

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



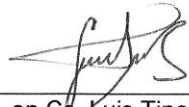
**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Borrelia burgdorferi* SENSU STRICTO EN PERROS DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.**

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA  
M. V. Z. BEATRIZ JULIETA GARCÍA PRIETO

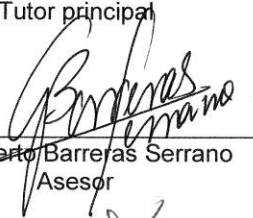
MEXICALI B. C., MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2010.

**Aislamiento y Caracterización Molecular de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto en Perros de Mexicali, Baja California, México. Tesis presentada por Beatriz Julieta García Prieto como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité parcial indicado:**



---

Dr. en Cs. Luis Tinoco Gracia  
Tutor principal



---

Dr. Alberto Barrejas Serrano  
Asesor



---

Dr. Gilberto López Valencia  
Asesor

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero y como más importante, me gustaría agradecer sinceramente a mi director y tutor de Tesis, Dr. en Cs. Luis Tinoco Gracia por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. Lo admiro y me siento en deuda con él por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado este proyecto.

Al Dr. Alberto Barreras Serrano, gracias por sus enseñanzas, su permanente disposición, su amistad y por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica.

También me gustaría agradecer por los consejos y su amistad a lo largo de los últimos años al Dr. Gilberto López Valencia, siempre con un consejo oportuno y certero.

Gracias al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California en especial al cuerpo de Salud Animal, al Gobierno Municipal de Mexicali y Centro Municipal de Control Animal, así como al Colegio de Médicos Veterinarios en Pequeñas Especies de Mexicali, A.C.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, a mis hermanos, que en todo momento me han apoyado incondicionalmente. Gracias por estar siempre conmigo y darme siempre un ejemplo de superación.

A Javier y Mishelle, que son el motor de mi vida, y que sin ellos no sería la persona que soy ahora. Los amo y son la razón de mi esfuerzo día con día.

Gracias Javier por tu comprensión, tu amor y tu apoyo tanto en las buenas como en las malas, este nuevo logro es “nuestro”.

## **Aislamiento y caracterización molecular de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto en perros de Mexicali, Baja California, México.**

**Resumen:** 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, mientras que otras especies como *R. sanguineus* no se ha demostrado que la transmitan. Es una enfermedad zoonótica caracterizada por provocar trastornos polisistémicos. En un estudio realizado en la ciudad de Mexicali, Baja California, determinaron la seroprevalencia de ésta espiroqueta resultando 8.2% (95% I.C. 1.5-13.3%) en 94 perros. El objetivo de este estudio fue 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*. Se analizaron 40 sueros sanguíneos de perros para identificar los seropositivos. Las muestras de tejidos seropositivos se cultivaron con el medio BSK-H completo. El 100% de las garrapatas colectadas en los sujetos de estudio fueron identificadas como *R. sanguineus*. La secuencia de los productos de PCR mostró 100% de homología con *B. burgdorferi* sensu lato. Por otra parte, también se detectó una fracción del gen *16S rRNA* de *B. burgdorferi* sensu stricto. La secuencia de los productos de PCR mostró 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto. 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.

**Palabras claves:** *Borrelia burgdorferi*, borreliosis, secuenciación, PCR , cultivo.

**Isolation and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in dogs of Mexicali, Baja California, México.**

**Abstract:** Lyme disease is the most frequent transmitted by ticks in humans and animals, mainly by *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* in North America, while other species such as *R. sanguineus* has not proved that they can transmit. It is a zoonotic disease characterized by cause polysystemic disorders. In a study in the city of Mexicali, Baja California identified the seroprevalence of this spirochete proving to be 8.2% (95% I.C. 1.5-13.3%) in 94 dogs. The aim of this study was detect DNA from *B. burgdorferi* sensu stricto using the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, from tissue culture of dogs seropositive for *B. burgdorferi*. Analyzed 40 sera blood dogs to identify the positives. The tissue samples of the dogs seropositive were cultivated with the BSK-H complete medium. The 100 per cent of the ticks collected in the subjects of study were identified as *R. sanguineus*. The sequence of the products of PCR obtained showed 100% homology with *B. burgdorferi* sensu lato. Moreover, also detected a fraction of the gene 16S rRNA of *B. burgdorferi* sensu stricto. The sequence of the products of PCR obtained showed 99 percent of homology with *B. burgdorferi* sensu stricto. It is important to note that is not documented that the tick participates in the transmission of this disease and considering that this area is endemic for this tick, it is necessary to investigate its possible participation.

