972) Merogony in multinucleate merozoites of *Eimeria magna* Pérard, 1925. *Journal Protozoology* 19: 454–457.
14. El-Shahawi GA, El-Fayomi HM, Abdel-Haleem HM (2011) Coccidiosis of domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Egypt: light microscopic study. *Parasitology Research* 110:251–258.
15. Fernández S, Pagotto AH, Furtado MM, Katsuyama AM, Madeira AMBD, Gruber A (2003) A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology Research* 127: 317–325.
16. Gasser RB, Woods WG, Wood JM, Ashdown L, Richards G, Whithear KG (2001) Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. *Electrophoresis* 22:3546–3550.
17. Grès V, Voza T, Chabaud A, Landau (2010) Coccidiosis of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in France. *Parasite* 10: 51-7.
18. Gordon RF and Jordan FTW (1982) Coccidiosis, in: *Poultry Diseases* 2nd .Ed:26-244.

19. Hamidinejat H, Seifiabad MR, Mayahi M, Borujeni MP (2010) Characterization of *Eimeria* Species in Commercial Broilers by PCR Based on ITS1 Regions. Iran Journal Parasitology 5:48-54.
20. Heitlinger E, Spork S, Lucius R and Dieterich C (2014) The genome of *Eimeria falciformis* reduction and specialization in single host *apicomplexa* parasite. Central Genomics 15:696-730.
21. Jeong J (2012). Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp. and *Eimeria* spp. in Healthy and Diarrheic Pet Rabbits. Journal of Veterinary Medical Science 74: 263-265.
22. Jelínková A, Licois D, Pakandl M (2008) The endogenous development of the rabbit coccidium *Eimeria exigua* Yakimoff, 1934. Veterinary Parasitology 156: 168–172.
23. Jing F, Yin G, Liu X, Suo X, Qin Y (2012) Large-scale survey of the prevalence of *Eimeria* infections in domestic rabbits in China. Parasitology Research 110:1495–1500.
24. Jithendran KP (2010) Coccidiosis In rabbits: A guide for the differential diagnosis of *Eimerias* species. Indian Veterinary Research 176:36-39.
25. Joyner LP (1982) Host and site specificity. In The biology of the coccidia. Ed. Long Baltimore MD: University Park Press. 35-62.
26. Kamir MR, Yu F, Li J, Li J, Zhang L, Wang R, Rume FI, Jian F, Zhang S, Ning C (2014) First molecular characterization of enteric protozoa and the human pathogenic microsporidian *enterocytozoon bienersi* in captive snakes in China. Parasitology Research 113:3041-304.
27. Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, (2010) Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. Veterinary Parasitology 174:49–57.

28. Kumar S, Garg R, Mofteh A, Clark EL, S E Macdonald, Chaudhry C, Sparagano O, Banerjee PS, Kundu K, Tomley FM, Blake DP (2014) An optimised protocol for molecular identification of *Eimeria* from chickens. *Veterinary Parasitology* 199:24-31.
29. Kvičerová J, Pakandl M and Hypša V (2008) Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135:443–452.
30. Levine ND (1962) Protozoology Today. *Journal of Protozoology*. 9: 1-6.
31. Lien YY, Sheu SC, Liu HJ, Chen SC, Tsai MY, Luo SC, Wu KC, Liu SS, Su HY (2007) Cloning and nucleotide sequencing of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA for three species of *Eimeria* from chickens in Taiwan. *The Veterinary Journal* 173:186–191.
32. Lindsay DS and Todd KS. (1993) Coccidia of mammals. In *Parasitic protozoa*. Academic Press, Inc., New York. Vol. 4. pp: 89-131.
33. Long PL (1993) Avian Coccidiosis. In: Kreier, J. P. (ed.), *Parasitic Protozoa* 2nd ed. Academic Press., New York, New York. 4: 1-88.
34. Long PL and Joyner P (1984) Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 31; 535-541.
35. Ming-Hsien L, Hai-I H and Hong-Kean O (2010) Prevalence, infectivity and oocyst sporulation time of rabbit-coccidia in Taiwan. *Tropical Biomedicine* 27:424–429.
36. Mohamed AD, Abdel-Maksoud MA, Al-Quraishy S, Abdel-Azeem Abdel-Baki S, Wunderlich F (2012) Gene expression in rabbit appendices infected with *Eimeria coecicola*. *Veterinary Parasitology* 186:222-228.

37. Morris GM, and Gasser RB (2009) Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. *Biotechnological Advances* 24:590–603.
38. Morgan JA, Morris GM, Wlodek BM, Byrnes R, Jenner M, Constantinoiu CC, Anderson GR, Lew-Tabor AE, Molloy JB, Gasser RB, Jorgensen WK (2009) Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. *Molecular and Cellular Probes* 23:83-89.
39. McAllister CT, Seville RS, Arlen R and Connior MB (2014) A new of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from tri-colored bats, *Perimyotis subflavus* (Chiroptera: Vespertilionidae), from the Ouachitas of Arkansas. *Acta Parasitologica* 59:690-693.
40. McDougald (2003) Protozoal infections. Editors. *Diseases of Poultry*. 11th edition. Iowa State University Press 1:973-1023.
41. Myung-Jo Y (2014) Detection of your important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. *Parasitology International* 63:527-532.
42. Norton CC, Catchpole J, Joyner LP (1979) Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology* 79: 231–248.
43. Oliveira UC, Fraga JS, Licois D, Pakandl M, Gruber A (2011) Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Parasitology* 176:275-280.
44. Ogedengbe ME, El-Sherry S, Ballena J and Barta JR (2014) Complete mitochondrial genome sequences from five *Eimeria* species (Apicomplexa; Eimeriidae) infecting domestic Turkeys. *Parasites and Vectors* 7:335-346.

