



Archivos de Zootecnia

ISSN: 0004-0592

pa1gocag@lucano.uco.es

Universidad de Córdoba

España

Bolaños, I.; Hernandez, D.; Álvarez, L.
Asociación de los alelos del gen BoLA-DRB3 con la infección natural de Babesia spp en
el ganado criollo Hartón del Valle
Archivos de Zootecnia, vol. 66, núm. 253, 2017, pp. 113-120
Universidad de Córdoba
Córdoba, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49551221016>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Asociación de los alelos del gen BoLA-DRB3 con la infección natural de *Babesia* spp en el ganado criollo Hartón del Valle

Bolaños, I.¹; Hernandez, D.^{1,2@} y Álvarez, L.¹

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. Palmira. Colombia.

²Departamento de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Sucre. Campus Puerta Verde. Sincelejo. Colombia.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Ganado criollo colombiano.
Protozoario.
Resistencia a enfermedades.

RESUMEN

En 191 individuos de la raza bovina criolla Hartón del Valle, se evaluó la infección por los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* mediante PCR convencional, los polimorfismos del gen BoLA-DRB3,2* mediante PCR-SBT y la asociación entre ambos (Odds Ratio, OR). Los alelos fueron categorizados según su asociación en resistentes (R), susceptibles (S) o neutrales (N) a la infección y los individuos genotipados según la clasificación de sus alelos como: N/N, N/R, N/S, R/R, R/S y S/S. Ningún animal fue positivo a la infección por *B. bovis* y por tanto no se realizaron estimaciones de asociación. La infección con *B. bigemina* fue del 13,1%. Se encontraron 36 alelos BoLA-DRB3,2, los más frecuentes fueron el *1101 (0,196), *20012 (0,097), *2006 (0,053) y *2703 (0,053). Se encontró una asociación positiva ($p < 0,001$) entre los alelos *1101 (OR = 9,1), *2006 (OR = 5,4) y *20012 (OR = 7,2) con la ausencia de *B. bigemina* y se consideraron como alelos R. Mientras que, el alelo *2703 presentó una asociación negativa ($p < 0,001$) y se consideró como alelo S (OR = 0,2). Las frecuencias acumuladas de los alelos fueron N = 0,591, R = 0,351 y S = 0,058. Así, los porcentajes de individuos con genotipos homocigotos N/N, R/R y S/S fueron del 40,3%, 19,4% y 1,6% respectivamente. Los genotipos heterocigotos N/R, N/S, y R/S presentaron frecuencias de 30,4%, 7,3% y 1% respectivamente. Se concluye que algunos alelos DRB3,2 en el ganado criollo Hartón del Valle le confieren resistencia a la infección con *B. bigemina*.

Association of alleles BoLA-DRB3 gene natural infection with *Babesia* spp in Hartón del Valle creole cattle

SUMMARY

In 191 individuals of Harton del Valle creole cattle, the infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* protozoa by conventional PCR, polymorphisms BoLA-DRB3.2 * gene by PCR-SBT and relationship between both of them were evaluated (Odds Ratio, OR). Alleles were categorized according to their resistant (R), susceptible (S) or neutral (N) association to infection and individuals genotyped according to the classification of alleles: N/N, N/R, N/S, R/R, R/S and S/S. No animal was positive for *B. bovis* infection and therefore no association estimates were estimated. On the one hand, *B. bigemina* infection was 13.1%. 36 alleles BoLA-DRB3.2 were found, the most frequent were the *1101 (0.196) *20012 (0.097), *2006 (0.053) and *2703 (0.053). A positive association ($p < 0.001$) between alleles *1101 (OR = 9.1), *2006 (OR = 5.4) and *20012 (OR = 7.2) with the absence of *B. bigemina* was found and were considered as R alleles. On the other hand, the *2703 allele showed a negative association ($p < 0.001$) and was considered as S allele (OR = 0.2). Cumulative allele frequencies were N = 0.591, R = 0.351 and S = 0.058. Thus, the percentage of homozygous individuals with N/N, R/R and S/S genotypes were 40.3%, 19.4% and 1.6% respectively. The heterozygous genotypes, N/R, N/S, and R/S presented the following frequencies 30.4%, 7.3% and 1% respectively. It is concluded that some alleles in DRB3.2 Harton del Valle creole cattle provide the animals with resistance to the infection by *B. bigemina*.

ADDITIONAL KEYWORDS

Colombian creole cattle.
Protozoan.
Disease resistance.

INFORMACIÓN

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 03.06.2016
Aceptado/Accepted: 27.09.2016
On-line: 15.01.2017
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
darwin.hernandez@unisucra.edu.co

INTRODUCCIÓN

La babesiosis es una enfermedad producida por un protozoario intraeritrocitario del género *Babesia* spp. de alta incidencia en las regiones tropicales y subtropica-

les del mundo. La enfermedad también es conocida con el nombre de ranilla roja, fiebre de garrapatas, fiebre de Texas, tristeza, piroplasmosis y hemoglobinuria enzoótica (Homer *et al.*, 2000). Las pérdidas económicas en la producción bovina asociadas a la enfermedad son al-

tas, debido a la significativa morbilidad y mortalidad, los signos clínicos varían según la edad del animal y cepa del parásito; los animales suelen presentar fiebre, anemia, hemoglobinuria e ictericia, que deriva en pérdida de peso y en la muerte del animal. La mayoría de los casos se observan en adultos mientras que, en animales menores de nueve meses generalmente no se presentan síntomas (Wilkowsky *et al.*, 2009).

