

ARTÍCULO RESEÑA

Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple

Ana María Bolívar^{1,*}

¹Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas «Jesús Moreno Rangel». Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Mérida-Venezuela.
Correo electrónico: ambolivar@hotmail.com; *Postgrado Biotecnología de Microorganismos. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Mérida-Venezuela.

RESUMEN: En la detección de algunos agentes hemáticos que comprometen la salud del ganado bovino, se emplean con mayor frecuencia, métodos parasitológicos directos y serológicos, muchas veces cuestionados dadas sus bajas especificidad y sensibilidad, adicional del tiempo consumido en la realización de los mismos. Por estas razones se discute en la presente reseña, las alternativas diagnósticas PCR y su variante múltiple como sistemas de detección alternativos con alto grado de confiabilidad y ahorros adicionales de tiempo y recursos en el entendimiento de la dinámica de infecciones hemotrópicas.

Palabras clave: diagnóstico, *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, PCR, PCR múltiple.

Methodology for the diagnosis of haemoparasites in the bovine livestock with emphasis on the polymerase chain reaction and its multiplex alternative

ABSTRACT: In the detection of some hematological agents that compromise the health of cattle, direct parasitological and serological methods have been more frequently used, very often questioned for their low specificity and sensitivity, in addition to the time spent in their performance. For these reasons, the diagnostic alternatives PCR and its multiplex variant are discussed in this review as alternative detection systems for their high degree of reliability, in addition to the time and resource saving for the understanding of the dynamics of haemoparasitic infections.

Key words: diagnosis, *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, PCR, multiplex PCR.

INTRODUCCION

Continúan siendo inestimables en regiones tropicales y subtropicales del mundo las pérdidas económicas en el sector pecuario debido a infecciones por hemoparásitos (1). A pesar de esta realidad, la detección de tales infecciones al presente, se basa fundamentalmente en criterios clínicos y métodos de diagnósticos clásicos cuyas fallas dificultan tener idea cierta de la prevalencia e incidencia reales de las dolencias ocasionadas en los rebaños (2,3). Lo anterior parecería justificar la necesidad de llevar a cabo estudios científicos de relevancia que permitan el desarrollo de nue-

vas metodologías cuyo producto coadyuve a un diagnóstico certero y efectivo de las infecciones referidas, superando la baja sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales empleados, (4,5) hecho que se logra en gran parte, mediante el desarrollo de investigaciones que emplean herramientas moleculares (4, 5, 6).

Resulta imprescindible entonces, sensibilizar sobre las problemáticas que estos agentes representan, y a las que pudiera dársele soluciones por la vía de la investigación científica, trabajando sobre una problemática real que se vive a diario en las explotaciones

ganaderas donde *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* pudieran constituir factores que interfirieran sobre el desarrollo ganadero, pretendiendo con la introducción de técnicas biotecnológicas, poner a disposición del productor, de herramientas científicas lo suficientemente sólidas como para responder a tales retos, ofreciendo la posibilidad de un diagnóstico certero, específico, altamente sensible y en corto tiempo (3).

En respuesta a estos desafíos, se presenta la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y su variante múltiple (PCR múltiple, PCR multiplex o mPCR) como técnica diagnóstica con alto grado de especificidad y sensibilidad, carente de interferencia diagnóstica como suele suceder cuando se aplican otros métodos, entre ellos los convencionales parasitológicos y/o serológicos.

PCR, PCR múltiple

La PCR descrita por Mullis en 1983, supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares (7). El método posee características especiales de sensibilidad, especificidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad que la hacen útil en identificación y diagnóstico. Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de subgénero, identificación de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual (3). El éxito de la técnica y la pulcritud de los resultados dependen en gran medida del cuidado que se tenga en evitar contaminación y en el seguimiento de recomendaciones (8).

Al presente, los protocolos de PCR convencional están bastante extendidos, sin embargo, existen numerosas variantes de la técnica original, algunas de las cuales han sido empleadas con éxito, entre ellas la PCR múltiple (multiplex PCR, mPCR), cuyo mayor atractivo se encuentra en la inclusión de una misma reacción, de diversos pares de *primers* que amplifican fragmentos diferentes de ADN. De esta forma se pueden detectar genes diversos de un mismo organismo (9) o detectar diferentes organismos al mismo tiempo (10). En la mPCR los *primers* deben tener una estabilidad térmica similar y puede ser necesario modificar algunas condiciones de la reacción para evitar interacciones entre los oligonucleótidos (11,12). En el campo veterinario, el ensayo múltiple de PCR se ha desarrollado con la finalidad de amplificar e identificar en una misma muestra, los microorganismos que con mayor frecuencia se encuentran infectando de forma concomitante al ganado principalmente de las regiones tropicales (13). Además de su uso en la detección de infecciones por género y especie, es útil en el

