

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE PCR EN TIEMPO REAL  
BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *FLAB* PARA LA DETECCIÓN  
DE *BORRELIA BURGDORFERI* A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA**

**KATTYA MORENO TORRES**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO**

**MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

**OCTUBRE DE 2018**

**Desarrollo de una plataforma de pcr en tiempo real basada en la amplificación del gen *flab* para la detección de *borrelia burgdorferi* a partir de muestras de sangre. Tesis presentada por Kattya Moreno Torres, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado**

---

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO  
DIRECTOR DE TESIS

---

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA  
CO-DIRECTOR

---

DR. SERGIO ARTURO CUETO GONZÁLEZ  
ASESOR

---

DR. JOSÉ CARLOMÁN HERRERA RAMÍREZ  
ASESOR

---

DR. HECTOR MANUEL ACOSTA VALLE  
ASESOR

## RESUMEN

### **Desarrollo de una plataforma de PCR en Tiempo Real basada en la amplificación del gen FlaB para la detección de *Borrelia burgdorferi* partir de muestras de sangre**

La enfermedad de Lyme es ocasionada por especies patógenas de *Borrelia burgdorferi sensu lato* y se transmite principalmente por garrapatas *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*. La enfermedad de Lyme o borreliosis se reconoce como una enfermedad infecciosa emergente con serias implicaciones para la salud pública. El diagnóstico de esta enfermedad se fundamenta en el uso de pruebas serológicas, las cuales son útiles solo hasta después de dos semanas después de la infección cuando los anticuerpos alcanzan niveles detectables en la sangre, extendiendo el tiempo requerido para establecer el diagnóstico con el subsecuente retraso en el inicio de la terapia con antibióticos. Las técnicas de diagnóstico molecular se han convertido en una alternativa viable al diagnóstico serológico de borreliosis ya que ofrecen alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, además que generan resultados en poco tiempo. Los estudios moleculares sobre la secuencia genómica de *Borrelia* han permitido identificar genes con alto valor diagnóstico, dentro de los cuales destaca el gen *FlaB*, que codifica para una proteína flagelar. La homología de las secuencias de ADN, el alto grado de conservación y expresión de esos genes en especies patógenas de *Borrelia*, lo ubica como una sólida base de referencia para el desarrollo de plataformas de detección y diagnóstico molecular para esta enfermedad, siendo el objetivo de este trabajo

el desarrollo de una plataforma PCR en tiempo real basada en la amplificación del gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi*. Las muestras de ADN fueron probadas en un termociclador *BioRad* CFX96 empleando controles de ADN positivos provenientes de casos confirmados de enfermedad de Lyme en humanos, además de controles negativos de mezcla maestra sin ADN template y controles negativos de agua grado biología molecular. En todas las corridas se aplicó el análisis de curva de disociación para la identificación de curvas de amplificación específica para el producto de PCR discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del template de ADN. Asimismo, se generó una curva estándar empleando 9 órdenes de magnitud para establecer la eficiencia, precisión y límite de detección de la prueba. Los resultados demuestran el PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi* es altamente eficiente, preciso y específico, con alta sensibilidad analítica capaz de detectar entre 10 y 100 copias de DNA por reacción. Al analizar muestras de campo procedentes de perros callejeros infestados con garrapatas, el PCR en tiempo real detecto ADN de *Borrelia burgdorferi* en 44/47 muestras probadas. Se concluye que la plataforma de PCR en tiempo real desarrollada en este trabajo es una herramienta confiable, precisa y sensible para la detección de *Borrelia burgdorferi* en perros.

Palabras clave: *Borrelia burgdorferi*, enfermedad de Lyme, PCR en tiempo real, salud pública, enfermedades zoonóticas

## ABSTRACT

### **Development of a real time PCR platform based on the amplification of the *FlaB* gene for the detection of *Borrelia burgdorferi* in blood samples**

Lyme disease is caused by pathogenic species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and is transmitted mainly by *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* ticks. Lyme disease or borreliosis is recognized as an emerging infectious disease with serious implications for public health. The diagnosis of this disease is based on the use of serological tests, which are useful only after two weeks after infection when the antibodies reach detectable levels in the blood, extending the time required to establish the diagnosis with the subsequent delay in starting the antibiotic therapy. Molecular diagnostic techniques have become an alternative to the serological diagnosis of borreliosis since they are highly sensitivity, reproducible and efficient, in addition to generating results in a short period of time. The molecular studies on the genomic sequence of *Borrelia* have allowed the identification of genes with a high diagnostic value, particularly the *FlaB* gene, which codes for the flagellar protein. The homology of the DNA sequence and the high degree of conservation and expression of the FlaB gene in pathogenic species of *Borrelia*, make this gene a solid base of reference for the development of molecular detection and diagnosis platforms for this disease, being the objective of this work, the development of a real time PCR platform based on the amplification of the *FlaB* gene of *Borrelia burgdorferi*. The DNA samples were tested in a BioRad CFX96 thermocycler using positive DNA controls from confirmed cases of Lyme disease in humans,

in addition to negative controls containing master mix without template DNA and negative controls containing molecular biology grade water. In all runs, a dissociation curve analysis was applied for the identification of specific amplification curves for the PCR product and to discriminate between artifacts different to the target DNA template. Additionally, a standard curve was generated using 9 orders of magnitude to establish the efficiency, precision and detection limit of the test. The results demonstrate the real-time PCR system for *Borrelia burgdorferi* that is highly efficient, precise and specific, with high analytical sensitivity capable of detecting between 10 and 100 copies of DNA per reaction. When analyzing field samples from street dogs infested with ticks, the real time PCR platform detected target *Borrelia burgdorferi* DNA in 44/47 samples tested. We is concluded that the real time PCR platform developed in this work is a reliable, accurate and sensitive tool for the detection of *Borrelia burgdorferi* in dogs.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease, real-time PCR, public health, zoonotic diseases

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	ii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	4
REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
Antecedentes .....	8
Epidemiología .....	8
Distribución .....	9
Factores de riesgo .....	10
Prevalencia .....	12
Vectores .....	13
Diagnóstico .....	15
Cultivo microbiológico .....	16
PCR convencional y PCR en Tiempo Real .....	16
Pruebas indirectas .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
Localización del área de estudio .....	20
Muestras de sangre y garrapatas .....	20
Extracción ADN .....	21
Controles positivos para <i>Borrelia burgdoferi</i> .....	22
Gen FlaB de <i>Borrelia burgdoferi</i> .....	23
Oligonucleótidos para el gen FlaB de <i>Borrelia burgdoferi</i> .....	23
Estandarización de reactivos para PCR en Tiempo Real .....	26
Curva estándar para RT-PCR de <i>Borrelia burgdoferi</i> .....	27
Pruebas de PCR en Tiempo Real .....	28

Interpretación de resultados .....	28
RESULTADOS .....	30
Estandarización de PCR en Tiempo Real .....	30
Desempeño de controles positivos del PCR en Tiempo Real .....	30
Curva estándar para el PCR en Tiempo Real .....	33
Resultados del PCR en Tiempo Real .....	33
DISCUSION .....	35
LITERATURA CITADA .....	43



## LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de <i>FlaB</i> con referencia GenBank NC_001318.1 .....	25
CUADRO 2. Optimización de volúmenes y concentraciones óptimas de reactivos para el PCR en tiempo real que amplifica un fragmento de 97 pb del gen <i>FlaB</i> de <i>Borrelia Burgdorferi</i> .....	26
CUADRO 3. Optimización de oligonucleótidos con mezcla maestra EvaGreen para el PCR en tiempo real de <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	31
CUADRO 4. Desempeño de controles positivos confirmados y controles negativos utilizados en la plataforma de PCR en tiempo real para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	32
CUADRO 5. Resultados del PCR en tiempo real para <i>Borrelia burgdorferi</i> en muestras de ADN obtenido de la capa flogística de perros capturados por el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali .....	34

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Curvas de amplificación (A) y disociación (B) de controles positivos y negativos obtenidas durante el proceso de optimización del PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi* ..... 32

FIGURA 2. Curva estándar para el PCR en tiempo real de *Borrelia burgdorferi* a partir de la amplificación del gen *FlaB* en diluciones seriadas (10X) de una muestra cuantificada conocida de DNA ..... 34

## INTRODUCCIÓN

La infección producida por *Borrelia burgdorferi* es responsable de más del 90% de los casos de enfermedad de Lyme en el Continente Americano y es considerada como una de las enfermedades zoonóticas bacterianas más frecuentes que transmiten las garrapatas en todo el mundo. La enfermedad de Lyme ocasiona afectaciones en piel, siendo el *eritema migrans* la lesión más característica de la enfermedad, la cual frecuentemente se resuelve sola, sin embargo, cuando la infección persiste en pacientes susceptibles, es posible que puedan ocurrir afectaciones en el sistema nervioso, articulaciones y corazón (Briciu et al., 2016, Stanek et al., 2012).

La enfermedad de Lyme se reconoce como una enfermedad infecciosa emergente con serias implicaciones para la salud pública, se transmite principalmente por garrapatas de las especies *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* donde ciertos mamíferos silvestres, aves e incluso reptiles fungen como reservorios. Los síntomas de enfermedad de Lyme se asemejan a los de otras enfermedades febriles como la influenza, leptospirosis o rickettsiosis, lo cual pone de manifiesto la necesidad de establecer un diagnóstico rápido y preciso de la causa primaria de la enfermedad y la aplicación del tratamiento correspondiente lo más temprano posible, ya que el diagnóstico y tratamiento temprano es la forma más efectiva de evitar que la enfermedad evolucione a un estado agudo con potenciales complicaciones a largo plazo.