Aunque el parásito es capaz de infectar una amplia gama de vertebrados, requiere tanto de un vertebrado que actúa como hospedero definitivo, como de un invertebrado que hace las veces de hospedero intermedio o vector, para cumplir con su ciclo de vida (Homer *et al.*, 2000); en el primero, ocurre la fase de reproducción asexual del protozoo, donde se multiplica por fisión binaria invadiendo los glóbulos rojos y produciendo trofozoítos; en el segundo, ocurren los demás pasos del ciclo evolutivo del parásito en los que se cuentan la transformación de los trofozoítos a vermículos en el intestino del vector, su paso a la hemolinfa y la infección de las células epiteliales de los túbulos de Malpighi, la migración hasta los ovarios del vector, donde infecta los huevos y mientras estos se desarrollan en larva, el parásito penetra en la células epiteliales del intestino donde tiene lugar una fisión múltiple del núcleo, con la formación de más vermículos, que pasando a las glándulas salivales de la ninfa, donde se redondean, aumentan de tamaño y allí hasta ser nuevamente inoculados en el hospedero vertebrado (Wilkowsky *et al.*, 2009; Homer *et al.*, 2000).

La *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son las especies más frecuentes e importantes en las regiones tropicales que afectan al ganado bovino (Benavides *et al.*, 2012). Los principales vectores para *B. bigemina* son las garrapatas *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus*, *R. geigy* y *R. evertsi*. Para *B. bovis* son las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *R. annulatus* (Spickler, 2016).

La *Babesia* puede ser diagnosticada mediante la identificación del parásito en sangre o tejidos, mediante

pruebas serológicas o mediante la detección del ADN del protozoo en una muestra de ADN total extraído de un bovino usando la técnica de la PCR (Oliveira *et al.*, 2005). Muñoz. (2005) recomienda la PCR como método de diagnóstico, pues sus resultados demostraron que el 66,6% de animales infectados experimentalmente, nueve meses después y sin signos clínicos de la enfermedad eran portadores de *B. bigemina* y pudieron inducir la infección mediante transfusión sanguínea al 44,4% de los terneros evaluados. Oliveira *et al.* (2008) afirma que la PCR anidada (nPCR) como métodos de diagnóstico para *B. bigemina* es 100 veces más sensible que la PCR convencional. Adicionalmente, Kim *et al.* (2007) reportan una especificidad del 96,9% y una sensibilidad del 100% para la detección de *B. bovis* usando una PCR cuantitativa (qPCR) contra la nPCR y de 100% de especificidad y de sensibilidad para la detección de *B. bigemina*.

El desarrollo de la Babesiosis en los bovinos esta determinada por múltiples factores, en los que se cuenta el manejo de los animales, la edad, la raza, los factores climáticos y las fluctuaciones en las poblaciones de garrapatas (Bock *et al.*, 2004). La enfermedad se puede controlar por medios inmunológicos como vacunas vivas atenuadas o mediante el uso de acaricidas para controlar la garrapata, sin embargo, las vacunas vivas pueden ser inseguras como lo reporta Bock *et al.* (2004), estas pueden fallar debido al proceso de atenuación; y los acaricidas aumentan los costos de producción, tienen un costo ambiental alto, generan residuos en los productos de origen animal y existe la posibilidad que la garrapata desarrolle resistencia (Molloy *et al.*, 2001). Recientemente se ha motivado la investigación de métodos alternativos, entre los cuales está la utilización de razas resistentes (Oliveira *et al.*, 2008) o la identificación de genes con efecto protector a la infección (Duangjinda *et al.*, 2013).

Uno de los genes asociado con resistencia y/o susceptibilidad a diferentes enfermedades como la brucelosis, la mastitis, la leucosis y algunas infecciones por garrapatas, (Xu *et al.*, 1993; Mirsky *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2006; Duangjinda *et al.*, 2013; Hernandez *et al.*, 2014) al igual que con características productivas tales como la producción de leche, proteína y grasa en leche (Machado *et al.*, 2005; Do Nascimento *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2014) es el gen BoLA-DRB3. Los antígenos leucocitarios bovinos (BoLA) son un conjunto de glicoproteínas que se ubican en la superficie celular existen tres clases, cada una con función diferente. El producto de los genes *clase I* son dos cadenas polipeptídicas, implicadas en el reconocimiento de las células hospederas que han sido infectadas, mediante la presentación de péptidos a las células citotóxicas T CD8⁺. Los genes *clase II* están localizados en dos sitios diferentes del cromosoma 23, posee dos regiones llamadas *clase IIa* y *clase IIb*, estos genes producen proteínas implicadas en la comunicación intercelular entre las células B y T, presentación de antígenos extracelulares a las células T CD4⁺. Los genes *clase III* codifican proteínas de complemento, implicadas en la destrucción de células extrañas (Takeshima and Aida, 2006).

Tabla I. Frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo Hartón del Valle (BoLA-DRB3 gene allele frequencies in Harton del Valle creole cattle).

Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
*0101	0.031	*1801	0.005	*2902	0.018
*0501	0.026	*1901	0.016	*3001	0.029
*0701	0.005	*2002	0.005	*3021	0.003
*0902	0.034	*2004	0.003	*3501	0.005
*1001	0.021	*2006	0.058	*3601	0.042
*1002	0.031	*2109	0.003	*3901	0.013
*1101	0.196	*2201	0.024	*4401	0.008
*1102	0.005	*2703	0.058	*4802	0.008
*1104	0.031	*2709	0.013	*14011	0.010
*1501	0.039	*2710	0.013	*20012	0.097
*1601	0.037	*2801	0.045	*25011	0.021
*1701	0.029	*2802	0.013	*25012	0.005

Entre los genes de la *clase IIa* se encuentra el gen DRB3, este tiene una longitud de 11,4 Kbp, con cinco intrones y seis exones (Russell *et al.*, 2004) y codifica elementos funcionales de restricción, proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño (Davies *et al.*, 1997). El exón 2 es el más polimórfico (*BoLA-DRB3,2*), codifica para el sitio de unión al péptido que se quiere presentar, se han reportado 137 alelos *BoLA-DRB3,2* (EMBL-EBI, 2016).