monitoreo de bovinos movilizados a una zona endémica y poder así detectar cuales animales necesitan tratamiento u otra medida preventiva a tiempo. La mPCR además, puede ser empleada en la caracterización de aislados; la identificación de cepas atenuadas (vacunales) o virulentas (de campo), la definición de cepas transmisibles o no transmisibles por un vector, entre otros; que encaminan a un mejor diagnóstico y como consecuencia, al establecimiento de mejores estrategias de control. También se discute que la caracterización de especies con marcadores moleculares puede ser el primer paso hacia la construcción de mejores herramientas diagnósticas (14,15).

Numerosos artículos científicos y manuales discuten en detalle las condiciones que influyen en la calidad de una PCR convencional (16), pero pocas son las que han señalado los factores experimentales y las dificultades que frecuentemente se observan con una mPCR. Especialmente importantes resultan las concentraciones relativas de los *primers*, taq polimerasa, temperaturas de hibridación y balance entre las concentraciones de MgCl₂ y deoxinucleótidos (11). De igual modo se discute la necesidad de formación técnica especializada y la inversión de tiempo para la planificación y optimización de protocolos necesarios en búsqueda de un correcto balance entre la amplificación de productos específicos y la reducción al mínimo de productos inespecíficos, tomando en consideración que un número mayor de *primers* secuestran componentes esenciales. Dados por estos factores, la sensibilidad del proceso pudiera verse comprometida cuando se aplica directamente a muestras biológicas, de allí que la efectividad depende en gran medida del trabajo con soluciones puras, situaciones que ha llevado a cuestionar en muchos investigadores la versatilidad de la técnica vs. su aparente simplicidad (17,18).

A pesar de estas consideraciones, hoy día la mPCR se presenta con una rentabilidad aceptable, mayor aun en situaciones que ameritan una interpretación diagnóstica especial y que permitan ampliar el conocimiento sobre infecciones mixtas o en situaciones que se requiera de estrategias rápidas, sensibles y específicas que favorezcan la toma de decisiones (10,19). Desde su introducción, ha facilitado el desarrollo de una gran cantidad de sistemas de detección para identificar bacterias, virus y parásitos de importancia médica (14). Al presente, variadas son las publicaciones que han reportado su uso para la detección de patógenos de interés veterinario (13,20) y muchos de estos ensayos son comparados con detecciones serológicas y/o parasitológicas que evidencian su mayor especificidad, sensibilidad y velocidad, ventajas

importantes que ofrece sobre los denominados métodos convencionales de diagnóstico (21).

Tomando en consideración lo expuesto, la presente reseña presenta investigaciones que han sido desarrolladas utilizando la PCR y su variante múltiple para el diagnóstico de *T. vivax*, *A. marginale*, *B. bigemina* y *B. bovis*, realizando comparación con los principales métodos de diagnóstico aun vigentes para cada microorganismo. De igual modo se reseñan aspectos ecoepidemiológicos que permitirán comprender la realidad de estas infecciones en las diferentes unidades de producción ganadera (casuística y limitaciones diagnósticas), situaciones válidas para justificar la necesidad de implementar nueva metodología diagnóstica que como la PCR en su variante múltiple, pueda dar soluciones, traduciendo a nivel de laboratorio en ahorro de tiempo y recursos, y a nivel de campo, de una mayor y mejor rapidez de la acción preventiva y/o implementación de estrategias de control.

T. vivax

A pesar de la amplia gama de hospedadores reportados (20) incluyendo equinos, bufalinos y ovinos (22, 23), es en el bovino donde el curso de la infección ha sido mayoritariamente estudiado fundamentado quizás en implicaciones económicas (24). Discutido es el hecho de que las lesiones así como los signos clínicos causados por este hemoflagelado son comunes a otras etiologías y frecuentemente la infección ocurre junto a otros patógenos, lo que complica el diagnóstico y aumenta las probabilidades de morbi-mortalidad (25, 26).

