

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria en garrapatas capturadas sobre caballos domésticos

Islay Rodríguez,<sup>1</sup> Lise Gern,<sup>2</sup> Olivier Rais,<sup>3</sup> Omar Fuentes,<sup>4</sup> Roberto González<sup>5</sup> y Carmen Fernández<sup>6</sup>

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** en la actualidad son varias las especies de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria transmitidos por garrapatas. Los estudios sobre estos agentes y sus enfermedades han sido escasos en Cuba. **OBJETIVOS:** conocer la presencia de algunos de estos patógenos en garrapatas cubanas que afectan el ganado equino. **MÉTODOS:** se procesaron 95 garrapatas colectadas de caballos domésticos, conservadas en alcohol e identificadas taxonómicamente según claves convencionales. A cada una se le realizó extracción de ADN y posteriormente diferentes reacciones en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos para los grupos microbianos *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma-Ehrlichia*, y *Babesia-Theileria*. Cada uno de los productos de las reacciones en cadena de la polimerasa fue sometido a hibridaciones en línea reversa utilizando sondas para cada grupo en cuestión, así como específicas para las principales especies de estos. **RESULTADOS:** las garrapatas estudiadas pertenecían a las especies *Dermacentor (Anocentor) nitens* (60 %), *Amblyomma cajennense* (38 %) y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (2 %). Se detectaron 7 garrapatas *Dermacentor (Anocentor) nitens* infectadas con bacterias del grupo *Anaplasma/Ehrlichia*, y no se pudo identificar la especie en cuestión con las sondas utilizadas. Una de estas garrapatas estaba además coinfectada con *Babesia bovis*. **CONCLUSIONES:** se sugiere la circulación de una nueva especie de *Anaplasma* o *Ehrlichia* no reportada antes en Cuba, por lo que se necesita estudiar un número mayor de garrapatas, así como la incorporación de nuevas sondas en la hibridación en línea reversa u otras metodologías que permitan conocer con exactitud las especies que pudiesen afectar hoy día los caballos domésticos.

**Palabras clave:** garrapatas, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria*, caballos, reacción en cadena de la polimerasa-hibridación en línea reversa.

### INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos obligados hematófagos de gran importancia médica y veterinaria, pues producen daños a sus hospedadores por acción directa (hematofagia y parálisis) o por la inoculación de organismos patógenos. Constituyen los artrópodos que mayor diversidad de patógenos transmiten (virus, bacterias, protozoos, hongos, nematodos).<sup>1</sup>

La fauna cubana de garrapatas está compuesta por 31 especies de las aproximadamente 850 que se reportan al nivel mundial, de ellas, 22 pertenecen a la familia Argasidae (garrapatas blandas) y 9 a la familia Ixodidae (garrapatas duras); estas últimas son las de mayor impacto para la salud humana y animal.<sup>1,2</sup>

Entre las principales enfermedades transmitidas al hombre y los animales por garrapatas duras o ixódidos al nivel mundial, se encuentran la

<sup>1</sup> Licenciado en Microbiología. Máster en Bacteriología-Micología. Investigador Agregado. Profesor Instructor. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>2</sup> Doctora del Instituto de Biología. Laboratorio de Ecoepidemiología. Universidad de Neuchatel, Suiza.

<sup>3</sup> Técnico en Biología del Laboratorio de Ecoepidemiología. Universidad de Neuchatel, Suiza.

<sup>4</sup> Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar. IPK.

<sup>5</sup> Licenciado en Biología. Máster en Control de Vectores. Sierra del Rosario, Pinar del Río.

<sup>6</sup> Doctora en Medicina Veterinaria. Máster en Microbiología Clínica/Veterinaria. Investigadora Auxiliar. Profesora Instructora. IPK.

enfermedad de Lyme, ehrlichiosis, anaplasmosis (monocítica y granulocítica) y babesiosis.<sup>2</sup>

La metodología más usada actualmente para la detección de los agentes etiológicos de estas entidades es la combinación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) con la hibridación en línea reversa (RLB, de sus siglas en inglés).<sup>3</sup>

En Cuba los estudios sobre estas enfermedades y sus agentes han sido escasos, por lo que este trabajo se propuso realizar la detección molecular de bacterias como *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. y hemoparásitos como *Babesia* sp. y *Theileria* sp. en garrapatas capturadas sobre caballos domésticos.

