

La técnica de hibridación reversa en línea para el diagnóstico de *Babesia* y *Theileria* : Revisión sistemática de la literatura

León G., Jorge A.¹

Medina, Claudia
F.²

The Reverse line blotting for diagnosis of *Babesia* and *Theileria*: Systematic review of the literature

Rev. Zool. 2014. 1(2):7-14

Resumen

Tradicionalmente, los piroplasmas se detectan mediante pruebas serológicas y examen microscópico de extendidos sanguíneos teñidos con Giemsa. Estas técnicas se consideran de baja sensibilidad y especificidad para la detección de portadores y para diferenciar entre especies parasitarias. Por ello surgen como alternativa las técnicas diagnósticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, como la hibridación reversa en línea. Esta técnica es poco conocida a pesar de su utilidad en estudios epidemiológicos. Por eso, se realiza una revisión sistemática de la literatura indexada de los estudios epidemiológicos de piroplasmosis que utilizan la hibridación reversa en línea como técnica diagnóstica. La RLB es una técnica de alta especificidad y sensibilidad para la detección de hemoparásitos transmitidos por garrapatas como la *Babesia* y *Theileria*. La principal aplicación es el desarrollo de estudios epidemiológicos, ya que permite detectar simultáneamente varios agentes, en múltiples muestras.

Babesia, *Theileria*, Sensibilidad, Especificidad

Abstract

Traditionally, the piroplasms was detected by serologic test and microscopic examination of blood smears stained with Giemsa. These methods are less sensitive and specific in the detection of the carrier state of animals and do not usually distinguish between parasites species. PCR based techniques constitute an alternative method for the direct detection of piroplasms, because are sensitive and highly specific methods for diagnosis. Recently, species specific PCR based reverse line blot hybridization method have been developed for the detection and identification of *Theileria* and *Babesia* species. We conducted this systematic review of the scientific literature to characterize the existing knowledge. The Reverse Line Blotting is a sensitive and highly specific method for the detection of blood parasites. The main application is the development of epidemiological studies, since it can detect various agents in multiple samples.

Keywords: Reverse Line Blotting, *Babesia*, *Theileria*, Sensibility, Specificity.

Palabras Claves: Hibridación Reversa en Línea,

Rev. Zool. 2014. 1(2):7-14

¹ Médico Veterinario Esp. MgSc@. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Calle 222 N° 55-37 Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: jorgleon@udca.edu.co

² Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Correo electrónico: cmedina@udca.edu.co

Introducción

La Piroplasmosis es una enfermedad transmitida por garrapatas que afecta animales domésticos y silvestres e incluso a los humanos (Almería *et al*, 2002). Sus agentes causales, *Theileria* y *Babesia*, se distribuyen mundialmente y son una seria preocupación para la salud animal y la producción (Almería *et al*, 2002; Vivas *et al*, 2000), debido a que genera altos costos de tratamiento, pérdidas reproductivas, incapacidad y además se constituye en barrera para el comercio internacional (Allsop *et al*. 2007).

Tradicionalmente, el diagnóstico de laboratorio de Piroplasmosis se ha basado en el empleo de técnicas directas de detección, como el examen microscópico de extendidos sanguíneos o de biopsias de ganglios linfáticos teñidos con Giemsa, los cuales presentan una baja sensibilidad y no permiten la diferenciación entre las especies causantes de la infección, aparte de lo anterior también es una técnica en la que influye la experticia del personal ejecutor de la misma (Hurtado *et al*, 2005). De otro lado, se utilizan técnicas serológicas como la Fijación de Complemento (FC), la Inmunofluorescencia Indirecta de Anticuerpos (IFAT) y el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), las cuales tienen desventajas tales como la reactividad cruzada con anticuerpos dirigidos contra diferentes especies, limitando su especificidad (Almería *et al*, 2002), y se presentan restricciones asociadas al nivel de anticuerpos en la sangre del hospedero al momento de extraer la muestra (Hurtado *et al*, 2005; Vargas *et al*, 2004).