45. Pakandl M (2009) Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitologica* 56:153-166.
46. Pakandl M (1988) Description of *Eimeria vej dovskyi* sp. n. and redescription of *Eimeria media* Kessel, 1929. *Folia Parasitologica* 35: 1–9.
47. Pakandl M, Hlášková L (2007) The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. *Parasitology Research* 101: 1435-1437.
48. Pereira BB, Medina JP, Salgado-Miranda C, García-Conejo M, Janczur M K, Gomes CW, Soriano-Vargas (2014) *E. Isospora celata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the orange-crowned warbler *Oreothlypis celata* (Say) (Passeriformes: Parulidae) in Mexico. *Systematic Parasitology* 89:253–257.
49. Perkins F (2000) Class Perkinsasida. In *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Society of Protozoologists 1:200–202.
50. Pellérdy LP, Dürr U (1970) Zum endogenen Entwicklungszyklus von *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865) Kisskalt, Hartman 1907. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 20: 227–244.
51. Razaví SM, Oryan A, Rakhshandehroo E, Moshiri A and Mootabi A (2010) *Eimeria* species in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Fars province, Iran. *Tropical Biomedicine* 27:470–475.
52. SAGARPA (2012) SPC. Comité Nacional Sistema Producto Cunícola. En Informe de Rendición de Cuentas de la Administración Pública Federal 2006 – 2012. Comités Sistema Producto. Memoria Documental. <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>. Consultado 13 de mayo de 2016.
53. SAGARPA (2015) SAGARPA impulsa la cunicultura como alternativa alimentaria y generadora de empleos en el campo. León, Gto. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B026.aspx> consultado 4 de abril 2016.

54. Streun A, Coudert P, Rossi GL (1979) Characterization of *Eimeria* species. II. Sequential morphologic study of the endogenous cycle of *Eimeria perforans* (Leuckart, 1879; Sluiter and Swellengrebel, 1912) in experimentally infected rabbits. *Z. Parasitenkd.* 60: 37–53.
55. Shi T, Bao G, Fu Y, Suo X, Hao L (2014) A low-virulence *Eimeria intestinalis* isolate from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in China: molecular identification, pathogenicity, and immunogenicity. *Parasitology Research* 113:1085-1090.
56. Schnitzler BE, Thebo P, Mattson JG, Tomley F, and Shirley MW (1998) Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathology* 27:490–497.
57. Schnitzler BE, Thebo P, Tomley F, Uggl A, Shirley MW (1999) PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathology* 28:89–93.
58. Shirley MW. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitol.* 1975;71:369–376.
59. Su-Fang F, Si-Qin T, Ping C, Guo-Hua L, Chun-Ren W, and Quan-Zhu X (2014) The complete mitochondrial genome sequence of *Eimeria magna* (Apicomplexa: Coccidia). *Parasites and Vectors* 7:335-351.
60. Slapeta JR, Modrý D, Ashe J, Koudela B (2003) Description of *Eimeria arabukosokokensis* spp (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Telescopus semiannulatus* (Serpentes: Colubridae) with notes on *Eimerian* coccidia from snakes of Eastern Kenya. *Folia Parasitology* 50:23-30.
61. Thenmozhi V, Veerakumari L and Raman M (2014) Preliminary Genetic Diversity Study on Different Isolates of *Eimeria tenella* from South India. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology* 3:114-118.
62. Varga I (1982) Large-scale management systems and parasite populations: coccidia in rabbits. *Veterinary Parasitology* 11:69–84.

63. Vrba V, Pakandl M (2014) Coccidia of turkey: from isolation, characterisation and comparison to molecular phylogeny and molecular diagnostics. *International Journal for Parasitology* 44:985-1000.
64. Wang Y, Tao G, Cui Y, Lv Q, Xie L, Li Y, Suo X, Qin Y, Xiao L, Liu X (2014) Molecular analysis of single oocyst of *Eimeria* by whole genome amplification (WGA) based nested PCR. *Experimental Parasitology* 144:96-99.
65. Woods WG, Richards G, Whithear KG, Anderson GR, Jorgenses WK, Gasser RB (2000) High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation. *Electrophoresis* 21:3558–3563.
66. Yan W, Wang W, Wang T, Suo X, Qian W, Wang S, Fan D (2013) Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments. *Veterinary Parasitology* 193:284-288.
67. Zhao X, Duszynski D W, Loker E S (2001) A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. *Journal of Microbiological Methods* 44:131-137.

Tabla 1. Especies de *Eimeria* que infectan al conejo.

Especie	Reportada por;
<i>E. coecicola</i>	Cheissin, 1947.
<i>E. exigua</i>	Yakimoff, 1934.
<i>E. flavescens</i>	Morotel and Guilhon, 1941
<i>E. intestinalis</i>	Cheissin, 1948.
<i>E. irresidua</i>	Kessel and Jankiewicz, 1931

<i>E. magna</i>	Pérard, 1925.
<i>E. media</i>	Kessel, 1929.
<i>E. perforans</i>	(Leuckart, 1879) Sluiter and Swellengrebel, 1912.
<i>E. piriformis</i>	Kotlán and Pospesch, 1934.
<i>E. vej dovskyi</i>	Pakandl, 1988.
<i>E. stiedae</i>	(Lindemann, 1865) Kisskalt and Harmann, 1907.

Tabla 2. Iniciadores usados para la amplificación de ITS1 de cada una de las 11 especies *Eimeria* spp que infectan al conejo doméstico (Oliveira et al. 2011).

