

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto De Ciencias Agrícolas
Instituto De Investigaciones En Ciencias Veterinarias



**“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BORRELIOSIS-LEPTOSPIROSIS EN
HUMANOS Y PERROS”**

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA
M. C. BEATRIZ JULIETA GARCÍA PRIETO

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS TINOCO GRACIA

La presente tesis “**Diagnóstico Molecular de Borreliosis-Leptospirosis en humanos y perros** “ realizada por la **C. Beatriz Julieta García Prieto**, dirigida por el **Dr. Luis Tinoco Gracia**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular

Dr. Luis Tinoco Gracia
Director de Tesis

Dra. Sawako Oshima Hori Katsuragui
Asesor

Dr. Alberto Barreras Serrano
Asesor

Dra. Bertha Landeros Sánchez
Asesor

Dra. Alma Rossana Tamayo Sosa
Asesor

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	i
INTRODUCCIÓN.....	1
ARTICULO 1: Identification of <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto in a naturally infected dog from a Mexico-United States border endemic region of <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3
Abstract.....	4
Introduction.....	5
Material and Methods.....	7
<i>Study location</i>	7
<i>Borrelia burgdorferi</i> identification.....	8
<i>Serology</i>	8
<i>Culture</i>	9
<i>Molecular Identification</i>	9
Tick identification and prevalence	11
<i>Data collection</i>	11
<i>Tick Collection and Taxonomic Identification</i>	11
Results	12
<i>Identification of Borrelia burgdorferi</i>	12
<i>Identification and prevalence of ticks</i>	12
Discussion	13
Acknowledgements	15
Author Disclosure Statement	15
References	15
CONCLUSIONES	20
INTRODUCCIÓN	21
ARTICULO 2: Primera evidencia molecular de borreliosis y leptospirosis en un humano de Sinaloa, México	24

Resumen	24
Abstract	25
Introducción	25
Materiales y Métodos	27
Resultados y Discusión	28
Literatura Citada	29

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Prevalence of dog infestation with <i>R. sanguineus</i> by body regions.	13

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Lyme es la más frecuente de las transmitidas por garrapatas en el humano y en animales, principalmente por *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* en Norteamérica (Magnarelli et al. 1987 y Green et al. 2000), mientras que otras, como *R. sanguineus* no se ha demostrado que la transmitan (Costa et al. 2002 y Walker et al. 1998). Es una enfermedad zoonótica caracterizada por provocar trastornos polisistémicos con poliartritis en varios animales, incluyendo roedores, ciervos, perros, gatos, vacas, caballos, reptiles, aves, y en el humano. Otros signos sistémicos incluidos en el cuadro de enfermedad de Lyme son anorexia, pérdida de peso, letargia, linfadenopatía y pirexia, los cuales pueden persistir hasta por más de 10 años (Magnarelli et al. 1987; Burgess et al. 1986 y Steere et al. 1987).

Es importante señalar que no está documentado que esta garrapata participe en la transmisión de esta enfermedad y considerando que esta zona es endémica de ésta, es necesario investigar su posible participación.

En general el cultivo presenta una baja sensibilidad debido al bajo número de organismos infectantes. Este problema es mayor cuando se trata de aislar el microorganismo a partir de líquidos corporales, donde estos microorganismos están libres muy poco tiempo por la rapidez con que se adhieren a cualquier tejido. Un factor clave en esta técnica es la composición del medio de cultivo. El tiempo necesario para obtener un aislamiento (hasta 2 meses) y otros factores añadidos hacen que esta técnica no sea útil ni fácil de incorporar a la rutina de

laboratorios clínicos. En base a lo anterior se planteó el siguiente objetivo:

Detectar ADN de *B. burgdorferi* sensu stricto utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, a partir de cultivo de tejidos de perros seropositivos a *B. burgdorferi* de Mexicali, Baja California.

**Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in a naturally infected dog
from a Mexico-United States border endemic region of *Rhipicephalus
sanguineus***

García-Prieto, Beatriz Julieta¹; Tinoco-Gracia, Luis¹; Oshima, Sawako¹; Medina-Basulto, Gerardo Enrique¹; Rentería-Evangelista, Tomás Benjamín¹; López-Valencia, Gilberto¹; Barreras-Serrano, Alberto¹; Pujol-Manríquez, Lourdes Carolina¹; Escárcega-Ávila, Angélica María¹; Field-Cortázares, Jorge¹; Quiroz-Romero, Héctor²; Melgarejo, Tonatiuh³; Quintero-Martínez, María Teresa²; Vinasco, Javier⁴; Moro, Manuel H.⁵; Gordillo-Pérez, Guadalupe⁶

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias –Universidad Autónoma de Baja California, México.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

³Department of Human Nutrition. College of Human Ecology. Kansas State University, USA.

⁴ College of Veterinary Medicine, Kansas State University, U.S.A.

⁵Division of Comparative Medicine, National Center for Research Resources, National Institutes of Health, U.S.A.

⁶Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

*Address:

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias - UABC.

Carretera San Felipe Km. 3.5, S/N.

Fraccionamiento Campestre.

Mexicali, Baja California. México CP 21386

Tel: +52-686-563-69-06

Email: tinoco.luis@yahoo.com

Abstract

Lyme disease is transmitted primarily by *Ixodes scapularis* and secondary *Ixodes pacificus* in North America. In previous study in Mexicali, Baja California, Mexico, the seroprevalence of Lyme borreliosis (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto) was 8.2% (95% CI 1.5-13.3%). Also, depending on the species of the genus *Borrelia*, it produces characteristic clinical manifestations and are transmitted by vectors specific, so it is important to identify the Etiologic Agent. Aim of this study was to identify *B. burgdorferi* by culture, PCR and sequencing analysis from tissues and blood sample of dogs and to estimate the prevalence of infestation by ticks in Mexicali. Blood samples, bladder tissue, and synovial fluid from four dogs with compatible clinical signs and seropositives to Lyme borreliosis were cultured in BSK. The presence of the motile spirochetes with *Borrelia*-like morphology was confirmed by dark-field microscopy in one of the samples of urinary bladder. The sequences obtained from PCR products from the positive culture using *Fla* and *16SrDNA* amplified showed 100% and 99% identity to *B. burgdorferi* sensu lato, and *B. burgdorferi* sensu stricto, respectively. The prevalence of infestation by ticks

in this study were 65.1% (250/384); the only species of ticks found was *Rhipicephalus sanguineus*. High seroprevalence of Lyme disease in dogs from this region (8.2%) and the frequency of culture positive from seropositive animals observed in this study (1/4, 25%), represent zoonotic risk where was the only species of ticks found *Rhipicephalus sanguineus*.

Key Words: Canine Lyme disease, borreliosis, *Borrelia burgdorferi*, tick.