## MÉTODOS

### *Garrapatas*

Se estudiaron 95 garrapatas capturadas a partir de caballos domésticos, en un asentamiento poblacional ubicado en la Sierra del Rosario, Pinar del Río, Cuba. Estas fueron colectadas por extracción manual con cuidado de no estropear las estructuras bucales y conservadas en alcohol 70 %, hasta su identificación taxonómica y posterior extracción del material genético.<sup>4,14</sup>

### *Identificación taxonómica*

Las garrapatas fueron identificadas hasta el taxón de especie y clasificadas según estado de vida y sexo, teniendo en cuenta las claves reportadas para estas en la región neotropical.<sup>4</sup>

### *Extracción del material genético (ADN)*

Se realizó utilizando hidróxido de amonio y calor según la metodología descrita por *Guy & Stanek, Rijpkema* y otros, y con las modificaciones de *Humair* y otros.<sup>5-7</sup> De forma breve, las garrapatas fueron individualmente sustraídas de la solución de alcohol 70 %, secadas al aire y calentadas a 100 °C durante 15 min en viales con 100 µL de hidróxido de amonio (0,7 M) para liberar el

ADN. Posteriormente los viales fueron abiertos durante 15 min a igual temperatura para evaporar el amonio. Los lisados fueron utilizados directamente para la amplificación por PCR o conservados a - 20 °C hasta su uso posterior.

### *Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa*

Los cebadores empleados para la identificación de cada grupo microbiano aparecen reflejados en la tabla 1.

Las amplificaciones por PCR fueron desarrolladas en un termociclador Biometra®, T Gradient (Biolabo, Scientific Instruments, Alemania) en volúmenes de reacción de 50 µL según lo descrito por *Schouls* y otros<sup>12</sup> y *Alekseev* y otros<sup>8</sup> para *B. burgdorferi* sensu lato, y *Bekker* y otros<sup>11</sup> con modificaciones de *Rühle* para *Anaplasma* sp.-*Ehrlichia* sp., y *Babesia* sp.-*Theileria* sp. (*Rühle C. Study of the epidemiology of ticks and tick-borne diseases in cattle in the South of the Ivory Coast using reverse line blot-PCR* [Tesis de Doctorado en Biología]. Neuchatel: Universidad de Neuchatel; 2008).

### *Hibridaciones en línea reversa (RLB)*

El procedimiento de hibridación utilizando la RLB y visualización de los productos se realizó según lo reportado por otros autores.<sup>8-10,12</sup> Los productos amplificados por PCR fueron hibridados con diferentes sondas de oligonucleótidos para cada grupo en cuestión, así como para las principales especies de estos (tabla 1).

Brevemente, se tomaron 10 µL de cada uno de los productos de la PCR, se diluyeron en 150 µL de SSPE 2x (Invitrogen, Basilea, Suiza) y 0,1 % de SDS; se desnaturalizaron durante 10 min a 99 °C y se colocaron inmediatamente en hielo.

Las sondas fueron diluidas en concentraciones de 12,5 a 100 pmol/150 µL en 500 mM de NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,4) y unidas covalentemente a membranas de Biodina C (Pall Biosupport, Portsmouth, Reino Unido) activadas con EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), en un patrón de líneas utilizando un *Miniblotter* 45 (Immuntics, Cambridge, EUA). Después las

membranas fueron tomadas y lavadas con SSPE 2x y 0,1 % de SDS a 60 °C durante 5 min, y colocadas de nuevo en el *miniblotter* con las líneas de los oligonucleótidos perpendiculares a las ranuras de este. Fueron llenadas con los productos de PCR desnaturalizados, se desarrolló la hibridación durante 60 min a 42 °C en una superficie horizontal.

Posteriormente la membrana fue removida del *miniblotter* y lavada 2 veces durante 10 min en SSPE 2x y 0,5 % de SDS a 52 °C (para *B. burgdorferi* 51 °C). Después fue incubada durante 30-60 min a 42 °C con el conjugado de estreptavidina marcado con peroxidasa (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza) diluido 1:4 000 en SSPE 2x y 0,5 % de SDS, y lavada 2 veces con

SSPE 2x y 0,5 % de SDS durante 10 min a 42 °C y 2 veces con SSPE 2x durante 5 min a temperatura ambiente.