Un correcto tratamiento y estrategias de control adecuadas para proteger al ganado contra la tripanosomiasis dependen en gran medida de datos epidemiológicos confiables (26, 27, 28). Los medios más comunes para detectar infecciones por *T. vivax* incluyen los métodos parasitológicos y serológicos. Los primeros, confrontan como inconveniente principal la baja sensibilidad en la medida que la infección tiende a la cronicidad o la parasitemia se mantiene en bajos niveles (29), aunque también es importante mencionar el pleomorfismo observado en diversas áreas geográficas del mundo y para lo cual debe ser importante un observador experto (25, 26, 30). Unido a estas desventajas, se señala que en general, la detección de parásitos circulantes se realiza en frotis de sangre periférica, olvidándose de la fase subclínica o asintomática presente en algunos animales, donde los niveles de parasitemia además de no ser detectables en los mismos, tienen mayor predisposición a hallarse en nódulos linfáticos, mucosa ocular y fluido cerebroespinal (30). Por su parte, los métodos serológicos

presentan como principales deficiencias no poder discriminar entre infecciones recientes y pasadas y no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica como *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma theileri* y que con gran frecuencia se encuentran causando infecciones mixtas en áreas endémicas (30, 31, 32).

Diferentes secuencias de ADN y ARN han sido diseñadas a partir de aislados africanos y americanos de *T. vivax* a fin de obtener mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico (33), concediéndole un potencial adicional en la diferenciación de la tripanosomiasis animal causada por diversas especies. En este sentido, la PCR ha sido comparada con la microscopía convencional, donde ha logrado solventar el inconveniente de la variabilidad morfológica no coincidente con las formas típicas observadas en diversos ungulados, y, aumentando además, la posibilidad de detectar parásitos en animales con infecciones crónicas y en aquellos con infecciones recién adquiridas en los que los niveles de parasitemia se encuentran muy por debajo del límite de detección de los métodos parasitológicos (34, 35). Siendo quizás el inconveniente principal que la mayoría de los *primers* diseñados a partir de secuencias genómicas específicas de *T. vivax*, no han sido probados lo suficiente bajo condiciones de campo y diversidad de muestras biológicas, proponiéndose nuevas investigaciones que solventen esta situación, así como otras entre ellas la variabilidad intraespecífica (36, 37) mediante la síntesis de *primers* a partir de otras regiones del genoma del parásito (10, 20, 22, 35).

Diversos mPCR han sido desarrollados principalmente por su practicabilidad en el diagnóstico de infecciones por *Trypanosoma* en el continente africano, donde variadas son la especies (además de *T. vivax*) que infectan al ganado bovino. Sin embargo, la principal limitante en su aplicabilidad a nivel de campo lo constituye los problemas de sensibilidad, situación no observada con los PCR simples y que pudieran deberse a la naturaleza de los *primers* (uso de secuencias no conservadas en la síntesis de los mismos causantes de falsos positivos) y/o al número de copias amplificadas cuando son ensayados varios juegos de *primers* en una sola reacción (28). Para solventar en parte el problema de la sensibilidad de los mPCR, se han desarrollado técnicas de detección (post-PCR) por hibridación para cada uno de los microorganismos que se desean detectar (38) situación que pudiera influir de modo negativo en la practicabilidad y tiempo invertido en una reacción de PCR convencional al requerirse de infraestructura, reactivos y personal calificado adicional.

A. marginale

α -protobacteria causante de la condición patológica denominada anaplasmosis. En bovinos, la literatura también señala a *Anaplasma centrale* -descrito por vez primera en Sudáfrica y utilizado en el desarrollo de vacunas contra *A. marginale* en Europa, Australia y África- como patógeno en algunas zonas geográficas. En la actualidad es reconocida la diversidad genética de *A. marginale*, representado en diferencias a nivel de morfología, secuencia proteica, características antigénicas (39) y habilidad de infectar y ser transmitidos por garrapatas, conocimiento que contribuye en los campos de epidemiología y estrategias efectivas de control (40, 41).

A. marginale puede ser transmitido biológicamente por garrapatas (han sido incriminadas 14 especies diferentes) o mecánicamente en las piezas bucales de insectos hematófagos (entre ellos tábanos y mosquitos del género *Psorophora*) o por inoculación directa de eritrocitos infectados a animales susceptibles a través de agujas hipodérmicas contaminadas e instrumentos quirúrgicos (42) y, en algunos casos, por vía transplacentaria (43). Las pérdidas económicas causadas por la anaplasmosis son cuantiosas en la mayoría de los países afectados, atribuibles tanto a factores de morbilidad como de mortalidad (44).