Introduction

Lyme disease is an emerging zoonotic infection transmitted by ticks and found most commonly in North America and Europe, the principal vectors are *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* in North America and *I. ricinus* in Europe (Barbour and Hayes, 1986; Greene et al., 2000; Magnarelli et al., 1987), while other tick species such as *Rhipicephalus sanguineus* has not been shown to transmit the disease in others countries (Baptista et al., 2004; Bernasconi et al., 1997; Bouattour et al., 1999; Costa et al., 2002; Filippova, 1990; Kurtti et al., 1993; Luckhart et al., 1991; Merino et al., 2005; Miserez et al., 1990; Munderloh et al., 1993; Nebreda Mayoral et al., 2004; Sanogo et al., 2003; Walker et al., 1998). The disease characterized by polysystemic disorders with polyarthritis in several animals and humans (Anderson and Norris, 2006; Anderson et al., 2006; Burgess, 1986; Faul et al., 1999; Foldvari et al., 2009; Humair et al., 2007; Jordan et al., 2009; Lane et al., 2006; Magnarelli et al., 1987; Scott et al., 2010; Steere, 1987; Straubinger, 2000; Takano et al., 2010). Therefore, depending on the species of the genus *Borrelia*, it produces different clinical signs, and are transmitted by specific vectors, so it is

important to identify the etiologic agent. In Monterrey, Mexico, studies in dogs indicated 16% seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* infection (Salinas-Melendez et al., 1999). Lyme disease was confirmed in the same city, by molecular techniques from selected dog synovial fluid samples with reported arthritis, suggesting the presence of the disease there (Salinas-Melendez et al., 1995). A seroprevalence of 3% (n = 350) in *Odocoileus virginianus texanus* deer was found in the same geographic region. Deer are considered an important host reservoir of the adult *I. scapularis* tick (Martinez et al., 1999). Additionally, in northeastern Mexico, various tick species were found to be positive to *B. burgdorferi* sensu stricto by PCR including, *I. spinipalpus*, *I. scapularis*, *I. spinipalpis*, *I. texanus*, *Amblyomma cajennense* and *Dermacentor andersoni* (Gordillo-Pérez et al., 1999; Gordillo et al., 2010). In Mexicali, Baja California, several studies have demonstrated seroprevalences of 6.6-59.6% in dogs with ticks, exclusively by *R. sanguineus* (Romano-Osuna et al., 1998; Tinoco-Gracia et al., 2009a; Tinoco-Gracia et al., 2007; Tinoco-Gracia et al., 2009b). In Mexico has been detected Lyme disease in humans, in 1999 the overall seroprevalence of Lyme disease in humans was 1.1% with high prevalence in the Northeast states (Tamaulipas, Nuevo Leon and Coahuila) of 6.4% and Mexico City was 3.4% (Gordillo-Pérez et al., 2003; Gordillo-Pérez et al., 1999). Therefore, four residents of Mexico City were bitten by ticks while visiting forest parks, 3 in Mexico City and one in Quintana Roo, biopsies from skin were positive by PCR for *B. burgdorferi*, using *fla* gene primers that encode for flagellin. One of the residents was also positive for sequencing of the *OspA* gene, which encodes the outer membrane protein of *B. burgdorferi* (Gordillo-Pérez et al., 2007). Culture is the most specific diagnostic test

for Lyme disease from skin, synovial fluid or bladder. This procedure has limitations, requires a special culture medium, takes a long time to grow, and has low sensitivity when using a few number of cells (Gordillo-Pérez et al., 2007). The most widely used tests are ELISA and immunofluorescence, detecting antibodies against the spirochete 21 days post inoculation (Callister et al., 2000), up to 2 years post infection (Appel et al., 1993). ELISA results must confirm with western blot (Guerra et al., 2000; Schouls et al., 1999) or PCR (Clark, 2004; Derdakova et al., 2003; Piesman et al., 2001). It is important to note that there are not records of *R. sanguineus* involvement in the transmission of the disease, and considering that in Mexicali It has been the only identified species (Tinoco-Gracia et al., 2009b), was necessary research their potential role in the transmission of this spirochete. Therefore, the aim of this study was to identification *B. burgdorferi* by culture, PCR and sequencing analysis from tissues and blood sample of dogs and to estimate the prevalence of infestation by ticks in Mexicali.

Material and Methods

Study location

This study was carried out in Mexicali, Baja California, which is located in the northwestern border of Mexico, adjacent to the State of California, USA, at 32° 40'0 "N, 115° 28'0"W and it has 855.962 inhabitants (National Institute of Statistics and Geography of Mexico, 2005). The climate is extreme desertic with an average rainfall of $0.63 \pm 0.43 \text{ cm}^3$. The weather conditions were obtained by the National Oceanic and Atmospheric Administration of the United States

(<http://www.nws.noaa.gov/>). The study for identification *B. burgdorferi* lasted 16 weeks, beginning in October 2009. The study of the prevalence of ticks was carried out with 384 dogs in June-July 2009. Dogs were captured by Animal Control Center of the city. *Borrelia burgdorferi* and tick identification were performed in the of Veterinary Public Health Laboratory of Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias of Universidad Autonoma de Baja California, Mexico.

***Borrelia burgdorferi* identification**

Serology

Fourty blood samples (1-3 mL) collected from the cephalic veins of dogs into 4-mL Vacuntainer® tubes without EDTA, after antisepsis using isopropyl alcohol. Samples were then centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes to separate serum from clots. The serum was transferred to plastic vials of 1.5 ml capacity with a cap, identified and stored at -20°C until serological testing. The samples were tested for presence of *B. burgdorferi* antibodies by a commercial ELISA kit (*Borrelia burgdorferi* ELISA kit © Helica Biosystems, Inc.), which detects canine IgG with a sensitivity and specificity of 95.8 and 94.7%, respectively. This test use whole bacteria extracts as antigen from three different species, *B. burgdorferi*, *B. afzelli* and *B. garinii*. The optical density (OD) was determined at 450 nm. Positive cases were defined in dogs with serological analysis resulting in $OD \geq 0.3$, according to the manufacturer's protocol.

Culture

Samples from seropositive dogs were cultured in a rich medium BSK-H® complete medium (Sigma, St. Louis, Mo.) supplemented, and were observed in dark field

microscopy every week. Previous to collect samples from dogs, these were euthanized by intra-venous administration of pentobarbital sodium using a dose rate of 150 mg/Kg, as was authorized by the Animal Ethics Committee (Subcomite Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentacion of Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autonoma de Mexico). A sample from each dog was collected from following sites: bladder and synovial membrane (25 mm² area). Samples were collocated in a tube with 4 ml of capacity containing 3 ml of BSK medium supplemented with 6% rabbit serum, 6% gelatin and antibiotics: rifampicin (100 mg/L), fosfomicin (50 mg/L) and amphotericin B (2.5 mg/L). After this a subculture was done.