Las hibridaciones fueron visualizadas al incubar las membranas con el líquido quimioluminiscente ECL (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza) y se expusieron a filmes de rayos X (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Otelfingen, Suiza).

## RESULTADOS

La identificación taxonómica y clasificación según el estado de vida y el sexo de las garrapatas

**TABLA 1.** Cebadores y sondas utilizados en las amplificaciones de ADN por PCR y en la hibridación en línea reversa

Organismo diana	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótidos	Gen diana	Referencia
Cebadores				
<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	B5S-Bor	5'-biotina-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT	ARNr 5S ( <i>rrfA</i> )	8
<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	23S-Bor	5'-TCAGGGTACTTAGATGGTTCACTT	ARNr 23S ( <i>rrlB</i> )	8
Sondas				
<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	SL	5'-amino-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	espaciador 23S-5S	8,9
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	SS	5'-amino-AACACCAATATTTAAAAAACATAA	espaciador 23S-5S	9
<i>B. afzelii</i>	AF	5'-amino-AACATTTAAAAAATAAATCAAGG	espaciador 23S-5S	9
<i>B. garinii</i>	GA	5'-amino-AACATGAACATCTAAAAACATAAA	espaciador 23S-5S	9
<i>B. garinii</i>	GANE	5'-amino-CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	espaciador 23S-5S	10
<i>B. valaisiana</i>	VSNE	5'-amino-TATATCTTTTGTCAATCCATGT	espaciador 23S-5S	10
<i>B. lusitanae</i>	LusiNE	5'-amino-TCAAGATTTGAAGTATAAAAATAAAA	espaciador 23S-5S	10
Cebadores				
<i>Anaplasma</i> sp.- <i>Ehrlichia</i> sp.	B-GA1B-new	5'biotina-CGGGATCCCGAGTTTGCCGGGACTTYTCT	ARNr 16S	11
Eubacteria	16S8FE	5'-GGAATTCAGAGTTGGATCMTGGYTCAG	ARNr 16S	12
Sondas				
<i>Anaplasma</i> sp.- <i>Ehrlichia</i> sp.	Catch all A/E	5'-amino-GGGGGAAAAGATTTATCGCTA	ARNr 16S	11
<i>E. ruminantium</i>	ER	5'-amino-AGTATCTGTTAGTGGCAG	ARNr 16S	11
<i>A. centrale</i>	AC	5'-amino-TCGAACGGACCATACGC	ARNr 16S	11
<i>A. phagocytophilum</i>	AP	5'-amino-TTGCTRTRARGAATARTTAGTGG	ARNr 16S	13
<i>A. marginale</i>	AM	5'-amino-GACCGTATACGCAGCTTG	ARNr 16S	11
<i>A. bovis</i>	AB	5'-amino-GTAGCTTGCTATGAGAACA	ARNr 16S	11
<i>A. ovis</i>	AO	5'-amino-ACCGTACGCGAGCTTG	ARNr 16S	11
Cebadores				
<i>Babesia</i> sp.- <i>Theileria</i> sp.	RLB-R2	5'biotina-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT	ARNr 18S	13
<i>Babesia</i> sp.- <i>Theileria</i> sp.	RLB-F2	5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	ARNr 18S	13
Sondas				
<i>Babesia</i> sp.- <i>Theileria</i> sp.	Catch all B/T	5'-amino-TAATGGTTAATAGGARCRGTTG	ARNr 18S	13
<i>T. velifera</i>	TV	5'-amino-CCTATTCTCCTTACGAGT	ARNr 18S	14
<i>T. parva</i>	TP	5'-amino-TTCGGGGTCTCTGCATGT	ARNr 18S	14
<i>T. taurotragi</i>	TT	5'-amino-TCTTGGCACGTGGCTTTT	ARNr 18S	14
<i>T. mutans</i>	TM	5'-amino-CTTGCGTCTCCGAATGTT	ARNr 18S	14
<i>B. bovis</i>	BB	5'-amino-CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG	ARNr 18S	14
<i>B. bigemina</i>	BBig	5'-amino-CGTTTTTCCCTTTTGTGG	ARNr 18S	14
<i>B. divergens</i>	BD	5'-amino-GTTAATATTGACTAATGTGCGAG	ARNr 18S	14