**Keywords:** *Borrelia burgdorferi*, borreliosis, sequencing, PCR , culture.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	i
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	2
Definición de borreliosis .....	
Métodos de diagnóstico .....	2
<i>Cultivo</i> .....	2
<i>IFA</i> .....	2
<i>ELISA</i> .....	5
<i>Western blot</i> .....	5
<i>PCR</i> .....	6
MATERIALES Y MÉTODOS .....	
Colección e identificación de garrapatas .....	
Análisis serológico .....	
Cultivo .....	
Caracterización molecular .....	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	
CONCLUSIONES .....	18
LITERATURA CITADA .....	19

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1	Análisis de la electroforesis en gel de productos de PCR para <i>B. burgdorferi</i> de tejidos, garrapatas y cultivo de vejiga de perros seropositivos a borreliosis.
2	Cromatograma de la secuenciación de 16S <i>rRNA</i> de <i>B. burgdorferi</i> del cultivo de vejiga de un perro seropositivo de la ciudad de Mexicali, B.C., México, mostrando 99% de homología con <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (número de acceso AE000783.1 del Genbank).

## INTRODUCCIÓN

Borreliosis es la enfermedad más frecuente de las transmitidas por garrapatas en el humano y en animales, principalmente por *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* en Norteamérica (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 (Burgess et al. 1986, Magnarelli et al. 1987 y Steere et al. 1987).

En la ciudad de Mexicali, Baja California, un estudio piloto determinó una seroprevalencia de 6.6% (2/30) de *B. burgdorferi* en perros con historia de epistaxis (Romano-Osuna et al., 1998). En otro estudio realizado en el otoño de 2003, demostró que el 59.6% (56/94) de los perros estaban infestados con garrapatas, y el 100% de las garrapatas fueron *R. sanguineus* (Tinoco-Gracia et al., 2009b). Posteriormente en otro estudio, se determinó la seroprevalencia de esta espiroqueta resultando 8.2% (95% I.C. 1.5-13.3%) en 94 perros analizados (Tinoco-Gracia et al., 2007).

Considerando las evidencias serológicas de esta bacteria en perros y que *R. sanguineus* es endémica en esta región, es necesario confirmar la presencia de *B. burgdorferi* e investigar la posible participación de ésta garrapata en la transmisión de borreliosis.

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.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Definición de Borreliosis

La enfermedad de Lyme o borreliosis es causada por *Borrelia burgdorferi*, la cual es una bacteria patógena zoonótica que infecta un rango muy amplio de especies de vertebrados, que involucra diversos mamíferos y aves (Hanincová et al., 2006). La mayoría de estas espiroquetas miden de 20 a 30 $\mu$  de largo por 0.2 a 0.3 $\mu$  de ancho y tiene de 7 a 11 flagelos (Barbour y Hayes, 1986; Greene et al., 2000).

La borreliosis fue descrita por primera vez en la comunidad de Lyme, Connecticut, E.U.A, en 1972 (Steere et al., 1977). Willy Burgdorfer en 1982 aisló por primera vez el agente etiológico de esta enfermedad. (Burgdorfer, 1984; Dunlop y Williams, 1996; Manley, 1996). Existen antecedentes en Europa que datan desde 1910 por el dermatólogo sueco Arvid Afzelius (Afzelius, 1910). Posteriormente, aproximadamente 12 años después, 2 médicos franceses reportaron una enfermedad que afectaba la piel y otros órganos, causando parálisis y que al parecer era provocada por mordeduras de garrapatas (Garin y Bujadoux, 1922).

En 1983, se demostró que este microorganismo era una nueva especie de espiroqueta del género *Borrelia* y propone el nombre de *Borrelia burgdorferi* en honor a su descubridor Willy Burgdorfer (Johnson et al., 1984).

## **Métodos de diagnóstico**

Actualmente se reconocen numerosas técnicas de diagnóstico para borreliosis que van desde cultivos, serológicas como ELISA, IFA, Western blot, moleculares como PCR y secuenciación, que nos permiten hacer el diagnóstico tanto en los vectores como en los hospedadores de la enfermedad.

**Cultivo:** El cultivo de *B. burgdorferi* puede hacerse a partir de garrapatas infectadas con esta espiroqueta. Las garrapatas son desinfectadas con varios pasajes de 2 minutos en 2-propanol y 70% de etanol, seriadamente bañadas en fosfato amortiguado salino y el medio Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK-II), y puestas en BSK-II fresco, donde los especímenes son abiertos con agujas. La suspensión se pasa a través de una jeringa con filtro ( $\mu$ Star 0.45- $\mu$ m-tamaño del poro; Corning Inc., Corning, N.Y ) a un tubo de cultivo de 5 ml conteniendo 4.5 ml de BSK suplementado con suero de conejo al 6% o directamente agregarlo sin filtración al tubo BSK suplementado con 0.4  $\mu$ g de ciprofloxacina por ml y 40  $\mu$ g de rifampicina por ml. El segundo medio a utilizar, con la suspensión no filtrada se compone de BSK suplementado con 8  $\mu$ g de kanamicina por ml y 230  $\mu$ g de 5-fluorouracil por ml. Se hacen pasajes ciegos hechos siempre a 24-48 horas de inoculación para evitar una posible toxicidad de detritos de garrapata y para prevenir algún efecto adverso de los antibióticos en el crecimiento de las espiroquetas. Los cultivos se examinan mediante microscopía de campo oscuro (Escudero, 2000).