El diagnóstico de enfermedad de Lyme se fundamenta principalmente en el uso de pruebas serológicas que detectan anticuerpos, siendo las pruebas

más comunes y disponibles en la actualidad, sin embargo; la serología solo es útil hasta después de dos semanas post-infección, tiempo requerido para que el sistema inmune produzca niveles detectables de anticuerpos en la sangre, lo cual extiende el tiempo requerido para el establecimiento del diagnóstico y retraso en el inicio del tratamiento con antibióticos. Otros métodos de diagnóstico para la enfermedad de Lyme incluyen la detección de antígenos en orina o anticuerpos en líquido sinovial. En la actualidad se utiliza un proceso de diagnóstico en dos etapas, en la primera se utiliza una prueba ensayo inmunoenzimática (ELISA) como prueba de escrutinio si resulta positivo se envía para confirmación en una segunda etapa empleando la técnica de inmunolectroforésis (SDS-PAGE). No obstante la disponibilidad del SDS-PAGE, este método no es capaz de producir resultados lo suficientemente rápido para tomar la decisión de iniciar la terapia con antibióticos más adecuada en etapas tempranas de infección (Marques, 2010).

Como alternativa al diagnóstico serológico de enfermedad de Lyme, durante la última década se han aplicado plataformas moleculares basadas en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y más recientemente, técnicas PCR en tiempo real para el diagnóstico de *Borrelia* con altos niveles de sensibilidad, especificidad y eficiencia, muy superiores a los que ofrecen las pruebas serológicas de rutina, eliminando la necesidad de obtener un cultivo bacteriológico positivo para confirmar la presencia de *Borrelia* y con la ventaja adicional de generar resultados en horas en lugar de semanas o meses que requiere el cultivo microbiológico (Marques, 2015).

En la búsqueda de estrategias de detección y diagnóstico más eficientes para *Borrelia burgdorferi*, se han identificado distintos genes candidatos para el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico molecular para esta enfermedad. De ellos, destaca el gen que codifican para la flagelina (*FlaB*), una proteína asociada al sistema de locomoción de *Borrelia* (Venczel et al., 2015). La homología en la secuencia de ADN, así como el alto grado de conservación de estos genes en bacterias patógenas del género *Borrelia*, lo ubica como una sólida base de referencia para el desarrollo de plataformas de detección y diagnóstico molecular de la enfermedad de Lyme empleando plataformas PCR en tiempo real.

## JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Lyme es una de las principales zoonosis transmitidas por garrapatas en el mundo y la más frecuente en los Estados Unidos con aproximadamente 300,000 casos reportados anualmente. A pesar que los casos reportados se encuentran principalmente en el norte y el medio este de ese país, los cambios climáticos y ecológicos han creado una expansión geográfica notable de la garrapata que transmite esta enfermedad (Moore et al., 2016).

La enfermedad de Lyme frecuentemente transcurre con un cuadro asintomático, sin embargo; pacientes con sintomatología evidente pueden presentar afectaciones cardíacas, articulares y nerviosas en estadios tardíos de la enfermedad, con una gran variedad de síntomas que pueden prolongarse por meses e incluso años (Tabbasam, 2016). El diagnóstico de esta enfermedad es complicado ya que los síntomas se asemejan a los de otras enfermedades también frecuentes en la región. Las dificultades en el establecimiento de infección por *Borrelia burgdorferi* se deben principalmente a que el diagnóstico se fundamenta en el uso de pruebas serológicas, las cuales solo producen resultados confiables después de dos semanas post-infección, extendiendo el tiempo para establecer un diagnóstico y por lo tanto, retraso en el inicio del tratamiento con antibióticos. Además, estas pruebas no son capaces de distinguir entre una infección activa de una cursada anteriormente, ya que un paciente puede producir resultados positivos a la serología meses o años después de la infección original, incluso cuando se administró una terapia

adecuada. Lo anterior, hace necesario el desarrollo y aplicación de pruebas más rápidas, seguras y eficaces para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.

En ese sentido, las pruebas moleculares, particularmente las basadas en plataformas de PCR en tiempo real se han convertido en la alternativa tecnológicamente adecuada para el diagnóstico de esta enfermedad, siendo capaces de establecer un diagnóstico definitivo en pocas horas, permitiendo a los profesionales de salud contar con una herramienta de diagnóstico confiable para iniciar la terapia de sostén y el tratamiento con antibióticos.

## REVISIÓN DE LITERATURA

La enfermedad de Lyme o borreliosis de Lyme es una infección multisistémica causada por las especies de espiroquetas pertenecientes al grupo de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, que son *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelli* y más recientemente *Borrelia mayonii*. Esta última, fue descubierta en un trabajo conjunto realizado por la Clínica Mayo, agencias estatales de salud pública y los *Centers for Disease Control* (CDC) de los Estados Unidos. Este grupo de bacterias son transmitidas principalmente por las garrapatas de la especie *Ixodes*. En los Estados Unidos solo se reconoce a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* y *Borrelia mayonii* como agentes causales de la enfermedad de Lyme, mientras que las restantes se consideran agentes causales de esa enfermedad en Europa y Asia (Pritt et al., 2016, Hengge et al., 2003).

*Borrelia burgdorferi* es un organismo Gram negativo con una longitud de 10 a 30 micras ( $\mu\text{m}$ ) de largo y de 0.2 a 0.25  $\mu\text{m}$  de ancho. La estructura de las distintas especies de *Borrelia*, incluyendo *Borrelia burgdorferi*, es parecida al de otras espiroquetas, la cual se caracteriza por la presencia de siete flagelos periplasmáticos unidos al cilindro protoplasmático y sobrepuesto al centro de la célula, donde el principal componente es la *flagellina*, una proteína de 41 Kilodaltones (KDa) cuya estructura genética y proteínica es altamente conservada entre estas especies de *Borrelia*. La membrana externa de *Borrelia* contiene seis proteínas de superficie denominadas *OspA hasta OspF*. Las proteínas *Osp* (*Outer surface protein*) se encuentran ancladas a la membrana



externa a través de estructuras lipídicas e incluyen *OspA*, *OspB*, y *OspC*, lipoproteínas de 32, 34, y 24 KDa, respectivamente. Una característica sobresaliente de este grupo de proteínas de membrana es que son codificadas por genes plásmidos. Aunque la función específica de las lipoproteínas *Osp* no se conoce, los distintos genes que codifican para las *Osp* son expresados durante diferentes etapas de la transmisión. Se ha sugerido que estas proteínas de membrana externa ayudan a la espiroqueta a adaptarse y sobrevivir en diferentes ambientes (Marques, 2010, Hengge et al., 2003).

Los genomas de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* cepa B31, *Borrelia afzelii* cepa PKo y *Borrelia garinii* cepa PBi han sido secuenciados; sus genomas se consideran pequeños, de aproximadamente 1.5 millones de pares de bases (pb), poseen un cromosoma inusualmente linear de 900,000 a 950,000 bases y múltiples plásmidos de conformación linear y circular (Casjens et al., 2000, Hengge et al., 2003). El número y tamaño de plásmidos varía entre las distintas cepas y contienen muchos de los factores necesarios para la sobrevivencia durante el complejo ciclo de vida del microorganismo. Los genes cromosomales codifican las proteínas necesarias para la división, metabolismo energético y el transporte de nutrientes. No se han identificado cuales son los genes que codifican para los factores asociados a virulencia. Los factores ambientales como la temperatura y la alimentación de la garrapata afectan la expresión de los genes en *Borrelia burgdorferi*, lo que puede relacionarse con las propiedades de virulencia e inmunogenicidad de estas bacterias (Hengge et al., 2003).

## **Antecedentes**

A finales del siglo XX, la enfermedad de Lyme o borreliosis de Lyme fue reconocida como una importante infección emergente. Ahora es conocida como una de las enfermedades transmitidas por garrapatas más frecuentemente reportadas en Estados Unidos y Europa (Steere et al., 2004, Rudenko et al., 2011). La enfermedad de Lyme fue identificada como el agente causal de casos de artritis reumatoide juvenil artritis en 1976 en un grupo de niños en el área de Lyme, Connecticut. Los síntomas orientaban el diagnóstico hacia una enfermedad multisistémica similar a una reportada anteriormente en Europa. En 1981, Burgdorfer y su equipo de colaboradores descubrieron una bacteria en forma de espiroqueta no conocida hasta entonces en una ninfa de garrapata *Ixodes scapularis*. Posteriormente, muestras de sangre de pacientes con síntomas de la enfermedad de Lyme fueron sometidas a cultivo microbiológico logrando aislar *Borrelia burgdorferi* y estableciendo una asociación entre la presencia de síntomas característicos de enfermedad reportada en Lyme con infección por esta bacteria (Steere et al., 2004).

## **Epidemiología**

La enfermedad de Lyme es una enfermedad multisistémica reportada principalmente en Norte América, Europa y Asia. El agente causal es un grupo de espiroquetas del grupo de *Borrelia*, donde *Borrelia burgdorferi* es responsable de más del 90% de los casos reportados anualmente. La enfermedad se transmite principalmente por garrapatas de la especie *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*.

## **Distribución**

La enfermedad de Lyme es de distribución mundial. Es la enfermedad reemergente transmitida por un vector artrópodo más frecuentemente reportada en los Estados Unidos y Europa (Rudenko et al., 2011). Los focos de enfermedad se encuentran principalmente en Asia, Europa y Estados Unidos (WHO, 2016). Las espiroquetas del grupo *Borrelia burgdorferi sensu lato*, son transmitidas principalmente por la mordedura de garrapatas del grupo *Ixodes*. La enfermedad de Lyme ocurre con la misma frecuencia en hombres y mujeres de cualquier edad. Las estimaciones de la incidencia de esta enfermedad son complicadas debido a la alta frecuencia de diagnósticos erróneos con enfermedades que producen un cuadro clínico muy similar. Durante la década del 2000, los CDC de los Estados Unidos, reportaron más de 300,00 casos por año (Dantas-Torres et al., 2012). Se han encontrado diferencias entre los genotipos de *Borrelia burgdorferi* en las diferentes zonas de Estados Unidos. Estas diferencias podrían deberse a las distintas interacciones de la garrapata vector con múltiples reservorios en las diferentes regiones geográficas mencionadas (Rudenko et al., 2011).

