

## Utilidad de las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en Ganado Bovino: Revisión Sistemática

Utility of molecular techniques applied to *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* diagnosis in cattle: Systematic Review

Natalia María Guevara A.<sup>\*</sup>, Lina María Rivas J.<sup>†</sup>, Leonardo Alberto Ríos O.<sup>‡</sup>

### RESUMEN

#### INTRODUCCIÓN

Existen numerosos métodos microscópicos, serológicos y moleculares para el diagnóstico de la babesiosis; sin embargo, las técnicas moleculares han ganado especial interés porque permiten la detección del material genético en bajas concentraciones, y en ocasiones, la discriminación de especie.

#### OBJETIVO

Describir la utilidad de las principales técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de infecciones por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura publicada entre 2006 y 2011 en las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Springer Link empleando los términos MeSH: *Polymerase Chain Reaction*, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, *Molecular Diagnostic Techniques*, *Western Blotting*, *Microarray Analysis*, *Cattle*, *Babesia* y *Babesia bovis*.

#### RESULTADOS

Se obtuvieron 299 artículos relacionados, de los cuales fueron seleccionados 28 de acuerdo con los criterios de inclusión. Las técnicas moleculares más empleadas fueron la PCR y sus variantes y el RLB; en menor proporción se emplearon el LAMP y el Western Blot. Se describe brevemente cada técnica, sus aplicaciones en el diagnóstico de infecciones por *B. bovis* y *B. bigemina* en bovinos y algunos aspectos a considerar para su correcta aplicación; así mismo, se analiza el marcador molecular, el método de extracción de ácidos nucleicos empleado y la discriminación geográfica del uso de las técnicas.

#### CONCLUSIONES

Las técnicas moleculares tienen la capacidad de detectar infecciones por *B. bovis* y *B. bigemina* con gran especificidad. Además, permite realizar estudios sobre la biología de los microorganismos, epidemiológicos, filogenéticos y de inmunización.

#### PALABRAS CLAVES

*Babesia*. Bovinos. Reacción en cadena de la polimerasa. Técnicas y procedimientos diagnósticos. Western Blotting.

<sup>\*</sup>Microbióloga y Bioanalista. Estudiante Maestría en Microbiología y Bioanálisis, énfasis Hematología. Universidad de Antioquia. <sup>†</sup>Microbióloga y Bioanalista. Estudiante Magíster en Ciencias Biológicas y Médicas Mención Microbiología. Universidad de Chile. Santiago-Chile. <sup>‡</sup>Profesor Asociado. Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. <sup>‡</sup>Contacto: [mleonardo@udea.edu.co](mailto:mleonardo@udea.edu.co) Recepción: 03-15-2012. Aceptación: 05-15-2012.

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Several microscopic, serological and molecular methods are available to diagnosis babesiosis; however, molecular techniques have gained special interest because they allow detection of genetic material at low concentrations, and sometimes it is possible to discriminate between species.

### OBJECTIVE

To describe the utility of the main molecular techniques applied to diagnosis of infections by *Babesia bovis* and *B. bigemina* in cattle.

### MATERIALS AND METHODS

We conducted a systematic review of literature published between 2006 and 2011 in Pubmed, ScienceDirect and Springer Link databases using MeSH terms: *Polymerase Chain Reaction*, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, *Molecular Diagnostic Techniques*, *Western Blotting*, *Microarray Analysis*, *Cattle*, *Babesia* and *Babesia bovis*.

### RESULTS

A total of 299 papers were obtained, 28 of them were selected according to the inclusion criteria. Molecular techniques used were PCR and its variants and RLB, to a lesser extent LAMP and Western Blot were used. A brief description of each technique, its application in the diagnosis of infections by *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle and some aspects to be considered for successful implementation were described; in addition, molecular markers, extraction methods of nucleic acids used and geographic discrimination in the use of the techniques were also described.

### CONCLUSIONS

Molecular techniques have the ability to detect infections by *B. bovis* and *B. bigemina* with high specificity. In addition, they allow performing studies on the biology of these microorganisms, as well as epidemiological, phylogenetic and immunization studies.

### KEY WORDS

*Babesia*. Western Blotting. Cattle. Diagnostic techniques and procedures. Polymerase chain reaction.

## INTRODUCCIÓN

*Babesia* sp. es un hemoparásito que afecta la producción ganadera en las regiones tropicales y subtropicales; la infección de bovinos se caracteriza por fiebre, anemia, hemoglobinuria e ictericia, produciendo altas tasas de morbilidad.<sup>1</sup> En las infecciones agudas con *B. bovis* se presentan altas tasas de mortalidad, por lo cual la detección temprana del parásito constituye un reto para el laboratorio clínico veterinario.<sup>1</sup>

En la actualidad, se dispone de numerosos métodos microscópicos, serológicos y moleculares para su diagnóstico. Los primeros identifican directamente los hemoparásitos en las muestras clínicas, los segundos detectan la respuesta humoral específica, mientras que las pruebas moleculares detectan el material genético.

El diagnóstico microscópico es un método económico y rápido, pero carece de la sensibilidad necesaria para la identificación de infecciones crónicas o con parasitemias muy bajas; además, en ocasiones se dificulta la diferenciación morfológica de las especies.<sup>2,3</sup> En contraste, las técnicas serológicas son apropiadas para el conocimiento de la distribución geográfica de la infección, permiten definir áreas endémicas, epidémicas o libres del parásito;<sup>2,4</sup> sin embargo, son incapaces de detectar infecciones en estadios tempranos y pueden presentarse reacciones cruzadas,<sup>5</sup> por lo que es necesario emplear otras pruebas para el diagnóstico precoz de esta enfermedad de alto impacto económico. Es por ello que las técnicas moleculares han ganado especial interés como herramientas diagnósticas efectivas, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la detección de pequeñas cantidades de ácidos nucleicos del parásito.<sup>2,6</sup>

El objetivo de esta revisión sistemática de la literatura fue describir la utilidad de las principales técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de infecciones por *B. bovis* y *B. bigemina* en bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó una investigación teórica bajo la metodología PICO donde la P corresponde con el diagnóstico de las infecciones por *babesias* bovinas, la I se correlaciona con las principales técnicas moleculares empleadas para el diagnóstico de la babesiosis bovina, la C se relaciona con la utilidad de dichas pruebas y la O es el resultado

de la revisión de la literatura científica sobre la utilidad de los técnicas moleculares en el diagnóstico.

La pregunta científica definida para la realización de la investigación fue ¿Cuál es la utilidad de las técnicas moleculares para el diagnóstico de infecciones por *B. bovis* y *B. bigemina*?

La selección de la literatura científica se realizó entre los años 2006 y 2011 en las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Springer Link. Se incluyeron los artículos científicos publicados en inglés y español en los cuales se describieran las técnicas moleculares y los procedimientos relacionados con su estandarización.

Se emplearon los términos MeSH (Medical Subject heading): *Polymerase Chain Reaction, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Molecular Diagnostic Techniques, Blotting Western, Microarray Analysis, Cattle, Babesia* y *Babesia bovis*.

Al realizar la búsqueda se obtuvieron 299 artículos relacionados con las palabras clave y se excluyeron aquellos artículos que empleaban técnicas moleculares para el diagnóstico en bovinos de otras especies de *Babesia* o en los que se evaluaba la infección en animales silvestres, los que hacían referencia a comparación de genomas sin una aplicación diagnóstica, y los artículos en los que sólo se realizaba detección en garrapatas o en cepas cultivadas sin incluir bovinos con infección natural; también se excluyeron aquellos artículos que hacían referencia a perfiles de expresión génica, y aquellos para evaluar efectividad posvacunación.

Teniendo en cuenta los anteriores criterios, se analizaron 28 artículos. Algunos describían más de una técnica molecular: 22 hicieron referencia a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) como método diagnóstico, 8 al RLB (del inglés *Reverse Line Blotting*), uno a la amplificación isotérmica (LAMP, del inglés *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) y otro al Western Blot (Tabla 1).