En el ganado criollo Colombiano Hartón del Valle se ha estudiado la diversidad genética (Delgado *et al.*, 2012), los genes asociados con calidad de leche (Rosero *et al.*, 2012) y carne (Cuetia *et al.*, 2012), además, de genes asociados con resistencia a la leucosis bovina (Hernández, 2013; Hernández *et al.*, 2014) pero no, con la infección de *Babesia spp.* Por lo que el objetivo de este estudio fue asociar los polimorfismos encontrados en el gen *BoLA-DRB3,2* con la infección natural de *Babesia spp.* en el ganado criollo Colombiano Hartón del Valle.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Se colectaron muestras de sangre en tubos con anticoagulante (K_2EDTA 7,2 mg) de 191 animales puros de la raza Hartón del Valle de ganaderías ubicadas en el Departamento del Valle del Cauca, Colombia. El ADN se obtuvo usando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *BoLA-DRB3,2*

La genotipificación de los alelos *DRB3,2* se realizó por secuenciación de los productos de PCR. El producto de la PCR fue un fragmento de aproximadamente 281 pb que fue amplificado con los cebadores DR-

B3FEW (5'-CGCTCCTGTGACCAGATCTATCC-3') y DRB3REV (5'-GGTGAGCGCGGGGGTG-3') (Takeshima *et al.*, 2011) en una concentración de 10 mM, 25 ng de ADN, 0,2 mM de cada dNTP, 1X de tampón de PCR, 2,5 mM de $MgCl_2$ y 1U de Taq DNA polimerasa. El perfil térmico de la reacción incluyó, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, junto con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos y una extensión final de 72 °C durante 5 minutos. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-100® Teltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA), que fue secuenciado bidireccionalmente en la empresa MACROGEN, USA.

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *BABESIA spp.*

La determinación de la infección de las muestras con los protozoarios *B. bigemina* y *B. bovis* se realizó mediante métodos moleculares. Para ello se amplificó el locus 18S del RNA ribosomal usando los cebadores BoF 5'-AGCAGGTTTCGCGCTGTATAATG-3' y BoR 5'-AGTCGTGCGTCATCGACAAA-3' para *B. bovis* y BiF 5'-AATAACAATACAGGGCTTTCGTCT-3' y BiR 5'-AACGCGAGGCTGAAATACAAC-3' para *B. bigemina* (Kim *et al.*, 2007).

La concentración de los reactivos utilizados en la PCR fueron 20ng de ADN, 10 mM de cada cebador, 0,20 mM de cada dNTP, 2,5mM de $MgCl_2$, 1X de tampón de PCR y 0,5U de Taq DNA polimerasa. El perfil térmico consto de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, para terminar con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Las condiciones de PCR fueron similares para el diagnóstico de ambas especies.

Se utilizó ADN de *B. bovis* y de *B. bigemina* obtenido a partir de la vacuna ANABASAN Registro ICA 5226-DB usando el kit Wizard® Genomic DNA

Tabla II. Valores de diversidad genética del gen *BoLA-DRB3* en el Hartón del Valle y otros reportes (Values of *BoLA-DRB3* gene genetic diversity in Harton del Valle and other reports).

Raza	N	Na	Alelos más frecuentes	Ho	He	F _{IS}	EHW	Referencia
Hartón del Valle	191	36	*1101, *2006, *2703, *20012	0.82	0.93	0.110**	0.0001	Presente estudio
Hartón del Valle	93	27	*1101, *0902, *2703, *20012	0.89	0.94	0.056**	0.026	
Lucerna	30	17	*0701, *1501, *1101, *2301	0.90	0.92	0.039 ^{ns}	0.399	Hernández <i>et al.</i> , 2015
Holstein	30	14	*0701, *2701, *1201, *1101	0.90	0.92	0.041 ^{ns}	0.045	
Hartón del Valle	66	37	*1101, *20012, *2006, *2801	0.73	0.92	0.213**	0.001	Hernández <i>et al.</i> , 2011a
Hartón del Valle	99	24	*1101, *2703, *2006, *2801	0.97	0.94	-0.036	0.000	Giovambattista <i>et al.</i> , 2013
Yacumeño	113	36	*0701, *0902, *1801, *0201	0.92	0.95	0.034 ^{ns}	0.780	
Shorthorn Japonés	100	20	*1201, *0301, *0801, *1101	0.92	0.91	-0.009	0.095	
Negro Japonés	200	23	*1001, *1601, *1101, 1201	0.90	0.91	0.009 ^{ns}	0.362	Takeshima <i>et al.</i> , 2003
Jersey	69	14	*4501, *0201, *2502, *3701	0.91	0.89	0.030**	0.0005	
Holstein	102	18	*1101, *1201, *1501, *0101	0.92	0.90	-0.021 ^{ns}	0.358	
Hanwoo	359	39	*4301, *1558, *0701, *1601	---	0.90	---	---	Lee <i>et al.</i> , 2012

Tamaño de muestra= N; Número de alelos= Na; Heterocigocidad observada= Ho; Heterocigocidad esperada He; Coeficiente FIS= Valor P; Equilibrio de Hardy-Weinberg= EHW, Valor P; **= p<0.05; ns= no significativo.

Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) según las instrucciones del fabricante como control positivo en las reacciones de PCR. Así, el animal se determinó como infectado mediante la aparición de una banda de 174pb en el caso de *B. bigemina* y de 154pb para el caso de *B. bovis* en electroforesis de poliacrilamida al 8%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las secuencias del gen DRB3,2 fueron editadas usando el programa GENEIOUS 6,1 (Biomatters development team, USA) y alineadas usando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Los genotipos fueron determinados usando el programa ASSIGN 400ATF ver. 1.0.2.41 (Conexio Genomics, Fremantle, Australia).

Se calculó el número de Alelos (Na), sus frecuencias, la heterocigocidad observada (Ho) y esperada (He), el índice F_{IS} y las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) con los programas ARLEQUIN versión 3,5 (Excoffier and Lischer, 2010) y GENALEX versión 6,5 (Peakall and Smouse, 2012).

Se calculó el porcentaje de animales infectados con *B. bigemina* y *B. bovis* y se realizó una prueba de independencia de χ^2 entre la presencia de *Babesia* spp. y los alelos BoLA-DRB3,2. La asociación entre la presencia de *Babesia* spp. y los alelos del gen DRB3,2 se determinó con el Odds Ratio (OR) y un test exacto de Fischer para determinar la significancia del OR, utilizando el software SAS versión 9.1. Los alelos con asociación positiva se consideraron como resistentes (R) a la infección ($OR > 1$, $p < 0,05$), los alelos con asociación negativa se consideraron como susceptibles (S) a la infección ($OR < 1$, $p < 0,05$) y los demás alelos se consideraron como neutrales (N) ($OR \sim 1$, $p > 0,05$). Los individuos fueron categorizados según la clasificación dada a los alelos (N, R o S) que conforman el genotipo en: neutral/neutral (NN), neutral/resistente (NR), neutral/susceptible (NS), resistente/resistente (RR), resistente/susceptible (RS) y susceptible/susceptible (SS).

RESULTADOS

Ninguno de los animales fue positivo para *B. bovis* y por tanto no se realizaron análisis de asociación. Mientras que, el porcentaje de animales infectados con *B. bigemina* fue del 13,1%. Se encontraron 36 alelos BoLA-DRB3,2* las frecuencias se pueden detallar en

Tabla III. Alelos asociados significativamente ($p < 0,05$) con la resistencia y/o susceptibilidad a la infección con *B. bigemina* (Alleles associated significantly ($p < 0,05$) with resistance and/or susceptibility to infection with *B. bigemina*).

Alelo	Frecuencia	OR	IC (95%)	Categoría
*1101	0,196	9,1	5.100 – 11.10	R
*2006	0,058	5,4	2.300 – 12.60	R
*2703	0,058	0,2	0.001 - 0.95	S
*20012	0,097	7,2	3.400 – 9.00	R

Odds Ratio= OR; Intervalo de confianza al 95%= IC (95%); Resistente= R; Susceptible= S.

la **tabla I**. Los alelos con frecuencias mayores al 5% fueron el *1101 (0,196), *2006 (0,058), *2703 (0,058) y *20012 (0,097). La frecuencia acumulada de los 32 alelos restantes fue de 0,591. La heterocigocidad observada (Ho) fue menor que la heterocigocidad esperada (He) (**tabla II**), lo que se reflejó en un F_{IS} de 0,11 ($p < 0,05$) y en una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,001$).

La prueba de χ^2 entre la presencia de *B. bigemina* y los alelos BoLA-DRB3,2 indicó dependencia entre ambos ($p < 0,01$). En la **tabla III** se presentan los valores de OR de los alelos con asociación significativa. Se encontró una asociación positiva y significativa ($p < 0,001$) entre los alelos *1101, *2006 y *20012 con la ausencia de *B. bigemina* y se consideraron como alelos resistentes (R) a la infección. La frecuencia acumulada de los alelos R fue de 0,351. Por otro lado, el alelo *2703 presentó una asociación negativa ($p < 0,001$) y se consideró como alelo de susceptibilidad (S) a la infección con *B. bigemina*, la frecuencia del alelo S fue de 0,058. Los restantes 32 alelos no presentaron asociación significativa y fueron considerados como neutrales (N) a la infección con una frecuencia acumulada del 59,1%.

Los individuos con genotipo N/N fueron los más frecuentes (40,3%), seguido por los individuos con los genotipos heterocigotos N/R y N/S (30,4% y 7,3% respectivamente), el menor porcentaje de animales se encontró en la categoría R/S (1%), mientras que, el 19,4% y el 1,6% de los bovinos se clasificaron como homocigotos R/R y S/S respectivamente.

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de prevalencia de *B. bigemina* usando métodos moleculares y de asociación con factores genéticos en la raza Hartón del Valle y para Colombia.

Benavides *et al.* (2012) afirman que las regiones de Colombia por debajo de los 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) son las más afectadas por la *Babesia* spp. En el presente estudio no se encontraron animales infectados con *B. bovis* y solo el 13,1% animales presento infección con *B. bigemina*, todos los animales evaluados provienen de ganaderías ubicadas en el valle geográfico del río Cauca, en el departamento del Valle del Cauca, este valle se encuentra a una altura promedio de 1000 msnm. Usando metodologías diagnósticas basadas en serología para otras regiones de Colombia, los porcentajes de infección reportados son más altos que los aquí presentados. En el departamento de Córdoba (Colombia, 18 msnm) el porcentaje de animales infectados con *B. bovis* fue del 90,74%, 76,47% y de 71,95% en ganados *B. taurus*, mestizos y *B. indicus* respectivamente (Herrera *et al.*, 2008). En este mismo departamento Blanco *et al.* (2015) en bovinos de la raza Gyr reportan que el 3,05% animales es positivo para *Babesia* spp. Ríos *et al.* (2010), en ganaderías ubicadas en la región del Magdalena medio Colombiano (125 msnm) reportan una serorreactividad para *B. bovis* del 57,1% y para *B. bigemina* del 25,9%, sin relación estadística con la edad, sexo y hato.