Desde el descubrimiento de *Borrelia burgdorferi*, un gran número de aislamientos microbiológicos se han obtenido a partir de diferentes especies de vertebrados, incluso humanos. A excepción de *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelli* y *Borrelia garinii* fueron consideradas por mucho tiempo como los únicos agentes causales de la enfermedad de Lyme alrededor del mundo. Las espiroquetas de *Borrelia* son transmitidas al hospedero por los tres estadios de las garrapatas *Ixodes*, aunque el estadio de ninfa parece ser el más

importante (Rudenko et al., 2011). El espectro de las enfermedades transmitidas por garrapatas en estos años se ha incrementado, muchas enfermedades importantes transmitidas por garrapatas como la enfermedad de Lyme, anaplasmosis, babesiosis y ehrlichiosis se han comprendido mucho mejor gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular aplicadas para la identificación de nuevas especies, cepas y variantes genéticas de estos microorganismos en todo el mundo y la lista de patógenos continua en aumento (Dantas-Torres et al., 2012).

El descubrimiento de nuevas especies de *Borrelia* relacionadas a la borreliosis de Lyme cambia drásticamente el entendimiento y reconocimiento de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se sabe desde hace tiempo que la borreliosis de Lyme desarrolla un cuadro clínico y síntomas muy parecidos a un gran espectro de enfermedades como encefalopatía crónica, esclerosis múltiple con linfoma de efusión primaria, afecciones cardíacas, desordenes psiquiátricos, hipersomnia, estrabismo paralítico y síndrome de Horner, entre otros. Sin embargo, se requiere de evidencia más precisa sobre de la etiología de las enfermedades mencionadas antes de aceptar cualquier relación entre las *Borrelia* y cualquiera de ellas (Rudenko et al., 2011).

### ***Factores de riesgo***

Los grupos de mayor riesgo para contraer la enfermedad son los individuos que viven o trabajan en áreas donde la enfermedad es endémica (Robertson et al., 2000). Distintos tipos de trabajo y actividades recreacionales en áreas boscosas como la caza, granjeros y personal militar entre otros, se consideran grupos de alto riesgo en Europa, donde los hombres han sido

reportados con mayor prevalencia de anticuerpos a partir de pruebas serológicas debido probablemente por una mayor exposición a las garrapatas (Lindgren, 2006). Los periodos de mayor riesgo reportados en Europa ocurren en distintos momentos entre las diferentes estaciones. Los síntomas aparecen desde el segundo y hasta los 30 días después de la mordida de la garrapata por lo que el incremento en el número de casos reportados de enfermedad de Lyme aumentan poco después de un período con temperaturas templadas cuando aumenta la actividad de las garrapatas. En Suecia los casos de Lyme son reportados a lo largo de todo el año siendo entre julio a agosto los meses con mayor número de personas afectadas (Lindgren, 2006, Asbrink et al., 1986). Estos patrones de enfermedad asociados a una temporada particular se deben en parte a que durante julio se celebran en ese país ciertos festejos donde se recolectan bayas y hongos silvestres, además de ser el inicio de temporada de caza (Lindgren, 2006).

En los Estados Unidos se reporta una mayor incidencia de enfermedad de Lyme en niños de 5 a 14 años de edad no obstante que los casos se reportan durante todo el año, destacan los meses de junio, julio y agosto, donde la mayoría de los casos son reportados y coinciden con los meses de actividad de las garrapatas cuando se encuentran en búsqueda de huéspedes para alimentarse (CDC, 2008). Además de las zonas boscosas, uno de los principales factores de riesgo, es el tipo de suelo y cuencas hidrográficas disponibles en una zona geográfica determinada, ya que juegan un papel importante en el ciclo de vida de las garrapata, debido principalmente por la abundancia de mamíferos que rodean esas zonas (Glass et al., 1995).

## ***Prevalencia***

En los Estados Unidos, los CDC reportaron durante el año 2015 un total de 28,453 casos confirmados de enfermedad de Lyme para una prevalencia de 8.9 casos por cada 100,000 habitantes, siendo los estados del noreste los más afectados con el 90% de los casos reportados durante ese período. Sin embargo, los datos reportados por los CDC no reflejan la cantidad real de casos diagnosticados de enfermedad de Lyme en ese país. Debido a eso, los CDC se han dado a la tarea de buscar fuentes de datos más certeros que incluya solo a personas en quienes se obtuvo un resultado positivo a una prueba serológica y no solo con base en datos obtenidos de historias clínicas. De esta forma se logró establecer por primera vez en el año 2008 un total 288,000 casos de enfermedad de Lyme a partir de datos de laboratorio (Hinckley et al., 2014). Estos datos contrastan con los reportados para enfermedad de Lyme en las bases de datos de las grandes compañías de seguros, las cuales reportan un total de 329,000 casos de la enfermedad para ese mismo período (Nelson et al., 2015, CDC, 2008).

La enfermedad de Lyme en Europa es considerada la principal enfermedad transmitida por vectores con una incidencia de 4.7 casos por cada 100,000 habitantes para el año 2010 (ECDC, 2014). A pesar de que la prevalencia es relativamente baja, en Europa cada año se reportan hasta 85,000 casos de la enfermedad (Lindgren, 2006). El rango promedio de incidencia más alto para enfermedad de Lyme fue reportado en países como Bélgica, Bulgaria, Eslovenia, Finlandia, Hungría, Croacia, Noruega, Polonia, República Checa y la federación Rusa entre los años 1990 y 2010, con

prevalencias que variaban desde 5 casos por cada 100,000 habitantes en Bulgaria hasta más de 130 casos por cada 100,000 habitantes en Eslovenia (ECDC, 2014).

## **Vectores**

Las garrapatas se encuentran divididas en dos grandes familias, la *Argasidae* también conocidas como garrapatas de cuerpo blando, y la familia *Ixodidae*, como las garrapatas de cuerpo duro. Existen diferencias entre los ciclos de vida de ambas familias pero todas las garrapatas son parásitos obligados temporales que se caracterizan por un complicado ciclo de vida que implica estadios de larva (eclosión del huevo), donde después de alimentarse caen al suelo y se transforman en ninfas. En el estadio de ninfa, cuando encuentran un hospedero adecuado, vuelven a alimentarse y regresan al suelo para volver a transformarse en ahora adultos. En la fase adulta, la garrapata encontrará un tercer hospedero donde se alimenta, se aparea y pone huevos en caso de las hembras. La hembra adulta pone miles de huevos que son dejados en sitios favorables para la sobrevivencia de estos. En cada etapa de alimentación, las garrapatas pueden entrar al ciclo de transmisión de algún patógeno, ya sea de manera horizontal o vertical. Para que algún patógeno transmitido por garrapatas y pueda perpetuar en el ambiente es necesario que sea adquirido por algún hospedero ya infectado y transmitido entre los estadios del vector, en este caso la garrapata, para luego ser transmitido a un nuevo hospedero (Estrada-Pena and de la Fuente, 2014).

Después de la ingesta de sangre, los patógenos permanecen en los intestinos de la garrapata con la sangre ingerida. Cada patógeno cuenta con

mecanismos diferentes para pasar a través de la membrana intestinal. Distintos estudios de laboratorio han demostrado que algunos patógenos entran a las células del intestino expresando ciertas moléculas capaces de reconocer receptores específicos de las membranas celulares. *Borrelia burgdorferi* expresa las *OspA*, *OspB* y *OspD* cuando se encuentra en los intestinos de la garrapata lo que sugiere que promueven la persistencia de la bacteria en la garrapata. Durante la transmisión al huésped mamífero, cuando la garrapata comienza a alimentarse, las espiroquetas que se encuentran en el intestino medio comienzan a multiplicarse rápidamente, la mayoría de las espiroquetas dejan de expresar *OspA* y simultáneamente aumenta la expresión de la *OspC* y migran a las glándulas salivares de la garrapatas durante el primer día de alimentación, llegando a su pico máximo a las 48 horas después de la unión (Estrada-Pena y de la Fuente, 2014).

El tiempo y duración del ciclo varía en gran medida con la temperatura a las que se desarrollan las garrapatas, algunas llegan a finalizar su ciclo de vida en un año, mientras que otras pueden tardar hasta tres, estas son principalmente aquellas que se desarrollan en climas fríos. La longevidad de las garrapatas depende de la cantidad de energía obtenida en su ingesta de sangre previa y como es utilizada dependiendo del estrés climático (Estrada-Pena y de la Fuente, 2014). Las garrapatas utilizan diferentes tipos de hospederos según el estadio en que se encuentren, en estadios tempranos, tienden a parasitar animales pequeños como roedores y aves, mientras que en los últimos estadios de vida se alimentan de carnívoros más grandes y ungulados. Lo anterior no ocurre como regla general puesto que existen especies de garrapatas



específicas a un hospedero y la presencia de este, es clave para la que una especie de garrapata sobreviva en un área determinada (Estrada-Pena y de la Fuente, 2014).