**TABLA 2.** Resultados de la PCR-RLB para la detección de los diferentes patógenos, según especie, estado de vida y sexo, en las garrapatas estudiadas

Especie de garrapata	Estado de vida y sexo*	Número de garrapatas	PCR-RLB para: ( <i>garrapatas positivas/garrapatas examinadas</i> )		
			<i>Borrelia burgdorferi</i> sp	<i>Babesia</i> sp.- <i>Theileria</i> sp.	<i>Anaplasma</i> sp.- <i>Ehrlichia</i> sp.
<i>Amblyomma cajennense</i>	Ninfa	1	0/1	0/1	0/1
	Adulto masculino	16	0/16	0/12	0/12
	Adulto femenino	19	0/19	0/16	0/16
	Total	36	0/36	0/29	0/29
<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	Ninfa	9	0/9	0/9	1/9
	Adulto masculino	20	0/20	1/20	4/20
	Adulto femenino	28	0/28	0/26	2/26
	Total	57	0/57	1/55	7/55
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Adulto femenino	2	0/2	-	-
	Total	2	0/2	-	-
Total		95	0/95	1/84 (1,2 %)	7/84 (8,3 %)

capturadas sobre los caballos domésticos, permitió identificar 3 especies, prevaleció *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (60 %), seguida por *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (38 %) y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (2 %); 89,5 % de las garrapatas se encontraban en estado de adulto, de las cuales 58 % eran hembras y 42 % machos. El resto de las garrapatas eran ninfas (10,5 %).

Los resultados de la clasificación según el estado de vida y el sexo por especie de garrapata se muestran en la tabla 2.

La extracción de ADN a partir de las garrapatas, utilizando la metodología del hidróxido de amonio y calor, mostró que para 11 de ellas no fue útil debido a que se encontraban ingurgitadas o repletas. Los resultados obtenidos por PCR-RLB se muestran también en la tabla 2.

Como se puede observar, en 7 garrapatas se detectó el material genético correspondiente a patógenos del grupo *Anaplasma* sp.-*Ehrlichia* sp., pero no se pudo determinar la especie con las sondas utilizadas. Además, se demostró que una de estas garrapatas resultó estar coinfectada con *B. bovis*.

## DISCUSIÓN

Los caballos domésticos son pastoreados en lugares frecuentados por el hombre y en ocasio-

nes muy cerca de sus casas y, además, están en contacto directo con este al ser utilizados como medios de transporte y recreación, por lo que son diversas las zoonosis que pueden afectar a ambos grupos biológicos; las de transmisión vectorial resultan las de mayor importancia por la complejidad para su prevención y control.

La garrapata *Dermacentor (Anocentor) nitens* fue la especie encontrada en mayor proporción afectando los caballos en este estudio, esto se corresponde con lo reportado en la literatura, pues para ella los hospederos principales son los Artiodáctilos y Perisodáctilos, entre los que se encuentran los caballos.<sup>2</sup> Tanto esta especie como *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* son consideradas de importancia médica y veterinaria, aunque *Amblyomma cajennense* por su amplia antropofilia afecta más frecuentemente a los humanos en Cuba.<sup>2,15</sup>

El método de extracción de ADN empleado resultó ser un proceso muy simple de liberación de material genético sin purificación, pero al realizar la PCR-RLB para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato se observó que, para las garrapatas ingurgitadas, la línea sobre la membrana donde se habían aplicado estas muestras se revelaba completamente a causa de la presencia de restos de sangre, lo que no permitió observar las manchas de hibridación en caso de que existiesen. Esta condición pudo inhibir la actividad de la enzima *Taq*

polimerasa en la reacción de amplificación por PCR y obtenerse resultados falsos negativos; dada esta dificultad se decidió no realizar PCR-RLB para la detección de los otros patógenos en estas muestras.