En Venezuela la anaplasmosis se considera como una enfermedad parasitaria enzootica de amplia distribución, existiendo las condiciones edafoclimáticas para el desarrollo y evolución de sus vectores naturales en casi todas las regiones geográficas. En este sentido, el «status» epizootiológico de los rebaños puede variar desde una condición de inestabilidad enzoótica (bajo porcentaje de animales infectados con alta susceptibilidad a la infección clínica) hasta una condición de estabilidad enzoótica (alto porcentaje de animales infectados y baja susceptibilidad del rebaño a enfermar clínicamente) (44). En el occidente del país es común observar una prevalencia superior al 50% en extendidos sanguíneos teñidos por los métodos convencionales y asociaciones con *T. vivax* en el orden del 18%. En la mayoría de las fincas, los brotes se observan en situaciones de estrés debido a la falta de alimentos, pariciones o mal manejo sanitario (2).

El diagnóstico de *A. marginale* se realiza comúnmente estimando la parasitemia con extendidos sanguíneos teñidos con Giemsa, naranja de acridina o bromuro de etidio, métodos de gran utilidad en fase aguda de la enfermedad, donde una parasitemia alta es fácilmente detectable en los eritrocitos de los bovinos (45); entre los métodos serológicos, la inmunofluorescencia indirecta y los

ensayos inmunoenzimáticos utilizando la MSP-5 recombinante (una de las seis proteínas mayoritarias de superficie altamente conservada e inmunogénica en todas las cepas conocidas de *A. marginale*, *A. centrale* y *Anaplasma ovis*) son de uso rutinario en algunos laboratorios de diagnóstico dependientes de universidades, donde pueden ser usadas en los programas de erradicación y regulación de movilización de animales además de que facilitan las investigaciones epidemiológicas (46, 47). A pesar del empleo de estos métodos en la detección de *A. marginale*, el diagnóstico se dificulta por la baja sensibilidad y especificidad que algunas de estas técnicas presentan, situación demostrada con el desarrollo de la PCR y las sondas de ácidos nucleicos ADN y/o ARN (48, 49). En tal sentido a nivel experimental, se ha comprobado la efectividad de un sistema de PCR múltiple para diagnóstico de *A. marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *T. vivax* y *Trypanosoma evansi* (2), mientras que otros se han utilizado para la detección de *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale* reportando sensibilidades de 0,00001%, 0,00001% y 0,0001% respectivamente a nivel de campo (50).

Las aplicaciones de las técnicas moleculares permiten avances significativos no sólo en el diagnóstico de *A. marginale* y su asociación con otras infecciones, sino en estudios que apuntan hacia otras áreas de conocimiento. Ensayos de PCR simple (51) empleando los *primers* BAP-2 y AL34S que amplifican un fragmento de 409pb sintetizados a partir del gen *mSP1 β* del aislado *A. marginale*-Florida, han servido para determinar la presencia de este microorganismo en la hemolinfa y en la saliva de *Dermacentor andersoni* demostrando así, tanto la participación de la garrapata como vector y la vía de transmisión (51). De igual modo, en el continente africano, diversas investigaciones empleando herramientas moleculares comprueban el rol de diversas especies de garrapatas en la transmisión de este patógeno (52).

La PCR ha sido de gran utilidad para la identificación de *Anaplasma* spp. a partir de muestras sanguíneas utilizando *primers* sintetizados a partir de la región altamente conservada 16S (45), y también para la diferenciación de especies especialmente en rumiantes salvajes, para la diferenciación de las infecciones naturales entre *A. marginale* y las vacunaciones con *A. centrale* (21) y en la identificación de especies en zonas geográficas particulares (53), algunos de los cuales han sugerido que *A. ovis* y *A. phagocytophilum* (que afectan a ovinos y rumiantes respectivamente) pertenezcan a la misma especie de *A. marginale* (21).

Los más recientes avances en biología molecular de *A. marginale* se han producido con el empleo de la PCR en tiempo real o nPCR (nested PCR o PCR ani-

dada). La primera ha permitido cuantificar el número de microorganismos en las glándulas salivares de algunos de sus vectores durante la fase de alimentación-transmisión (48), así como la detección en sangre de diferentes reservorios (54) evidenciando una gran especificidad al impedir reacciones cruzadas con otros hemoparásitos y una mayor ventaja cuando se compara con PCR convencional o frotis sanguíneo (54,55). Mientras que la segunda ha sido capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mL de sangre, lo que corresponde a un aumento de 10 a 100 veces la sensibilidad con relación a la PCR simple, sondas de ARN o hibridaciones que han sido descritas (46). Sea cual fuere la variante de PCR utilizada, debido a su alta sensibilidad y especificidad, ésta puede ser utilizada como herramienta confiable para validar otras técnicas de diagnóstico, expedición de certificados para exportación de animales o estudios epizootiológicos (54, 55, 56, 57).