### **Diagnóstico**

La mayoría de las pruebas de laboratorio empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme están basadas en la detección de anticuerpos (pruebas indirectas) cuya sensibilidad incrementa con la duración de la infección, lo que significa que los estadios tempranos de la enfermedad tienden a dar resultados falsos-negativos como consecuencia de una respuesta inmune inmadura con niveles de anticuerpos bajos, apenas detectables. La recomendación de los CDC para el diagnóstico de esta enfermedad consiste en un algoritmo de dos niveles. En el primer nivel se realiza una prueba ELISA que al resultar negativa, se recomienda no seguir con la detección del agente de Lyme; si la prueba resulta ser positiva, se confirma por medio de un SDS-PAGE empleando anticuerpos tipo IgG e IgM (Sanchez et al., 2016). Este algoritmo funciona muy bien para los estadios tardíos de la enfermedad, sin embargo; tiene muy poca sensibilidad en las etapas tempranas de la enfermedad, que es el período más recomendable para iniciar la terapia de antibióticos para la enfermedad de Lyme y reducir las posibilidades de mayores complicaciones posteriores (Marques, 2015).

### ***Cultivo microbiológico***

El cultivo microbiológico no es un método de diagnóstico que se realice de forma rutinaria ya que es técnicamente complicado además de poco sensible. Los periodos de incubación suelen ser muy largos por el mismo hecho

de que la mayoría de las muestras cuentan con poca carga bacteriana y sumándose el hecho de que *Borrelia burgdorferi* tiene una capacidad metabólica limitada, por lo que requiere un medio de cultivo complejo (Sanchez et al., 2016, Aase et al., 2016). *Borrelia burgdorferi* tiene una capacidad metabólica limitada por lo que requiere un medio complejo para crecer y tiempo prolongado para multiplicarse, lo que hace que los cultivos requieran de ocho a 12 semanas de incubación antes de ser considerados negativos (Liveris et al., 2011, Marques, 2015). Los cultivos a partir de biopsias de eritema migrans llegan a tener una sensibilidad de 40-60% (Marques, 2015, Liveris et al., 2013) lo que puede variar según el tiempo de la lesión y la especie de *Borrelia* además de la respuesta del sistema inmune del hospedero. El cultivo a partir de muestras de plasma de pacientes aun sin tratamiento llega a tener una sensibilidad del 40%, (Marques, 2015). Sin embargo, los cultivos de muestras sanguíneas provenientes de pacientes con múltiples lesiones dermatológicas tiene mejores probabilidades de resultar positivo (Liveris et al., 2013).

### ***PCR convencional y PCR en tiempo real***

Las plataformas de diagnóstico molecular basadas en técnicas PCR convencional y PCR en tiempo real proporcionan una alternativa más sensible y específica que el cultivo celular, particularmente las plataformas PCR en tiempo real ya que requiere menos de 100 de moléculas de DNA disponibles para producir un resultado positivo, además que las plataformas de PCR convencional y PCR en tiempo real no requieren de microorganismos vivos para producir un resultado positivo y el tiempo requerido desde el procesamiento de la muestra para extracción de ADN hasta el resultado final puede ser de menor

de un día (Strube et al., 2010). Además, el PCR en tiempo real es capaz de diferenciar entre otros patógenos que producen infecciones con cuadro clínico similar a la enfermedad de Lyme como *Babesia*, *Ehrlichia* o *Anaplasma*, cuando se utilizan juegos de oligonucleótidos específicos y se aplica el análisis por curva de disociación (Pritt et al., 2016).

Los ensayos PCR en tiempo real son la opción ideal para la confirmación en laboratorio de casos sospechosos de enfermedad de Lyme ya que han demostrado ser altamente específicos, detectando acertadamente el ADN extraído de diversas cepas de *Borrelia burgdorferi* que representan todas las especies principales que causan enfermedad de Lyme y diferenciando de otras especies microbianas no relacionadas. El PCR en tiempo real es altamente reproducible y sensible con límite de detección inferior de 6 copias de ADN por cada reacción. Al comparar el PCR en tiempo real con el cultivo a partir de muestras de biopsia de piel tomadas de pacientes que presentaban lesión eritematosa migrante, el PCR en tiempo real basado en el gen *recA*, un gen indispensable para los mecanismos de recombinación, replicación y reparación del ADN bacteriano; fue más sensible que el cultivo al lograr identificar 77.7% de biopsias positivas frente a 55.1% logradas por el cultivo (O'Rourke et al., 2013).

En general la sensibilidad del PCR es superior al del cultivo (O'Rourke et al., 2013). La diferencia fundamental entre ambos procedimientos estriba en la simplicidad de la realización del PCR y el tiempo en la generación de resultados. Es evidente que si el propósito principal del diagnóstico temprano de la enfermedad de Lyme es el inicio de la terapia con antibióticos lo más pronto

posible, cualquier técnica de diagnóstico que logre reducir de semanas/meses a horas/días la generación de un resultado, será la más adecuada y pertinente para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad (Picken et al., 1997, Li et al., 2011). En pruebas PCR que amplifican el gen 16S de *Borrelia* a partir de muestras de líquido sinovial pueden llegar a detectar entre 70 al 85% de los pacientes con artritis de Lyme (Li et al., 2011).

### ***Pruebas indirectas***

Este tipo de pruebas se basan en el análisis de la respuesta inmune hacia el agente causal. La mayoría de estas pruebas están basadas en la detección de anticuerpos en suero y son el único método diagnóstico clínico aprobado por el United States Department of Agriculture (USDA). Con el objetivo de mejorar la especificidad de este tipo de pruebas los CDC utilizan el algoritmo de 2 niveles mencionado anteriormente. A pesar de que es una prueba que trabaja relativamente bien, utilizándose cuando se recomienda, la baja sensibilidad en etapas tempranas de la enfermedad, la interpretación subjetiva de las bandas y la confusión al momento de interpretar los resultados siguen siendo factores que conducen a la búsqueda y validación de pruebas de diagnóstico alternativas (Marques, 2015, Leeflang et al., 2016).

El diagnóstico preciso por medio de las pruebas indirectas está relacionado con factores como el tiempo en el que la muestra fue recolectada con respecto al estadio de la enfermedad, la respuesta inmune del hospedero y la selección apropiada de los péptidos inmunodominantes o los antígenos, lo que complica la interpretación de resultados de las pruebas serológicas (Theel, 2016, Leeflang et al., 2016). El 80% de los pacientes llega a presentar una

lesión en la piel, en los estadios tempranos de la enfermedad (de 7 a 14 días después de la mordedura de la garrapata) pero solo del 10% al 50% llegan a tener respuesta de anticuerpos detectables (Aguero-Rosenfeld y Wormser, 2014, Leeflang et al., 2016).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del área de estudio**

Las muestras de sangre y especímenes de garrapatas fueron colectadas en el Centro Municipal de Control Animal (CMCA) de Mexicali, Baja California y las tareas de procesamiento, extracción de ADN y pruebas de PCR en tiempo real se realizaron en el área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Serología de la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) en la ciudad de Mexicali, Baja California, México.

### **Muestras de sangre y garrapatas**

Se colectaron 47 muestras de sangre provenientes de animales capturados por el CMCA que al momento del muestreo se encontraban infestados con garrapatas. Los muestreos se ejecutaron entre los meses de julio y agosto de 2017 y las muestras fueron tomadas durante el procedimiento de eutanasia a que son sometidos los perros. Brevemente, los perros fueron sedados con xilacina por vía intramuscular y posteriormente sujetos a una sobredosis de pentobarbital sódico, procedimiento que produce un paro cardio-respiratorio sin sufrimiento del animal. Una vez alcanzado el plano anestésico profundo, se colectó una muestra de sangre entre 5 a 10 ml por punción directa al corazón empleando una jeringa de 20 ml. La sangre colectada fue colocada en uno o dos tubos evacuados con EDTA como anticoagulante. Una vez obtenida la muestra de sangre, se procedió a colectar la totalidad de las garrapatas presentes en cada animal muestreado empleando pinzas de

disección de punta aguda. La extracción de las garrapatas se realizó colocando la punta de las pinzas en la base del aparato bucal de las garrapatas y retirando el parásito en dirección opuesta a la piel del animal. Las garrapatas fueron colocadas en tubos de 15 ml de capacidad conteniendo 7.5 ml de etanol al 70% para su conservación. Para obtener la capa flogística, las muestras de sangre con anticoagulante fueron almacenadas en refrigeración a 4°C por un período de 18 a 24 horas para permitir la sedimentación de los componentes sanguíneos y la formación de la capa flogística de forma natural. Posteriormente, el plasma fue aspirado empleando una pipeta de 1000 micro litros ( $\mu$ l) y depositado el fluido en tubos cónicos estériles de 1.5 ml de capacidad. La capa flogística fue colectada aspirando lentamente la capa celular ubicada inmediatamente sobre la columna de eritrocitos empleando una pipeta de 200  $\mu$ l, colectando un volumen entre 200 a 300  $\mu$ l el cual fue depositado en tubos cónicos estériles de 1.5 ml de capacidad. Las muestras de plasma y capa flogística fueron almacenadas en congelación a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las muestras de capa flogística se realizó utilizando los juegos de reactivos *PureLink<sup>TM</sup> Genomic DNA Mini Kit* de *Invitrogen* (Carlsbad, California, EUA), número de catálogo K182002. Para la extracción de ADN se siguió el protocolo para aislamiento de ADN genómico a partir de muestras de sangre completa. El ADN extraído de las muestras de capa flogística fue reconstituido en un volumen final de 50  $\mu$ l empleando la solución de rehidratación de ADN suministrada con los juegos de reactivos. El

ADN extraído fue almacenado en congelación a -20°C hasta el momento de ejecutar las pruebas de PCR en tiempo real.

### **Controles positivos para *Borrelia burgdorferi***

Como controles de referencia se utilizaron tres muestras de plasma independientes positivas para *Borrelia burgdorferi* procedentes de pacientes humanos en quienes fue confirmada la enfermedad de Lyme. Esos especímenes fueron amablemente proporcionados por el Departamento de Epidemiología del Hospital General de Mexicali, dependiente de la Secretaría de Salud de Baja California (DGE-SSBC).