## RESULTADOS

### TÉCNICAS MOLECULARES

Entre las diversas técnicas moleculares que se emplearon en los estudios para el diagnóstico de infecciones bovinas por *B. bovis* y *B. bigemina* se destacaron la PCR y sus variantes<sup>7-28</sup> y el RLB,<sup>19, 21, 23, 29-33</sup> otras técnicas empleadas en menor proporción fueron la amplificación isotérmica o LAMP (del inglés, *Loop Mediated*

*Isothermal Amplification*),<sup>16</sup> y el Western Blot (WB).<sup>34</sup> A continuación, se presenta una breve descripción de cada técnica molecular incluida en la revisión, sus aplicaciones en el diagnóstico de infecciones bovinas por estos hemoparásitos y algunos aspectos que deben considerarse para su correcta aplicación.

- **PCR Convencional.** Permite la amplificación de una secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) específica en una muestra compleja de material genético a partir del uso de oligonucleótidos que flanquean la región de interés.<sup>35</sup>

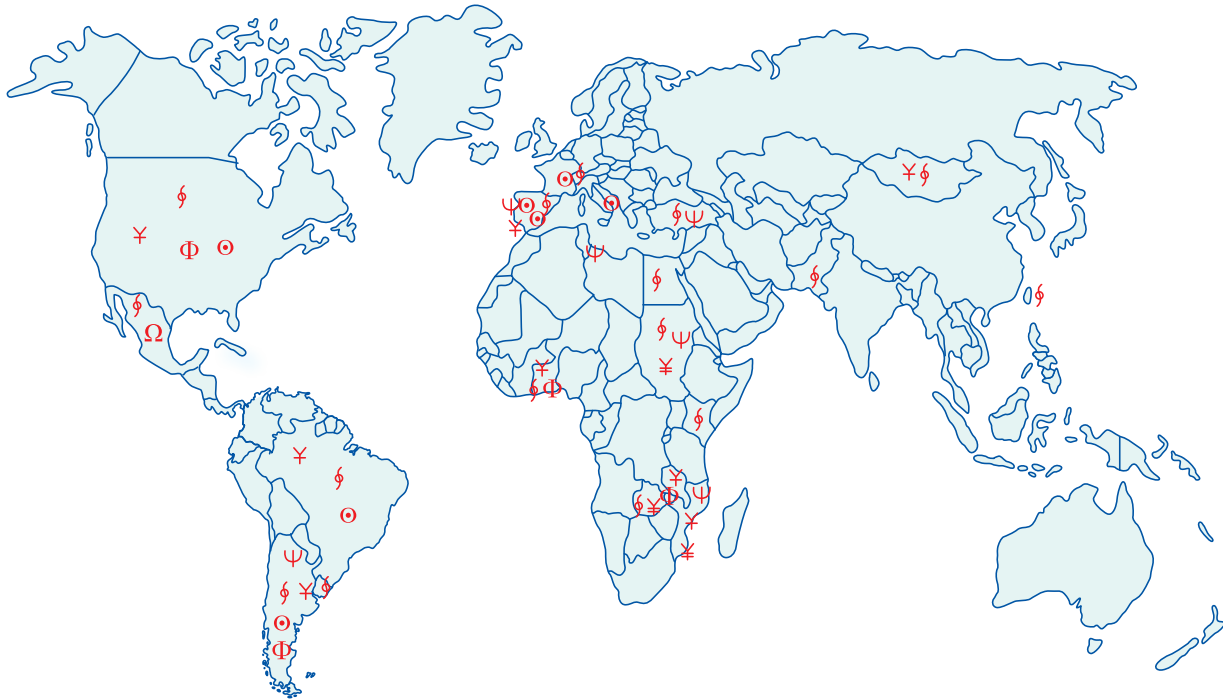
Esta técnica se ha empleado para el diagnóstico de especies de *Babesia* que infectan bovinos y la detección de cepas provenientes de diferentes regiones del mundo (Figura 1).<sup>7-9, 27</sup> Así mismo, se ha evaluado su uso con diferentes marcadores moleculares, entre los cuales se destacan genes que codifican para el RNA de subunidades ribosomales de *B. bovis* y *B. bigemina*,<sup>9,14,15,23</sup> así como el fragmento de restricción de SpeI-Aval, para esta última especie,<sup>20,26,28</sup> entre otros genes. En la Tabla 2 se presenta una descripción de las características de las técnicas diferentes técnicas moleculares que se evaluaron en cada estudio.

Con el propósito de mejorar el rendimiento, la especificidad o adaptarse a determinadas condiciones, han surgido numerosas modificaciones de la PCR convencional. A continuación se comentan las variantes que se emplearon en los estudios para el diagnóstico de la Babesiosis por *B. bovis* y *B. bigemina*.

- **PCR en Tiempo Real.** La principal característica de la técnica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en una muestra, para ello se realizan adaptaciones tales como el uso de fluorocromos y de sondas específicas durante el proceso de amplificación; el termociclador está conectado a un computador y el resultado se observa como una curva de amplificación en un software específico de cada equipo.<sup>36</sup> A partir de ésta se han detectado y cuantificado parasitemias de *B. bovis* amplificando los genes *msa2c*,<sup>22</sup> citocromo B<sup>12,13</sup> y 18S rRNA,<sup>17</sup> y para *B. bigemina* se han utilizado los genes citocromo B<sup>12,13</sup> y 18S rRNA.<sup>17</sup> Los sistemas que se emplearon para la cuantificación de los amplificadores fueron SYBR Green<sup>12,22</sup> y TaqMan.<sup>13,17</sup>

Tabla 1. Estudios incluidos.

Autores	Año	Base de datos	País de procedencia del ganado o las cepas	Técnicas moleculares	Especies de <i>Babesia</i>
AboutLaila y cols. <sup>7</sup>	2010	PubMed. Science Direct.	Ghana, Mongolia, Brasil	PCR convencional, PCR anidada	<i>B. bovis</i>
AboutLaila y cols. <sup>8</sup>	2010	PubMed Science Direct.	Ghana, Mongolia, Brasil	PCR convencional, PCR anidada	<i>B. bovis</i>
Adham y cols. <sup>9</sup>	2009	PubMed. SpringerLink.	Egipto, México	PCR convencional	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Altangerel y cols. <sup>10</sup>	2009	PubMed. SpringerLink.	Argentina, Ghana	PCR convencional	<i>B. bigemina</i>
Awad y cols. <sup>11</sup>	2011	PubMed. Science Direct.	Sudán	PCR convencional, PCR semianidada	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Bulling y cols. <sup>12</sup>	2007	PubMed. Science Direct.	Portugal, Argentina, España	PCR convencional, PCR en tiempo real	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Criado Fornelio y cols. <sup>13</sup>	2009	PubMed. Science Direct.	Portugal, Argentina, España, Brasil, Francia, Italia	PCR en tiempo real	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Durrani y cols. <sup>14</sup>	2008	PubMed. SpringerLink.	Pakistán	PCR convencional	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Hilpertshauer y cols. <sup>15</sup>	2007	PubMed. Science Direct.	Suiza, Italia, España, Turquía, México, Kenia	PCR convencional	<i>B. bigemina</i>
Iseki y cols. <sup>16</sup>	2007	PubMed. Science Direct.	Ghana, Zambia, Estados Unidos, Argentina	PCR convencional, PCR anidada, LAMP.	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Kim y cols. <sup>17</sup>	2007	PubMed.	Brasil, Estados Unidos, Argentina	PCR anidada, PCR en tiempo real	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Martins y cols. <sup>18</sup>	2008	PubMed.	Mozambique	PCR convencional, PCR anidada, PCR semianidada	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Martins y cols. <sup>19</sup>	2010	PubMed. Science Direct.	Mozambique	PCR convencional, PCR semianidada, RLB.	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Oliveira y cols. <sup>20</sup>	2008	PubMed. Science Direct.	Brasil	PCR convencional, PCR anidada	<i>B. bigemina</i>
Pettrigh y cols. <sup>21</sup>	2008	PubMed.	Argentina	PCR convencional, RLB	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Ramos y cols. <sup>22</sup>	2011	PubMed. Science Direct.	Brasil	PCR convencional, PCR en tiempo real	<i>B. bovis</i>
Salih y cols. <sup>23</sup>	2007	PubMed. SpringerLink.	Sudán	PCR convencional, RLB	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Silva y cols. <sup>24</sup>	2009	PubMed. Science Direct.	Portugal	PCR anidada	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Simuunza y cols. <sup>25</sup>	2011	PubMed. Science Direct.	Zambia	PCR semianidada	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Tsai y cols. <sup>26</sup>	2011	PubMed. Science Direct.	Taiwan	PCR convencional	<i>B. bigemina</i>
Wilkowsky y cols. <sup>27</sup>	2009	PubMed. Science Direct.	Argentina, Brasil, Uruguay, México, Estados Unidos	PCR convencional	<i>B. bovis</i>
Yamada y cols. <sup>28</sup>	2009	PubMed. Science Direct.	Zambia	PCR convencional	<i>B. bigemina</i>
Altay y cols. <sup>29</sup>	2008	PubMed. Science Direct.	Turquia	RLB	<i>B. bigemina</i>
García-Sanmartín y cols. <sup>30</sup>	2006	PubMed.	España	RLB	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
M'ghirbi y cols. <sup>31</sup>	2008	PubMed. SpringerLink.	Túnez	RLB	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Silva y cols. <sup>32</sup>	2010	PubMed. Science Direct.	Portugal	RLB	<i>B. bovis, B. bigemina</i>
Salih y cols. <sup>33</sup>	2010	PubMed.	Sudán	RLB	<i>B. bigemina</i>
Borgonio y cols. <sup>34</sup>	2008	PubMed.	México	Western Blot	<i>B. bovis</i>