Los agentes patógenos detectados a partir de su material genético en este estudio, afectan fundamentalmente al ganado bovino, pero también se han reportado afectando a otros hospederos, incluido el hombre,<sup>2</sup> de ahí la emergencia de las enfermedades que ocasionan.

En Cuba se ha detectado la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* infectando frecuentemente la sangre de los bovinos.<sup>16,17</sup> Anticuerpos contra estas especies han sido encontrados en trabajadores agropecuarios expuestos a las mordeduras de las garrapatas que afectan al ganado,<sup>18</sup> *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es la especie principal de garrapata que transmite estos hemoparásitos; sin embargo, no existen en el país reportes anteriores publicados sobre estos patógenos en *Dermacentor (Anocentor) nitens* capturados de bovinos y equinos.

En esta investigación las sondas utilizadas en la RLB no permitieron discriminar exactamente si el material genético detectado correspondía a microorganismos del género *Anaplasma* o *Ehrlichia*, por lo que existe la posibilidad de la circulación de una nueva especie de *Anaplasma* no reportada en Cuba, pues la existente, *A. marginale*, estaba representada en las sondas específicas utilizadas, o la circulación de alguna especie de *Ehrlichia*, diferente a *E. ruminantium*, las cuales no han sido reportadas en Cuba; por lo que se necesita del estudio de un número mayor de garrapatas colectadas sobre caballos, así como de otros estudios genéticos como la RLB con nuevas sondas específicas para otras especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia*, o la secuenciación de los productos de ADN amplificados en la PCR.

La anaplasmosis bovina puede ser transmitida por artrópodos hematófagos como las garrapatas del género *Boophilus* y *Dermacentor*, moscas de establo (*Stomoxys calcitrans*), mosquitos (*Siphona* spp. y *Psophona* spp.), y tábanos (*Tabanus* spp.). En Cuba, aunque no se han realizado estudios de la transmisión de la anaplasmosis, se piensa que el principal vector involucrado son

las garrapatas del género *Boophilus*, teniendo en cuenta que es el género más extendido entre los bovinos en el país.<sup>19</sup> Otros animales susceptibles, para los que se han descrito infecciones subclínicas, son los búfalos de agua, ovinos y caprinos,<sup>19</sup> por lo que los resultados encontrados en este trabajo sugieren a *Dermacentor (Anocentor) nitens* como vector y a los equinos como posibles reservorios y susceptibles a la infección por *Anaplasma* sp., pues se ha reportado anteriormente en caballos la presencia de anaplasmosis o fiebre transmitida por garrapatas *A. phagocytophilum* en Europa, aunque el principal vector en estos casos ha sido *Ixodes ricinus*.<sup>20</sup>

La aplicación de las tecnologías moleculares, específicamente la RLB, ha demostrado tener múltiples ventajas, pues no se requiere de la secuenciación de ADN del producto de la PCR, se pueden identificar pequeñas cantidades de ADN, así como de diferentes grupos genómicos al unísono, y además permite distinguir la coinfección de una muestra por diferentes grupos genómicos,<sup>9</sup> por lo que se recomienda su utilización para el estudio de patógenos transmitidos por garrapatas. Se debe tener en cuenta el método utilizado para la extracción del ADN, pues cuando las garrapatas se encuentran repletas o ingurgitadas, no se debe utilizar el hidróxido de amonio, y en sustitución se deben emplear otros procedimientos como la extracción con fenol-cloroformo, donde se realiza una purificación del ADN obtenido, la cual impide que queden restos de sangre.

Los microorganismos encontrados en las garrapatas estudiadas que afectan a los caballos domésticos, constituyen una alerta epidemiológica y epizootiológica para la región en estudio y para Cuba en general, pues se podría completar un ciclo de transmisión zoonótica de estas entidades entre los animales, las garrapatas y el hombre, lo que tendría implicaciones sociales y económicas.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Confederación Suiza por la beca otorgada, así como al personal del Laboratorio de Ecoepidemiología de la Universidad de Neuchatel, Suiza, por todo el apoyo ofrecido para la realización de este trabajo.