Las muestras de plasma fueron sometidas al mismo proceso de extracción de ADN utilizado para las muestras de capa flogística y fueron utilizadas como controles de referencia para la etapa de instrumentación, validación y ejecución de las pruebas de laboratorio de la plataforma PCR en tiempo real de este trabajo. Brevemente, una vez obtenido el ADN a partir de cada una de las tres muestras de plasma, se generó una alícuota combinada la cual fue probada y amplificada empleando la plataforma RT-PCR aquí descrita.

El producto amplificado del PCR obtenido de esas pruebas mezclado y homogenizado en una sola alícuota y titulado en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, Delaware, EUA*) para obtener el número de copias de ADN por micro litro de producto del PCR. El ADN titulado fue utilizado posteriormente como referencia cuantitativa para construir la curva estándar del PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi*.



### **Gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi***

Para el desarrollo de la plataforma de PCR en tiempo real se utilizó la secuencia de referencia de *Borrelia burgdorferi* B31 con número de acceso al *GenBank* NC\_001318.1. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *FlaB* (*flagellin*) con número de identificación *GeneID*: 1194982, ubicado entre la posición 147,649 a 148,659 de la secuencia de referencia de *Borrelia burgdorferi* arriba mencionada. La secuencia del gen *FlaB* corresponde a una molécula de ADN cromosomal de 1,010 pares de bases publicada el 3 de agosto del 2016 en las bases de datos del NCBI. El gen *FlaB* fue seleccionado para la plataforma de PCR en tiempo real con base a su alto grado de homología y expresión entre las cepas patógenas de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (de Leeuw et al., 2014). El gen *FlaB* codifica para una proteína de 41 kilodaltones (KDa) y constituye el principal componente estructural del filamento flagelar que generara las ondas de movimiento que producen el desplazamiento de esta bacteria (Gautam et al., 2009).

### **Oligonucleótidos para el gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi***

Para el diseño, evaluación y selección de los oligonucleótidos, se utilizaron los programas *Primer3Plus* versión 2.4 que se encuentra disponible en <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, así como el programa *GeneRunner* versión 6.1 (<http://www.generunner.net/>) y las herramientas de bioinformática del programa *OligoCalc* versión 3.2 que se encuentran disponibles en <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. A partir del uso de estos programas y herramientas de bioinformática se generaron oligonucleótidos que cumplen con las características recomendadas

por el fabricante del termociclador *BioRad* CFX96 utilizado en este estudio. Brevemente, las características recomendadas incluyen oligonucleótidos con una longitud de 20 a 24 bases con un contenido de GC entre 50% y 60%, manteniendo una temperatura de fusión entre 50 °C a 65°C, evitando repeticiones de más de 3 nucleótidos G o C continuos, verificando que las secuencias positiva y negativa no produzcan complementariedad o la formación de dímeros, trímeros u otro tipo de estructuras secundarias aberrantes.

Aplicando los parámetros arriba descritos, se diseñó e instrumentó una plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi* empleando el oligonucleótido de banda positiva con longitud de 21 pb denominado *FlaBF* con secuencia 5'- CCTTGAGAAGGTGCTGTAGCA-3', con un contenido de G y C de 52% y temperatura de disociación ( $T_m$ ) de 54.4°C, así como el oligonucleótido de banda negativa con longitud de 20 pb denominado *FlaBR* con secuencia 3'-AGCAGTTTGAGCTCCCTCAC-5', con un contenido de G y C de 55% y  $T_m$  de 53.8°C (Cuadro 1). La amplificación por PCR en tiempo real empleando estos oligonucleótidos genera a un producto de 97 pares de bases y una  $T_m$  estimada con rango de 77.0°C a 80.0°C. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía *GenScript LTD* (Piscataway, Nueva Jersey, EUA), empacados y enviados liofilizados.

Para su utilización, los oligonucleótidos fueron reconstituidos y ajustados a la concentración de trabajo recomendada por el fabricante. Brevemente, los tubos conteniendo los oligonucleótidos fueron centrifugados a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agregó agua grado biología molecular a cada tubo en volumen 10

veces el valor de la concentración en nano moles (nM) referida en el certificado de análisis del fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micromolar ( $\mu\text{M}$ ). Los tubos fueron mezclados en vórtex por 30, incubados a  $4^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos y mezclados nuevamente en vórtex. Para las pruebas de PCR en tiempo real, la concentración de trabajo de los oligonucleótidos fue establecida en  $10\ \mu\text{M}$  para lo cual se diluyó la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular y se distribuyó en alícuotas de  $200\ \mu\text{l}$  cada una. Las soluciones de oligonucleótidos estándar y de trabajo fueron almacenadas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de las pruebas de PCR en tiempo real.

**Cuadro 1.** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen *FlaB* con referencia *GenBank* NC\_001318.1

<i>FlaB</i>	
Oligonucleótido	<i>FlaB2F</i>
Secuencia:	CCTTGAGAAGGTGCTGTAGCA
Inicio: 317	Longitud: 21 pb    Tm: $54.4^{\circ}\text{C}$ GC: 52%
Oligonucleótido:	<i>FlaB2R</i>
Secuencia:	AGCAGTTTGAGCTCCCTCAC
Inicio: 394	Longitud: 20 pb    Tm: $53.8^{\circ}\text{C}$ GC: 55%
Producto:	97 pb    Tm amplicon: $77.0^{\circ}\text{C}$ a $80.0^{\circ}\text{C}$

Los oligonucleótidos fueron diseñados, evaluados y seleccionados utilizando el programa *Primer3Plus* versión 2.4.

## Estandarización de reactivos para PCR en tiempo real

Para establecer los volúmenes y concentraciones óptimas de reactivos para las reacciones del PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi*, los oligonucleótidos mencionados en la sección previa fueron probados por triplicado a una concentración de 200 nM, 400 nM y 800 nM con 1 µl, 2 µl y 3 µl de ADN templete, respectivamente, en un volumen total de reacción de 20 µl empleando una mezcla maestra que contiene el fluoróforo *EvaGreen* (*Biotium, Hayward, CA, EUA*), una tinción fluorescente de alta afinidad para ADN de doble banda, no tóxica ni mutagénica (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Optimización de volúmenes y concentraciones óptimas de reactivos para el PCR en tiempo real que amplifica un fragmento de 97 pb del gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi*

<b>Reactivo</b>	<b>200 nM</b>	<b>400 nM</b>	<b>800 nM</b>
Mezcla maestra	10 µl	10 µl	10 µl
ADN templete*	1-2-3 µl individual	1-2-3 µl individual	1-2-3 µ individual
Oligonucleótido positivo	0.5 µl	1 µl	2 µl
Oligonucleótido negativo	0.5 µl	1 µl	2 µl
H <sub>2</sub> O	8-7-6 µl	7-6-5 µl	5-4-3 µl
Volumen final	20 µl	20 µl	20 µl

\* El ADN templete fue agregado al final en una campana de seguridad diferente

### **Curva estándar para el PCR en tiempo real de *Borrelia burgdorferi***

Con el propósito de evaluar la eficiencia, precisión y establecer el límite de detección de la plataforma de PCR en tiempo real que amplifica un fragmento de 97 pb del gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi*, se generó una curva estándar empleando ADN obtenido del producto amplificado del PCR en tiempo real de las muestras de referencia positivas confirmadas proporcionadas por la DGE-SSBC. Brevemente, el producto amplificado del PCR en tiempo real de 10 reacciones de 20  $\mu$ l fue mezclado y homogenizado en vórtex y el número de equivalentes genómicos por micro litro de amplificado establecido empleando un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (*Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, Delaware, EUA*). Posteriormente, se produjo una alícuota de ADN ajustada a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  equivalentes genómicos por micro litro empleando agua grado biología molecular. A partir de esta muestra estandarizada de ADN se generaron diluciones seriadas logarítmicas  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$ ; las cuales fueron probadas por cuadruplicado en la plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi*. Una prueba de PCR en tiempo real con 90% a 110% de eficiencia con una precisión basada en una  $R^2 > 0.99$  y curvas de amplificación con  $T_m$  dentro del rango estimado para un amplicon particular se consideran precisos y eficientes (Schlachter et al., 2017). El límite de detección será establecido con base en la muestra de ADN que produzca una curva de amplificación con  $T_m$  dentro del rango de  $77.0^\circ \text{C}$  a  $80.0^\circ \text{C}$  en el ciclo más cercano a los 40 programados para los experimentos.

## **Pruebas de PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi***

Los extractos de ADN obtenidos de las 47 muestras de capa flogística fueron probados por duplicado en un termociclador *BioRad CFX96* (*BioRad, Hercules, California, EUA*). En cada corrida de PCR en tiempo real se utilizaron ocho controles positivos de ADN, dos controles negativos conteniendo mezcla maestra sin ADN templete y dos controles negativos conteniendo agua grado biología molecular. Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión fueron calculados empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra, resultando en un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos con 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 20 segundos de hibridación a 56.4°C y un ciclo final de extensión de 15 segundos a 72°C. Asimismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 70°C y hasta 95°C, lo cual permita la identificación de curvas de amplificación dentro de la temperatura estimada por las herramientas de bioinformática y establecidas entre 77.0°C a 81.0°C para el producto del PCR de 97 pb de *FlaB* y lograr la identificación y discriminación de artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN esperado.

### **Interpretación de resultados**

Los resultados de las pruebas de PCR en tiempo real que amplifican un fragmento del gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi* se consideraron como positivos cuando la muestra correspondiente obtuvo una señal fluorescente de amplificación con una  $T_m$  en rango de 77.0° C a 80.0° C antes del ciclo 40, por

encima de la línea umbral de control que el programa CFX96 establece de manera automática y que corresponde a 10 veces la desviación estándar del promedio de índice de fluorescencia generada por todas las muestras durante los 10 primeros ciclos de cada corrida. Asimismo, los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logró desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral en un máximo de 40 ciclos, independientemente del  $T_m$  desarrollado.