Especie	Iniciador Nombre	Secuencia
<i>Eimeria</i> spp	ITS1-F	GGGAAGTTGCGTAAATAGA
	ITS1-R	CTGCGTCCTTCATCGAT
<i>E. coecicola</i>	Ecoe-ITS1-F	AGCTTGGTGGGTTCTTATTATTGTAC
	Ecoe-ITS1-R	CTAGTTGCTTCAACAAATCCATATCA

<i>E. exigua</i>	Eexi-ITS1-F	GAATAAGTTCTGCCTAAAGAGAGCC
	Eexi-ITS1-R	TATATAGACCATCCCCAACCCAC
<i>E. flavescens</i>	Efla-ITS1-F	GAATATTGTTGCAGTTTACCACCAA
	Efla-ITS1-R	CCTCAACAACCGTTCTTCATAATC
<i>E. intestinalis</i>	Eint-ITS1-F	TGTTTGTACCACCGAGGGAATA
	Eint-ITS1-R	AACATTAAGCTACCCTCCTCATCC
<i>E. irresidua</i>	Eirr-ITS1-F	TTTGGTGGGAAAAGATGATTCTAC
	Eint-ITS1-R	TTTGCATTATTTTAAACCCATTCA
<i>E. magna</i>	Emag-ITS1-F	TTTACTTATCACCGAGGGTTGATC
	Emag-ITS1-R	GGAGAAAGGTAAAGCTTACCACC
<i>E. media</i>	Emed-ITS1-F	GATTTTTTCCACTGCGTCC
	Emed-ITS1-R	TTCATAACAGAAAAGGTAAAAAAGC
<i>E. perforans</i>	Eper-ITS1-F	TTTTATTTCAATCCCATTTGCATCC
	Eper-ITS1-R	CTTTTCATAACAGAAAAGGTCAAGCTTC
<i>E. piriformis</i>	Epir-ITS1-F	ACGAATACATCCCTCTGCCTTAC
	Epir-ITS1-R	ATTGTCTCCCCCTGCACAAC
<i>E. stiedae</i>	Esti-ITS1-F	GTGGGTTTTCTGTGCCCTC
	Esti-ITS1-R	AAGGCTGCTGCTTTGCTTC
<i>E. vej dovskyi</i>	Evej-ITS1-F	GTGCTGCCACAAAAGTCACC
	Evej-ITS1-R	GCTACAATTCATTCCGCC

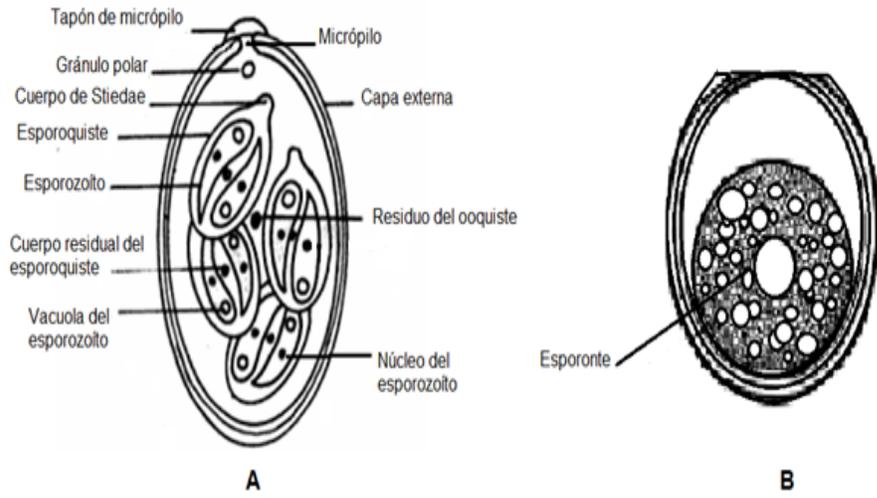


Figura 1. Morfología de un ooquiste de *Eimeria*. A) Esporulado B) Sin esporular.

13. REFERENCIAS

- Al-Mathal E. (2008). Hepatic coccidiosis of the domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus domesticus* L. in Saudi Arabia. World Journal of Zoology vol. 3, p. 30-35.
- Al-Rukibat R., Irizarry A., Lacey J., Kazacos K., Storandt S., DeNicola D. (2001). Impression Smear of Liver Tissue from a Rabbit. Veterinary Clinical Pathology vol. 30, p. 57-61.
- Aoutil N., Bertani S., Bordes F., Snounou G., Chabaud A. and Landau I. (2005). *Eimeria* (Coccidia: *Eimeridae*) of hares in France: Description of New Taxic Parasite. Parasite journal vol. 12, p.131-144.
- Baldwin B., Sanderson M., Porter J., Wojciechowski M., Campbell C and Donoghue M., (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden vol. 82, p. 247-277.
- Bayer R., Hufford L. y Soltis D. (1996) Phylogenetic relationships in Sarraceniaceae based on rbc L and ITS sequences. Systematic Botany vol.21, p. 121-143.
- Baker F., Olsen L. and Stam J. (1995) Evolution of nuclear r DNA ITS sequences in the *Cladophora albida* sericea clade (Chlorophyta). Journal of Molecular Evolution vol.40 p. 640-651.
- Bennet P. (2003) DNA sequencing and the human genome Project. Molecular Biology In Cellular Pathology. John Wiley & Sons, Ltd p. 308-328.
- Băcescu B. y Petruț T. (2012). Comments on histopathological changes in rabbit liver whit eimeriosis. Veterinary Medicine vol. 58, p.1222-5304.
- Buller M. (1993) Enzymes of Molecular Biology Humana Press Inc. Totowa. New Jersey, United States of America. 372 p.

- Brown B., Ruiz M., Coronado C. y Castillo C. (2010). Incidence of *Eimeria* spp in healthy weaning Rabbits in a farm of Trujillo state, Venezuela. *Academia* vol. 9, p. 20-29.
- Brower A. (1999) Delimitation of phylogenetic species whit DNA sequences: A critique od Davis and Nixon´s Population Agregation Analysis. *Sistematic Biology* vol. 48, p. 199-213.
- Beaumont M. and Balding D. (2004). Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* vol. 13, p. 969–80.
- Black W., Baer C., Antolin M. and DuTeau N. (2001). Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. *Annual Review of Entomology*, vol. 46, p. 441–469.
- Bruford M., Bradley D., and Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* vol.4, p. 900–910.
- Campell C., Baldwin B. Y Donoghue M. (1993) A phylogeny of Maloide (Rosaceae) from sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal Botany* vol. 80, p. 135.
- Carvalho J. (1942). *Eimeria* neoleporis occurring naturally in the cottontail and transmissible to the tame rabbit. *Journal Science* vol.1, p. 409-410.
- Cracraft J. (1983) Species concepts and speciation analysis. *Ornithology* vol 1, p. 159-187.
- Cracraft J. (1989) Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. En Otte, D y Eller J.A. Compiladores. *Speciation and its Consequences*. Library of Congress Massachusetts, p.28-59.
- Céré N., Licois D., Humbert J (1995) Study of the inter- and intraspecific variation of *Eimeria* spp. from the rabbit using random amplified polymorphic DNA. *Parasitology Research* vol.81, p.324-328.