En este contexto, durante los últimos años, se han desarrollado técnicas de biología molecular para detectar e identificar las diferentes especies de *Babesia* y *Theileria* que afectan a los animales, Estas pruebas han demostrado mayor sensibilidad y especificidad, así como una información más objetiva (Altay *et al*, 2008; Hurtado *et al*, 2005). Por ello, cada vez es más frecuente el uso de los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y técnicas adicionales como PCR anidada, PCR multiplex, amplificación isotérmica en forma cíclica (LAMP, loop mediated isothermal amplification) y la Hibridación Reversa en Línea, también conocida como RLB (Reverse Line Blotting).

La técnica desarrollada más recientemente es la

RLB, la cual ocasiona gran interés, pues ha demostrado ser una herramienta útil para la realización de estudios epidemiológicos, porque permite detectar e identificar simultáneamente múltiples hemoparásitos en diferentes muestras (Isogen Life Science, 2004). En 1999 Gubbels *et al*, efectuaron un estudio empleando esta prueba para la identificación y diferenciación simultánea de diferentes especies de *Babesia* y *Theileria*, corroborando su utilidad práctica.

Sin embargo, a pesar de sus aplicaciones, la RLB es una técnica poco conocida por los profesionales de la medicina veterinaria, razón que justifica el desarrollo de la presente revisión, que tuvo por objetivo sintetizar la información disponible sobre la técnica RLB y su aplicación práctica en estudios de detección e identificación de piroplasmas.

Materiales y Métodos

Se realizó una revisión sistemática de la literatura que implicó: el diseño y ejecución de una estrategia organizada y coherente de búsqueda, además de la selección y análisis de la información encontrada, con el objeto de redactar una síntesis crítica de la misma. Los estudios objeto de esta revisión fueron los que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Documentos publicados en los últimos 12 años (2000-2011)
- Estudios veterinarios
- Detección de Piroplasmas
- Reportes de caso
- Estudios epidemiológicos
- Lenguaje del artículo: Inglés y español

Dentro de la búsqueda se priorizaron estudios que establecían datos de sensibilidad y especificidad de la técnica.

De otra parte, se descartaron los documentos encontrados en literatura no indexada, y publicaciones tipo editorial o cartas al editor.

Se utilizaron como fuentes de búsqueda las bases de datos electrónicas: Science Direct, Springer Link, Medline, Scielo y Google Académico.

Como descriptores de búsquedas se utilizaron las palabras: *Babesia*, *Theileria*, Molecular Detection, PCR, Reverse Line Blot, haemoparasites y RLB.

Para organizar la información, se elaboraron tablas de síntesis que incluyeron la información de cada

estudio acerca de: autores, tipo de estudio, lugar de desarrollo del estudio, población de estudio, análisis estadístico, análisis de sensibilidad y especificidad. Estas tablas ayudaron a identificar los hallazgos comunes entre los diferentes estudios y a comparar y contrastar los resultados.

Resultados y Discusión

Los artículos que reunieron los criterios establecidos en la metodología fueron veintiuno. De estos trabajos, 12 (57%) fueron realizados en la especie bovina, 4 (19%) en animales silvestres, 3 (14%) en ovinos y caprinos, y 2 (10%) en equinos. Todos los autores emplearon sangre completa como muestra analizada, algunos además utilizaron muestras de tejidos de bazo y encéfalo (Oosthuizen *et al*, 2009; Nijhof *et al*, 2003); y cuatro trabajos recolectaron y utilizaron garrapatas para complementar los estudios epidemiológicos, (Georges *et al* 2001; Sparagano *et al*, 2000; Bekker *et al*, 2002 y M'ghirbi *et al*, 2008).

Los estudios se realizaron principalmente en regiones endémicas de África (Uganda, Swazilandia, Namibia, Tunisia, Sudan, Sudáfrica, y Mozambique), España (Toledo, Cádiz, Basque Country y Norte de España), Italia (Sicilia), China, Turquía (Kayseri, Tokat, Amasya, Gumushane, Giresun, Trabzon) y Argentina.

La mayoría de los estudios fueron desarrollados por instituciones académicas como: la Universidad de Utrecht en los Países Bajos, la Universidad de Pretoria en Sudáfrica, el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), y el Instituto Zooprofiláctico Experimental de Sicilia; todos bajo la dirección de académicos de las respectivas facultades de medicina veterinaria y sus departamentos de parasitología y enfermedades tropicales.