## RESULTADOS

### **Estandarización del RT-PCR para *Borrelia burgdorferi***

Se probaron distintas concentraciones de oligonucleótidos en diferentes volúmenes de mezcla maestra *EvaGreen* para establecer las condiciones óptimas del sistema PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi* (Cuadro 3). Los resultados de la amplificación y la curva de disociación (Figura 1B), calculados por la paquetería del CFX96 de *BioRad* demostraron que la combinación óptima de reactivos para obtener la máxima amplificación en las muestras se logra mezclando los oligonucleótidos FlaB2F y FlaB2R a una concentración de 800 nM con 2  $\mu$ l de ADN template, aplicando un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95 °C, 20 segundos de hibridación a 56.4 °C y un ciclo final de extensión de 15 segundos a 72 °C.

### **Desempeño de controles positivos del RT-PCR para *Borrelia***

Los controles positivos confirmados de ADN proporcionados por a DGE-SSBC fueron probados por triplicado (n= 12) produciendo un valor promedio del ciclo de amplificación de 24.77 (Figura 1A) con una temperatura de disociación promedio de 78.5°C (Figura 1B). Los controles negativos, consistentes en tubos con mezcla maestra sin ADN template (n= 6) y tubos con agua grado biología molecular (n= 6), no mostraron evidencia de amplificación alguna en los 40 ciclos de cada corrida correspondiente (Cuadro 4).



**Cuadro 3.** Optimización de oligonucleótidos con mezcla maestra EvaGreen para el PCR en tiempo real de *Borrelia burgdorferi*.

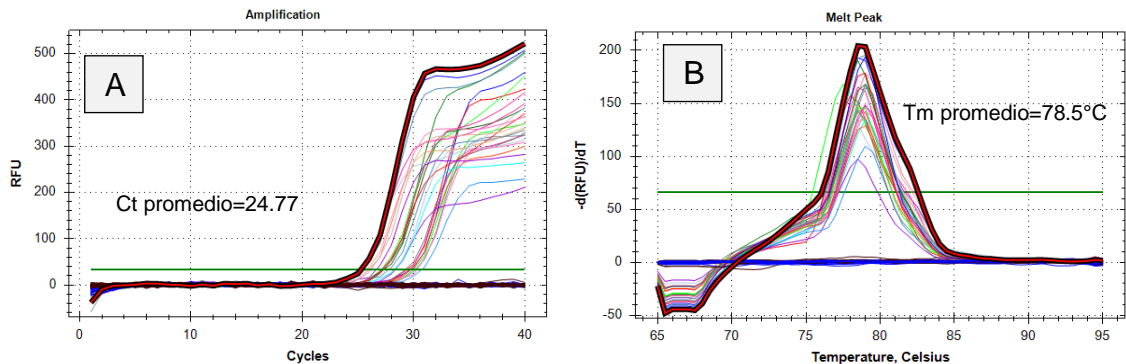
Reacción <sup>(a)</sup>	Promedio Tm <sup>(b)</sup>	Promedio Ct <sup>(c)</sup>	Reacción <sup>(a)</sup>
200 nM + 1 µl	78.83 ° C	29.57	200 nM + 1
200 nM + 2 µl	78.83 ° C	29.49	200 nM + 2
200 nM + 3 µl	79.00 ° C	30.36	200 nM + 3
400 nM + 1 µl	78.16 ° C	27.54	400 nM + 1
400 nM + 2 µl	79.00 ° C	28.05	400 nM + 2
400 nM + 3 µl	78.50 ° C	27.19	400 nM + 3
800 nM + 1 µl	78.66 ° C	25.16	800 nM + 1
800 nM + 2 µl	78.66 ° C	25.29	800 nM + 2
800 nM + 3 µl	79.00 ° C	26.24	800 nM + 3

(a) Concentración de oligonucleótidos + µl de ADN en muestras por triplicado

(b) Tm = Temperatura de disociación

(c) Ct = Ciclo de amplificación

**Figura 1.** Curvas de amplificación (A) y disociación (B) de controles positivos y negativos obtenidas durante el proceso de optimización del PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi*.



### Curva estándar para el PCR en tiempo real de *Borrelia burgdorferi*

Se construyó una curva estándar del PCR en tiempo real para el fragmento del gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi* empleando diluciones seriadas base 10 de una muestra cuantificada conocida de DNA template (Figura 2). Los resultados de la amplificación mostraron una eficiencia (E) de 104.9% con un intervalo promedio entre diluciones (*slope*) de 3.315 ciclos y un coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) de 0.993; parámetros que indican la exitosa validación analítica del sistema PCR en tiempo real desarrollado en este trabajo.

### Resultados de RT-PCR para muestras de sangre

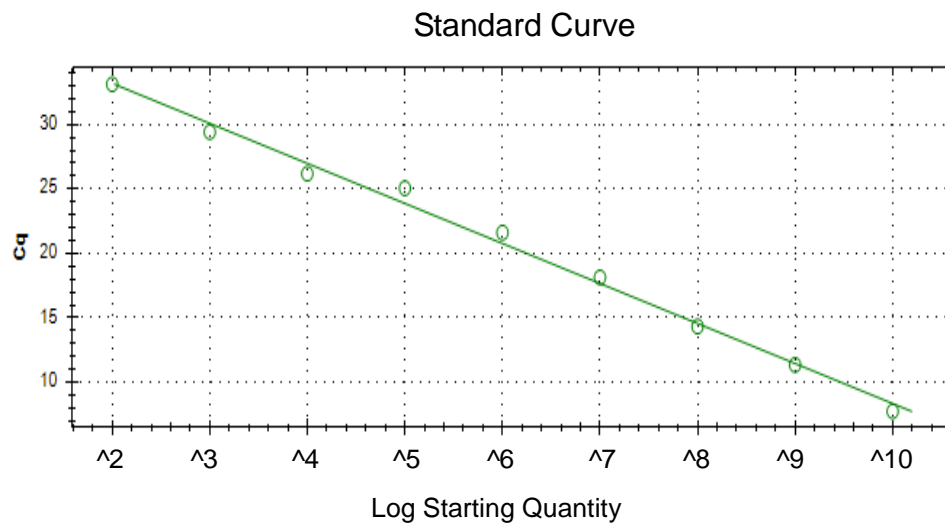
Se probaron por duplicado 47 muestras de ADN extraído de la capa flogística de sangre de perros capturados por el CMCA de Mexicali. Los resultados de las pruebas de PCR en tiempo real indican que 44 de las 47 (93.62%) muestras analizadas lograron una amplificación por encima de la línea umbral establecida por el software CFX96 y fueron consideradas como

positivas. El ciclo de amplificación promedio de este grupo de muestras fue de 31.79 con un rango entre 23.33 a 39.22 ciclos y temperatura de disociación promedio de 78.7°C. (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Desempeño de controles positivos confirmados y controles negativos utilizados en la plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi*.

	Ciclo de amplificación	Temperatura de disociación (° C)
Límite inferior	14.71	78.5
Límite superior	33.17	80.0
Promedio	24.77	79.25

**Figura 2.** Curva estándar para el PCR en tiempo real de *Borrelia burgdorferi* a partir de la amplificación del gen *FlaB* en diluciones seriadas (10X) de una muestra cuantificada conocida de DNA.



EvaGreen E=104.9% R2=0.993 Slope=3.315 y-int=8.359

**Cuadro 5.** Resultados del PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi* en muestras de ADN obtenido de la capa flogística de perros capturados por el Centro Municipal de Control Animal de Mexicali.

<b>Muestras de ADN</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Ciclo de amplificación</b>	<b>Temperatura de disociación</b>
N = 47	44 (93.62%)	3 (6.38%)	$Li^{(e)} = 23.33$ $Ls^{(f)} = 39.22$ $\bar{X}_{Ct} = 31.79$	$\bar{X}_{Tm} = 78.7^{\circ}C$ $(SD^{(g)}) = 0.692$

(e) Li = Límite inferior

(f) Ls = Límite superior

(g) SD = 0 Desviación estándar

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se reporta el desarrollo e instrumentación de un sistema de PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular de borreliosis a partir de ADN extraído de la capa flogística de muestras de sangre de perros. El sistema se fundamenta en la amplificación de un fragmento de ADN de 96 pb del gen de la *flagellina*, también conocido como gen *FlaB*; dicho gen codifica para la principal proteína estructural del flagelo bacteriano y es responsable de la locomoción y desplazamiento en este tipo de espiroquetas. Genéticamente, el gen *FlaB* es altamente conservado entre las distintas especies patógenas de *Borrelia* (Binnin, 2016; Norris, Barbour, Fish, y Diuk-Wasser., 2015), lo cual permite una alta especificidad en la detección de *Borrelia burgdorferi* en particular, pero también en otras cepas patógenas de *Borrelia* asociadas a enfermedad de Lyme dentro de las que destacan *Borrelia garinii* y *Borrelia afzelii*, las cuales han sido descritas como zoonóticas en el continente Americano, Europa y Asia (Krupka et al., 2007), además de *Borrelia mayonii*, recientemente caracterizada por los laboratorios Mayo como cepa patógena (Pritt et al., 2016).