- Cifuentes L. (1996) Fundamentos de identificación genética. En: *Identificación genética y pruebas de paternidad*, L. Cifuentes (ed.) Editorial Universitaria. Santiago de Chile.
- Chen S., Su Y., Wu S., Sha T. and Zhang Y. (2005). Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. *Molecular Phylogenetics and Evolution* vol. 37, p.804–814.
- Conchouso Paz Ma. Del P., (2011). Alternativa para comercialización de carne de conejo. *BUAP* vol.1, p. 40-46.
- Chowdhury, A., Fraser, G. (2008). Coccidia of domestic rabbits in New South Wales, *Australian Veterinary Journal* vol. 86, p. 365-366.
- Comité Sistema Producto Cunícola del Distrito Federal, Plan Rector, (2012). Disponible en línea; http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/EPT%20COMITE%20SISTEMA%20OPRODUCTO%20CUNICOLA%20DF/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CUNICOLA_DF_2012.pdf
- Combes C. (1990). Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach. *Trends Ecology Evolution* vol. 5, p. 334–337.
- Davis J. y Nixon K. (1992) Populations, genetics variation and the delimitation of phylogenetics species. *Systematic Biology* vol.41, p. 421-435.
- Dalloul R., and Lillehoj H. (2006) Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Review of Vaccines* vol.1, p.143–163.
- Desai N., Antonopoulos D., Gilbert J., Glass E., Meyer F. (2012). From genomics to metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 23, p. 72–76.
- Devran Z., Gozel U., Sogut M., Yildiz F. and Elekcioglu I. (2002) Identification of Root-Knot Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by Using rDNA and mt DNA Markets. *Turk J. Agric. For.* Vol. 26, p 337-341.

- Dwight D. (2004). *Parasitología Veterinaria De Georgi*, Editorial Elsevier España, 8 Edición, p. 95-99.
- Evans T. (2000) Engineering in genomics. Developing and commercializing a DNA sequencer. *Engineering in Medicine and Biology Society* vol.19, p. 117-120.
- Excoffier L., Hofer T., Foll M. (2009) Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* vol.103, p. 285–298.
- Fagner L., Yamamoto B., Wagner L., Almeida K. and Machado C. (2010). *Eimeria stiedai*: metabolism of lipids, proteins and glucose in experimentally infected rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Brazil Journal Veterinary Pathology* vol. 2, p. 37-40.
- Frankel, O., Brown, A. and Burdon J.J. (1995). *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press. United Kingdom, p. 299.
- Frankham, R., Ballou, J. and Briscoe D. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. United Kingdom. 617p.
- Freeland JR. (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley y Sons Inc, p.110-111.
- Graham P., (1986) Future applications of biotechnology in poukry. *Auhn Dis* vol. 30, p.47-59.
- Godinez, A. (1987) La cunicultura como una alternativa de solución en la alimentación nacional. Situación y perspectivas de la cunicultura en México, UACh, México.
- Good D. y Wake D. (1992) Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). *University of California Publication Zoology* vol. 126, p. 1-91.
- Goldstein, D. and Schötterer C. (1999). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, United Kingdom, p.352.
- Gómez-Bautista (2002). Coccidiosis s1. *Parasitología Veterinaria*. McGraw- Hill Interamericana. Madrid p. 729-734.

- Gómez-Ramos B., Ortiz- Rodríguez R., Becerril-Pérez C., Román-Bravo R. y Camacho J. (2011). Caracterización de la producción de leche de la coneja con énfasis en la supervivencia y crecimiento de la camada en razas Nueva Zelanda blanco y California. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* vol. 4 p. 15-35.
- González-Redondo A., Finzi, P., Negretti N. and Micci M. (2008). Incidence of coccidiosis in different rabbit keeping systems. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* vol.60, p.1267-1270.
- Ginnobili S. (2009) Adaptación y función - El papel de los conceptos funcionales en la teoría de la selección natural darwiniana. *Ludus Vitalis* vol.17 p.3-24.
- Gres V., Voza T., Chabaud A, and Landau I. (2003). Coccidiosis of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in France. *Parasitology* vol.10, p. 51-57.
- Gutiérrez J. (2003). Tratamientos y profilaxis de la coccidiosis en el conejo. *Cunicultura* vol. 162, p. 97-106.
- Hartl D. and A. Clark. (1989) *Principles of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, p.682.
- Halffter G. y Ezcurra E. (1992) ¿Qué es la biodiversidad? En: G. Halffter (ed). *La diversidad biológica de Iberoamérica*. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México. Vol. 1, p. 3-24.
- Hatcher M., Dunn A. (2011). *Parasites in ecological communities: from interactions to ecosystems*: Cambridge University Press.
- Hedrick P. (2005) *Genetics of Populations*. Jones & Bartlett Learning. Third Edition, Boston, MA, p. 400.
- Hernández I. and Mendoza N. (2002). Time of Sporulation for Several Species of *Eimeria* in Goats: an In Vitro Assessment *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. 12, p. 24-28*.