Técnica molecular	Referencia	Símbolo
PCR convencional	AbouLaila y cols., <sup>7</sup> AbouLaila y cols., <sup>8</sup> Adham y cols., <sup>9</sup> Altangerel y cols., <sup>10</sup> Awad y cols., <sup>11</sup> Buling y cols., <sup>12</sup> Durrani y cols., <sup>14</sup> Hilpertshauer y cols., <sup>15</sup> Iseki y cols., <sup>16</sup> Martins y cols., <sup>18</sup> Martins y cols., <sup>19</sup> Oliveira y cols., <sup>20</sup> Petrigh y cols., <sup>21</sup> Ramos y cols., <sup>22</sup> Salih y cols., <sup>23</sup> Tsai y cols., <sup>26</sup> Wilkowsky y cols., <sup>27</sup> Yamada y cols. <sup>28</sup>	§
PCR anidada	AbouLaila y cols., <sup>7</sup> AbouLaila y cols., <sup>8</sup> Iseki y cols., <sup>16</sup> Kim y cols., <sup>17</sup> Martins y cols., <sup>18</sup> Oliveira y cols., <sup>20</sup> Simuunza y cols. <sup>25</sup>	¥
PCR semianidada	Awad y cols., <sup>11</sup> Martins y cols., <sup>18</sup> Martins y cols., <sup>19</sup> Simuunza y cols. <sup>25</sup>	¥
PCR en tiempo real	Buling y cols., <sup>12</sup> Criado-Fornelio y cols., <sup>13</sup> Kim y cols., <sup>17</sup> Ramos y cols., <sup>22</sup> Martins y cols., <sup>19</sup> Salih y cols., <sup>23</sup> Altay y cols., <sup>29</sup> García-Sanmartín y cols., <sup>30</sup> M'ghirbi y cols., <sup>31</sup> Silva y cols., <sup>32</sup> Salih y cols. <sup>33</sup>	⊙
Western blot	Borgonio y cols. <sup>34</sup>	Ω
LAMP	Iseki y cols. <sup>16</sup>	ψ

**Figura 1.** Ubicación geográfica de los estudios en los cuales se han empleado las técnicas moleculares de detección de *babesias* bovinas.

- PCR Anidada.** El objetivo de la PCR anidada es incrementar la especificidad y el límite de detección. La reacción comprende dos rondas de amplificación, cada una con diferentes pares de oligonucleótidos; el segundo par se unirá a una secuencia interna del producto amplificado en la primera reacción, obteniéndose productos de PCR más cortos, pero más específicos.<sup>37</sup> Esta técnica se ha evaluado para el diagnóstico de *B. bigemina* a partir de la amplificación del *B. bigemina*-rRAP-1/CT-STR<sup>24</sup>

y del fragmento de restricción Spel–Aval<sup>16,20</sup> y para *B. bovis* se ha evaluado la amplificación de los genes SBP2 (del inglés *Spherical Body Protein 2*), BV5650 y BV8970, RAP-1,<sup>7,8</sup> el fragmento recombinante *B. bovis*-rRAP-1/CT-STR<sup>24</sup> y otros.

Martins y cols., evaluaron la amplificación del fragmento de restricción Spel–Aval de *B. bigemina* y del fragmento 350 bp de *B. bovis*, empleando ADN polimerasa de inicio caliente (en inglés *Hot Start PCR*), con el objetivo de disminuir las amplifica-

**Tabla 2.** Técnicas moleculares empleadas y genes blanco utilizados para la amplificación de ácidos nucleicos de *B. bovis* y *B. bigemina*.