Historia y desarrollo de la RLB

Esta técnica se desarrollo en un principio para la identificación de serotipos de *Streptococcus*, por Kaufhold *et al* (1994); también se empleo para la diferenciación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* por Kamerbeek *et al* (1997); y su primera aplicación para la detección y diferenciación de patógenos encontrados en garrapatas, como la *Borrelia*, fue realizada por Rijpkema *et al* (1995) y

posteriormente se utilizo también para detectar *Ehrlichia* (Gubbels *et al*, 1999; Isogen Life Science, 2004).

En 1999, Gubbels *et al.*, desarrollaron la técnica para la detección y diferenciación de diferentes especies de *Babesia* y *Theileria* en sangre. Este desarrollo la técnica para detectar y diferenciar simultáneamente varios hemoparásitos del ganado bovino, generando un protocolo que ha venido siendo utilizado por otros investigadores para su utilización en la misma especie bovina (Almeria *et al*, 2002; Brigido *et al*, 2004).

La RLB también se utilizo para la caracterización de *Babesia divergens* en casos humanos, incluso ha sido empleada para detectar nuevas especies de *Babesia* y *Theileria* en distintas especies animales (Isogen Life Science, 2004; Nijhof *et al*, 2003). En équidos también fue utilizada para detectar y diferenciara diferentes especies de *Babesia* y *Theileria* (Nagore *et al*, 2004; Bhoora *et al*, 2009), ovejas (Nagore *et al*, 2004; Qingli Niu *et al*, 2009), felinos salvajes (Boosman *et al*, 2007), jirafas y antílopes (Oosthuizen *et al*, 2009); e incluso se ha desarrollado para la detección e identificación de piroplasmas en garrapatas (Sparagano *et al*, 2000).

Estas aplicaciones han permitido considerar a la RLB como una herramienta molecular para el diagnóstico, útil para la realización de estudios epidemiológicos en todo el mundo.

Fundamento de la RLB

Esta técnica se fundamenta en el trabajo conjunto de la hibridación y la PCR. La esencia de la técnica es la hibridación de los productos de la PCR, con oligonucleótidos de detección específicos, o sondas, inmovilizados en una membrana de nylon, los cuales guardan un respectivo orden de identificación, permitiendo de esta manera analizar múltiples muestras y realizar una detección simultánea de múltiples agentes patógenos, (Gubbels *et al*, 1999).

Después de la hibridación de sondas y productos de PCR, se visualiza la reacción por medio de quimioluminiscencia: Para esto se requiere que el producto del PCR se encuentre marcado con biotina,

la cual reacciona al adicionar un conjugado de peroxidasa-streptavidina que genera una luz azul, que puede ser captada por una película de rayos-X, (Isogen Life Science, 2004).

Uso de la RLB para el diagnóstico de Babesia y Theileria en bovinos

En cuanto a la utilidad diagnóstica de la RLB, esta revisión enfatizó en los trabajos que analizaron muestras de sangre en búsqueda de los protozoos piroplasmidos: Babesia y Theileria, y que establecían sensibilidad y especificidad de la técnica, encontrando aspectos interesantes relacionados con la especificidad y sensibilidad de la técnica (Tabla 1).

Especificidad de la técnica

En los trabajos revisados, se encontró que la técnica de RLB es altamente específica pues no reportan reacción cruzada entre los hemoparásitos analizados. En todos los trabajos cada sonda híbrido con su respectiva secuencia de ADN parasitario, y no híbrido con sondas diferentes, lo cual permitió detectar los verdaderos negativos. En la mitad de los trabajos analizados, los cuales utilizaron la sonda universal que detecta tanto el género Babesia como el Theileria (*catchall*), diseñada por Gubbels *et al* (1999), se demostró que la prueba era altamente específica, y no se presentaron reacciones cruzadas con otro tipo de agentes como *Anaplasma Marginale*, *A. Centrale*, *Tripanosoma vivax*, *Ehrlichia canis*, entre otros, (Sparagano *et al*, 2001). Asimismo, Petrih *et al* (2008) desarrollaron un estudio para detectar *Babesia bigemina*, y las muestras obtenidas fueron tomadas de aislados con el hemoparásito y de animales infectados experimentalmente, aun así, no se reporto reacción cruzada con otro agente.