- Jithendran K. (2010). Coccidiosis In rabbits: A guide for the differential diagnosis of *Eimerias* species. Regional Station, Indian Veterinary Research Institute, Palampur, Himanchal Pradesh 176 061, p. 36-39.
- Juárez A., Morales A. (2002) "Casos Clínicos de diarreas en Granjas Cunícolas en México". Memorias del II Ciclo internacional de conferencias en cunicultura empresarial. (24-26 de octubre) UACh. México.
- Kimura M. and Ohta T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 75, p. 2868–2872.
- Korallo N., Vinarski M., Krasnov B., Shenbrot G., Mouillot D. (2007). Are there general rules governing parasite diversity? Small mammalian hosts and gamasid mite assemblages. Diversity and Distributions vol.13, p. 353–360.
- Kvíčerová J., Pakandl M., Hypša V., (2008). Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (*Apicomplexa*, *Eimeriidae*) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. Parasitology vol.135, p. 443–452.
- Lebas F. (1990). "El conejo": cría y patología. Editorial FAO. Roma Italia.
- Licois D., Wyers M., Coudert P. (2006). Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. Veterinary Research vol. 36, p. 601–613.
- Liu G., Tian S., Cui P., Fang S., Wang C., Zhu X. (2015). The complete mitochondrial genomes of five *Eimeria* species infecting domestic rabbits. Experimental Parasitology vol. 159, p.67-71.
- Li M-H., and Ooi H. (2010). Prevalence, infectivity and oocyst sporulation time of rabbit-coccidia in Taiwan. Tropical Biomedicine vol. 27, p. 424–429.
- Lowe A, Harris S and Ashton P. (2004) Ecological Genetics: design, analysis, and application. Blackwell Publishing; p. 326.

- Marlier R, Licois D., Lassence C., Poulipoulis A., Vindevogel H. (2003). Description des principales etiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *American Medicine Veterinary* vol. 147, p. 385–392.
- Markert C., Moller F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 45, p.753-763.
- Meyer, D. (1997) Análise filogenética de seqüências de DNA. In: AMORIM, D.S. *Elementos básicos de sistemática filogenética*. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Holos, cap. 14, p.187-208.
- Morales A. (2013). Enfermedades que influyen en la productividad. Foro Nacional de Cunicultores de México, Morelia Michoacán.
- Murray R., and Larry J. (2009). *Estadística*. 4ta edición. Mc Graw-Hill. México, D.F.
- Mugridge N., Morrison D., Jakel T., Heckerroth A., Tenter A., Johnson A. (2000) Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. *Molecular Biology and Evolution* vol.17, p.1842–1853.
- Mburu D., Ochieng J., Kuria S., Jianlin H. and Kaufmann B. (2003). Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Animal Genetics* vol. 34, p. 26–32.
- McDouaall J. and Galloway D. (1982) In situ cytologid hybridización in diagnostic pathology: In: Fenosdio, C. M. y Wolff, M., eds. *Progwws in Surgid fhology*, val. 4. Nueva York, USA.
- Nei, M. and Kumar, S. (2001) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. 333p.
- Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, p.512.

- Nei M, Kumar S. (2000) Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Nixon K., y Wheeler Q. (1990) An amplification of the phylogenetic species concep. Cladistics vol.6, p.211- 223.
- Lagally E. T., I. Medintz y R. A. Mathies. 2001. Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. Analytical Chemistry 73: 565-570.
- Long P. and Joyner L. (1984) Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. J Protozool vol. 31, p.535-541.
- Olivares P., Gómez C., Schwentesius R. Y Carrera C. (2009). Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. Región y Sociedad, No. Septiembre-Diciembre, p. 191-207.
- Oliveira U., Fraga J., Licois D., Pakandl M. y Gruber A. (2011). Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Veterinary Parasitology vol. 176, p. 275-280.
- Oncel T., Gulen E., Senlik B. and Bakirci N. (2011). Intestinal coccidiosis in Angora Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) caused by *Eimeria intestinalis*, *Eimeria perforans* and *Eimeria coecicola*. Veteriner Fakultesi ergisi vol. 22, p. 27-29.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2010). Consultado el día 7 de Abril de 2015. Disponible en línea: http://www.fao.org/index_es.htm
- Olmstead R. (1992) Species concepts and pleisomorphic species. Systematic Botany vol. 20, p. 623-630.
- Otha T and Kimura M. (1973) The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. Genetic Research vol.22, p. 201-204.

- Page R. and Holmes E. (2001) *Molecular Evolution: A phylogenetic approach*. Blackwell Science, p.346.
- Pakandl M. (2009). *Coccidia of rabbit: a review*. *Folia Parasitológica* vol.56, p.153-166.
- Pakandl M. and Hlášková L. (2007). The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. *Parasitology Research* vol.101, p.1435-1437.
- Peakall R., Ruibal M., Lindenmayer D. (2003) Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* vol.57, p.1182-1195.
- Pérez M. y Betancourt A. (2011). Coccidiosis hepática en el conejo: aspectos ambientales y clínico-patológicos. *Ciencia ergo sum* vol.27, p. 269-276.
- Pérez-Nasser N. y D. Piñero (1997) Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* vol.60, p.77-84.
- Pérez-Tris J. (2009) La parasitología ecológica en la era de la genética molecular. *Ecosistemas* vol.18, p. 52-59.
- Piñero D. (2008). *La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México*, en **Capital natural de México**, Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, p.415-435.
- Poulin R., Morand S. (2000). La diversidad de parásitos. *Quarterly Review of Biology* vol. 75, p. 277-293.
- Porter A. (1990) Testing nominal species boundaries using genes flow statistics; the taxonomy of two hybridizing admiral butterflies (*Limenitis*: Nymphalidae). *Systematic Zoology* vol. 39, p. 131-147.
- Quiroz H. (2005). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*, Editorial Limusa, S.A, Grupo Noriega Editores México p. 158-162.