Técnica	Especie	Marcador molecular	Métodos de extracción	Autores
PCR convencional	<i>B. bovis</i>	SBP2, RAP-1 <sup>7</sup> BV5650 y BV8970 <sup>8</sup> , Gen SSrRNA <sup>9</sup> , Gen babesipsina <sup>11,18,19</sup> , Citocromo B <sup>12,22</sup> , Gen Subunidad ribosomal rRNA 18S <sup>12,23</sup> , Gen SSU-rRNA <sup>14</sup> , Apocitocromo B <sup>26</sup> , Minisatélites de p200, TRAP, desmoyokina, Bv80/Bb-1 y antígeno 3 <sup>27</sup> .	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>7,8,16</sup> , Wizard Genomic DNA Purification Kit <sup>9</sup> , Proteinasa K <sup>11,18,19,27</sup> , Qiagen Flexi Gene kit (QIAGEN) <sup>12</sup> , DNA Extraction Kit (PUREGENE®) <sup>14</sup> , SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd) <sup>16</sup> , Easy DNA kit (Invitrogen) <sup>22</sup> , DNeasy® Tissue kit (Qiagen) <sup>23,26</sup> .	AbouLaila y cols. <sup>7</sup> AbouLaila y cols. <sup>8</sup> Adham y cols. <sup>9</sup> Awad y cols. <sup>11</sup> Buling y cols. <sup>12</sup> Durrani y cols. <sup>14</sup> Iseki y cols. <sup>16</sup> Martins y cols. <sup>18</sup> Martins y cols. <sup>19</sup> Ramos y cols. <sup>22</sup> Salih y cols. <sup>23</sup> Tsai y cols. <sup>26</sup> Wilkowsky y cols. <sup>27</sup>
	<i>B. bigemina</i>	Gen SSrRNA <sup>9</sup> , Gen 200kDa <sup>10</sup> , Gen babesipsina <sup>11,18</sup> , Citocromo B <sup>12</sup> , Fragmento de restricción de Spel-AvaI <sup>20,26,28</sup> , Gen SSU rRNA <sup>14</sup> , Gen Subunidad ribosomal rRNA 18S <sup>12,15,23</sup> , Rap-1a.	Wizard Genomic DNA Purification Kit <sup>9,28</sup> , QIAamp DNA Blood Mini-Kit <sup>10,16</sup> , Proteinasa K <sup>11,18,19</sup> , Blood-spin kit (MOBIO) <sup>12</sup> , QIAGEN Flexi Gene kit (QIAGEN) <sup>12</sup> , DNA Extraction Kit (PUREGENE®) <sup>14</sup> , QiaampDNA blood kit (Qiagen) <sup>15</sup> , SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd) <sup>16</sup> , GFX™ kit (Genomic Blood DNA Purification kit, GE Health Care) <sup>20</sup> , DNeasy® Tissue kit (Qiagen) <sup>23,26</sup> .	Adham y cols. <sup>9</sup> Altangerel y cols. <sup>10</sup> Awad y cols. <sup>11</sup> Buling y cols. <sup>12</sup> Durrani y cols. <sup>14</sup> Hilpertshausen y cols. <sup>15</sup> Iseki y cols. <sup>16</sup> Martins y cols. <sup>18</sup> Martins y cols. <sup>19</sup> Oliveira y cols. <sup>20</sup> Petrigh y cols. <sup>21</sup> Salih y cols. <sup>23</sup> Tsai y cols. <sup>26</sup> Yamada y cols. <sup>28</sup>
PCR en tiempo real	<i>B. bovis</i>	Citocromo B <sup>12,13</sup> , Gen 18S rRNA <sup>12,17</sup> , msa2c <sup>22</sup> .	Blood-spin kit (MOBIO) <sup>12,13</sup> , QIAGEN Flexi Gene kit (QIAGEN) <sup>12,13</sup> , Blood Archive Pure Kit (5 Prime) <sup>13</sup> , GenElute Mammalian Genomic DNAMini-prep Kit (Sigma-Aldrich) <sup>13</sup> , Genomic DNA extraction Kit (Real Biotech) <sup>13</sup> , QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>17</sup> , Easy DNA kit (Invitrogen) <sup>22</sup> .	Buling y cols. <sup>12</sup> Criado-Fornelio y cols. <sup>13</sup> Kim y cols. <sup>17</sup> Ramos y cols. <sup>22</sup>
	<i>B. bigemina</i>	Citocromo B <sup>12,13</sup> , Gen 18S rRNA <sup>12,17</sup>	Blood-spin kit (MOBIO) <sup>12,13</sup> , QIAGEN Flexi Gene kit, (QIAGEN) <sup>12, 13</sup> , Blood Archive Pure Kit (5 Prime) <sup>13</sup> , GenElute Mammalian Genomic DNAMini-prep Kit (Sigma-Aldrich) <sup>13</sup> , Genomic DNA extraction Kit (Real Biotech) <sup>13</sup> , QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>17</sup> .	Buling y cols. <sup>12</sup> Criado-Fornelio y cols. <sup>13</sup> Kim y cols. <sup>17</sup>
PCR anidada	<i>B. bovis</i>	SBP2 y RAP-1, BV5650 y BV8970 <sup>7,8</sup> , Fragmento 291bp <sup>16,18</sup> , <i>B. bovis</i> -rap-1/CT-STR (24)	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>7,8,16,17</sup> , Proteinasa K <sup>18</sup> , Puregene DNA Purification System Blood Kit™ (Gentra/ Qiagen) <sup>24</sup> .	AbouLaila y cols. <sup>7,8</sup> Iseki y cols. <sup>16</sup> Kim y cols. <sup>17</sup> Martins y cols. <sup>18</sup> Silva y cols. <sup>24</sup>
	<i>B. bigemina</i>	Fragmento de restricción de Spel-AvaI <sup>16,18,20</sup> , <i>B. bigemina</i> -rap-1/CT-STR, Rap-1 <sup>24</sup> .	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>16,17</sup> , Proteinasa K <sup>18</sup> , GFX™ kit (Genomic Blood DNA Purification kit, GE Health Care) <sup>20</sup> , Puregene DNA Purification System Blood Kit™ (Gentra/ Qiagen) <sup>24</sup>	Iseki y cols. <sup>16</sup> Kim y cols. <sup>17</sup> Martins y cols. <sup>18</sup> Oliveira y cols. <sup>20</sup> Silva y cols. <sup>24</sup>

Continúa.

Continuación de la Tabla 2.

Técnica	Especie	Marcador molecular	Métodos de extracción	Autores
PCR semianidada	<i>B. bovis</i>	Gen babesipin <sup>11,18,19</sup> , Gen 16S rRNA <sup>25</sup> .	Proteinasa K <sup>11,18,19</sup> , Harris Micro-punchTM (Whatman) <sup>25</sup> .	Awad y cols., <sup>11</sup> Martins y cols., <sup>18,19</sup> Simuunza y cols. <sup>25</sup>
	<i>B. bigemina</i>	Gen babesipin <sup>11,18,19</sup> , Gen 16S rRNA <sup>25</sup> , Proteinasa K <sup>18,19</sup> .	Harris Micro-punchTM (Whatman) <sup>25</sup> .	Awad y cols., <sup>11</sup> Martins y cols., <sup>18,19</sup> Simuunza y cols. <sup>25</sup>
Amplificación isotérmica	<i>B. bovis</i>	Gen rap-1 <sup>16</sup>	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>16</sup> , SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd) <sup>16</sup> .	Iseki y cols. <sup>16</sup>
	<i>B. bigemina</i>	Gen rap-1 <sup>16</sup>	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) <sup>16</sup> , SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd) <sup>16</sup> .	Iseki y cols. <sup>16</sup>
RLB	<i>B. bovis</i>	Gen 18S rRNA <sup>19,23,30-32</sup>	Proteinasa K <sup>19</sup> , QIAamp DNA Mini kit DNeasy® Tissue kit (Qiagen) <sup>23</sup> , QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) <sup>30</sup> , QIAGEN Kit DNA <sup>31</sup> , PuregeneTM (Gentra/Qiagen) <sup>32</sup> .	Martins y cols., <sup>19</sup> Salih y cols., <sup>23</sup> García-Sanmartín y cols., <sup>30</sup> M'ghirbi y cols., <sup>31</sup> Silva y cols. <sup>32</sup>
	<i>B. bigemina</i>	Gen 18S rRNA (19, 21, 23, 29-33)	Proteinasa K <sup>19,29</sup> DNeasy® Tissue kit (Qiagen) <sup>23,33</sup> , (QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) <sup>30</sup> , QIAGEN Kit DNA <sup>31</sup> , PuregeneTM (Gentra/Qiagen) <sup>32</sup> .	Altay y cols., <sup>29</sup> García-Sanmartín y cols., <sup>30</sup> Martins y cols., <sup>19</sup> Salih y cols., <sup>23</sup> Petrigh y cols., <sup>21</sup> M'ghirbi y cols., <sup>31</sup> Silva y cols., <sup>32</sup> Salih y cols. <sup>33</sup>
Western Blot	<i>B. bovis</i>	MSA-1, MSA-2c <sup>34</sup>	Fenol cloroformo <sup>34</sup>	Borgonio y cols. <sup>34</sup>

ciones inespecíficas durante los primeros ciclos de la reacción.<sup>18</sup>

- **PCR Semianidada.** Es similar a la PCR anidada, sólo que en la segunda PCR uno de los oligonucleótidos fue empleado en la primera PCR.<sup>38</sup> Martins y cols.,<sup>18</sup> y Awad y cols.,<sup>11</sup> emplearon esta técnica con una ADN polimerasa de punto caliente para la amplificación de un fragmento del gen *Babesipina* de *B. bovis* y *B. bigemina* y para cada especie obtuvieron un amplificado de 275bp y 469bp, respectivamente.<sup>11,18</sup> Por su parte, Simuunza y cols., evaluaron la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 18S rRNA.<sup>25</sup>

Otras técnicas que se han empleado para el diagnóstico molecular de estas especies de *Babesia*, son:

- **Amplificación isotérmica - LAMP.** Es un método de amplificación de ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas con temperaturas promedio de 65°C, empleándose polimerasas con gran actividad de desplazamiento de cadena<sup>39,40</sup> y por lo tanto, no se utilizan termocicladores. Para llevar a cabo la reacción, se emplean múltiples juegos de oligonucleótidos y ello le confiere mayor especificidad a la reacción.<sup>39</sup> Esta técnica fue empleada por Iseki y cols., para el diagnóstico de *B. bovis* y *B. bigemina* a partir de la amplificación de secuencias específicas del Gen rap-1 de cada especie, y ella permitió el diagnóstico de ganado bovino naturalmente infectado en regiones de Ghana y Zambia.<sup>16</sup>
- **Reverse Line Blotting (RLB).** Este método combina la amplificación por PCR y la hibrida-

ción, para ello, se emplean oligonucleótidos de captura específicos (secuencias género-específicas y/o especie-específicas) covalentemente unidos a una membrana de nylon o nitrocelulosa y productos de PCR de la región de interés marcados con biotina. La hibridación se detecta por la adición de estreptavidina conjugada con una enzima y un sustrato colorimétrico.<sup>41</sup>

El marcador molecular empleado es la región hipervariable V4 de la subunidad 18S del rRNA, dado que combina tanto regiones conservadas entre especies que se amplifican por PCR como regiones variables para las cuales se diseñan sondas específicas para cada una de las especies que se desea identificar.<sup>29,31</sup> Todas las PCR de las muestras positivas hibridaron con la sonda género-específica, sin embargo, algunas de ellas no presentaron señal con sondas especie-específicas<sup>19,21</sup> y cuando se secuenciaron los fragmentos, se confirmaron los resultados obtenidos por RLB a través de BLAST con las secuencias disponibles en GenBank®.<sup>19,23,31</sup>

- **Western Blot.** Permite la identificación de una proteína específica presente en una mezcla compleja a través de la unión específica de un anticuerpo con la proteína a estudiar. Para ello, las muestras se someten a electroforesis en gel con SDS (Dodecilsulfato sódico), se transfieren a una membrana en donde se agrega ya sea un anticuerpo directamente marcado o dos, uno específico para la proteína y el otro marcado. La lectura se realiza evaluando la presencia de diferentes bandas en la membrana.<sup>35,37</sup> Borgoni y cols., en 2008 diseñaron un Western Blot para la identificación de MSA-1 y MSA-2c de *B. bovis*, lo aplicaron en cepas aisladas de diferentes regiones de México y observaron mayor conservación de la proteína MSA-2c entre los aislados.<sup>34</sup>

#### UTILIDAD DE LAS PRUEBAS MOLECULARES EN LA DETECCIÓN DE *BABESIAS* BOVINAS

En conjunto, los estudios de ADN y ARN son muy valiosos para la investigación biológica, gracias a que permiten detectar, identificar, caracterizar y/o cuantificar la carga parasitaria; así mismo, permiten la implementación de estrategias de control de infecciones.<sup>42</sup> En general, las técnicas moleculares que se incluyeron en esta revisión presentaron un buen desempeño para

el diagnóstico de infecciones en bovinos por *B. bovis* y *B. bigemina* y fueron más sensibles que los métodos microscópicos y serológicos,<sup>10,14,26</sup> tal como lo demostraron Durrani y cols.,<sup>14</sup> quienes encontraron que la PCR convencional tiene mayor sensibilidad, especificidad, valores pronósticos positivos y negativos que el examen microscópico de los frotis sanguíneos para el diagnóstico de hemoparásitos como *Babesia* spp.<sup>14</sup> Así mismo, Altangerel y cols.,<sup>10</sup> no obtuvieron positividad en ninguna muestra al analizar los frotis sanguíneos, mientras que el 61% y 62% fueron positivas por ELISA y por PCR, respectivamente. Entre las modalidades de PCR se observaron diferencias en los límites de detección, como otras diferencias que son inherentes a cada prueba.<sup>10</sup> En la Tabla 3 se resumen las principales utilidades de cada técnica molecular.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN DE LAS PRUEBAS Y POSIBILIDAD DE CUANTIFICACIÓN

Dada su gran capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, en los estudios se demostró que la PCR es capaz de detectar infecciones tempranas o que cursan con bajas parasitemias,<sup>9,10</sup> sin embargo, entre sus variantes pueden observarse diferencias en los límites de detección; por ejemplo, los de la PCR anidada son superiores a los de la PCR convencional<sup>17,20</sup> y a su vez los límites de detección de la amplificación isotérmica son superiores a los de la PCR anidada.<sup>16</sup>

De igual forma, se ha demostrado que el uso de RLB en el diagnóstico de estas infecciones es de gran ayuda para identificar pequeñas cantidades de ADN,<sup>23,29,31</sup> superando la sensibilidad del examen microscópico con un aumento entre el 15% y 50% del número de muestras positivas;<sup>23,30,31</sup> también supera la sensibilidad de pruebas serológicas<sup>33</sup> e incluso, de la PCR,<sup>21</sup> por lo que permiten identificar infecciones agudas, crónicas y el estado de portador.<sup>21,23,29-33</sup> En contraste, Silva y cols., sugieren que esta prueba no es lo suficientemente sensible para detectar bajas parasitemias de *B. bovis* y *B. bigemina*, ya que algunas muestras positivas por PCR anidada, resultaron negativas por RLB.<sup>32</sup>

#### CAPACIDAD DE DIFERENCIAR ENTRE ESPECIES EN UNA SOLA PRUEBA

La utilización de múltiples juegos de oligonucleótidos en la amplificación isotérmica y la posterior di-



**Tabla 3.** Utilidad de las técnicas moleculares.

Técnica	Ventajas	Autores
<b>PCR convencional</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mayor eficacia en detección de <i>Babesia</i> sp. en comparación con microscopía óptica.</li> <li>Permiten la detección de bajas parasitemias.</li> <li>Aplicable a cepas de diferentes regiones geográficas.</li> </ul>	Adham y cols., <sup>9</sup> Wilkowsky y cols., <sup>27</sup> AbouLaila y cols., <sup>7,8</sup> Salih y cols., <sup>23</sup> Durrani y cols. <sup>14</sup>
<b>PCR en tiempo real</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bajos porcentajes de variación intra ensayo e interensayo.</li> <li>Permite cuantificar las parasitemias.</li> <li>Permite el diagnóstico en animales que están iniciando la fase de la infección o en los animales portadores.</li> <li>Puede aplicarse para seguimiento clínico.</li> <li>Límite de detección menor que el de una PCR convencional.</li> </ul>	Buling y cols., <sup>12</sup> Criado-Fornelio y cols., <sup>13</sup> Kim y cols. <sup>17</sup>
<b>PCR anidada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Permiten la detección de bajas parasitemias.</li> <li>Permite el diagnóstico en animales que están iniciando la fase de la infección o en los animales portadores.</li> <li>Permite la detección del parásito en los primeros días después de la vacunación.</li> </ul>	AbouLaila y cols., <sup>7,8</sup> Silva y cols., <sup>24</sup> Petrigh y cols. <sup>21</sup>
<b>PCR semi anidada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mejora la detección de muestras positivas con respecto a la PCR convencional.</li> </ul>	Martins y cols. <sup>18,19</sup>
<b>Amplificación isotérmica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se requieren termocicladores.</li> <li>Visualización directa de los resultados.</li> <li>Límite de detección supera al de la PCR convencional.</li> </ul>	Iseki y cols. <sup>16</sup>
<b>RLB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mayor eficacia en detección de <i>Babesia</i> sp. en comparación con microscopía óptica, estudios serológicos y PCR.</li> <li>Permite el diagnóstico simultáneo de infecciones por varias especies de <i>Babesia</i>.</li> <li>Permite el diagnóstico de infecciones subclínicas.</li> <li>Útil para realizar estudios epidemiológicos.</li> </ul>	García-Sanmartín y cols., <sup>30</sup> M'ghirbi y cols., <sup>31</sup> Petrigh y cols., <sup>21</sup> Salih y cols., <sup>23,33</sup> Silva y cols. <sup>32</sup>
<b>Western Blot</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Permite realizar diagnóstico de especie a través de la identificación de un antígeno específico</li> </ul>	Borgonio y cols. <sup>34</sup>

gestión de los productos amplificados por enzimas de restricción, permiten la diferenciación entre *B. bovis* y *B. bigemina*.<sup>16</sup>