Molecular identification

DNA extractions were performed using the kit DNeasy[®] Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, California, USA.) performed according manufacturer's instructions. The molecular identification of *B. burgdorferi* was carried out by PCR as previously described (Thomas et al., 2001) with the Hot Start kit GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and using two targeted genes, one encoding flagellin gene (*fla*), to identify *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the other encoding 16S *rRNA*, to identify *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. The expected PCR product of *fla* (Germer et al., 1999) was 256 base pairs (bp) with the following primers: FLA 107 (5'TTAATCGAGCTTCTGATGATGCTGC3') and FLA 335 (5'ATTTCGTCTGTAAGTTGCTCTATTTCAA3') and the product PCR of 16S *rRNA* with primers: BB+ (5'GGGATGTAGCAATACATTC3') and BB- (5'ATATAGTTTCCAACATAGG3') was of 574 bp (Marconi and Garon, 1992). The PCR reaction conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min; 45

cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 1 min. A final extension step at 72°C for 7 min, and the samples were chilled at 4°C until gel analysis. For 16S rRNA, the PCR reaction conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min; 40 cycles of 95°C for 30 s, 53°C for 1 min, and 72°C for 30 s. A final extension step at 72°C for 2 min, and the samples were chilled at 4°C until nested PCR. The nested PCR reaction conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min; 45 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 2 min, and 72°C for 1 min. A final extension step at 72°C for 7 min, and the samples were chilled at 4°C until gel analysis. The electrophoresis was carried out in 1.5% agarose gels. The DNA from sonicated bacterial culture of *B. burgdorferi* N40 was used as positive control. Water was used as negative control. To prevent contamination, DNA extraction, amplification and identification of PCR products were performed in different laboratory areas (Chang et al., 2000). The alignment of the sequences obtained was carried out with the NCBI BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) and sequenced by Eurofins MWG Operon.

Tick identification and prevalence

To be included in the study, dogs had to be at least one month old, but could be of any breed, size or gender. Dogs were randomly selected from each group. All the selected dogs were examined for ticks on face, ears, neck, dorsal, limbs (interdigital spaces) and abdomen, the number of ticks per region were recorded. Dogs on which at least one tick was found were considered positive. The degree of infestation was determined based on the tick count on each dog, irrespective of the area of the body where they were found (Tinoco-Gracia et al., 2009b).

Data Collection

A questionnaire was designed to collect information of the tested dogs and included: general information of dog: gender (female, male), age (< 1 year, ≥ 1 year), size (small, medium, large), coat (short, medium, large), intensity of tick infestation: none, low (1-10 ticks), moderate (11-30 ticks), intense (> 30 ticks) and compatible clinical signs with Lyme borreliosis (emaciation, depression, lameness).

Tick Collection and Taxonomic Identification

Tick specimens were obtained from each dog. The dog was examined beginning from the head, followed by the neck, dorsal, abdomen, limbs and tail and all ticks stages were collected in sterile 10 ml collecting tubes with a sealing cap and stored at -20°C (Farley, 1996; Lyon and Restifo, 2000). The Identification of collected ticks was carried out under a stereomicroscope, 100x magnification by comparison with characteristics presented in taxonomic keys (Quiroz, 1999).

Prevalence values within each information of the tested dogs were compared by chi-squared tests by using odds ratio analyses in 2 x 2 tables (Walker, 1997). All statistical analyses were performed using the SAS statistical package v 9.1(SAS, 2004).

Results

Identification of *Borrelia burgdorferi*

Of the 40 blood serum samples tested, 4 (10%) were positive to *B. burgdorferi* by ELISA. Bladder and synovial fluid samples of these seropositive dogs were collected for culture and PCR. The bladder sample of only one dog were PCR positive for the *fla* gene of *B. burgdorferi* sensu lato. None synovial fluid samples

was positive. The positive bladder sample were culture and spirochete growth was observed at 86 days after, showing the characteristic spirochetal (Burgdorfer, 1984). The sequence of the PCR product obtained from the culture showed 100% homology with the *B. burgdorferi* sensu lato (accession number Genbank AF416447.1). A fraction of the 16S rRNA gene of *B. burgdorferi* sensu stricto was identified in the same sample, and the sequence of the PCR products obtained showed 99% homology with *B. burgdorferi* sensu stricto (accession number AE000783.1 Genbank).

Identification and prevalence of ticks

Out of total 384 dogs examined over a period of June-July 2009, 65.1% dogs were found to be positive for tick infestation. Most of the ticks were found on the ears, followed by the dorsal region and interdigital spaces (Table 1). There was no association between the prevalence and risk factors in this study ($P > 0.05$). However, 44.5% (171/384) were found with low infestation, 12.7% (49/384) with moderate infestation, 7.8% (30/384) with intense infestation, and 34.9% (134/384) none infestation.

Table 1. Prevalence of dog infestation with *R. sanguineus* by body regions.

Body Region	Positives	Prevalence %
Face	24	6.2
Ears	146	38.0
Neck	43	11.2
Dorsal	108	28.1
Interdigital	88	22.9

Discussion

The combination of serological (ELISA) and molecular (PCR) assays, and culture (BSK), provides a powerful tool to accurate diagnosis and epidemiological investigation of *B. burgdorferi*. The results indicated the presence of this bacteria in dogs in Mexicali area, as previously described, it identified serologic evidence of *B. burgdorferi* (Tinoco-Gracia et al., 2007; Tinoco-Gracia et al., 2008), whereas in this study showed for the first time, the existence of *B. burgdorferi* sensu stricto in *R. sanguineus* and dogs in this city. Studies in Mexicali, (Quintero et al., 2004), Cuernavaca, Morelos, Mexico (Cruz-Vazquez and Garcia-Vazquez, 1999) and in Brazil (Szabo et al., 2001) have shown that tick *R. sanguineus*, may be the only species that infects dogs in the respective cities, making to this tick species a potentially vector of zoonotic diseases such as ehrlichiosis and rickettsiosis (Marquez-Jimenez et al., 2005; Merino et al., 2005) and possibly other pathogens. Although in the region does not exist a known vector of Lyme disease, such as *I. pacificus* or *I. scapularis*. These findings may be indicative a zoonotic risk to be taken into consideration due to that *R. sanguineus* is related to bite cases in humans (Carpenter et al., 1990; Dantas-Torres et al., 2006; Quintero et al., 2004) affecting up to 50 people per 100,000 (Manfredi et al., 1999; Merino et al., 2005), although it should be consider that the frequency of bites of this tick to humans may be higher which is currently registered. The presence of *B. burgdorferi* and *R. sanguineus* ticks in dogs, is an important fact to consider in the implementation of

preventive and therapeutic measures against Lyme disease and another vector borne diseases by veterinarians, doctors, nurses and health practitioners, since the results of this study suggest the possibility of Lyme disease infection in a region where the common vectors, *I. scapularis*, *I. pacificus* and *I. ricinus*, *I. texanus*, *Amblyomma cajennens*, *Dermacentor andersoni* (Barbour and Hayes, 1986; Gordillo-Pérez et al., 2009; Greene et al., 2000; Magnarelli et al., 1987) have not reported in Mexicali, only *R. sanguineus*. Further studies will be required to clarify what is the vector of Lyme disease and the possible involvement of reservoirs, such as mice, rats, cats, pigeons, sparrows or other animals that inhabit in this region.