- Razaví S., Oryan A., Rakhsandehroo E., Moshiri A. and Mootabi A. (2010). *Eimeria* species in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in farms province, Iran. Tropical biomedicine vol. 27, p. 470-475.
- Ressom H., Reynolds R. and Varghese R. (2003) Increasing the efficiency of fuzzy logic based gene expression data analysis. En: Physiological Genomics vol. 13, p. 107–117.
- Rodríguez-De Lara, R. (2003). Enteropatías en conejos. Memorias del Ciclo de Conferencias “La cunicultura hoy”. 23–24 de Enero 2003, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, México.
- Ruttkowski A., Joachim A., Dauschies. (2001). PCR-based differentiation of three porcine *Eimeria* species and *Isospora suis* B. Veterinary Parasitology vol. 95, p. 17–23.
- Sanger F. (1988) Early nucleic acid chemistry. Trends in Biochemical Sciences vol.13, p. 67-69.
- Santa C., Argentina M., Genzelis M., Mijalenko S., Beltramino J. (2014). Survey of *Eimeria* spp. in sheep: first notice of *Eimeria macusaniensis* in the region of Governor Gregores. Revista Salud Animal vol.36 p. 20-24.
- Saitou N, Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution vol. 4, p.406–425.
- SAGARPA. (2016). “Programa estratégico para el desarrollo de la cunicultura en México: producción, transformación y comercialización del conejo”, Alianza para el campo programa estratégico de investigación, transferencia y adopción de tecnología agroalimentaria, Tlaxcala, Tlaxcala, México.

SAGARPA. (2012). Delegación en el Estado de México; Comunicación social B.78/12. El Estado de México primer lugar en producción y consumo de conejo. Zinacatepec, Edo. De Méx. Diciembre.

Slatkin M. (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* vol. 16, p. 393-430

Secretaria de Medio Ambiente, Gobierno del Estado de México (2015). En línea Consultado 23 de Mayo 2015. <http://www.edomexico.gob.mx/medioambiente/mapa/htm/consulta.asp?municipio=Amecameca>

Šlapeta J., Modrý D., Ashe J., Koudela B., (2003). Description of *Eimeria arabukosokokensis* sp. n. (*Apicomplexa: Eimeriidae*) from *Telescopus semiannulatus* (Serpentes: Colubridae) with notes on eimerian coccidia from snakes of Eastern Kenya. *Folia Parasitologica* vol. 50, p. 23-30.

Sosa D., Pérez M., Molina S., Demey J., Gómez K., Domínguez D., Istúriz M., Rumbos R. y Parra D. (2014). Diversidad genética de *Trichoderma* spp. en Venezuela, determinada mediante análisis combinado ITS-AFLP. *Revista de Protección Vegetal*, vol. 29, p.42-51.

Shibata D., W. J. Martin y N. Arnheim. 1988. Analysis of DNA Sequences in Forty-Year-Old Paraffin-embedded Thin-Tissue. *Cancer Research* 48: 4564-4566.

Schneider H. (2003) Métodos de análise filogenética: Um guia prático. 2ª ed. Ribeirão Preto: Holos p.114.

Stein D., Lonant S. and Ahearn E. (1992) Structural rearrangements of the chloroplast genome provide an important phylogenetic link in ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 19, p. 1856-1860.

Soltis D., Johnson L., y Looney C. (1996) Discordance between ITS and chloroplast topologies in the *Boykinia* group (Saxifragaceae). *Systematic Botany* vol. 21, p. 169-185.

- Tapia, C. E.; Espinosa; G. M.; Warburton, L. M.; Varela, S. A; y Monter, V.A. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. *Interciencia: Rev. Ciencia y tecnología de América* 30(11):687 - 693.
- Tamasaukas R. y Roa N., (1998). Aislamiento, identificación y caracterización de aislados de campo de *Eimeria* spp en fincas bovinas de Venezuela. *Revista científica FCV-LUZ*, vol. 8, p. 119-126.
- Tamasaukas R., Agudo I., Vintimilla M. (2010). Bovine coccidiosis pathology in Venezuela: a review REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria* vol. 11, p.1695-7504.
- Tehrani A., Yakhchali M., Beikzadeh B., Morvaridi A. (2013). Prevalence of rabbit hepatic coccidiosis in North West of Iran. *Archives of Razi Institute* vol. 68, p. 65-69.
- Templeton A. (2006) *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. John Wiley y Sons, New Jersey p.82-246.
- Tian, S., Cui, P., Fang, S., Liu, G., Wang, C., Zhu, X. (2015). The complete mitochondrial genome sequence of *Eimeria magna* (Apicomplexa: Coccidia), *Mitochondrial DNA* vol. 26, p. 14-19.
- Vázquez L., Dacal V., Panadero R., (2006). Principales parasitosis internas de los conejos: medidas de prevención y control. *Boletín de cunicultura* vol. 146, p. 25-28.
- Vasemagi, A., Primmer, C.R. 2005. Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Molecular Ecology* 14:3623-3642.
- Ventura E., Juárez M. and Candanosa E. (2004). Diarrheal case in semintensive production of New Zealand White (NZW) rabbits in Mexico City. "Characterization of macroscopy and microscopy lesions". *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla México* vol. 3, p. 664–668.

- Vignau, M. (2005). Parasitología práctica y modelos de Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos. 1ra ed. Argentina.
- Vilgalys R. y Sun L. (1994) Ancient and recent patterns of geographics speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences USA Vol. 91, p. 4599-4603.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research vol. 23, p. 4407-4414.
- Voss A., Thomas T. (2001) Identification of novel genes by gene trap mutagenesis. Methods in Molecular Biology vol. 175, p. 377-396.
- Weir B. and Cockerham C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution vol. 38, p.1358-1370.
- Wiens J. y Penkrot (2002) Delimiting species using AND and morphological variation and discordant species limits in spiny lizard (*Sceloporus*). Systematic Biology vol. 51, p.69-91.
- White T. Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1996) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and amplifications. (Ed. Inns, M.A. Gelfanda D.H., Sninsky, J. White, JT.) Academic Press. New York.
- Whitlock MC and McCauley DE. (1999) Indirect measures of gene flow and migration. Heredity vol.82, p. 117-125.
- Williams, J. G.; Kubelik, K. J.; Livak, J. A.; Rafalski y, S. V. y Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531 - 6535.
- Wright S. (1951) The genetical structure of populations. Ann. Eugenics vol. 15, p.323-354.
- Yan W., Wang W., Wang T., Suo X., Qian W., Wang S., Fan D. (2013). Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments, Veterinary Parasitology vol. 193, p.284-292.