B. bigemina* / *B. bovis

Son los nombres con los que se designan a los agentes causales de la enfermedad parasitaria en bovinos conocida comúnmente como babesiosis, fiebre de garrapatas, fiebre de Texas, tristeza bovina, agua roja, malaria bovina o piroplasmosis. Es válido reconocer la existencia de otras especies que afectan a los bovinos en áreas geográficas diferentes al continente americano: *Babesia divergens*, *Babesia major*, *Babesia beliceri*, *Babesia ovata* y *Babesia occultans*, siendo las características históricas, morfológicas y serológicas la principal diferenciación entre ellas (53, 58).

B. bovis a diferencia de *B. bigemina* es escaso en sangre periférica y se ubica de preferencia en capilares de órganos como el cerebro, riñón, hígado y bazo. Ambos son transmitidos principalmente por la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aunque en Venezuela también ha sido incriminada *Amblyoma cajennense*. En *R. microplus* se ha demostrado que ocurre transmisión transovárica, que ha permitido la amplia diseminación de estos hemoparásitos a nivel mundial (59). La situación epizootiológica para estos agentes es variable debido a diferentes prácticas de manejo, condiciones geográficas y manejo del vector, y en general son escasas o nulas las medidas de control inmunoproláctico (2).

La toma de una muestra sanguínea de calidad, venosa (yugular o coccígea) o capilar (oreja, punta de la cola) es crucial para iniciar el diagnóstico de laboratorio de infecciones por *Babesia* en el cual, tradicionalmente se ha aconsejado la coloración con Giemsa en frotis delgados para la visualización de posibles eritrocitos infectados. También ha sido señalada con

buenos resultados, la coloración con naranja de acridina, altamente sensible que colorea los ácidos nucleicos (60) apareciendo las babesias de color naranja brillante con algunas tonalidades verdes y los eritrocitos de color verde siendo su desventaja, la necesaria disponibilidad de un microscopio de luz ultravioleta. En general, estas técnicas son útiles en fase aguda donde la identificación del agente causal es posible. Los métodos serológicos han sido potencialmente útiles para la detección de portadores asintomáticos (infecciones subclínicas), lo que resulta de utilidad en estudios epidemiológicos y evaluación del estado enzoótico de los rebaños. Entre las técnicas serológicas que han sido empleadas en el diagnóstico de la babesiosis se citan fijación del complemento, con buena sensibilidad y especificidad durante los periodos de infección activa y de recuperación pero cuestionada para la detección de portadores; la difusión en gel, solo reportada en estudios epidemiológicos de campo; la aglutinación, probada en sistemas de hemoaglutinación, aglutinación en capilares, láminas, tarjetas y látex, ventajosas por su rapidez, sensibilidad y disponibilidad de uso en campo; la inmunofluorescencia indirecta de amplia difusión y utilización para la evaluación de los rebaños debido a su sensibilidad y facilidad para analizar gran cantidad de muestras; la técnica de ELISA de fácil manejo, uso de equipos no costosos y reactivos estables. Variantes de esta técnica empleadas con buen resultado son el dot-ELISA y la SELISA (58, 61). El principal problema con este conjunto de técnicas serológicas radica en el hecho de que en países donde se inmunizan los rebaños, el aumento de anticuerpos producto de este control, puede confundir el diagnóstico (14). Para solventar en parte este inconveniente, se presentan las técnicas moleculares, desarrolladas cada día con mayor sensibilidad y especificidad, y empleadas para el diagnóstico de *Babesia* a nivel de género y especie, no solo en el bovino sino también en el vector, siendo además de utilidad para la identificación y correlación de la virulencia entre diferentes aislados (14, 58).

Los ensayos de PCR múltiple en el campo veterinario, inicialmente fueron descritos para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* (50). En esta técnica, la eficiencia de numerosos juegos de *primers* desarrollados depende en gran medida del uso de secuencias conservadas (21,62). Entre los protocolos múltiples para el diagnóstico simultáneo de infecciones mixtas que incluyan a *Babesia*, se citan la detección en bovinos de *A. marginale*, *T. evansi*, *B. bovis*, *B. bigemina* y *Theileria* sp. siendo de gran ayuda en estudios epidemiológicos, ya que permite la disminución en el requerimiento de costos, tiempo y personal (59). Los

primers BiA/BiB y BoF/BoR (50) ensayados a nivel de campo han evidenciado una alta prevalencia de bovinos infectados con *B. bigemina* y *B. bovis*, así como la identificación de infecciones subclínicas y crónicas. Este mismo juego de *primers* así como otros sintetizados a partir de diferentes regiones del parásito han sido utilizados para el diagnóstico de infecciones en el vector *R. microplus* contribuyendo al mejor entendimiento de la verdadera epidemiología de la infección (63,64,65,66).