## Molecular detection of emerging pathogens of medical and veterinary importance in ticks found in domestic horses

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** at present, there are several tick-borne emerging pathogen species of medical and veterinary importance. Few studies on these agents and its diseases have been made in Cuba. **OBJECTIVES:** to determine the presence of some of these pathogens in Cuban ticks existing in the equine cattle. **METHODS:** ninety five ticks collected from domestic use horses were processed, preserved in alcohol and taxonomically identified according to the set classifications. Their DNA was extracted and subjected to several polymerase chain reactions with specific primers for microbial groups *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma-Ehrlichia*, y *Babesia-Theileria*. Each of the products from polymerase chain reactions underwent reverse line blot hybridization using probes for each group as well as specific probes for the main species included in these groups. **RESULTS:** the studied ticks belonged to *Dermacentor (Anocentor) nitens* (60 %), *Amblyomma cajennense* (38 %) y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (2 %). Seven *Dermacentor (Anocentor) nitens* ticks infested with *Anaplasma/Ehrlichia* bacteria were detected but the species in question could not be detected by the used probes. One of these ticks was also co-infested with *Babesia bovis*. **CONCLUSIONS:** it is suggested that a new species of *Anaplasma* o *Ehrlichia*, not reported in Cuba before now, is circulating, so studying a higher number of ticks is needed and new probes in reverse line blot hybridization or other methodologies must be incorporated to allow exactly determining the species that may affect the Cuban domestic horses at present.

**Key words:** ticks, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria*, horses, polymerase chain reaction-reverse line blot hybridization.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Venzal JM, Castro O, Cabrera PA, de Souza CG, Guglielmone AA. Garrapatas de importancia médica y veterinaria en Uruguay. *Entomol Vect*. 2003;10(4):635-50.
- Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Keirans JK, Robbins RG. Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region. The Netherlands: Atlanta; 2003.
- Tait A, Oura C. Reverse line blotting: a new technique for the sensitive detection of tick borne pathogens. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 2004;81(1-4):47-50.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Becharra GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: ICTTD-3/Butantan; 2006.
- Guy EC, Stanek G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1991;44:610-1.
- Rijpkema S, Golubic D, Molkenboer M, Verbeek-De Kruif N, Schellekens J. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol*. 1996;20:23-30.
- Humair PF, Douet V, Moran-Cadenas F, Schouls L, Van de Pol I, Gern L. Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J Med Entomol*. 2007;44:869-80.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Van de Pol I, Schouls LM. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic Regions of Russia. *J Clin Microbiol*. 2001;39(6):2237-42.
- Rijpkema SGT, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 1995;33(12):3091-5.
- Poupon MA, Lommano E, Humair P-F, Douet V, Rais O, Schaad M, et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:976-9.
- Bekker CP, De Vos S, Taoufik A, Sparagano OA, Jongejan F. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet Microbiol*. 2002;89:223-38.
- Schouls LM, Van de Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2215-22.
- Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol*. 2001;99:273-86.
- Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, 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.
- Rodríguez I, Fernández C, Cinco M, Pedrosa R, Fuentes O. Do antiborrelial antibodies suggest Lyme disease in Cuba? *Emer Infect Dis*. 2004;10(9):1698-700.
- Alonso M, Blandino T, Mendoza S, Fedraga M, Baudin C, Rodríguez D, et al. Evaluación de una vacuna de *Babesia bovis* atenuada. *Rev Cubana Cienc Vet*. 1992;23(1):25-32.
- Rodríguez ON, Espaine L, Rivas A, Rodríguez P. Epizootiología de las enfermedades de los bovinos causados por hemoparásitos en la República de Cuba. *Rev Cubana Cienc Vet*. 1989;20:37-56.
- Suárez M, Alonso M, Peláez R, Sánchez B, Bravo JR, Sánchez A. Pesquisa de *Babesia* en trabajadores agropecuarios y donantes en la provincia de Ciego de Avila. *Rev Cubana Med Trop*. 1997;49(2):130-5.
- Corona B, Rodríguez M, Martínez S. Anaplasmosis bovina. *REDVET* 2004;6(4). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040405.html>
- Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum*-the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun*. 2007;31(Supl 1):79-84.

Recibido: 17 de junio de 2008. Aprobado: 25 de septiembre de 2008.  
Lic. Islay Rodríguez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, Marianao 13. Ciudad de La Habana. Cuba. Correo electrónico: islay@ipk.sld.cu