Es importante destacar que para la etapa de estandarización y optimización de reactivos de la plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia* se utilizaron controles positivos de ADN extraído de muestras de plasma provenientes de pacientes humanos con diagnóstico confirmado de borreliosis por la Secretaria de Salud de Baja California, lo cual permitió contar con un estándar de oro para validar los resultados de las pruebas realizadas en muestras de ADN de perros y comprobar la universalidad del PCR en tiempo

real para detectar y amplificar ácido nucleico microbiano en muestras obtenidas de distintas especies animales, incluyendo a los humanos. En ese sentido, la plataforma de PCR en tiempo real para el diagnóstico de borreliosis canina que aquí se reporta, puede ser fácilmente adaptada para el diagnóstico de enfermedad de Lyme en humanos, previa validación analítica y de campo correspondiente.

La plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia* también incluyó la aplicación del análisis de la curva de disociación, la cual consiste en medir la temperatura específica a la que una molécula de ADN de doble banda se desnaturaliza y se separa en dos moléculas de banda sencilla independientes. El análisis de la curva de disociación representa una técnica sencilla de ejecutar, sensible, económica, rápida y altamente comparable con las técnicas de secuenciación de nueva generación (Seeb et al., 2011). En ese sentido, el análisis de la curva de disociación ha sido utilizado para diferenciar entre cepas de *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii*, partiendo de la diferencia del punto de fusión de su producto amplificado del PCR (Schlachter et al., 2017). Para el caso específico del producto amplificado de 94 pb de *FlaB*, se genera una curva de disociación a una temperatura promedio de 78.7 ° C, la cual es específica para el fragmento objetivo del RT-PCR para *Borrelia*, convirtiendo a esta plataforma en una herramienta sensible, rápida y precisa para el diagnóstico de las distintas especies de *Borrelia* asociadas a enfermedad de Lyme en perros.

La utilización de la curva estándar permite establecer la eficiencia y precisión de una prueba de PCR en tiempo real, además de establecer el límite

de detección de la prueba, es decir la cantidad mínima de copias de ADN que el sistema es capaz de detectar en una muestra. La utilización de la curva estándar es también de gran ayuda para identificar posibles errores asociados a la calidad y cantidad de los reactivos utilizados en las reacciones, para identificar posibles fallas en el equipo e instrumentos o bien, para detectar deficiencias o inconsistencias en la ejecución de los experimentos por parte del personal técnico involucrado tales como errores de pipeteo, errores en la mezcla de reactivos, la configuración de placas y otras tareas sujetas al error humano (Chan et al., 2013). La curva estándar para pruebas de PCR en tiempo real se genera a partir de la amplificación de diluciones seriadas logarítmicas de un estándar de ADN purificado con número de equivalentes genómicos conocido, usualmente entre 6 y 10 órdenes de magnitud. Los estándares de ADN más frecuentemente utilizados incluyen el producto de PCR purificado o un plásmido purificado que contiene la secuencia objetivo. La curva estándar se genera graficando el valor del ciclo umbral (Ct) de diluciones seriadas base 10 de ADN contra el número de copias iniciales de ADN de cada muestra estándar diluida. En la curva estándar, un coeficiente de correlación alto ( $R^2 > 0.99$ ) indica una alta precisión de la prueba (Schlachter et al., 2017).

En este trabajo, posterior a la optimización de las condiciones de temperatura, concentración y volúmenes de reactivos para obtener la máxima amplificación en las pruebas de PCR en tiempo real, se generó una curva estándar con 9 órdenes de magnitud para medir la eficiencia y precisión del sistema para amplificar el fragmento de ADN de 96 pb del gen *FlaB* de *Borrelia burgdorferi*, logrando los niveles de eficiencia y precisión requeridos para una

prueba de diagnóstico confiable (Schlachter et al., 2017). Además, la curva estándar permitió establecer el límite de detección del sistema, calculado entre 10 a 100 copias de DNA por reacción, haciendo de la plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia*, una prueba analíticamente sensible, confiable y específica.

Tradicionalmente, las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos tanto en para humanos como en animales, han dominado las plataformas de diagnóstico para borreliosis o enfermedad de Lyme bajo el argumento que las técnicas moleculares son inferiores debido al efecto de inhibidores de la ADN polimerasa presentes en las muestras de sangre, lo cual se manifiesta en baja sensibilidad y especificidad en la detección de *Borrelia* (Marques, 2015). Sin embargo, la utilización de reactivos de última generación para extracción de ADN, como los empleados en este trabajo, permiten la obtención de ácido nucleico prácticamente libre de inhibidores de la ADN polimerasa, resultando en un mejor desempeño de las pruebas y la obtención de curvas de amplificación bien definidas tanto para los controles positivos y negativos como para las muestras de campo analizadas. Por otro lado, también se ha reportado que las plataformas de PCR en tiempo real proporcionan una alta sensibilidad analítica y son capaces de detectar hasta 10 equivalentes genómicos en muestras tomadas dentro de los primeros 7 días post-infección en pruebas similares (Venczel et al., 2015). Los resultados de nuestro trabajo indican que nuestra plataforma RT-PCR para borreliosis puede detectar y amplificar entre 10 y 100 espiroquetas por reacción, mientras que para cualquiera de los formatos de pruebas serológicas disponibles en la actualidad,



es necesario esperar al menos 3 semanas para lograr un resultado positivo empleando anticuerpos tipo IgM y de 4 a 6 semanas para un resultado positivo empleando anticuerpos tipo IgG (Aberer, 2012)

Si bien en este trabajo no fue posible establecer el inicio de la infección debido a la ausencia de la historia clínica de los sujetos incluidos en este estudio, destaca el hecho que la totalidad de los animales muestreados se encontraban parasitados con distintas cantidades y estados evolutivos de garrapatas, en los casos con menor infestación fue posible identificar diez o menos garrapatas y hasta más de 100 garrapatas por animal en los casos de mayor infestación. Considerando que *Borrelia* se transmite de las garrapatas hacia el hospedero dentro de las 36 a 48 después de adherirse a la piel e iniciar la alimentación con sangre (Stanek et al., 2012), se puede especular que los animales muestreados adquirieron la enfermedad cuando menos 7 días antes del sacrificio y la toma de las muestras correspondientes, corroborando que la plataforma de PCR en tiempo real reportada aquí, es capaz de detectar y amplificar *Borrelia* en etapas tempranas de infección, sin embargo; para comprobar este argumento será necesario realizar estudios epidemiológicos con muestras de pacientes que cuenten con historia clínica disponible o infectados experimentalmente.

Los resultados de este trabajo demuestran que poco más de 9 de cada 10 perros probados con la plataforma de PCR en tiempo real se encontraban infectados con *Borrelia*, lo cual sugiere una alta presencia de borreliosis en la población de perros callejeros del municipio de Mexicali. Estos resultados confirman lo publicado en estudios previos en el sentido de que los perros han

sido identificados como reservorios altamente competentes para *Borrelia burgdorferi* e incluso se ha propuesto el perro como especie animal centinela para la detección enfermedad de Lyme de zonas emergentes de alto riesgo (Bhide, 2004). La utilización de una plataforma de PCR en tiempo real como la aquí descrita para la detección temprana de la enfermedad de Lyme, puede convertirse en una herramienta valiosa para el diagnóstico rápido y certero tanto de infección en casos individuales de borreliosis como en situaciones de brotes epidémicos de esta enfermedad o bien, para establecer el diagnóstico diferencial con brotes de otras enfermedades febriles indiferenciadas como dengue, ehrlichiosis, anaplasmosis, *Rickettsia* y otras.

La prevención de enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas y otros vectores recae en gran medida en la capacidad de los especialistas en salud de educar a la población en temas que incluyan la importancia de las garrapatas como vectores de distintas enfermedades, las medidas de prevención y control de las mismas y sobre la tenencia responsable de mascotas, enfatizando en papel que juegan en la transmisión y perpetuación de estas enfermedades. Como estrategia de acción contra la borreliosis y otras enfermedades que utilizan al perro como reservorio y son transmitidas por garrapatas, se sugiere adoptar la perspectiva de una sola salud para abordar el problema de las zoonosis transmitidas por garrapatas en nuestra región, lo cual puede lograrse promoviendo y compartiendo el conocimiento y la habilidad para reconocer la existencia de este grupo de enfermedades por las profesiones encargadas de la medicina humana y veterinaria, creando grupos de investigación con miembros de ambas profesiones en búsqueda de ampliar el

conocimiento sobre esta problemática de salud, su epidemiología, distribución geográfica y patogénesis y en conjunto, desarrollar pruebas de diagnóstico sensibles y eficaces y sistemas de vigilancia epidemiológica que ayuden profundizar en el conocimiento de las interacciones entre mascotas, animales peri-domésticos y fauna silvestre que pudieran tener una participación determinante en la epidemiología de la borreliosis canina y sus implicaciones hacia la salud humana.

## CONCLUSIONES

La plataforma de PCR en tiempo real desarrollada en este trabajo es una herramienta confiable, sensible y precisa para la detección de *Borrelia burgdorferi* en perros.

El número de muestras que resultaron positivas (93.62%) a la plataforma de PCR en tiempo real para *Borrelia burgdorferi* aquí referida no puede ser extrapolada a la población canina de la región, sin embargo; sugiere una amplia distribución de *Borrelia burgdorferi* en la población de perros callejeros del municipio de Mexicali.

Se requiere de estudios epidemiológicos adicionales, con un tamaño de muestra estadísticamente apropiado, que incluya poblaciones de perros callejeros y domésticos provenientes de zonas geográficas representativas de la región para conocer la magnitud real del problema de borreliosis canina y las posibles implicaciones zoonóticas de la enfermedad.

La educación como base fundamental para la comprensión de los riesgos asociados a la presencia de perros domésticos o callejeros infestados con garrapatas debe ser propuesta como estrategia básica para la detección, tratamiento y prevención oportuna de borreliosis y otras enfermedades zoonóticas transmitidas por vectores.