Pese a lo anteriormente señalado, en el diagnóstico de estos agentes, la tecnología nPCR pareciera ser de mayor valía (65,67) y la mayor prevalencia en algunas áreas geográficas se justificaría por la mayor sensibilidad de esta variante en comparación a PCR convencionales o mPCR (15,68). En tal sentido utilizando juegos de *primers* específicos a nivel de especie sintetizados para ampliar la región ITS, ha permitido detectar prevalencias de 21% y 12% respectivamente para *B. bigemina* y *B. bovis* con 6,5% de infección mixta (69).

El concepto de PCR en tiempo real también ha sido aprovechado en el diagnóstico de *Anaplasma* y *Babesia* en ensayos ejecutados para estudios de expresión del gen (21) y aplicaciones diagnósticas (57)

CONCLUSIÓN

El problema que supone la detección de algunos agentes infecciosos que comprometen la salud del rebaño bovino pudiera encontrar solución mediante la herramienta diagnóstica PCR, aun más atrayente en su variante múltiple, al permitir la detección en un solo ensayo, de patógenos de variadas etiologías, salvaguardando esfuerzos y tiempos considerables y favoreciendo la actuación preventiva y/o curativa adecuada y oportuna. A pesar de que en algunos casos son necesarias modificaciones a la metodología original a fin de incrementar la rentabilidad, no hay duda que un sistema que permita en un solo paso la detección de patógenos como *T. vivax*, *A. marginale* y *Babesia* spp. a partir de diferentes muestras biológicas, resultaría la meta más esperanzadora en el campo diagnóstico.

REFERENCIAS

- Márquez-Quivera N. Principales enfermedades del bovino en Venezuela y su control preventivo. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay. 2000;1-12.
- Rey C. Hemoparasitosis en América Latina: El caso Venezuela. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe. RedEctopar. 2004;1-5.
- Añez N, Cristante G, Bolívar AM, Añez-Rojas N. Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos. Taller Teórico Práctico. UNESUR. Santa Bárbara del Zulia. 2007;1-29.
- García H, Mendoza-León A. Diagnóstico molecular en protozoarios Kinetoplastida. Principios y aplicaciones. Rev Fac Cs Vets. 2000;41:109-130.
- Tamasaukas R, Aguirre A, Ron J, Roa N, Cobo M. Tetralogía hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del Municipio Santa Rita Estado Guárico, Venezuela. Rev Fac Cs Vet. 2000;41:101-108.
- Medellín-Ledezma J. Manejo y control de las principales enfermedades bacterianas y por hemoparásitos en sistemas de producción de bovinos y pequeños rumiantes en Tamaulipas. Laboratorio de diagnóstico clínico de grandes especies. Facultad de medicina veterinaria. 2002.
- Lejona S, Benetti M, Fay F, Fay O. Avances en el diagnóstico molecular: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio 2006; XIV: 033-037.
- Guevara P. Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. Red de Innovación Tecnológica IDMM. 2004; 1-102.
- Liguori G, Gallé F, Lucariello A, Di Onofrio V, Albano L, Mazzarella G, D'Amora M, Rossano F. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. New Microbiol. 2010;33:63-67.
- Nakayima J, Nakao R, Alhassan A, Mahama C, Afakye K, Sugimoto C. Molecular epidemiological studies on animal trypanosomiasis in Ghana. Parasit Vectors. 2012;5:217.
- Henegariu O, Heerema N, Dlouhy S, Vance G, Vogh P. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. Bio Techniques. 1997;23:504-511.
- Hernández-Hernández F, Rodríguez M. Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Salud Pública Mex. 2009;51(3):s424-s438.