Acknowledgements

To Centro Municipal de Control Animal de Mexicali and Colegio de Médicos Veterinarios en Pequeñas Especies de Mexicali, A.C.

Author Disclosure Statement

The authors, disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscript. All authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal.

References

- Anderson, J.M., Norris, D.E., 2006, Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in *Peromyscus leucopus*, the primary reservoir of Lyme disease in a region of endemicity in southern Maryland. *Appl Environ Microbiol* 72, 5331-5341.
- Anderson, J.M., Swanson, K.I., Schwartz, T.R., Glass, G.E., Norris, D.E., 2006, Mammal diversity and infection prevalence in the maintenance of enzootic *Borrelia burgdorferi* along the western Coastal Plains of Maryland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6, 411-422.
- Appel, M.J., Allan, S., Jacobson, R.H., Lauderdale, T.L., Chang, Y.F., Shin, S.J., Thomford, J.W., Todhunter, R.J., Summers, B.A., 1993, Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *The Journal of infectious diseases* 167, 651-664.
- Baptista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M., Collares-Pereira, M., 2004, Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 109-116.
- Barbour, A.G., Hayes, S.F., 1986, Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50, 381-400.
- Bernasconi, M., Valsangiacomo, C., Balmelli, T., Peter, O., Piffaretti, J., 1997, Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. *Eur J Epidemiol* 13, 209-215.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A., Daoud, A., 1999, Distribution and ecology of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Tunisia: an overview of eighth years field collections. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 5-10.
- Burgdorfer, W., 1984, Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 57, 515-520.
- Burgess, E.C., 1986, Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 263, 49-54.
- Callister, S.M., Jobe, D.A., Schell, R.F., Lovrich, S.D., Onheiber, K.L., Korshus, J.B., 2000, Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* ticks. *J Clin Microbiol* 38, 3670-3674.
- Carpenter, T.L., McMeans, M.C., McHugh, C.P., 1990, Additional instances of human parasitism by the brown dog tick (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology* 27, 1065-1066.
- Clark, K., 2004, *Borrelia* Species in Host-Seeking Ticks and Small Mammals in Northern Florida. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5076-5086.
- Costa, I.P., Bonoldi, V.L., Yoshinari, N.H., 2002, Search for *Borrelia* sp. in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: a short report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 631-635.
- Cruz-Vazquez, C., Garcia-Vazquez, Z., 1999, Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Exp Appl Acarol* 23, 277-280.
- Chang, Y.F., Novosol, V., McDonough, S.P., Chang, C.F., Jacobson, R.H., Divers, T., Quimby, F.W., Shin, S., Lein, D.H., 2000, Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. *Vet Pathol* 37, 68-76.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Brandao-Filho, S.P., 2006, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39, 64-67.
- Derdakova, M., Beati, L., Pet'ko, B., Stanko, M., Fish, D., 2003, Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 69, 509-516.
- Farley, D., 1996, Fighting Fleas and Ticks. Preventing Tick-Borne Disease. *FDA Consumer magazine*.

- Faul, J.L., Doyle, R.L., Kao, P.N., Ruoss, S.J., 1999, Tick-borne pulmonary disease: update on diagnosis and management. *Chest* 116, 222-230.
- Filippova, N., 1990, [The taxonomic aspects of the transmission of the causative agent of Lyme disease]. *Parazitologiya* 24, 257-267.
- Foldvari, G., Rigo, K., Majlathova, V., Majlath, I., Farkas, R., Pet'ko, B., 2009, Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards and their ticks from Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9, 331-336.
- Germer, J., Ryckmann, B., Moro, M., Hofmeister, E., Barthold, S.W., Bockenstedt, L., Persing, D.H., 1999, Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* with a microtiter-based competitive polymerase chain reaction assay. *Molecular diagnosis* 4, 185-193.
- Gordillo-Pérez, G., Torres, J., Solórzano-Santos, F., De Martino, S., Lipsker, D., Velázquez, E., Ramon, G., Muñoz, O., Jaulhac, B., 2007, *Borrelia burgdorferi* Infection and Cutaneous Lyme Disease, Mexico. *Emerg Infect Dis* 13, 1556-1558.
- Gordillo-Pérez, G., Torres, J., Solórzano-Santos, F., Garduno-Bautista, V., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O., 2003, [Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the northeast of the Mexican Republic]. *Salud Publica Mex* 45, 351-355.
- Gordillo-Pérez, G., Torres, J., Solórzano, F., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O., 1999, Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. *Arch Med Res* 30, 64-68.
- Gordillo-Pérez, G., Vargas, M., Solórzano-Santos, F., Rivera, A., Polaco, O., Alvarado, L., Muñoz, O., Torres, J., 2009, Demonstration of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto infection in ticks from the northeast of Mexico. *Clin Microbiol Infect* 15, 496-498.
- Gordillo, G., Santos, F.S., Torres, J., Velázquez, E., Ramón, G., García, R., Vargas, M., 2010, Epidemiological, clinical and zoonotic evidences for the existence of Lyme disease in Central of Mexico. *International Journal of Infectious Diseases* 14, e378-e379.
- Greene, C.E., Appel, M.J.G., Straubinger, R.K., 2000, Enfermedades Infecciosas en perros y gatos. *Borreliosis de Lyme*, Tercera edición Edition. McGraw-Hill Interamericana, Mexico, D.F., 311-324 pp.
- Guerra, M.A., Walker, E.D., Kitron, U., 2000, Quantitative approach for the serodiagnosis of canine Lyme disease by the immunoblot procedure. *J Clin Microbiol* 38, 2628-2632.
- Humair, P.F., Douet, V., Cadenas, F.M., Schouls, L.M., Van De Pol, I., Gern, L., 2007, Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J Med Entomol* 44, 869-880.
- Jordan, B.E., Onks, K.R., Hamilton, S.W., Hayslette, S.E., Wright, S.M., 2009, Detection of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia lonestari* in birds in Tennessee. *J Med Entomol* 46, 131-138.
- Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Krueger, D.E., Johnson, R.C., Schwan, T.G., 1993, Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. *J Med Entomol* 30, 586-596.
- Lane, R.S., Kucera, T.F., Barrett, R.H., Mun, J., Wu, C., Smith, V.S., 2006, Wild turkey (*Meleagris gallopavo*) as a host of ixodid ticks, lice, and Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) in California state parks. *J Wildl Dis* 42, 759-771.
- Luckhart, S., Mullen, G., Wright, J., 1991, Etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, detected in ticks (Acari: Ixodidae) collected at a focus in Alabama. *J Med Entomol* 28, 652-657.
- Lyon, W.F., Restifo, R.A., 2000, Ticks. Tick removal. . Ohio State University Extension Fact Sheet Entomology, HYG 2073-2098.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Schreier, A.B., Ficke, C.M., 1987, Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* 191, 1089-1094.