Valores de seroprevalencia en otros lugares del mundo son de 86% para *B. bovis* y de 96% *B. bigemina* en Departamento de Santa Cruz de la Sierra Bolivia (León *et al.*, 2002). Regassa *et al.* (2003) al igual que en el presente reporte, no encontró animales positivos para *B. bovis*, mientras que el porcentaje de infección de *B. bigemina* varió con la edad, teniendo un promedio de 72,3%. En Brasil Mattos *et al.* (2015) reportan una presencia de *Babesia spp* del 52,5%.

Usando métodos de hibridación de ADN, García-Sanmartín *et al.* (2006) reportan la ausencia de animales infectados con *B. bigemina* y una infección 2,2% con *B. bovis*, resultado contrario a lo aquí presentado, mientras que, Altay *et al.* (2008) reportan una infección de 0,77% de *B. bigemina*.

Con métodos de detección de la infección a partir de PCR los reportes varían en comparación con los acá presentados, Chaudhry *et al.* (2010) reporta una infección del 11% para *B. bovis* y de 18% para *B. bigemina*, Bhat *et al.* (2015), reportan 7,35% de positivos para *B. bigemina*, mientras que, Laha *et al.* (2015) para esta misma especie reportan la infección en el 3,6% de los animales evaluados. Usando variantes de la PCR convencional, Bawm *et al.* (2016) usando la nPCR reporta infecciones de *B. bovis* y *B. bigemina* 17,1% y 9,8% respectivamente, y Buling *et al.* (2007) con una qPCR y reportan que de 20 animales expuestos a garrapatas ninguno fue positivo por PCR convencional a *B. bovis* y *B. bigemina*, pero con qPCR 3 fueron positivos para *B. bigemina*. En general, los reportes indican que los valores de prevalencia de *Babesia spp.* son menores cuando son utilizados métodos moleculares para el diagnóstico de infección en lugar de métodos serológicos, además, la prevalencia molecular de varió con respecto al método molecular usado (PCR, nPCR y qPCR) y a la raza evaluada.

Con referencia a los polimorfismos del gen BoLA-DRB3, estos ya han sido estudiados en la raza Hartón del Valle. En la **tabla II** se presentan los principales resultados usando la metodología de la PCR-SBT como método de genotipado. El presente trabajo muestra un alto número de alelos, solo superado por el reporte de

Hernández *et al.* (2011). Al igual que en otros tres reportes el alelo *1101 es el más frecuente, los alelos *2703 y *20012 también aparecen como de alta frecuencia en dos reportes. Solo para Giovambattista *et al.* (2013) el valor de la H_o superó levemente al de la H_e teniendo un valor negativo de F_{IS} y desviaciones significativas del EHW. Para los demás reportes la H_e fue mayor que la H_o y fue en promedio de 0,93, indicando alta diversidad genética para este locus, aunque, este exceso de animales heterocigotos llevó a desviaciones significativas en las proporciones teóricas de EHW y en valores positivos de F_{IS} . El valor F_{IS} acá reportado es menor que el presentado por Hernández *et al.* (2011) pero superior al de Hernández *et al.* (2015). Estas diferencias encontradas entre los reportes pueden ser explicadas por el número de fincas utilizadas para la colección de las muestras, pues Giovambattista *et al.* (2013) y Hernández *et al.* (2011) solo tienen animales de un hato, Hernández *et al.* (2015) muestreo en cuatro hatos, mientras que, los animales empleados para esta investigación provienen de 5 fincas. Estos valores de diversidad no son inesperados para genes *Clase II* de los genes BoLA, conociendo su importante función biológica en el organismo (Hernández *et al.* 2015).

En la **tabla IV**, se muestran algunos trabajos de asociación entre alelos DRB3 determinados por PCR-SBT y algunas enfermedades en el ganado bovino. Usando el método de genotipado de PCR-RFLP Duangjinda *et al.* (2013) reportan que los alelos asociados con resistencia a la infección con *B. bigemina* son el *10 y *51 y con *B. bovis* el *14 y que el alelo *20 se relacionan con susceptibilidad a *B. bigemina*, mientras que, los alelos *3 y *16 con susceptibilidad a *B. bovis*. Los métodos de genotipado (PCR-RFLP y PCR-SBT) para el gen DRB3, tiene influencias sobre el resultado de asociación, pues un mismo patrón de restricción por PCR-RFLP puede ser similar para varios alelos determinados por PCR-SBT (Hernández *et al.* 2011a). Así, por ejemplo, el patrón de restricción para el alelo *20 que fue asociado a S a la infección con *B. bigemina*, es similar para los alelos *2301, *2901 y *3601 determinados mediante PCR-SBT, de los cuales, los dos primeros no se encontraron en

Tabla IV. Reportes de asociación entre alelos BoLA-DRB3 y resistencia y/o susceptibilidad a diferentes enfermedades (Reports of association between alleles BoLA-DRB3 and resistance and/or susceptibility to different diseases).