13. Leal D, Madruga C, Matos P, Souza B, Franke C. Evaluation of PCR and multiplex PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*. *Pesq Vet Bras*. 2011;31(7):575-578.
14. Figueroa JV, Álvarez JA. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*. 2003;9(4):75-104.
15. 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;939-946.
16. Biotecnología para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008; Capítulo 1.1.7:1-26.
17. Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, Klapper P. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):559-70.
18. Méndez-Alvarez S, Pérez-Rotha, E. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(3):18-92.
19. Rodríguez-Preval N, Fernández-Molina C, Rodríguez I, Berdasquera D, Rivera-Tapia J. PCR-multiple para el diagnóstico de *Mycoplasma geniculatum*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2007; 24(2):152-156.
20. Anderson N, Mubanga J, Fevre E, Picozzi K, Eisler M, Thomas S, Welbum S. Characterisation of the wildlife reservoir community for human and animal trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1211.
21. Lew A, Jorgensen W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *Afr J Biotechnol*. 2005;4(4):292-302.
22. García H, Rangel-Rivas A, Contreras I, García M, García F, Perrone T. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. *Rev Cs FCV-LUZ*. 2009;19(3):203-237.
23. Da Silva A, García H, Costa M, França R, De Gasperi D, Zanette R, Amado J, Lopes S, Teixeira M, Monteiro S. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitol Res*. 2010;2036-2042.
24. Guillén A, León E, Aragot W, Silva M. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias Periodo 1986-2000. *Vet Trop*. 2001;26(1):47-62.
25. Oliveira J, Hernández-Gamboa J, Jiménez-Alfaro C, Zeledón R, Blandón, M, Urbina A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Vet Parasitol*. 2009;163:136-139.
26. Cadioli F, Barnabé P, Machado R, Teixeira M, André M, Sampaio P. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21(2):118-124.
27. González N, Espinoza E. Transmisión transplacentaria del *Trypanosoma vivax* y su efecto sobre la descendencia de hembras gestantes infectadas experimentalmente. *Vet Trop*. 1994; 19:41-53.
28. Thumbi S, McOdimba F, O Mosi R, Jung'a J. Comparative evaluation of three PCR base diagnostic assays for the detection of pathogenic trypanosomes in cattle blood. *Parasit Vectors*. 2008;1:46.
29. De Almeida P, Ndao M, Van Meirvenne N, Geets S. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Trop*. 1997;66:45-50.
30. Osorio A, Madruga C, Desquesnes D, Oliveira C, Rios L, Gonçalves S. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):1-13.
31. Desquesnes M. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop*. 1997;65:139-148.
32. Morlais I, Ravel S, Grébaud P, Dumas V, Cuny G. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Trop*. 2001;80:207-213.
33. Ventura R, Paiva F, Silva R, Takeda G, Buck G, Teixeira M. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol*. 2001;99:37-48.

34. Dirie M, Otte M, Thatthi, R, Gardiner P. Comparative studies of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* isolates from Colombia. *Parasitol.* 1993;106:21-29.
35. García H, García M, Zerpa H, Pérez G, Contreras C, Pivat I, Mendoza-León A. Detección parasitológica y molecular de infecciones naturales por *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en los estados Apure, Cojedes y Guárico, Venezuela. *Rev Fac Cs Vets.* 2003;44(2):131-144.
36. Auty H, Anderson N, Picozzi N, Lembo T, Mubanga J, Hoare R. et al. Trypanosome diversity in wildlife species from the Serengeti and Luangwa Valley ecosystems. *PLOS Negl Trop Dis.* 2012;6(10):e1828.
37. Hamilton P. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? *Trends Parasitol.* 2012;28(5):173.
38. Majiwa P. Nucleic acid-based systems for detection of trypanosomes. In: Antigen ELISAs for Trypanosomes. Evaluation of the Performance. Proceedings of a Workshop held at ILRI Nairobi, Kenya. 1996.
39. Junior D, Araújo F, Almeida N, Adi S, Cheung L, Fragoso S, Ramos C, M de Oliveira R, Santos C, Bacanelli G, Soares C, Rosinha G, Fonseca A. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):843-849.
40. Kocan K, De la Fuente J, Blouim E. Advances toward understading the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. *Front Biosci.* 2008;13:7032-7045.
41. Ruybal P, Moretta R, Perez A, Petrih R, Zimmer P, Alcaraz E, Echaide I, Torioni S, Kocan K, De la Fuente J, Farber M. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. *Vet Parasitol.* 2009;162:176-180.
42. Reinbold J, Coetzee J, Hollis L, Nickell J, Riegel C, Christopher J, Ganta R. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *Am J Vet Res.* 2010;71(10):1178-1188.
43. Coronado A. Transmisión de *Anaplasma marginale*, Theiler, 1910. En: Taller sobre agentes hemotrópicos tripanosomiasis-babesiosis-anaplasmosis. Memorias ASODEGAAEl Vigía-Venezuela. 1997;1-40.
44. Toro M. Epizootiología y métodos de control de la anaplasmosis. En: Taller sobre agentes hemotrópicos tripanosomiasis-babesiosis-anaplasmosis. Memorias ASODEGAAEl Vigía-Venezuela. 1997;1-40.
45. Noaman V, Shayan P. Comparison of microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Iran J Microbiol.* 2010;2(2):89-94.
46. Torioni S, Knowles D, Mcguire T, Palmer G, Suarez C, McElwain T. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linkd immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol.* 1998;36(3):777-782.
47. Eleizalde M, Caballero H, Reyna-Bello A. Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, utilizando la MSP5 recombinante como antígeno. *Rev Cs FCV-LUZ.* 2007;XVII(4):349-356.
48. Melman S, Hartt Y, Giardina S. El uso de la biología molecular en el diagnóstico de *Anaplasma marginale*. Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos. Departamento de Biología Celular Universidad Simón Bolívar Caracas-Venezuela. 2004.
49. Ybañez A, Sivakumar T, Ybañez R, Ratilla J, Perez Z, Gabotero S, Hakimi H, Kawazu S, Matsumoto K, Yokoyama N, Inokuma H. First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in cebu, Philippines. *J Vet Med Sci.* 2012;Aug;1-27.
50. Figueroa JV, Chieves L, Jonson G, Buenin G. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* 1993;50:69-81.
51. Stich R, Bantle J, Kocan K, Fekete A. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmatataceae) in Hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. *J Med Entomol.* 1993;30(4):781-788.
52. Reye A, Arinola O, Hübschen J, Mullera C. Pathogen prevalence in ticks collected from the vegetation and livestock in Nigeria. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(8):2562-2568.
53. De la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal J, Kocan K, Sonenshine D. Overview: Ticks as vectors of