Por otra parte, los RLB se posicionan como una técnica de gran utilidad para detectar y discriminar entre especies de *Babesia* y de otros piroplasmas como *Theileria* spp y *Anaplasma* spp cuando se emplean diferentes sondas, además no se requiere la secuenciación de los productos y es posible distinguir la co-infección de una muestra por diferentes grupos genómicos.<sup>19,23,29-33</sup>

#### CONSIDERACIONES TÉCNICAS PARA LA APLICACIÓN DE LAS PRUEBAS MOLECULARES

Entre los inconvenientes de la aplicación de las técnicas moleculares se encuentran la dificultad para extraer los ácidos nucleicos de algunos sustratos, la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa y limitaciones para su aplicación en el campo.<sup>42</sup> La manipulación del ARN en particular presenta dificultades debido a que se degrada fácilmente por las RNasas presentes en la piel y por temperaturas superiores a 4°C.<sup>43</sup>

Uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional, la PCR anidada, dúplex y otras variantes, es que se requieren sistemas adicionales para visualizar la región amplificada, como lo son el equipamiento para la electroforesis en gel de agarosa y la cámara de luz UV;<sup>7,10</sup> además, se requiere el uso de agentes intercalantes de DNA para observar la reacción, uno de ellos es el bromuro de etidio, una sustancia tóxica y con efectos carcinogénicos.<sup>37</sup>

Así mismo, es necesaria la estandarización del procedimiento: las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos, la concentración de magnesio, las concentraciones de oligonucleótidos y otros parámetros para obtener el mejor rendimiento de estas pruebas moleculares.<sup>9,12</sup> Por ejemplo, Martins y cols.,<sup>18</sup> observaron que al amplificar el fragmento de restricción Spel–Aval para *B. bigemina* y el fragmento de 219 bp para *B. bovis* por PCR anidada, se obtenía amplificación tanto de las regiones de interés como de algunos fragmentos inespecíficos de igual peso molecular y si se reducía a la mitad el volumen de ácido nucleico molde que usaban para la reacción, se disminuía el porcentaje de amplificaciones inespecíficas.

Al comparar la PCR convencional con la PCR anidada, la primera tiene una gran ventaja en cuanto a tiempo y a costos,<sup>21</sup> aunque esta última tiene mayor especificidad y el límite de detección puede superar al de la primera, por lo que cada laboratorio clínico debe definir cuál de las dos va a implementar con base en las necesidades de la región.

En contraste, las amplificaciones isotérmicas no requieren equipamiento especial, dado que al emplear el sistema de polimerasa con gran actividad de desplazamiento de cadena, es innecesario el uso de termocicladores; además, gracias a su alta eficiencia en la amplificación, se produce un precipitado blanco al final de la reacción o se diseñan otros sistemas para visualizar el amplificado y no se requieren equipos adicionales como cámara de electroforesis para verificar si hubo amplificación, por lo cual se posiciona como una prueba simple, costo-efectiva y rápida.<sup>16</sup>

Para la aplicación del RLB, debe incluirse una sonda que reconozca el género del microorganismo y otra que sea especie-específica. En caso que no se identifique la especie, puede deberse a que no se incluya una sonda para esta, se trate de una especie no reconocida previamente, de un polimorfismo no caracterizado o de un animal con parasitemias tan bajas que

resultan indetectables por RLB;<sup>19,21,32</sup> por lo tanto, para instaurar esta técnica en una zona geográfica, deben conocerse las especies circulantes y, cuando se desee emplear para estudios epidemiológicos, se requiere el conocimiento previo de la diversidad genética de las cepas o el diseño de un estudio en el cual se evalúe dicha diversidad.

Entre las desventajas de la aplicación del Western Blot se encuentra su elevado costo económico, tiempo prolongado de procesamiento y la necesidad de personal adiestrado. Así mismo, se presenta variabilidad en la reactividad de las bandas, diferente valor pronóstico de las mismas y subjetividad en la lectura; en estos casos se recomienda realizar otra prueba como la PCR o repetir el ensayo en un mes, porque pueden estar generando reacciones cruzadas;<sup>44</sup> sin embargo, se requiere de más estudios en los cuales se evalúe esta técnica para poder determinar con mayor certeza las ventajas y desventajas de su aplicación para el diagnóstico de babesiosis bovina.

## DISCUSIÓN

La importancia de la implementación de técnicas con capacidad para identificar un bajo número de parásitos, radica en que son comunes las infecciones subclínicas, los portadores crónicos y las fluctuaciones en la parasitemia; por lo tanto, algunos de estos bovinos no reciben el tratamiento adecuado y se constituyen en una fuente de infección a través de las garrapatas, influyendo directamente en la epidemiología de la enfermedad.<sup>23,29</sup>

En este sentido, las técnicas moleculares son de especial interés para el diagnóstico veterinario, porque tienen la capacidad de detectar infecciones con bajas parasitemias, con una gran sensibilidad y especificidad. Su alto límite de detección permite identificar ácidos nucleicos en muestras muy diluidas, su especificidad permite distinguir entre organismos basándose en diferencias en sus genotipos, y desde el punto de vista de seguridad, no se requiere el aislamiento del agente infeccioso. Además, también se aplican en la investigación de la biología de los microorganismos, estudios epidemiológicos, filogenéticos, en el desarrollo de vacunas y en la evaluación de los animales después de la inmunización.<sup>42,45</sup>

La PCR es una técnica molecular ampliamente implementada en el campo investigativo y poco a poco

en el diagnóstico clínico. Su versatilidad, capacidad para amplificar genomas presentes en bajas concentraciones y los altos porcentajes de identidad de las regiones amplificadas,<sup>3,21</sup> han justificado el desarrollo de estudios para estandarizar los procedimientos, evaluar su desempeño y convertirla en una prueba diagnóstica rutinaria en los laboratorios clínicos veterinarios.

Es por ello, que se han evaluado variantes de la PCR para el diagnóstico de las *babesias* bovinas y se han observado diferencias entre ellas: la PCR anidada y la PCR semi anidada de inicio caliente (hot start) se caracterizan por presentar límites de detección superiores a la PCR convencional y a la hot start – PCR, respectivamente,<sup>7,18</sup> mientras que la PCR en tiempo real es la única que permite la cuantificación de las parasitemias.<sup>12</sup>

Por otra parte, el límite de detección puede verse afectado no sólo por la variante de PCR, sino por el marcador molecular que se amplifica. AbouilLaila y cols., en 2010, describieron que el límite de detección es superior cuando se amplifica la proteína SBP-2 que cuando se amplifica RAP-1, ya sea por PCR convencional o por PCR anidada,<sup>7</sup> situación similar a la que se presenta con los genes BV5650 y BV8970, siendo superior el límite de detección con BV5650.<sup>8</sup> De igual forma, el porcentaje de positividad de muestras sanguíneas bovinas varía según el gen que se amplifique;<sup>7</sup> por ejemplo, la positividad para *B. bovis* es mayor con SBP2 que con RAP-1.<sup>7</sup>

Para la PCR en tiempo real, el límite de detección también está influenciado por el marcador molecular. Bulíng y cols.; 2007, emplearon el gen de citocromo B en una PCR en tiempo real para diagnosticar *B. bovis* y *B. bigemina*,<sup>12</sup> dado que este gen posee mayor número de copias que los genes ribosomales<sup>46</sup> y observaron que mejoró el límite de detección de la prueba, por lo que se identificaron y cuantificaron parasitemias más bajas en comparación con el uso de genes ribosomales.<sup>12</sup>

Situaciones como las anteriormente descritas, reflejan que tanto el límite de detección, como la proporción de positividad en muestras de bovinos naturalmente infectados con *Babesia* spp., son aspectos que deben tenerse en cuenta al momento de seleccionar el marcador molecular, pues el número de copias del gen y la conservación de su identidad son aspectos propios de cada uno e influyen en la eficiencia diagnóstica de la prueba.