Ganado	Enfermedad	Resistencia	Susceptibilidad	Referencias
Hartón del Valle	Infección con <i>B. bigemina</i>	*1101, *2006, *20012	*2703	Presente estudio
Hartón del Valle	Presencia del VLB	*1101, *2709, *20012	*1002, *25011	Hernández <i>et al.</i> , 2011b
Holstein Argentino	Carga proviral	*0902, *1701	*1501, *1503	Juliarena <i>et al.</i> , 2008
Negro Japonés	Carga proviral	*0902, *1101	*1601	Miyasaka <i>et al.</i> , 2013
Zebú	Anticuerpos contra Aftosa	*0201, *0801, *1501	*0701, *1103, *1101	Gowane <i>et al.</i> , 2013
Holstein	Mastitis (SCC)	*1101, *2703, *0101	*1201, *1501,	Yoshida <i>et al.</i> , 2012
<i>Bos indicus</i> <i>B. indicus</i> x Holstein	<i>Anaplasma</i> <i>Babesia bigemina</i> <i>Babesia bovis</i>	*14, *41/*10, *51/*14	*2/*20/*3, *16	Duangjinda <i>et al.</i> , 2013
Holstein x Eslovaca Manchada	Paratuberculosis	*1601, *1602, *0502, *0601	*1402, *1900, *0101, *1102	Rastislav <i>et al.</i> , 2012
Gyr	Resistencia a Garrapatas	*8, *16, *20, *27	---	Martinez <i>et al.</i> , 2006

este estudio y el último tuvo una frecuencia de 4,2% y con asociación *N*. De igual manera, las equivalencias de los alelos considerados como *R* a la infección con *B. bigemina*, son para el alelo *10 por PCR-RFLP los alelos *1601 y 1602 por PCR-SBT y para el alelo *51 por PCR-RFLP el *4201 por PCR-SBT. Tal como se puede evidenciar, los alelos con asociación significativa (*R* o *S*) a la infección con *B. bigemina* no concuerdan con la presente investigación. Otras razones por las cuales pueden variar estos resultados son: el tamaño de muestra utilizado, el método de diagnóstico empleado y el tipo racial evaluado.

La mayoría de los alelos tuvieron una asociación neutral a la infección y por tanto las frecuencias de los alelos *N* y genotipos *N/otro* fueron las más altas. Los alelos aquí considerados como *R* también han sido asociados con baja probabilidad de infección con el virus de la leucosis bovina (VLB), con disminución de la carga proviral del VLB y bajo conteo de células somáticas en leche (tabla IV). De forma particular, el alelo considerado *S* (*2703) a la infección con *B. bigemina* se asoció a bajo conteo de células somáticas en leche (tabla IV). La frecuencia de animales *N/R* (30,4%) fue más alta que los *R/R* (19,4%), estos resultados sugieren una posible ventaja del heterocigoto, pues estos genotipos son capaces de reconocer un amplio espectro de antígenos, aumentando así la eficiencia de estos individuos en comparación con los individuos homocigotos. Resultados similares de ventaja del heterocigoto son presentados para mastitis y carga proviral del virus de la leucosis bovina por Baxter *et al.*, 2008; Takeshima *et al.*, 2008 y Miyasaka *et al.*, 2013.

Otra posible explicación al fenómeno de estudio, indicaría que polimorfismos en la región regulatoria del gen DRB3 (Ripoli *et al.*, 2002) y no los polimorfismos en la región codificadora, pueden estar asociados con altos niveles de expresión de algunas variantes alélicas del gen DRB3, como se ha demostrado en otros genes y enfermedades (Konnai *et al.*, 2006). Otros autores aseguran que, más que los polimorfismos en el ADN del gen son los polimorfismos aminoacídicos en la proteína. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos, predichas a partir de las secuencias de ADN de los alelos *R*, muestran un motivo aminoacídico común entre ellos, de secuencia LFYS en las posiciones 25, 30, 31 y 56 de la cadena BoLA-DRβ, mientras que el alelo *S* tiene en estas mismas posiciones los aminoácidos FYTD.

Este trabajo se evidenció el efecto del gen DRB3 en la probabilidad de infección con *B. bigemina* en el ganado criollo Hartón del Valle, es el primer reporte de asociación usando el método de PCR-SBT para genotipar el gen DRB3.

CONCLUSIONES

No se encontraron animales infectados con *B. bovis*, y la prevalencia molecular para *B. bigemina* fue similar a otros reportes. Los valores de diversidad genética del gen DRB3 fueron similares a otros reportes existentes para la misma raza. Se logró asociar a los alelos *1101, *2006 y *20012 con la resistencia a la infección con *B. bigemina* y al alelo *2703 con la susceptibilidad. El