- Yakhchali M. and Tehrani A. (2007). Eimeriidosis and pathological findings in new zeland white rabbits. *Journal of Biological Sciences* vol.7, p. 1488-1491.
- Yuan J., Reed A., Chen F. and Stewart C. (2006) Statistical analysis of real time PCR data. *BMC Bioinformatics* vol.1, p.85.
- Zerrin, E. Yesari E. (2007). Hepatic Coccidiosis in Angora Rabbits. *Journal of Animal and Veterinary Advances* vol. 5, p. 462-463.
- Zilsel J., MA P. and Beatty J. (1992) Derivation of a mathematical expression useful for the construction of complete genomic libraries. *Gene* vol. 120, p. 89-92
- Zoran K., Zoran T., Živorad M., Nevenka A. and Zorana M. (2006). White blood cell differential count in rabbits artificially infected with intestinal coccidian. *Journal Protozool Research* vol. 16, p.42-50.

14. ANEXOS

Anexo 1. Técnica de Mc Máster

(INIFAP, 2010)

Procedimiento

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

Anexo 2. Instrucciones del kit Fecal Microbe DNA de Zymo Research®

Procedimiento

Paso 1

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

Añadir 750 µl de Solución de Lisis el tubo.

Paso 2

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

Paso 3

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

Paso 4

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

Paso 5

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

Paso 6

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

Paso 7

Deseche el filtrado y repita el paso 6

Paso 8

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

Paso 9

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

Paso 10

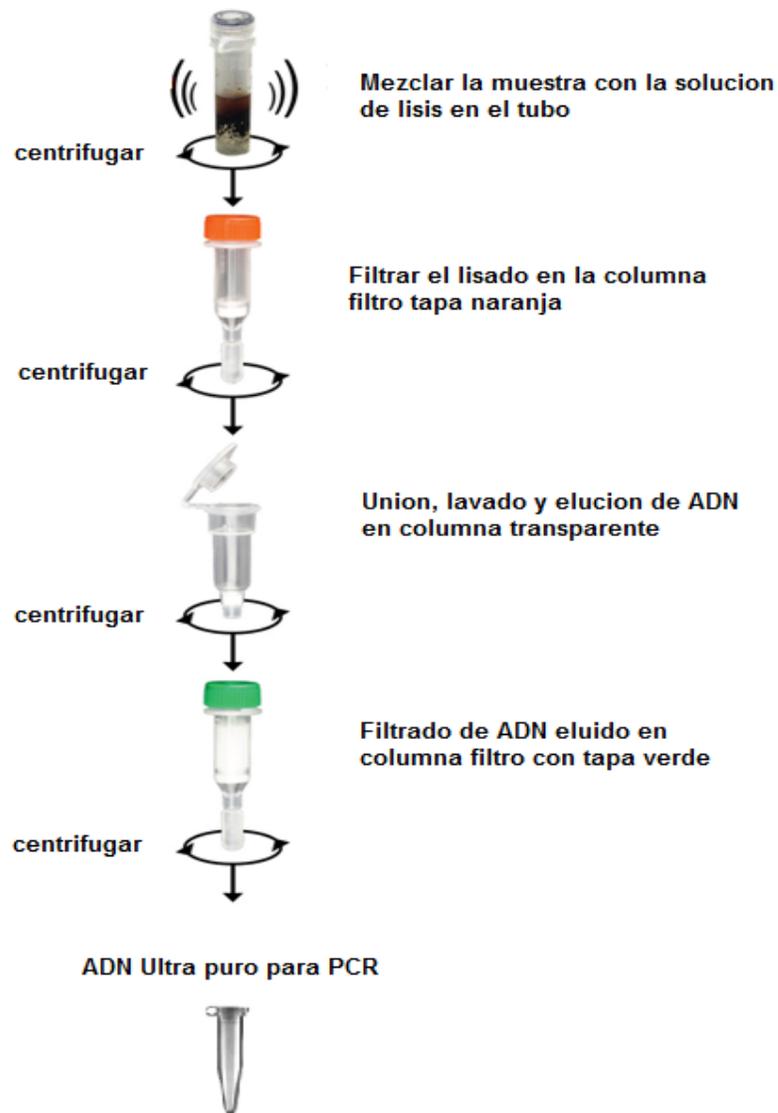
Transferir el Zymo -Spin™ IIC columna a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml limpio y nuevo, se añade 100 µl (25 µl mínimo) de tampón elución de ADN directamente a la matriz de la columna. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos para eluir el ADN.

Si se tomaron muestras de los hongos o cultivos bacterianos, el ADN es ahora adecuado para la PCR.

Paso 11

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

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



Anexo 3. Condiciones de amplificación de las 11 especies de *Eimeria* del conejo.

Especie de <i>Eimeria</i>	Tm	MgCl2	Ciclos	Tamaño del amplicon
<i>Coecicola</i>	50 °C	4 µl	35	256 pb
<i>Exigua</i>	55°C	2.5 µl		280 pb
<i>Flavescens</i>	58°C			199 pb
<i>Intestinalis</i>	56°C			241 pb
<i>Irresidua</i>	52°C			226 pb
<i>Magna</i>	56°C			218 pb
<i>Media</i>	56°C			152 pb
<i>Perforans</i>	58°C			157 pb
<i>Piriformis</i>	57°C	3µl		289 pb
<i>Stiedae</i>	52°C	4µl		217 pb

Anexo 4. Instrucciones de Kit the Gel DNA Recovery Zymoclean™

El Kit de purificación de ADN Zymoclean™ es un método rápido de purificación de gel a partir de TAE / buffer geles de agarosa de ADN y de alta calidad. El producto cuenta con tecnología Fast-Spin para obtener ADN de alta calidad, purificado en cuestión de minutos. ADN purificado utilizando con el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ están perfectamente adecuado para su uso en reacciones de ligación de ADN, secuenciación, reacciones de marcaje de ADN, PCR, etc.