- Manfredi, M.T., Dini, V., Piacenza, S., Genchi, C., 1999, Tick species parasitizing people in an area endemic for tick-borne diseases in north-western Italy. *Parassitologia* 41, 555-560.
- Marconi, R.T., Garon, C.F., 1992, Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2830-2834.
- Marquez-Jimenez, F.J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodriguez-Liebana, J.J., Muniain-Ezcurra, M.A., 2005, [Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23, 94-102.
- Martinez, A., Salinas, A., Martinez, F., Cantu, A., Miller, D.K., 1999, Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. *J. Wildl. Dis.* 35, 799-803.
- Merino, F.J., Nebreda, T., Serrano, J.L., Fernandez-Soto, P., Encinas, A., Perez-Sanchez, R., 2005, Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiol Infect* 133, 943-949.
- Miserez, V., Gern, L., Aeschlimann, A., 1990, *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia* 32, 293-299.
- Munderloh, U.G., Park, Y.J., Doh, J.M., Fallon, A.M., Kurtti, T.J., 1993, Plasmid modifications in a tick-borne pathogen, *Borrelia burgdorferi*, cocultured with tick cells. *Insect Mol Biol* 1, 195-203.
- Nebreda Mayoral, T., Merino, F.J., Serrano, J.L., Fernandez-Soto, P., Encinas, A., Perez-Sanchez, R., 2004, Detection of antibodies to tick salivary antigens among patients from a region of Spain. *Eur J Epidemiol* 19, 79-83.
- Piesman, J., Schneider, B.S., Zeidner, N.S., 2001, Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J Clin Microbiol* 39, 4145-4148.
- Quintero, M.T., Gaxiola, C.S., Castillo, M.A., Juárez, V.G., 2004, Algunas consideraciones sobre la presencia de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (Acari Ixodidae) sobre perros y su repercusión en salud. *Entomología Mexicana* 3, 86-88.
- Quiroz, H., 1999, *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Ixódidos*, Vol I, 1ra Edition. Editorial Limusa, México, D.F., 876 p.
- Romano-Osuna, M., Tinoco-Gracia, L., Covarrubias-Pimentel, F., 1998, Demostración de *Ehrlichia canis* mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, B.C. *Revista AMMVEPE* 9, 86.
- Salinas-Melendez, J.A., Avalos-Ramirez, R., Riojas-Valdez, V.M., Martinez-Munoz, A., 1999, Serological survey of canine borreliosis. *Rev Latinoam Microbiol* 41, 1-3.
- Salinas-Melendez, J.A., Tamez-Gonzalez, R., Welsh-Lozano, O., Barrera-Saldaña, H.A., 1995, Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in human skin biopsies and dog synovial fluid by the polymerase chain reaction. *Rev Latinoam Microbiol* 37, 7-10.
- Sanogo, Y.O., Parola, P., Shpynov, S., Camicas, J.L., Brouqui, P., Caruso, G., Raoult, D., 2003, Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 990, 182-190.
- SAS, I.I., 2004, SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Scott, J.D., Lee, M.K., Fernando, K., Durden, L.A., Jorgensen, D.R., Mak, S., Morshed, M.G., 2010, Detection of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, including three novel genotypes in ticks (Acari: Ixodidae) collected from songbirds (Passeriformes) across Canada. *J Vector Ecol* 35, 124-139.
- Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G., Schot, C.S., 1999, Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37, 2215-2222.

- Steere, A.C., 1987, [Lyme disease--a tick-transmitted spirochete infection]. *Terapevticheskii arkhiv* 59, 32-34.
- Straubinger, A.F., 2000, Lyme Borreliosis In Dogs. In: Carmichael L. (Ed.), Recent Advances in Canine Infectious Diseases. International Veterinary Information Service A0109.0400.
- Szabo, M.P., Cunha, T.M., Pinter, A., Vicentini, F., 2001, Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, Sao Paulo, Brazil. *Exp Appl Acarol* 25, 909-916.
- Takano, A., Goka, K., Une, Y., Shimada, Y., Fujita, H., Shiino, T., Watanabe, H., Kawabata, H., 2010, Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environ Microbiol* 12, 134-146.
- Thomas, V., Anguita, J., Barthold, S.W., Fikrig, E., 2001, Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect Immun* 69, 3359-3371.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M.T., Renteria-Evangelista, T., Barreras Serrano, A., Hori-Oshima, S., Medina-Basulto, G., Tamayo-Sosa, A.R., López-Valencia, G., Moro, M.H., Vinasco, J., Gordillo, G., 2009a. Primera evidencia molecular de *Borrelia burgdorferi* en perros y garrapatas de Mexicali, Baja California, México. In: XXXIV Congreso Anual de Infectología y Microbiología Clínica, Guadalajara, Jal., México.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero, M.M.T., Rentería-Evangelista, T.B., Barreras-Serrano, A., Hori-Oshima, S., López-Valencia, G., Tamayo-Sosa, A.R., Rico, O., Moro, M., Vinasco, J., 2007, Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in dogs from a Mexico-U.S. border desert region: pilot study. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6, 787-789.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz, H., Quintero, M.M.T., Rentería-Evangelista, T., Barreras Serrano, A., Hori-Oshima, S., Medina-Basulto, G., Vinasco, J., Moro, M.H., 2008, Prevalence and Risk Factors for *Borrelia burgdorferi* Infection in Mexicali, Baja California, a Mexico-US Border City. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 6, 161-165.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz, H., Quintero, M.M.T., Rentería-Evangelista, T., González-Medina, Y., Barreras Serrano, A., Hori-Oshima, S., Moro, M., Vinasco, J., 2009b, Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet Rec*. 164, 59-61.
- Walker, E.D., Stobierski, M.G., Poplar, M.L., Smith, T.W., Murphy, A.J., Smith, P.C., Schmitt, S.M., Cooley, T.M., Kramer, C.M., 1998, Geographic distribution of ticks (Acari: Ixodidae) in Michigan, with emphasis on *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 35, 872-882.
- Walker, G.A., 1997, Common Statistical Methods for Clinical Research. SAS Institute Inc., Cary, NC., 187-196 pp.

CONCLUSIONES

Con el análisis de los resultados anteriormente descritos se concluye que la colección e identificación de garrapatas procedentes de perros de la ciudad de Mexicali, ha revelado la existencia una única especie, *Rhipicephalus sanguineus*. , la cual no ha sido reconocida como el principal vector de la borreliosis o enfermedad de Lyme. Además en este trabajo se confirma por primera vez la existencia de *B. burgdorferi* sensu stricto en perros, mediante cultivo y diagnóstico biomolecular, y en garrapatas *R. sanguineus* la existencia de al menos *B. burgdorferi* sensu lato. Por lo tanto, es posible que las garrapatas *R. sanguineus* podrían participar en la transmisión de borreliosis en perros. Por otra parte, la presencia de *B. burgdorferi* en perros y en garrapatas *R. sanguineus*, es importante a considerar para la implementación de medidas preventivas y terapéuticas contra borreliosis en esta región y en donde predomine *R. sanguineus*, aunque no exista el vector *I. scapularis*.