Sensibilidad de la técnica

La técnica de Hibridación Reversa en Línea, en los diferentes trabajos demostró ser altamente sensible, pues todos los resultados PCR positivos, mostraron reacciones positivas con su correspondiente sonda general, a excepción de algunas especies de Babesia que no emitieron señal con las sondas específicas utilizadas, como en el estudio de Altay *et al* (2008). Esta situación probablemente se asocia a

la presencia de un nuevo genotipo o de uno ya conocido omitido en el estudio. Resultados similares se obtuvieron en los estudios realizados en especies silvestres por Oosthuizen *et al* (2008) y en caballos de Sudáfrica por Bhoora *et al* (2009).

Gubbels *et al* (1999), evaluó la sensibilidad, utilizando una muestra de sangre de un animal con un nivel de parasitemia (*T. Annulata*) conocido. Esta muestra fue diluida serialmente con sangre de un animal no infectado, y la detección del parásito se dio hasta niveles del $1 \times 10^{-6}\%$ (0.000001%), correspondiendo a 3 parásitos por microlitro de sangre. Del mismo modo Oura *et al*, (2004), encontraron un nivel de detección para *T. parva* ligeramente más alto, el cual varió entre $4.4 \times 10^{-5}\%$ y $1.4 \times 10^{-5}\%$, lo que equivale a 1-2 parásitos por microlitro de sangre.

No obstante lo anterior, en algunos trabajos que buscaban diagnosticar Babesia, se observó que la técnica de RLB es menos sensible cuando los picos de parasitemia fluctúan, provocando que algunas veces se escape a la detección por esta técnica, (Gubbels *et al*, 1999; Altay *et al*, 2008).

Aparte de lo anterior, en China, Qingli Niu *et al* (2009), encontró que en muestras sanguíneas de ovinos, la sensibilidad fue diferente para cada agente así: $10^{-6}\%$ para *Babesia motasi*, $10^{-3}\%$ para *Babesia sp. Kashi*, $10^{-8}\%$ para *T. luwenshuni*, y $10^{-8}\%$ para *T. uilenberg*.

En todo caso la RLB demostró ser mucho más sensible frente a otros métodos utilizados para el diagnóstico (Sanmartin *et al*, 2006; Ica *et al*, 2007; Georges *et al*, 2001; M'ghirbi *et al*, 2008). Georges *et al*, 2001, encontró que de 69 extendidos de sangre, tan solo el 46% fue positivo por microscopia, mientras que con la técnica de RLB se detectaron cerca del 89%. Igualmente, Salih *et al*, (2007), sugieren que la sensibilidad es lo suficientemente alta como para detectar la presencia de parásitos viables en niveles muy bajos en la muestra, confirmando su utilidad para la detección de parásitos en animales aparentemente sanos o con infección subclínica; situación que se demostró también en el trabajo de Nagore *et al*, (2004), el cual recolecto 181 muestras de sangre de caballos clínicamente sanos con exposición a garrapatas, de estas 92 resultaron positivas mediante RLB, pero al examen microscópico resultaron negativas todas las muestras.

Tabla 1. Descripción del tipo de muestra y sensibilidad-especificidad hallada en los estudios