## LITERATURA CITADA

- Aase, A., Hajdusek, O., Oines, O., Quarsten, H., Wilhelmsson, P., Herstad, T.K., Kjelland, V., Sima, R., Jalovecka, M., Lindgren, P.E. & Aaberge, I.S. (2016). Validate or falsify: Lessons learned from a microscopy method claimed to be useful for detecting *Borrelia* and *Babesia* organisms in human blood. *Infect Dis (Lond)*, Vol. 48, No. 6, pp. 411-9.
- Aberer, E., Schwantzer, G. (2012). Course of Antibody Response in Lyme Borreliosis Patients before and after Therapy. *ISRN Immunology*, Vol. 2012, pp. 4.
- Aguero-Rosenfeld, M.E. & Wormser, G.P. (2014). Lyme disease: diagnostic issues and controversies. *Expert Rev Mol Diagn*, Vol. 15, No. 1, pp. 1-4.
- Asbrink, E., Olsson, I. & Hovmark, A. (1986). Erythema chronicum migrans Afzelius in Sweden. A study on 231 patients. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, Vol. 263, No. 1-2, pp. 229-36.
- Briciu, V.T., Sebah, D., Coroiu, G., Lupse, M., Carstina, D., Tatulescu, D.F., Mihalca, A.D., Gherman, C.M., Leucuta, D., Meyer, F., Hizo-Teufel, C., Fingerle, V. & Huber, I. (2016). Immunohistochemistry and real-time PCR as diagnostic tools for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks collected from humans. *Exp Appl Acarol*, Vol. 69, No. 1, pp. 49-60.
- Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O. & Fraser, C.M. (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an

- infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*, Vol. 35, No. 3, pp. 490-516.
- CDC, C.f.D.C.a.P.-. (2008). Surveillance for Lyme Disease —United States, 1992–2006. In *Surveillance Summaries*.
- Chan, K., Marras, S.A. & Parveen, N. (2013). Sensitive multiplex PCR assay to differentiate Lyme spirochetes and emerging pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*. *BMC Microbiol*, Vol. 13, pp. 295.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B. & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol*, Vol. 28, No. 10, pp. 437-46.
- de Leeuw, B.H., Maraha, B., Hollemans, L., Sprong, H., Brandenburg, A.H., Westenend, P.J. & Kusters, J.G. (2014). Evaluation of *Borrelia* real time PCR DNA targeting *OspA*, *FlaB* and 5S-23S IGS and *Borrelia* 16S rRNA RT-qPCR. *J Microbiol Methods*, Vol. 107, pp. 41-6.
- Estrada-Pena, A. & de la Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res*, Vol. 108, pp. 104-28.
- Gautam, A., Hathaway, M. & Ramamoorthy, R. (2009). The *Borrelia burgdorferi* *flaB* promoter has an extended -10 element and includes a T-rich -35/-10 spacer sequence that is essential for optimal activity. *FEMS Microbiol Lett*, Vol. 293, No. 2, pp. 278-84.
- Glass, G.E., Schwartz, B.S., Morgan, J.M., 3rd, Johnson, D.T., Noy, P.M. & Israel, E. (1995). Environmental risk factors for Lyme disease identified

- with geographic information systems. *Am J Public Health*, Vol. 85, No. 7, pp. 944-8.
- Hengge, U.R., Tannapfel, A., Tyring, S.K., Erbel, R., Arendt, G. & Ruzicka, T. (2003). Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis*, Vol. 3, No. 8, pp. 489-500.
- Hinckley, A.F., Connally, N.P., Meek, J.I., Johnson, B.J., Kemperman, M.M., Feldman, K.A., White, J.L. & Mead, P.S. (2014). Lyme disease testing by large commercial laboratories in the United States. *Clin Infect Dis*, Vol. 59, No. 5, pp. 676-81.
- Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R. & Weigl, E. (2007). Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, Vol. 151, No. 2, pp. 175-86.
- Leeflang, M.M., Ang, C.W., Berkhout, J., Bijlmer, H.A., Van Bortel, W., Brandenburg, A.H., Van Burgel, N.D., Van Dam, A.P., Dessau, R.B., Fingerle, V., Hovius, J.W., Jaulhac, B., Meijer, B., Van Pelt, W., Schellekens, J.F., Spijker, R., Stelma, F.F., Stanek, G., Verduyn-Lunel, F., Zeller, H. & Sprong, H. (2016). The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, Vol. 16, pp. 140.
- Li, X., McHugh, G.A., Damle, N., Sikand, V.K., Glickstein, L. & Steere, A.C. (2011). Burden and viability of *Borrelia burgdorferi* in skin and joints of patients with erythema migrans or lyme arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol. 63, No. 8, pp. 2238-47.

- Lindgren, E., Jaenson, T.G. (2006). Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures.
- Liveris, D., Schwartz, I., Bittker, S., Cooper, D., Iyer, R., Cox, M.E. & Wormser, G.P. (2011). Improving the yield of blood cultures from patients with early Lyme disease. *J Clin Microbiol*, Vol. 49, No. 6, pp. 2166-8.
- Liveris, D., Schwartz, I., McKenna, D., Nowakowski, J., Nadelman, R., Demarco, J., Iyer, R., Bittker, S., Cooper, D., Holmgren, D. & Wormser, G.P. (2013). Comparison of five diagnostic modalities for direct detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with early Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Vol. 73, No. 3, pp. 243-5.
- Marques, A.R. (2010). Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep*, Vol. 10, No. 1, pp. 13-20.
- Marques, A.R. (2015). Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am*, Vol. 29, No. 2, pp. 295-307.
- Moore, A., Nelson, C., Molins, C., Mead, P. & Schriefer, M. (2016). Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States. *Emerg Infect Dis*, Vol. 22, No. 7.
- Nelson, C.A., Saha, S., Kugeler, K.J., Delorey, M.J., Shankar, M.B., Hinckley, A.F. & Mead, P.S. (2015). Incidence of Clinician-Diagnosed Lyme Disease, United States, 2005-2010. *Emerg Infect Dis*, Vol. 21, No. 9, pp. 1625-31.



- O'Rourke, M., Traweger, A., Lusa, L., Stupica, D., Maraspin, V., Barrett, P.N., Strle, F. & Livey, I. (2013). Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in erythema migrans skin lesions using internally controlled duplex real time PCR. *PLoS One*, Vol. 8, No. 5, pp. e63968.
- Picken, M.M., Picken, R.N., Han, D., Cheng, Y., Ruzic-Sabljić, E., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S. & Strle, F. (1997). A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Mol Pathol*, Vol. 50, No. 4, pp. 186-93.
- Pritt, B.S., Mead, P.S., Johnson, D.K.H., Neitzel, D.F., Respicio-Kingry, L.B., Davis, J.P., Schiffman, E., Sloan, L.M., Schriefer, M.E., Replogle, A.J., Paskewitz, S.M., Ray, J.A., Bjork, J., Steward, C.R., Deedon, A., Lee, X., Kingry, L.C., Miller, T.K., Feist, M.A., Theel, E.S., Patel, R., Irish, C.L. & Petersen, J.M. (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 16, No. 5, pp. 556-564.
- Robertson, J.N., Gray, J.S. & Stewart, P. (2000). Tick bite and Lyme borreliosis risk at a recreational site in England. *Eur J Epidemiol*, Vol. 16, No. 7, pp. 647-52.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. & Oliver, J.H., Jr. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis*, Vol. 2, No. 3, pp. 123-8.

- Sanchez, E., Vannier, E., Wormser, G.P. & Hu, L.T. (2016). Diagnosis, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: A Review. *JAMA*, Vol. 315, No. 16, pp. 1767-77.
- Schlachter, S., Chan, K., Marras, S.A.E. & Parveen, N. (2017). Detection and Differentiation of Lyme Spirochetes and Other Tick-Borne Pathogens from Blood Using Real-Time PCR with Molecular Beacons. *Methods Mol Biol*, Vol. 1616, pp. 155-170.
- Seeb, J.E., Pascal, C.E., Grau, E.D., Seeb, L.W., Templin, W.D., Harkins, T. & Roberts, S.B. (2011). Transcriptome sequencing and high-resolution melt analysis advance single nucleotide polymorphism discovery in duplicated salmonids. *Mol Ecol Resour*, Vol. 11, No. 2, pp. 335-48.
- Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J. & Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *Lancet*, Vol. 379, No. 9814, pp. 461-73.
- Steere, A.C., Coburn, J. & Glickstein, L. (2004). The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest*, Vol. 113, No. 8, pp. 1093-101.
- Strube, C., Montenegro, V.M., Epe, C., Eckelt, E. & Schnieder, T. (2010). Establishment of a minor groove binder-probe based quantitative real time PCR to detect *Borrelia burgdorferi* sensu lato and differentiation of *Borrelia spielmanii* by ospA-specific conventional PCR. *Parasit Vectors*, Vol. 3, pp. 69.
- Tabbasam, F., Malik, M. F., Asghar, U., Paracha, K. S., Nazir, T. (2016). Introduction, Sign, Symptoms, Prevention and Management of Lyme

Disease Caused by *Borrelia burgdorferi* Channeled through Ixodes Ticks as Vector. A Review. *Advances in Entomology*, Vol. 4, pp. 249-259.

Theel, E.S. (2016). The Past, Present, and (Possible) Future of Serologic Testing for Lyme Disease. *J Clin Microbiol*, Vol. 54, No. 5, pp. 1191-6.

Venczel, R., Knoke, L., Pavlovic, M., Dzaferovic, E., Vaculova, T., Silaghi, C., Overzier, E., Konrad, R., Kolencik, S., Derdakova, M., Sing, A., Schaub, G.A., Margos, G. & Fingerle, V. (2015). A novel duplex real-time PCR permits simultaneous detection and differentiation of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infection*, Vol. 44, No. 1, pp. 47-55.