Tomando en cuenta los resultados de este estudio y para comprobar la hipótesis de transmisión, cabe mencionar, que es necesario demostrar experimentalmente la transmisión de *B. burgdorferi* a través de garrapatas *R. sanguineus* en perros, infectándolas con medio de cultivo de borrelias colectadas de tejidos de perros de la región.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad causada por más de 180 serovares de *Leptospira interrogans*. Esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial y es considerada como una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia (Acha y Sziyres, 1992). Los organismos tienen forma de espiral, son muy finos, de 5-18 μm de longitud y 0.1-0.2 μm de ancho. Tienden a formar un gancho aerobio que se ha diferenciado de otras espiroquetas patógenas y se puede cultivar en medios artificiales (Acosta et al., 1994). La temperatura óptima de crecimiento es 30°C y el tiempo para obtener una nueva generación es de 7 a 10 días para nuevas colonias aisladas, pero son difíciles de recuperar mediante cultivos in vitro (McDonough, 2001).

Los principales reservorios de la leptospira en ambiente urbano son los perros y las ratas, así como los bovinos, porcinos y equinos en el campo. La leptospira se adaptó a "huéspedes reservorios primarios", los cuales comúnmente son animales salvajes. Estas mismas especies de *Leptospira* también se presentan en casi cualquier otro huésped mamífero como "huéspedes reservorio incidentales o accidentales" (McDonough, 2001).

La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria cursan en forma asintomática o con manifestaciones clínicas inespecíficas y auto limitadas, de 4 a 7 días. La enfermedad evoluciona con o sin ictericia (Vinetz, 2001; Abdulkader; et al., 2002).

La forma ictérica es la presentación grave de leptospirosis (5 a 10% de los casos), conocida como enfermedad o síndrome de Weil. Cursa con ictericia,

hemorragia e insuficiencia renal aguda y está asociada al serotipo ictehaemorrhagiae (Hill y Sanders, 1997; Salto, et al., 1997; Costa, et al., 2001; Daher, et al., 2003).

Los síntomas y signos más frecuentes son fiebre (100%), mialgias intensas (71 a 92%), cefalea (85 a 99%), manifestaciones gastrointestinales, como vómitos, alteraciones del tránsito y dolor abdominal (17.2 a 62.3%), inyección conjuntival (36.3 a 77.2%) y síndrome meníngeo (19.4 a 22.7%, en la segunda semana de evolución) (Zunino, 2007).

Para evitar las complicaciones y las formas más graves de la enfermedad es imprescindible realizar un diagnóstico temprano y comenzar inmediatamente un tratamiento eficaz (Perani, et al., 1998).

La leptospirosis se puede diagnosticar mediante aislamiento de la bacteria o demostrando anticuerpos específicos contra leptospiras. El cultivo tiene la desventaja de que el período que tarda la bacteria en crecer y su bajo porcentaje de aislamiento hacen que no sea útil para un diagnóstico seguro (Hartskeerl, et al., 2001).

Esta enfermedad es frecuentemente subdiagnosticada debido a que los síntomas clínicos son inespecíficos y, por lo tanto, las pruebas de laboratorio son esenciales para confirmar la sospecha clínica. La técnica de confirmación serológica de referencia internacional es la microaglutinación (MAT). Esta prueba es compleja y de difícil realización, y generalmente no permite la detección precoz de los casos (Levett, 2001).

La Reacción de polimerasa en cadena (PCR) en algunos trabajos se ha demostrado útil en muestras de sangre, LCR, orina o tejidos. Si bien en sangre

tiene mejor sensibilidad que el cultivo. Otros métodos de identificación son la Microscopia de campo oscuro; útil, pero requiere de un operador experto y puede dar resultados falsos positivos.

Otros métodos de diagnóstico están basados en la respuesta inmune del paciente frente a las leptospiras, como la prueba de microaglutinación (MAT)¹² y el ELISA IgM¹³, que detectan anticuerpos contra *Leptospira* spp. en líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero, pero estas técnicas son poco sensibles en los primeros seis días de enfermedad y por tanto pueden ser inoportunas para el inicio de tratamiento.

El diagnóstico precoz en leptospirosis es necesario, sobre todo en las formas graves de la enfermedad; esto ha motivado el desarrollo de técnicas de PCR que han demostrado que pueden ser útiles en los periodos agudos de la infección.

En base a lo anterior el objetivo de esta investigación es: **Confirmar casos positivos a Leptospirosis por microscopia de campo oscuro, utilizando la técnica de PCR.**

Primera evidencia molecular de borreliosis y leptospirosis en un humano de Sinaloa, México.

Beatriz Julieta García-Prieto¹, Sawako Hori¹, Luis Tinoco-Gracia¹, Bertha Landeros- Sánchez ², Alma Rossana Tamayo-Sosa¹; Alberto Barreras-Serrano¹; José Antonio Guzmán-Trejo¹, Jazmín Paola Gómez Castellanos¹, Pedro Rodríguez Peñuelas³; Tonatiuh Melgarejo ⁴

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias,

²Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería,
Universidad Autónoma de Baja California, México.

³Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma de Sinaloa.

⁴Department of Human Nutrition. College of Human Ecology,
Kansas State University, USA.

RESUMEN

La borreliosis conocida como enfermedad de Lyme es una zoonosis producida por los diversos genotipos del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, es de distribución mundial y transmitida por garrapatas. La leptospirosis es la enfermedad zoonótica mas ampliamente distribuida en el mundo, con más de un millón de casos por año. Por lo tanto este trabajo tiene como objetivo detectar molecularmente por PCR el agente etiológico (*Borrelia* sp., *Leptospira* sp.) en una muestra sanguínea de un humano positivo a espiroquetosis por microscopía de campo oscuro, de Culiacán, Sinaloa, México. En este estudio se incluyó una muestra sanguínea de una paciente con manifestaciones clínicas compatibles a leptospirosis. La muestra analizada por PCR resultó positiva tanto a *Borrelia* sp. como *Leptospira* sp., detectando una fracción del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato, y otra fracción del gen *LigA* de *Leptospira interrogans*. Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar para la confirmación del diagnóstico molecular de ambas espiroquetosis, borreliosis y leptospirosis. La secuenciación de los

productos de PCR de FLA obtenidos mostró 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto y de LIG 99% con *Leptospira interrogans*. Los resultados de este estudio indican la necesidad de confirmar el resultado de microscopia de campo oscuro con métodos más confiables, siendo PCR eficaz para detectar tanto *B. burgdorferi* sensu stricto, como *Leptospira interrogans* a partir de una muestra sanguínea.