Autor y año	Tipo de muestra	Resultados	
		Sensibilidad	especificidad
Gubbels <i>et al</i> 1999	Muestreo de sangre de ganado: Animales experimentalmente infectados con cepas de diferentes países. Ganado de España: 28 Toledo 17 Cádiz	$10^{-6}\%$ 3p/ μ l (0.000001%)	100% No reacciones cruzadas
Sparagano <i>et al</i> , 2000	Muestreo de sangre y garrapatas de vacas, en la isla sicilia 6 granjas en abril y 4 en noviembre	Mas sensible que PCR	100% No reacciones cruzadas
Georges <i>et al</i> , 2001	Se obtuvieron 187 muestras de sangre en granjas donde se reportaron brotes. 15 en abril-nov/98 12 en junio-ag-nov/99 Tambien recolectaron garrapatas	La RLB es mucho más sensible que los extendidos de sangre, el # de muestras + fueron hasta 2 veces más altas que las detectadas con los métodos tradicionales	No se reportan reacciones cruzadas
Oura <i>et al</i> , 2004	Muestras de sangre bovina Uganda: 1. 44 nativo 2. 48 cruce 3. 11 exotico (infe. aguda) 4. 28 cruce(infe. aguda)	4.4×10^{-5} a $1.4 \times 10^{-5}\%$ 1-2 parasites/ μ l (<i>T parva</i>)	No se midió para RLB. No se reportaron reacciones cruzadas
Brigido <i>et al</i> , 2004	116 muestras de sangre de ganado adulto de raza mirandesa	Tanto en el PCR como en la RLB solo 3/116 animales resultaron positivos	
Salih <i>et al</i> , 2006	Muestreo de sangre 600 muestras de ganado nativo aparentemente sano de diferentes edades	La RLB es una técnica altamente sensible, el ADN parasitario fue detectado aun sin confirmación por PCR o microscopia	Altamente especifico
San martin <i>et al</i> , 2006	Muestreo de sangre 263 muestras tomadas de 79 granjas	La técnica de RLB demostró la infección en 54% de las muestras, de las cuales solo 28.8% fueron positivas por microscopia	Altamente especifico

Además, la RLB demostró ser efectiva para la detección de varios agentes en una misma muestra. Salih *et al* (2007), reporto que de 600 muestras analizadas 406(67.7%) presentaban infecciones mixtas y Sparagano *et al* (2000), determino que la RLB es una herramienta útil para demostrar la coinfección de especies de Babesia y Theileria en bovinos, pero también en equinos como lo menciona Nagore *et al* (2004); las infecciones mixtas fueron un resultado común en la mayoría de los estudios, (Salih *et al*, 2007; Ica *et al*, 2007; Sparagano *et al*, 2000).

Conclusiones

De todos los artículos que fueron encontrados para desarrollar la revisión, la mayoría realizó el estudio para detectar Babesia y Theileria en sangre de bovinos; lo que se relaciona al impacto que ha generado el problema de las hemoparasitosis en esta especie a nivel mundial. Asimismo, se encontró que los estudios se realizaron principalmente para evaluar la epidemiología de la babesiosis y theileriosis en las diferentes regiones, pues esta técnica resulta ser muy práctica y eficiente, debido a la posibilidad de evaluar muestras de poblaciones numerosas.

En cuanto a la sensibilidad se concluyó que la técnica de RLB, varía su sensibilidad dependiendo del agente involucrado y se sugiere determinarla para cada hemoparásito. (Oura *et al*, 2004). Del mismo modo, se sugiere tener en cuenta el pico de parasitemia, pues las fluctuaciones en estos picos conducen a que existan momentos en donde los piroplasmas se pueden escapar a la detección.

Por último, la técnica ha demostrado ser más efectiva que la PCR simple o la microscopia, para la detección temprana y masiva de múltiples hemoparásitos, debido a su mayor sensibilidad y especificidad, haciéndola una herramienta útil para la realización de estudios epidemiológicos para la determinación de la prevalencia de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