Dadas las implicaciones clínicas y epidemiológicas, no sólo debe identificarse la infección bovina por *Babe-*

*sia* sp.,<sup>14</sup> sino que debe diferenciarse entre especies, por lo cual se ha evaluado la capacidad de múltiples marcadores moleculares para discriminar correctamente entre *B. bovis* y *B. bigemina*. Los genes que se han identificado sólo en una especie constituyen una alternativa para tal fin, como el gen que codifica para la proteína SBP2 de *B. bovis*, para el cual se ha reportado un nivel de identidad de 100% con los genomas secuenciados de esta especie y no amplifica genomas de *B. bigemina*;<sup>7</sup> también se ha explorado el uso de otros genes como BV5650 y BV8970<sup>8</sup> por PCR convencional y PCR anidada y de minisatélites de p200, TRAP, desmoyokina, Bv80/Bb-1, Antígeno 3 por PCR convencional.<sup>27</sup>

Para lograr la diferenciación de especies, también se han evaluado secuencias génicas que varían entre ellas, como los genes que codifican para el RNA de las subunidades ribosomales pequeñas, que a su vez tienen una alta conservación de las secuencias entre cepas de la misma especie;<sup>9,14</sup> por ejemplo, las secuencias de RNA de subunidades ribosomales pequeñas amplificadas por Adham y cols., en 2009, presentaron una identidad superior al 90% con secuencias reportadas en GeneBank y otras bases de datos para *B. bovis* (códigos de acceso EF643472, EF601930, EF643474, AY150059 y EF643469), y del 100% en las secuencias de con las reportadas en GenBank y otras bases de datos para *B. bigemina* (códigos de acceso DQ785311, AY533147, DQ159075, DQ159074 y DQ159072).<sup>9</sup> Por lo tanto, la amplificación de regiones de los genes que codifican para el RNA ribosomal, no sólo permitiría el diagnóstico de la infección y diferenciación de especies, sino que podrían usarse para identificar especies en diferentes regiones geográficas;<sup>9</sup> sin embargo, algunos estudios han reportado polimorfismos en la secuencia ITS2 del 18SrRNA entre aislados de las mismas o de diferentes cepas de *B. bigemina*.<sup>15</sup> Es por ello, que si se toman estos genes como marcadores moleculares, debe analizarse cuidadosamente la secuencia de los oligonucleótidos que se van a emplear, la región que flanquean y la conservación de ésta entre cepas previamente secuenciadas.

Así mismo, la técnica de RLB ha demostrado su efectividad para la diferenciación entre especies de *Babesia* e incluso para la diferenciación simultánea de otros hemoparásitos que afectan al ganado bovino como *Theileria* spp y *Anaplasma* spp (19, 23, 29-32). En particular, García y cols.; 2010, identificaron ocho especies de *Babesia* y *Theileria* tanto en infecciones in-

dividuales como en infecciones mixtas, ya sea *Babesia/Babesia*, *Theileria/Theileria* o *Babesia/Theileria*.<sup>30</sup> Además, la aplicación de RLB permite identificar nuevas especies de *Babesia* a través de las sondas que han sido diseñadas para el género, gracias a que éstas garantizan la detección de una especie para la cual no se había incluido una sonda específica.<sup>29</sup> De forma contraria, la capacidad de detección de distintas especies de *Babesia* por la PCR y sus variantes, en general es limitada, dado que requieren de varias reacciones para detectar los agentes potencialmente presentes en una muestra.<sup>35</sup> Tal situación trae como consecuencia la necesidad de disponer de una cantidad considerable de ADN, aumentar la manipulación de las muestras y por lo tanto, el riesgo de contaminación.

A diferencia de los estudios anteriores, Wilkowsky y cols.; 2009, evaluaron por PCR convencional minisatélites de DNA de p200, TRAP, desmoyokina, Bv80/Bb-1, Antígeno 3, que amplifican específicamente genomas de *B. bovis*, pero que permiten la diferenciación de las cepas, a partir del análisis posterior de los polimorfismos de los amplificadores de cada cepa;<sup>27</sup> así como también analizaron por PCR y posteriormente con enzimas de restricción los genes *msa-2a* y *msa2b* de este parásito.<sup>47</sup> Es así como la selección del marcador molecular está influenciada no sólo por el interés en detectar la infección, sino por la posibilidad de realizar simultáneamente estudios filogenéticos con cepas aisladas de diferentes regiones geográficas.

Una técnica empleada con menor frecuencia para el diagnóstico de la babesiosis es el Western Blot, posiblemente por los costos que representa su implementación y por la disponibilidad de técnicas más simples, económicas y rápidas; sin embargo, ofrece un diagnóstico de especie basado en la identificación de bandas que corresponden a antígenos del parásito. No obstante, estudios previos han reportado reacciones cruzadas entre las especies por la presencia de epítopos comunes;<sup>34,48</sup> por lo tanto, deben estandarizarse los marcadores moleculares empleados para asegurar una reproducibilidad suficiente. Así mismo, un número mayor de estudios permitirían identificar y seleccionar marcadores conservados no sólo entre las diferentes especies de *Babesia* spp. sino también que permitan ser implementadas en ciertas regiones en particular.

Por otra parte, se ha incursionado con técnicas menos convencionales como la amplificación isotérmica.<sup>16,39,40</sup> Iseki y cols.; 2007, han demostrado que esta

técnica es promisorio como herramienta diagnóstica de infecciones por *B. bovis* y *B. bigemina*,<sup>16</sup> dado que es un método altamente específico al emplear varios juegos de oligonucleótidos, el límite de detección supera al de la PCR anidada, y además se destaca por características operativas como la necesidad de pocos equipos para realizarla y la rapidez en la obtención de resultados.<sup>16,39,40</sup>

Adicionalmente, se dispone de una gran diversidad de métodos para realizar la extracción y purificación de ácidos nucleicos, el objetivo de éstos es obtener material de forma simple, eficiente y de elevada pureza. Es importante tener en cuenta este aspecto en la aplicación de técnicas moleculares, debido a que variaciones en la eficiencia de la lisis, el rendimiento y la pureza del ADN o RNA pueden afectar los resultados.<sup>42</sup> En los artículos revisados, predomina el uso de kits comerciales para realizar la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, lo cual simplifica la extracción y permite recuperar de forma eficiente el material, con buen rendimiento y alta pureza; sin embargo, los costos son elevados y en ocasiones los resultados no son homogéneos,<sup>49</sup> por lo que es necesario establecer el sistema de extracción y purificación de ácidos nucleicos más adecuado de acuerdo con el tipo de muestra.

En el caso de los kits de pruebas moleculares comerciales, también debe evaluarse su desempeño antes de su implementación masiva. Es así, como Petrih y cols.; 2008, reportaron deficiencias en un kit comercial de RLB para detectar aislados argentinos de *B. bigemina*,<sup>21</sup> situación que evidencia la importancia de que en cada laboratorio se evalúen las pruebas disponibles en el mercado y seleccione la de mayor costo-efectividad.

El origen diverso de las muestras de bovinos analizadas en los artículos incluidos en la presente revisión se correlaciona con el hecho de que la babesiosis es un problema generalizado para la industria ganadera. Las muestras provenientes de países de nuestra región<sup>7,12-14,16,17,20-23</sup> permiten no sólo orientar la selección de marcadores moleculares conservados sino también el diseño de pruebas moleculares que faciliten la identificación específica de las especies que infectan en Suramérica.