ABSTRACT

Known as Lyme disease Lyme is a zoonotic disease caused by different genotypes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, is transmitted by ticks and global distribution. Leptospirosis is a zoonotic disease more widely distributed in the world, with more than one million cases per year. Therefore this work is aimed at molecularly for PCR to detect the Etiologic Agent (*Borrelia* spp., *Leptospira* sp.) in a blood sample of a positive human to espiroquetosis for dark-field microscopy from Culiacan, Sinaloa, Mexico,. This study included a blood sample from a patient with compatible clinical manifestations to leptospirosis. The sample analysed by PCR was positive both to *Borrelia* sp. as *Leptospira* sp., detecting a fraction of gene fla of *B. burgdorferi* sensu lato, and another fraction of the gene of *Leptospira interrogans*. The obtained PCR products were sent to sequencing for confirmation of the molecular diagnosis of both espiroquetosis, borreliosis and leptospirosis. The sequencing of the FLA PCR products obtained showed 99% of homology with *B. burgdorferi* sensu stricto and LIG 99% with *Leptospira interrogans*. The results of this study indicate the need to confirm the result of more reliable methods dark field microscopy, being effective PCR to detect both *B. burgdorferi* sensu stricto as *Leptospira interrogans* from a blood sample.

INTRODUCCIÓN

La borreliosis conocida como enfermedad de Lyme es una zoonosis producida por los diversos genotipos del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, es de distribución mundial y transmitida por garrapatas (Escudero et al., 2000; Liveris et al., 1999; Qiu et al., 2002; Thomas et al., 2001; Yoshinari et al., 2003). *Borrelia*

burgdorferi es capaz de infectar a roedores, ciervos, perros, gatos, vacas, caballos, reptiles, aves y a varias especies de garrapatas, además de afectar al humano (Faul *et al.*, 1999; Straubinger, 2000). En el Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia se han reportado 157,410 casos de borreliosis en humanos desde 1990 a 2001. En el año 2002 se reportaron 23,763 casos en los Estados Unidos (CDC, 2004). En el Distrito Federal y el noreste de la República Mexicana, un estudio de 2,346 sueros sanguíneos de humanos analizados por ELISA y confirmados con Western blot para el diagnóstico de *B. burgdorferi*, encontraron una prevalencia del 3.4 y 6.2% respectivamente (Gordillo-Pérez *et al.*, 2003a). Además 4 pacientes residentes del Distrito Federal que fueron mordidos por garrapatas al visitar parques forestales (3 en la Ciudad de México y uno en Quintana Roo), resultaron positivos por PCR de biopsias de piel a *B. burgdorferi* utilizando iniciadores para el gen de flagelina. Uno de los cuales resultó también positivo por secuenciación al gen OspA (Gordillo-Pérez *et al.*, 2007). Algunos casos sugestivos de borreliosis de Lyme fueron descritos a principios de la década de 1990 en los estados de Sinaloa y Nuevo León, sin que se haya logrado la confirmación etiológica (Gordillo-Pérez *et al.*, 2003b).

La leptospirosis es la enfermedad zoonótica mas ampliamente distribuida en el mundo, con más de un millón de casos por año (Bharti *et al.*; Levett, 2001). El humano puede infectarse por contacto directo o indirecto, con la orina de animales infectados por *Leptospira* spp. patógenas, ya sea de granja, de compañía o fauna silvestre (Levett, 2001); siendo los roedores los principales vectores de esta enfermedad (Ko *et al.*, 2009). Se caracteriza por manifestar fiebre aguda en la fase de leptospirémica, la cual progresa causando severo daño multisistémico, tales como falla renal, disfunción hepática, síndrome hemorrágico pulmonar, miocarditis y meningoencefalitis. Además, las leptospirosis pueden persistir en lugares inmunoprivilegiados, como la cámara anterior y cuerpo vítreo del ojo y túbulos renales causándoles daño (Ko *et al.*, 2009; Koizumi *et al.*, 2013; Levett, 2001). Evidencias serológicas se han demostrado en Sinaloa, Jalisco, Ciudad de México, Chiapas, Puebla y Chihuahua, pero no evidencias moleculares (Flisser *et al.*,

2002). El diagnóstico de borreliosis y de leptospirosis por microscopía de campo oscuro es ampliamente utilizado, pero por su baja sensibilidad y especificidad, requiere confirmarse por otros métodos, como inmunofluorescencia, aglutinación microscópica ó PCR (Benacer et al., 2013; Costa et al., 2002; Koizumi et al., 2013). Por lo tanto este trabajo tiene como objetivo detectar molecularmente por PCR el agente etiológico (*Borrelia* sp., *Leptospira* sp.) en una muestra sanguínea de un humano positivo a espiroquetosis por microscopía de campo oscuro, de Culiacán, Sinaloa, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se incluyó una muestra sanguínea de una paciente con manifestaciones clínicas compatibles a leptospirosis, procedente de Culiacán Sinaloa, México, colectada por personal calificado bajo la supervisión del Dr. Pedro Rodríguez Peñuelas, Docente-investigador de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La extracción de ADN y PCR se realizaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. La paciente de 23 años fue portadora del síndrome migrañoso de 5 años de evolución, con diagnóstico inicial por microscopía de campo oscuro de leptospirosis en septiembre de 2008; en abril de 2009 presentó síndrome de Well confirmándose con múltiples espiroquetas en sangre; en 2012 presentó recaída con pancreatitis, neumonitis y neuritis óptica, confirmados por TAC tóraco abdominal, ultrasonido abdominal y colangio resonancia magnética; en 2013 presentó nuevo episodio de pancreatitis clínica con lipasemia de 6,240 UI; se descartó patología autoinmune; en todos los eventos clínicos se sometió a tratamiento con antimicrobianos tipo carbapenémicos por alergia a cefalosporinas y penicilinas; después del último tratamiento con ertapenem resultó sin evento clínico activo sugerente de enfermedad. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, California, E.U.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el diagnóstico molecular se utilizaron dos juegos de iniciadores, a) uno que tiene como blanco al gen *fla* codificante de la flagelina bacteriana para