- ALHASSAN A., GOVIND Y., THANH TAM, THEKISOE, YOKOYAMA N., INOUE N. IGARASHI I.; Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis; Parasitology Research (2007)100:1165–1168.
- ALLSOP P M. AND ALLSOP B; Molecular Sequence Evidence for the Reclassification of Some *Babesia* Species; Ann. N.Y. Acad. Sci. 1081: 509–517 (2006).2006 New York Academy of Sciences.
- ASGARALI Z., COOMBS D. K., MOHAMMED F., CAMPBELL D. M., CAESAR E.; A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad; Veterinary Parasitology 144 (2007) 167–171.
- BATTSETSEG B., XUAN X., IKADAI H., BAUTISTA J, BYAMBAA B., BOLDBAATAR D., BATTUR B., BATTSETSEG G., BATSUKH I, IKUO ZAY, NAGASAWA H., MIKAMI T., FUJISAKI K.; Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in Dermacentor nuttalli adult ticks; International Journal for Parasitology 31 (2001) 384-386.
- BEKKER P J, DE VOZ SANDER, TAOUFIK A, SPARAGANO O, JONGEJAN F; Simultaneous detection of Anaplasma and Erlichia species in ruminants and detection of *erlichia ruminantium* in *amblyoma variegatum* ticks by reverse line blot; veterinary microbiology 89(2002)223-238
- BHOORA RAKSHA , FRANSSEN LINDA , MARINDA C. OOSTHUIZEN *ET AL*; Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa; Veterinary Parasitology 159 (2009) 112–120.
- BIRKENHEUER J., NEEL J., RUSLANDER D., LEVY M.G., BREITSCHWERDT E.B.; Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog; Veterinary Parasitology 124 (2004) 151–160.
- BOSMAN A. M., VENTER E.H, PENZHORN B.L.; Occurrence of *Babesia felis* and *Babesia leo* in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis; Veterinary Parasitology 144 (2007) 33–38.
- BRIGIDO C, FONSECA DA P I., PARREIRA R., FAZENDEIRO I, E. DO ROSÁRIO V., CENTENO-LIMA S; Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal; Veterinary Parasitology 123 (2004) 17–23.
- BUITRAGO DANIEL, PACHON HECTOR; Epidemiología de la Rickettsiosis* una revisión narrativa, aportes para la vigilancia epidemiológica; especialización en epidemiología, Universidad de Antioquia, 2008.
- COSTA JOSEP; Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real; Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(5):299-305.
- GEORGES K., LORIA G.R., RIILI S., GRECO A., CARACAPPA S., JONGEJAN F., SPARAGANO O.; Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily; Veterinary Parasitology 99 (2001) 273–286.
- GORIS J., SALAS Á, FERRANDIS E; el artículo de revisión; revista iberoamericana de enfermería comunitaria, en prensa, 2007.
- GUBBELS J. M.,A. P. DE VOS, M. VAN DER WEIDE, J. VISERAS, L. M. SCHOOLS, E. DE VRIES, AND F. JONGEJAN; simultaneous detection of bovine theileria and babesia species by reverse line blot hybridization; journal of clinical microbiology, june 1999, p. 1782–1789.
- HOMER M., DELFIN IRMA, TELFORD SAM, KRAUSE PETER J. AND PERSING DAVID; Babesiosis; clinical microbiology reviews, july 2000, p. 451–469
- HUNFELD K.-P, A. HILDEBRANDT B, J.S. GRAY; Babesiosis: Recent insights into an ancient disease; International Journal for Parasitology (2008).