Para finalizar, las aplicaciones de las técnicas moleculares van más allá del diagnóstico en bovinos,<sup>45, 47</sup> por lo que pueden emplearse para estudios filogenéticos y enzoóticos, estudios posteriores a la vacunación de hatos y por lo tanto, su estandarización e implementación abrirá nuevos horizontes en el panorama

clínico y epidemiológico. Así mismo, la aplicación de una técnica diagnóstica u otra va a depender de los objetivos del estudio, de la infraestructura que se disponga y de las condiciones del campo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W.** Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S247-69.
2. **Bose R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ.** Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol*. 1995;57(1-3):61-74.
3. **Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuno A, Estrada-Pena A, Gutierrez JF.** Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet Parasitol*. 2001;99(3):249-59.
4. **Domínguez-Alpizar J, Rodríguez-Vivas I, Oura C, Cob-Galera L.** Determinación de la especificidad y sensibilidad de las técnicas de Ensayo Inmunoenzimático indirecto y de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de *Babesia bovis*. *Rev Biomed*. 1995;6(1):17-23.
5. **Papadopoulos B, Brossard M, Perie NM.** Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 2. Piroplasms of cattle. *Vet Parasitol*. 1996;63(1-2):57-66.
6. **Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM.** Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol*. 1993;50(1-2):69-81.
7. **AbouLaila M, Yokoyama N, Igarashi I.** Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol*. 2010;169(1-2):45-50.
8. **AbouLaila M, Yokoyama N, Igarashi I.** Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Vet Parasitol*. 2010;172(1-2):65-70.
9. **Adham F, Abd-el-Samie E, Gabre R, el-Hussein H.** Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I--*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol Res*. 2009;105(3):721-30.
10. **Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, et al.** Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res*. 2009;105(1):249-54.
11. **Awad H, Antunes S, Galindo RC, do Rosário VE, de la Fuente J, Domingos A, et al.** Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Veterinary Parasitology*. 2011;In Press, Corrected Proof.
12. **Buling A, Criado-Fornelio A, Asenzo G, Benitez D, Barba-Carretero JC, Florin-Christensen M.** A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet Parasitol*. 2007;147(1-2):16-25.
13. **Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Benitez D, Florin-Christensen M, Gonzalez-Oliva A, et al.** Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasms. *Vet Parasitol*. 2009;162(3-4):200-6.
14. **Durrani A, Kamal N.** Identification of ticks and detection of blood protozoa in Friesian cattle by polymerase chain reaction test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan. *Trop Anim Health Prod*. 2008;40(6):441-7.
15. **Hilpertshauser H, Deplazes P, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mathis A.** Genotyping of *Babesia bigemina* from cattle from a non-endemic area (Switzerland). *Veterinary Parasitology*. 2007;145(1-2):59-64.
16. **Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekisoe OMM, Yokoyama N, Inoue N, et al.** Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;71(3):281-7.
17. **Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, et al.** Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(5):837-41.
18. **Martins T, Pedro O, Caldeira R, do Rosario V, Neves L, Domingos A.** Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. *Vet Parasitol*. 2008;153(3-4):225-30.
19. **Martins T, Neves L, Pedro O, Fafetine J, Do Rosario V, Domingos A.** Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. *Parasitology*. 2010;137(6):939-46.
20. **Oliveira MC, Oliveira-Sequeira TC, Regitano LC, Alencar MM, Neo TA, Silva AM, et al.** Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus tick. *Vet Parasitol*. 2008;155(3-4):281-6.
21. **Pettrigh R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Morretta R, Wilkowsky S, et al.** Improved molecular tools for detection of *Babesia bigemina*. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1149(1):155-7.
22. **Ramos CA, Araujo FR, Souza, II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, et al.** Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol*. 2011;176(1):79-83.

23. **Salih D, El Hussein A, Seitzer U, Ahmed J.** Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Parasitol Res.* 2007;101(4):1035-44.
24. **Silva M, Henriques G, Sanchez C, Marques P, Suarez C, Oliva A.** First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. *Vet Parasitol.* 2009;166(1-2):66-72.
25. **Simuunza M, Weir W, Courcier E, Tait A, Shiels B.** Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. *Vet Parasitol.* 2011;175(3-4):331-42.
26. **Tsai Y-L, Chomel BB, Chang C-C, Kass PH, Conrad PA, Chuang S-T.** Bartonella and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2011;34(2):179-87.
27. **Wilkowsky S, Moretta R, Mosqueda J, Gil G, Echaide I, Lia V, et al.** A new set of molecular markers for the genotyping of *Babesia bovis* isolates. *Vet Parasitol.* 2009;161(1-2):9-18.
28. **Yamada S, Konnai S, Imamura S, Simuunza M, Chembensofu M, Chota A, et al.** PCR-based detection of blood parasites in cattle and adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vet J.* 2009;182(2):352-5.
29. **Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M.** Molecular detection of Theileria and *Babesia* infections in cattle. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):295-301.
30. **García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez A, Juste R, Hurtado A.** Molecular diagnosis of Theileria and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res.* 2006;2(16):1-7.
31. **M'ghirbi Y, Hurtado A, Barandika J, Khlif K, Ketata Z, Bouattour A.** A molecular survey of Theileria and *Babesia* parasites in cattle, with a note on the distribution of ticks in Tunisia. *Parasitol Res* 2008;103(2):435-42.
32. **Silva M, Marques P, Oliva A.** Detection of *Babesia* and Theileria species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. *Veterinary Parasitology.* 2010;174(3-4):199-205.
33. **Salih D, El Hussein A, Ahmed J, Seitzer U.** Comparison between reverse line blot and enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of major tick-borne diseases of cattle in Southern Sudan. *Transbound Emerg Dis* 2010;57(1-2):61-2.
34. **Borgonio V, Mosqueda J, Genis A, Falcon A, Alvarez J, Camacho M, et al.** msa-1 and msa-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1149:145-8.
35. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Darnell J.** *Biología celular y molecular.* 5ª ed. Madrid: Panamericana; 2005.
36. **Karp G.** *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments.* 6ª ed. United States: John Wiley & Sons; 2010.
37. **A. LJyH.** *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud.* Elsevier, editor. Madrid: España; 2001.
38. **Walker J, Rapley R.** *Molecular biology and Biotechnology.* 5ª ed ed. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 2009.
39. **Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T.** Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(1):150-4.
40. **Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
41. **Gubbels J, de Vos A, van der Weide M, Viseras J, Schouls L, de Vries E, et al.** Simultaneous Detection of Bovine Theileria and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1782-9.
42. **Hunt P.** Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Vet Parasitol.* 2011;180(1-2):12-46.
43. **Sambrook D, Russell W.** *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* 3ª ed. United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
44. **U.S.** Preventive Services. *Guía de actividades preventivas en la práctica médica.* Madrid: Díaz de Santos; 1992.
45. **Costa-Junior LM, Rabelo EM, Martins Filho OA, Ribeiro MF.** Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Vet Parasitol.* 2006;139(1-3):231-6.
46. **Salem G, Liu X, Johnsrude J, Dame J, Roman Reddy G.** Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. *Mol Cell Probes.* 1999;13(2):107-13.
47. **Wilkowsky S, Farber M, Gil G, Echaide I, Mosqueda J, Alcaraz E, et al.** Molecular characterization of *babesia bovis* strains using PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the msa2-a/b genes. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1149:141-4.
48. **Edelhofer R, Müller A, Schuh M, Obritzhauser W, Kanout A.** Differentiation of *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* and *B. major* by Western blotting-first report of *B. bovis* in Austrian cattle. *Parasitol Res.* 2004;92(5):433-5.
49. **Greenspoon S, Scarpetta MA, Drayton M, Turek S.** QIAamp Spin Columns as a Method of DNA Isolation for Forensic Casework. *J Forensic Sci.* 1998;43(5):1024-30.