detectar *Borrelia burgdorferi* sensu lato, utilizando los iniciadores: FLA-107 (5'TTAATCGAGCTTCTGATGATGCTGC) y FLA-335 (5'ATTTCTGTCTGTAAGTTGCTCTATTTCAA), con un tamaño esperado de producto de PCR de 256 (pb) pares de bases (Germer et al., 1999); y b) otro juego de iniciadores que tiene como blanco al gen *ligA* codificante de una parecida inmunoglobulina leptospiral para detectar *Leptospira* spp. patógenas, utilizando los iniciadores: LIG1 (TCAATCAAAACAAGGGGCT) y LIG2 (ACTTGCATTGGAAATTGAGAG), con un tamaño esperado de producto de PCR de 468 pb (Figueira et al., 2011; Matsunaga et al., 2003; McBride et al., 2009). El protocolo de PCR, en ambos casos, inició con un calentamiento de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización de 94°C por 40 s, hibridación de 55°C por 40 s y extensión de 72°C por 40 s; y una extensión final de 72°C por 5 min (Germer et al., 1999; Palaniappan et al., 2005). Para prevenir la contaminación de las muestras, las preparaciones, la extracción del ADN, la amplificación y detección de productos de PCR fueron realizados en diferentes áreas del laboratorio (Chang et al., 2000). Los productos de amplificación por PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE (tris-acetato EDTA 1X) conteniendo el colorante de ácidos nucleicos GR Safe®, en lugar de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar al Laboratorio Eurofins MWG Operon de Huntsville, Alabama, EUA. Y los resultados de secuenciación fueron analizados con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra analizada por PCR resultó positiva tanto a *Borrelia* sp. como *Leptospira* sp., detectando una fracción del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato, y otra fracción del gen *LigA* de *Leptospira interrogans*. Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar para la confirmación del diagnóstico molecular de ambas espiroquetosis, borreliosis y leptospirosis. La secuenciación de los productos de PCR de FLA obtenidos mostró 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto y de LIG 94% con *Leptospira interrogans*. La muestra sanguínea en

estudio, fue previamente diagnosticada por microscopia de campo oscuro como espiroquetosis, presumiblemente como leptospirosis por la apariencia morfológica general de esta bacteria. Por lo tanto, las evidencias moleculares en este trabajo confirman la existencia de *B. burgdorferi* sensu stricto y de *Leptospira* sp. en una muestra sanguínea de humano procedente de Culiacán, Sinaloa, México; siendo la primera vez que se confirma molecularmente un diagnóstico de borreliosis y leptospirosis en humanos en esta ciudad. Los resultados de este estudio indican la necesidad de confirmar el resultado de microscopia de campo oscuro con métodos más confiables, siendo PCR eficaz para detectar tanto *B. burgdorferi* sensu stricto, como *Leptospira interrogans* a partir de una muestra sanguínea.

LITERATURA CITADA

- Benacer, D., Mohd Zain, S.N., Amran, F., Galloway, R.L., Thong, K.L., 2013, Isolation and Molecular Characterization of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* Isolates from the Urban Rat Populations of Kuala Lumpur, Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 88, 704-709.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 757-771.
- CDC, 2004, Lyme Disease --- United States, 2001--2002. *CDC* 53, 365-369.
- Costa, I.P., Bonoldi, V.L., Yoshinari, N.H., 2002, Search for *Borrelia* sp. in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: a short report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 631-635.
- Chang, Y.F., Novosol, V., McDonough, S.P., Chang, C.F., Jacobson, R.H., Divers, T., Quimby, F.W., Shin, S., Lein, D.H., 2000, Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. *Vet Pathol* 37, 68-76.
- Escudero, R., Barral, M., Perez, A., Vitutia, M.M., Garcia-Perez, A.L., Jimenez, S., Sellek, R.E., Anda, P., 2000, Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 38, 4026-4033.
- Faul, J.L., Doyle, R.L., Kao, P.N., Ruoss, S.J., 1999, Tick-borne pulmonary disease: update on diagnosis and management. *Chest* 116, 222-230.
- Figueira, C.P., Croda, J., Choy, H.A., Haake, D.A., Reis, M.G., Ko, A.I., Picardeau, M., 2011, Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte

- Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. *BMC Microbiol* 11, 129.
- Flisser, A., Velasco-Villa, A., Martínez-Campos, C., González-Domínguez, F., Briseño-García, B., García-Suárez, R., Caballero-Servín, A., Hernández-Monroy, I., García-Lozano, H., Gutiérrez-Cogco, L., Rodríguez-Angeles, G., López-Martínez, I., Galindo-Virgen, S., Vázquez-Campuzano, R., Balandrano-Campos, S., Guzmán-Bracho, C., Olivo-Díaz, A., de la Rosa, J.L., Magos, C., Escobar-Gutiérrez, A., Correa, D., 2002, Infectious Diseases in Mexico. A Survey from 1995–2000. *Archives of Medical Research* 33, 343-350.
- Germer, J., Ryckmann, B., Moro, M., Hofmeister, E., Barthold, S.W., Bockenstedt, L., Persing, D.H., 1999, Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* with a microtiter-based competitive polymerase chain reaction assay. *Molecular diagnosis* 4, 185-193.
- Gordillo-Pérez, G., Torres, J., Solórzano-Santos, F., De Martino, S., Lipsker, D., Velázquez, E., Ramon, G., Muñoz, O., Jaulhac, B., 2007, *Borrelia burgdorferi* Infection and Cutaneous Lyme Disease, Mexico. *Emerg Infect Dis* 13, 1556-1558.
- Gordillo-Pérez, G., Torres, J., Solorzano-Santos, F., Garduno-Bautista, V., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O., 2003a, [Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the northeast of the Mexican Republic]. *Salud Publica Mex* 45, 351-355.
- Gordillo-Pérez, G., Torres, J., Solórzano-Santos, F., Garduño-Bautista, V., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O., 2003b, Estudio seroepidemiológico de borreliosis de Lyme en la Ciudad de México y el noreste de la República Mexicana. *Salud Pública de México* 45, 351-355.
- Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M., 2009, *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nature Reviews. Microbiology* 7, 736-747.
- Koizumi, N., Muto, M.M., Akachi, S., Okano, S., Yamamoto, S., Horikawa, K., Harada, S., Funatsumaru, S., Ohnishi, M., 2013, Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 62, 630-636.
- Levett, P.N., 2001, Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 296-326.
- Liveris, D., Varde, S., Iyer, R., Koenig, S., Bittker, S., Cooper, D., McKenna, D., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., Schwartz, I., 1999, Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 37, 565-569.

- Matsunaga, J., Barocchi, M., Croda, J., Young, T., Sanchez, Y., Siqueira, I., Bolin, C., Reis, M., Riley, L., Haake, D., Ko, A., 2003, Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 49, 929-945.
- McBride, A., Cerqueira, G., Suchard, M., Moreira, A., Zuerner, R., Reis, M., Haake, D., Ko, A., Dellagostin, O., 2009, Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol* 9, 196-205.
- Palaniappan, R., Chang, Y., Chang, C., Pan, M., Yang, C., Harpending, P., McDonough, S., Dubovi, E., Divers, T., Qu, J., Roe, B., 2005, Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes* 19, 111-117.
- Qiu, W.G., Dykhuizen, D.E., Acosta, M.S., Luft, B.J., 2002, Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. *Genetics* 160, 833-849.
- Straubinger, R.K., 2000, PCR-Based Quantification of *Borrelia burgdorferi* Organisms in Canine Tissues over a 500-Day Postinfection Period. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2191-2199.
- Thomas, V., Anguita, J., Barthold, S.W., Fikrig, E., 2001, Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect Immun* 69, 3359-3371.
- Yoshinari, N.H., Abrao, M.G., Bonoldi, V.L., Soares, C.O., Madruga, C.R., Scofield, A., Massard, C.L., da Fonseca, A.H., 2003, Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 311-318.