- pathogens that cause disease in human and animals. *Front Biosci.* 2008;13:6938-6946.
54. Picoloto G, Ferreira de Lima R, Oliveira L, Espínola Carvalho C, Reis A, Moraes W, Lima P, Oliveira A, Madruga C. Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(3):186-188.
 55. Aubry P, Geale D. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58:1-30.
 56. Vidotto O, Marangoni E. Diagnóstico em Anaplasmosse bovina. Revisao bibliográfica. *Ciência Rural.* 2001;31(2).
 57. Shebish E, Vemulapalli R, Oseto C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Vet Parasitol.* 2012;188:164-167.
 58. Rivera M. Hemoparasitosis bovinas: tripanosomiasis. UCV-Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 1996;15-84.
 59. Tananyutthawongese C, Saengsombut K, Sukhumsirichat W, Uthaisang W, Sarataphan N, Chansiri K. Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. *Science Asia.* 1999;25:85-90.
 60. Chatel G, Gulletta M, Matteelli A, Marangoni A, Signorini L, Oladeji O, Calagaris S. Short report: diagnosis of tick-borne relapsing fever by the quantitative buffy coat fluorescence method. *Ann J Trop Med Hyg.* 1999;60(5):738-739.
 61. Singh H, Mishra A, Rao J, Tewari A. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41:153-159.
 62. 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;105:721-730.
 63. Oliveira-Sequeira T, Oliveira M, Araujo J, Amarante A. PCR-based of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol.* 2005;35:105-111.
 64. Quintao-Silva M, Melo M, Ribeiro M. Comparison of duplex PCR and microscopic techniques for the identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Zoonoses Public Health.* 2007;54:147-151.
 65. Oliveira M, Oliveira-Sequeira T, Regitano L, Alencar M, Néo T, Silva A, Oliveira H. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Vet Parasitol.* 2008;155:281-286.
 66. Ogo N, Fernández I, Galindo R, Okubanjo O, Inuwa H, Agbede R, Torina A, Alongi A, Vicente J, Gortázar C, de la Fuente J. Molecular identification of tick-borne pathogens in Nigerian ticks. *Vet Parasitol.* 2012; 187: 572-577.
 67. Cantu A, Ortega A, García Z, Mosqueda J, Henke S, George J. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern México. *J Parasitol.* 2009; 95(3):536-542.
 68. Awad H, Antunes S, Galindo R, do Rosário V, de la Fuente J, Domingos A, El Hussein A. Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Vet Parasitol.* 2011; doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.007.
 69. Cao S, Oluga G, Terkawi L, Yu L, Kamyngkird K, Luo Y, et al. Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in northern Thailand. *Parasitol Res.* 2012; 2960-2964.

Recibido: 4-10-2012.
Aceptado: 29-11-2012.