ganado criollo Hartón del Valle posee alta frecuencia acumulada de los alelos de resistencia. Los datos acá reportados pueden ser usados en planes de mejoramiento animal con el fin de aumentar la resistencia genética a la Babesiosis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, al grupo de Investigación en Recursos Zoogenéticos por la Cofinanciación de la Investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Altay, K.; Aydin, F.; Dumanli, N.; and Aktas, M. 2008. Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattle. *Vet Parasitol*, 158: 295-301.
- Bawm, S.; Htun, L.; Maw, N.; Ngwe, T.; Tosa, Y.; Kon, T.; Kaneko, C.; Nakao, R.; Sakurai, T.; Kato, H.; and Katakura, K. 2016. Molecular survey of Babesia infections in cattle from different areas of Myanmar. *Ticks Tick Borne Dis*, 7: 204-207.
- Baxter, R.; Hastings, N.; Law, A.; and Glass, E. 2008. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Anim Genet*, 39: 561-563.
- Bhat, S.; Singh, H.; Singh, N.; and Rath, S. 2015. Molecular detection of Babesia bigemina infection in apparently healthy cattle of central plain zone of Punjab. *J Parasit Dis*, 39: 649-653.
- Benavidez, L.; Polanco, N.; Vizcaino, O.; y Betancur, O. 2012. Hemoparasitos. *Carta Fedegan*, 128: 48-52.
- Blanco, R.; Cardona, J.; y Vargas, M. 2015. Prevalencia de parásitos hematópicos endoglobulares en bovinos Gyr puros en Córdoba, Colombia. *Rev Vet Med*, 31: 67-74.
- Bock, R.; Jackson, L.; and Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129: 247-269.
- Buling, A.; Criado-Fornelio, A.; Asenzo, G.; Benitez, D.; Barba-Carretero, J.; and Florin-Christensen, M. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of Babesia bovis and B. bigemina. *Vet Parasitol*, 147: 16-25.
- Castro, G.; Trujillo, E.; y Duran, C. 2006. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Rev Col Ciencias Pec*, 19: 270-279.
- Chaudhry, A.; Suleman, M.; Younus, M.; and Aslim, A. 2010. Molecular Detection of Babesia bigemina and Babesia bovis in Crossbred Carrier Cattle Through PCR. *Pakistan J Zool*, 42: 201-204.
- Cuetia, J.; Álvarez, L.; y Muñoz, J. 2012. Tipificación de las frecuencias de los genes calpaína, calpastatina y leptina en bovinos criollos Colombianos. *AICA*, 2: 231-234.
- Davies, C.; Andersson, L.; Mikko, S.; Ellis, S.; Henen, E.; and Lewin, H. 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim Genet*, 28: 159-168.
- Delgado, J.; Martínez, A.; Acosta, A.; Álvarez, L.; Armstrong, E.; Camacho, E.; Cañón, J.; Cortés, O.; Dunner, S.; Landi, V.; Marques, J.; Martín-Burriel, I.; Martínez, O.; Martínez, R.; Melucci, L.; Muñoz, J.; Penedo, M.; Postiglioni, A.; Quiróz, J.; Rodellar, C.; Sponenberg, P.; Uffo, O.; Ulloa-Arvizu, R.; Vega-Pla, J.L.; Villalobos, A.; Zambrano, D.; Zaragoza, P.; Gama, L.; and Ginja, C. 2012. Genetic characterization of latin-American creole cattle using microsatellite markers. *Anim Genet*, 43: 2-10.
- Do Nascimento, C.; Machado, M.; Martinez, M.; Barbosa da Silva, M.; Martins, M.; Campos, A.; Sousa, A.; Teodoro, R.; Verneque, R.; Facioni, S.; and Andrade D. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (Bos indicus). *Genet Mol Biol*, 29: 641-647.
- Duangjindaa, M.; Jindatajak, Y.; Tippong, W.; Sriwarothai, J.; Pattarajinda, V.; Katawatina, S.; and Boonkum, W. 2013. Association of

- BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. *Vet Parasitol*, 196: 314-320.
- EMBL-EBI. 2016. International Society for Animal Science. BoLA nomenclature Cattle. http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3. (20/05/2016).
- Excoffier, L.; and Lischer, H. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 10: 564-567.
- García-Sanmartín, J.; Nagore, D.; García-Pérez, A.; Juste, R.; and Hurtado, A. 2006. Molecular diagnosis of Theileria and Babesia species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res*, 2: 1-7.
- Giovambattista, G.; Takeshima S.; Ripoli, M.; Matsumoto, Y.; Franco, L.; Saito, H.; Onuma, M.; and Aida Y. 2013. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene*, 519: 150-158.
- Gowane, G.; Sharma, A.; Sankar, M.; Narayanan, K.; Das, B.; Subramaniam, S.; and Pattnaik, B. 2013. Association of BoLA DRB3 alleles with variability in immune response among the crossbred cattle vaccinated for foot-and-mouth disease (FMD). *Res Vet Sci*, 95: 156-163.
- Hernández, D.; Posso, A.; Benavides, J.; Muñoz, J.; Giovambattista, G.; y Álvarez, L. 2011a. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 en el ganado criollo Hartón del Valle por PCR-RFLP y PCR-SBT. *Rev Colomb Cien Pec*, 24:390-390.
- Hernández, D.; Posso, A.; Muñoz, J.; Giovambattista, G.; y Álvarez, L. 2011b. Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina. *AICA*, 1: 169-172.
- Hernández, D. 2013. Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina en infección natural. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Hernández, D.; Posso, A.; Muñoz, J.; Giovambattista, G.; y Álvarez, L. 2014. Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano. *Rev Colombiana Cienc Anim*, 6: 319-326.
- Hernández, D.; Muñoz, J.; and Alvarez, L. 2015. Genetic diversity of BoLA-DRB3 gene in Colombian creole Hartón del Valle cattle. *Rev CES Med Vet*, 10: 18-30.
- Herrera, M.; Soto, A.; Urrego, V.; Rivera, G.; Zapata, M.; y Ríos, L. 2008. Frecuencia de hemoparásitos en bovinos del bajo Cauca y alto San Jorge, 2000-2005. *Rev MVZ Córdoba*, 13: 1486-1494.
- Homer, M.; Aguilar-Delfin, I.; Telford, I.; Krause, P.; and Persing, D. 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 13: 451-469.
- Juliana, M.; Poli, M.; Sala, L.; Ceriani, C.; Gutierrez, S.; and Dolcini, G. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genetics*, 39: 432-438.
- Konnai, S.; Usui, T.; Ikeda, M.; Kohara, J.; Hirata, T.; Okada, K.; Ohashi, K.; and Onuma, M. 2006. Tumor necrosis factor- α genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemivirus-infection. *Microbes Infect*, 8: 2163-2171.
- Kim, C.; Iseki, H.; Herbas, M. S.; Yokoyama, N.; Suzuki, H.; Xuan, X.; Fujisaki, K.; and Igarashi, I. 2007. Development of Taqman-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg*, 77: 837-841.
- Machado, M.; Nascimento, C.; Martínez, M.; Silva, M.; Campos, A.; Teodoro, R.; Verneque, R.; e Guimarães, S. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 57: 380-389.
- Martínez, R.; Toro, R.; Montoya, F.; Burbano, M.; Tobon, J.; Gallego, J.; y Ariza, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch Zootec*, 54: 349-356.
- Martínez, M.; Machado, M.; Nascimento, C.; Silva, M.; Teodoro, R.; Furlong, J.; Prata, M.; Campo, A.; Guimarães, M.; Azevedo, A.; Pires, M.; and Verneque, R. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet Mol Res*, 5: 513-524.
- Mattos, P.; Rodrigues, F.; Melo, A.; e Frazao, E. 2015. Prevalência de *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale* em bovinos no município de Palma, MG. *Rev Bras Med Vet*, 37: 359-365.
- Mirsky, M.; Olmstead, C.; Da, Y.; and Lewin, H. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Anim Genetics*, 29: 245-252.
- Miyasaka T, Takeshima S.; Jimba, M.; Matsumoto, Y.; Kobayashi, N.; Matsushashi, T.; Sentsui, H.; and Aida, Y. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens*, 81: 72-82.
- Molloy, J.; Bock, R.; Templeton, J.; Bruyeres, A.; Bowles, P.; Blight, G.; and Jorgensen, W. 2001. Identification of antigenic differences that discriminate between cattle vaccinated with *Anaplasma central* and cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol*, 31: 179-186.
- Muñoz, F. 2005. Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) através da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.
- Oliveira-Sequeira, T.; Oliveira, M.; Araujo, J.; and Amarante, A. 2005. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol*, 35: 105-111.
- Oliveira, M.; Oliveira-Sequeira, T.; Regitano, L.; Alencar, M.; Néo, T.; Silva, A.; and Oliveira, H. 2008. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick. *Vet Parasitol*, 155: 281-286.
- Laha, R.; Mondal, B.; Kumar, S.; Chand, K.; Das, M.; Sarma, D.; Goswami, A.; and Sen, A. 2015. Detection of *Babesia bigemina* in cattle from north-eastern Indian by polymerase chain reaction and its genetic relatedness with other isolates. *Trop Anim Health Prod*, 47: 633-636.
- Lee, B.; Hur, T.; Jung, Y.; and Kim, H. 2012. Identification of BoLA-DRB3.2 alleles in Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein populations using a next generation sequencer. *Anim Genet*, 43: 438-441.
- León, A.; Riberca, C.; y Villegas, F. 2002. Detección de anticuerpos IgG contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en bovinos. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Peakall, R.; and Smouse, P. 2012. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Rastislav, M.; and Mangesh, B. 2012. BoLA-DRB3 exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle. *Vet J*, 192: 517-519.
- Regassa, A.; Penzhorn, B.; and Bryson, N. 2003. Attainment of endemic stability to *Babesia bigemina* in cattle on a South African ranch where non-intensive tick control was applied. *Vet Parasitol*, 116: 267-274.
- Ríos, L.; Zapata, R.; Reyes, J.; Mejía, J.; y Baena, A. 2010. Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. *Rev Cientí*, 20: 485-492.
- Ripoli, M.; Peral-García, P.; and Giovambattista, G. 2002. Nucleotide sequence of the upstream regulatory region of the BoLA-DRB. *Eur J Immunol*, 29: 537-540.
- Spickler, A. 2016. Bovine babesiosis. The center for food security and public health. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/factsheets.php>. (20/05/2016).
- Rosero, J.; Álvarez, L.; Muñoz, J.; Duran, C.; and Rodas, A. 2012. Allelic frequency of the Kappa-Casein gene in Colombian and creole cattle breeds. *Rev Colomb Cien Pec*, 25:173-182.
- Russell, G.; Smith, J.; and Oliver, R. 2004. Structure of the BoLA-DRB3 gene and promoter. *Eur J Immunogenet*, 31: 145-151.
- Takeshima, S.; Saitou, N.; Morita, M.; Inoko, H.; and Aida, Y. 2003. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene*, 316: 111-118.
- Takeshima, S.; and Aida, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *J Anim Sci*, 77: 138-150.

- Takeshima, S.; Matsumoto, Y.; Chen, J.; Yoshida, T.; Mukoyama, H.; and Aida, Y. 2008. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococci* and *Escherichia* species. *Tissue Antigens*, 72: 525-531.
- Takeshima, S.; Matsumoto, Y.; Miyasaka, T.; Arainga-Ramirez, M.; Saito, Onuma, M.; and Aida, Y. 2011. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens*, 78: 208-213.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729.
- Wilkowsky, S.; Moretta, R.; Mosqueda, J.; Gil, G.; Echaide, I.; Lia, V.; Falcon, A.; Christensen, M.; and Faber, M. 2009. A new set of molecular markers for genotyping of *Babesia bovis* isolates. *Vet Parasitol*, 161, 9-18.
- Xu, A.; van Eijk, M.; Park, C.; and Lewin, H. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol*, 151: 6977-6985.
- Yoshida, T.; Furuta, H.; Kondo, Y.; and Mukoyama, H. 2012. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim Sci J*, 83: 359-366.
- Zambrano, J.; Echeverri, J.; and López, A. 2014. Association of gene BoLA DRB3.2 with production traits in a dairy herd of Antioquia, Colombia. *Rev MVZ Córdoba*, 19: 4116-4129