- ICA A., INCI A., YILDIRIM A. Parasitological and Molecular Prevalence of Bovine Theileria and Babesia Species in the Vicinity of Kayseri; Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2007; 31(1): 33-38
- ISOGEN LIFE SCIENCE; Reverse line blot hybridisation in the detection of tick-borne diseases; Based on the work of Amar Taoufik, Ard Nijhof, Radi Hamidjaja and Frans Jongejan of the Division of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands; September 2004.
- KURSAT ALTAY, M. FATI H AYDIN, NAZIR DUMANLI, MUNIR AKTAS; Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattles; Veterinary Parasitology 158 (2008) 295–301.
- LETELIER M, MANRIQUEZ J, RADA G; Revisiones sistematicasy metaanálisis: ¿son la mejor evidencia?; Rev Méd Chile 2005; 133: 246-249
- M'GHIRBI Y. ,HURTADO A., BRANDIKA 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 Reseach (2008) 103:435–442.
- NAGORE DANIEL, G. JOSUNE , GARCIA P. ANA, RAMÓN A. JUSTE, HURTADO ANA; Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis; Veterinary Parasitology 123 (2004a) 41–54.
- NAGORE DANIEL, JOSUNE GARCIA-SANMARTIN, ANA L. GARCÍA-PÉREZ, RAMÓN A. JUSTE, ANA HURTADO; Identification, genetic diversity and prevalence of Theileria and Babesia species in a sheep population from Northern Spain; International Journal for Parasitology 34 (2004b) 1059–1067.
- NETHERLANDS INSTITUTE OF ECOLOGY (NIOO-KNAW); manual reverse line blot hybridization; November 2002.
- NIJHOF A M., PENZHORN B. L., LYNEN G., MOLLEL J. O., MORKEL P., BEKKER C.P., JONGEJAN F.; *Babesia bicornis* sp. nov. and *Theileria bicornis* sp. nov.: Tick-Borne Parasites Associated with Mortality in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*); Journal Of Clinical Microbiology, May 2003, p. 2249–2254
- OIE; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals; Updated; 20.12.2005; http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/a_00084.htm.
- OIE; Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004; Babesiosis bovina, capítulo 2.3.8.
- OOSTHUIZEN M. C., ALLSOPP B., TROSKIE M., COLLINS N. E., PENZHORN B. L. ; Identification of novel Babesia and Theileria species in South African giraffe (*Giraffa camelopardalis*, Linnaeus, 1758) and roan antelope (*Hippotragus equinus*, Desmarest 1804); Veterinary Parasitology 4791(2009) xxx–xxx
- OOSTHUIZEN M. C., ZWEYGARTH E., COLLINS N., TROSKIE M., PENZHORN B. L.; Identification of a novel *Babesia* sp. from sable 1 antelope (*Hippotragus niger*, Harris 1838); journal clinical of microbiology 1128(2008).
- OURA C.A.L., R.P. BISHOP, E.M. WAMPANDEA, G.W. LUBEGAA, A. TAIT; Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda; International Journal for Parasitology 34 (2004) 603–613.
- PETRIGH R., RUYBAL P., THOMPSON C., NEUMANN R., MORETTA R., WILKOWSKY S., DRAGHI G., ECHAIDE I., TORIONI DE ECHAIDE S. AND FARBER M.; Improved Molecular Tools for Detection of *Babesia bigemina*; Annals NewYork Academy of Sciences. 1149: 155–157 (2008)
- PRICHARD R., TAIT A.; The role of molecular biology in veterinary parasitology; Veterinary Parasitology 98 (2001) 169–194
- QINGLI NIU, JIANXUN LUO, GUIQUAN GUAN , MILING MA , ZHIJIE LIU , AIHONG LIU , ZHISHENG DANG , JINLIANG GAO , QIAOYUN REN , YOUQUAN LI, JUNLONG LIU, HONG YIN; Detection and differentiation of ovine Theileria and Babesia by reverse line blotting in China; Parasitology Reseach (2009) 104:1417–1423.
- SALIH D. A, HUSSEIN A., SEITZER U., AHMED J. S.; Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan; Parasitol Reseach (2007) 101:1035–1044.
- SANMARTÍN J., NAGORE D., GARCÍA P. A, A JUSTE R., HURTADO A.; Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays; BMC Veterinary Research 2006.
- SPARAGANO O., ALLSOPP M., MANK R., RIJPKEMA S., FIGUEROA J. AND F. JONGEJAN; Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review; Experimental and Applied Acarology 23: 929–960, 1999.

- SPARAGANO O., LORIA G.R, GUBBELS M.-J., CARACAPPA A. P. DE VOS S., F JONGEJAN; Integrated Molecular Diagnosis of *Theileria* and *Babesia* Species of Cattle in Italy; Annals New York Academy of Sciences 2000.
- TOMASSONE L., NUÑEZ P., GÜRTLER R. E., CEBALLOS L.A., OROZCO M. M., KITRON U. D., FARBER M.; Molecular Detection of Ehrlichia chaffeensis in Amblyomma parvum Ticks, Argentina; Emerging Infectious Diseases Vol. 14, No. 12, December 2008.
- UILENBERG GERRIT; Babesia—A historical overview; Veterinary Parasitology 138 (2006) 3–10
- VARGAS DANILO, BONET RAFAEL, OLIVA PAULINA Y CAMPANO SERGIO; Implementación de la técnica de PCR en la identificación de Babesia ssp en equinos; Parasitol Latinoam 59: 179 - 182, 2004 FLAP.
- VIVAS R. I. RODRÍGUEZ, COB-GALERA L.A., DOMÍNGUEZ A. JOSÉ L.; Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999); Rev. Biomed 2000; 11:277-282.
- ZOBBA R, ARDU M., NICCOLINI, S., CHESSA B., MANNA L., COCCO R, PARGAGLIA M; Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmiasis; Journal of Equine Veterinary Science Vol 28, No 5 (2008)

Artículo Recibido: noviembre 15 de 2014

Artículo Aceptado: diciembre 30. de 2014