Procedimiento

Paso 1

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

Paso 2

Añadir 3 volúmenes de ADB por cada volumen de gel de agarosa (por ejemplo, para 100 μ l (mg) de la rebanada de gel de agarosa al añadir 300 μ l de ADB).

Paso 3

Se incuba a 37-55 ° C durante 5-10 minutos hasta que la porción de gel este completamente disuelto.

Para fragmentos de ADN > 8 Kb, después de la etapa de incubación, añadir un volumen adicional (igual a la de la porción de gel) de agua a la mezcla para una mejor recuperación de ADN (por ejemplo, 100 μ l de agarosa, 300 μ l ABD, y 100 μ l de agua).

Paso 4

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

Paso 5

Centrifugar durante 30-60 segundos. Deseche el filtrado.

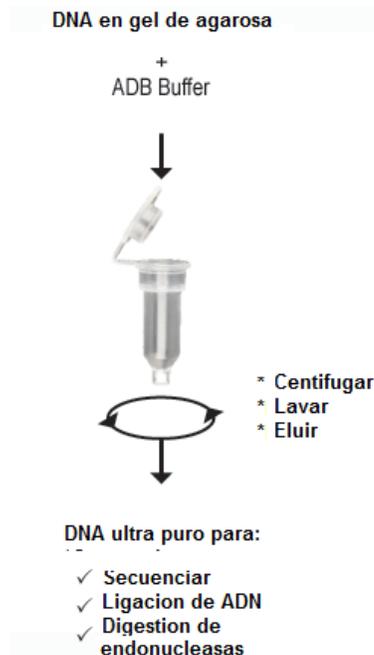
Paso 6

Añadir 200 μ l de tampón de lavado de ADN a la columna y centrifugar durante 30 segundos. Deseche el filtrado. Repetir la etapa de lavado.

Paso 7

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

ADN ultra - puro ahora está listo para su uso.



Anexo 5. Proceso de clonación de amplicones de PCR

1.- Se realiza gel de agarosa 2x para la obtención de amplicones que se utilizaran en el proceso de purificación (el tamaño es específico por fragmento). Se cargan de 20 a 40 μ l del producto de PCR por pozo y se realiza la electroforesis. Posteriormente se visualiza el gel en lámpara U.V y se tiñe con bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados se cortan con una navaja de bisturí y se colocan en un vial eppendorf de 2 ml.

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

3.- Ligación

*Kit PGEM-T Easy vector System I

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

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

Donde:

Kb inserto: tamaño del amplicón

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

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

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

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

Reactivo	Stock	Final	1Rx
Vector (PGEM)	50 µg/ml	50µg/ml	1µl
Inserto (DNA)	?	+De acuerdo a la banda	3µl
Ligasa (T4 DNA)	3 Wv/ml	3Wv/ml	1µl
*Buffer 2x	2x	1x	5µl
Agua libre de nucleasas	0	0	0

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

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

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

4.- Transformación

4.1.- Descongelar en hielo las células competentes.

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

Porque:

50 ng/µl = 5 ng/µl

30 ng del ligado del DNA= 6 µl

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

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

4.5.- Se deja en hielo 2 minutos.

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

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

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

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

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

4.11.- Incubar de 12-24 horas.

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

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

7.- Mezclar los viales por pipeteo.

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

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

10.- Cálculo de concentración y mix para PCR

Mix	Stock	Final	1 Rx
DNA	?	5 u/rx	5 μl
Taq pol	5 u/μl	1 u/rx	0.2 μl
d'NTPS	2 mμ	0.2 mμ	2 μl
Primers	10 mμ	0.2 mμ	0.4 μl x 2= 0.8 μl
Buffer	10x	1x	2 μl
MgCl ₂	30 mμ	1.5 mμ	1 μl
Agua L.N	Cbp 20 μl		9 μl

Cálculo para mix (excepto la taq pol):

Primers: 0.4 μl x Rx

C1- 10 mμ

Se divide

V1- ?

C2- 0.2 mμ

Se multiplica

V2- 20 μl

Cálculo para la taq pol:

1 u/rx – 5 u/μl

? - 1 u/μl

Taq pol: 0.2 μl x Rx

Programa de PCR

94°C x 5 minutos

94°C x 30 seg
T.M x 30 seg
72 °C x 40 seg

} 30 ciclos

72 °C x 5 minutos

10.1 Se visualiza en gel de agarosa 3x

11.- Preparación del stock.

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

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

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

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

12.- Preparación de la miniprep.

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

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

Mix de carga:

2 µl de colorante 5x

4 µl de muestra

2 µl de Agua libre de nucleasas

Anexo 6. kit ilustra plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare)

Purificación con altos rendimientos de ADN plásmido en menos de 10 min. Tubos con códigos de color y columnas que simplifican el protocolo del ADN purificado adecuado para todas las aplicaciones posteriores.

Tiempo total de preparación es de menos de 10 min representa una reducción del 50 % en el tiempo.

Produce ADN plásmido de alta calidad con excelente reproducibilidad para su uso en la clonación, la digestión con enzimas de restricción, amplificación por PCR y secuenciación de ADN.

Mayor facilidad de uso proporcionado por cambios mínimos en volumen de pipeteo de una parte del protocolo a otro, un menor número de etapas de centrifugación, los componentes del kit con código de color y la ausencia de disolventes orgánicos.