Coulter et al. (2005) realizaron un estudio de cohorte en pacientes con diagnóstico sospechoso de enfermedad de Lyme, utilizando cultivo de sangre y biopsia de piel, PCR y serología. De un total de 86 pacientes, 30 (35%)

resultaron positivos al cultivo, mientras que solo 15 (18%) fueron seropositivos. Identificaron 4 pacientes que no fueron seropositivos y tampoco cultivo positivos. A través de 40 laboratorios donde se diagnosticaron pacientes como positivos, alcanzaron una sensibilidad del 100% cuando se utilizó a la par en el diagnóstico, PCR de piel, cultivo y serología, sin embargo las pruebas serológicas aunadas a el PCR de piel alcanzaron una sensibilidad del 92%. Concluyeron que a pesar de que el cultivo es un diagnóstico definitivo y tiene una alta sensibilidad, se requiere de al menos 3.5 semanas para obtener un resultado. La combinación de serología realizada en fase aguda y el PCR de piel alcanzaron una sensibilidad del 75%, dando una alternativa práctica y rápida para confirmar el diagnóstico de pacientes con signos clínicos sospechosos. La batería completa de pruebas puede ser muy útil para pacientes con signos clínicos confusos o para proveer un diagnóstico con un fuerte respaldo para estudios clínicos de la enfermedad de Lyme.

***Inmunofluorescencia (IFA):*** Esta es una de las técnicas más utilizadas para la detección de infecciones transmitidas por garrapata. IFA utiliza un protocolo de dilución por lo que una muestra es probada a varias diluciones. La mayoría de los laboratorios toman como referencia la primera dilución a 1 parte de suero de perro por 80 de diluyente. La muestra es diluida hasta que se vuelva negativa y se reporta como la ultima dilución a la cual la muestra fue positiva. Típicamente las placas de IFA son hechas de células infectadas de cultivos y cuando estas células son adheridas al cristal de las placas, se vuelven permeables, exponiendo así sus antígenos tanto internos como externos. Esta exposición de antígenos es la que permite que los anticuerpos

se unan cuando la muestra es introducida a la placa. Como hay un amplio rango de antígenos que permiten esta unión con los anticuerpos, la sensibilidad de esta prueba es muy buena. Incluso en respuestas inmunes tempranas, donde los niveles de anticuerpos son muy bajos, el efecto aditivo de estos anticuerpos diversifica anticuerpos que pueden dar un resultado positivo. El gran número de antígenos expuestos sobre la placa de IFA puede dar resultados falsos positivos, ya que esos antígenos pueden no ser los únicos para el organismo que se busca. Por ejemplo un resultado positivo por IFA para *Borrelia burgdorferi* puede ser el resultado de detectar anticuerpos producidos por otra especie de *Borrelia* (Lorentzen, 2007).

Jovičić et al. (2003), realizaron un estudio comparativo de 4 pruebas para el serodiagnóstico de la enfermedad de Lyme. Las pruebas incluían un análisis de inmunofluorescencia basado en *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, un ensayo de ELISA basado en aislados de *B. afzelii* y *B. burgdorferi* s.s. y un ensayo de inmunoblot (IB) basado en *B. afzelii*. El panel de sueros incluía un total de 214 muestras, 120 pertenecientes al grupo control y 94 de pacientes en distintos estadios de la enfermedad. La especificidad para el ensayo de IB fue de 96%, ELISA 93% e IFA 89%. En estadios tempranos de la enfermedad obtuvieron una sensibilidad para IFA de 36%, ELISA 67% y 94% para IB. En estadios tardíos la sensibilidad fue de: 72% IFA, 80% ELISA y 94% para IB. Concluyeron que la sensibilidad del diagnóstico aumenta utilizando cepas de la región como *B. afzelii*.

**ELISA:** Este análisis se realiza con preparaciones de células completas o antígenos recombinantes simples para la detección y precisa medición de anticuerpos. El análisis es leído por una máquina y por lo tanto la subjetividad humana es eliminada. Comúnmente ELISA es corrida en placas con 96 pocillos, esto permite al laboratorio incluir suficiente suero control y un gran número de muestras al mismo tiempo en un solo análisis. La reacción cruzada de anticuerpos influye la especificidad de la prueba. En este contexto un punto de corte bajo del ensayo aseguraría una sensibilidad relativa aunque con una pobre especificidad. Muchos falsos positivos van a dar como resultado debido a la poca especificidad y a la reacción cruzada. Por otra parte, si se escoge un punto de corte alto, la prueba se vuelve más específica pero a expensas de la sensibilidad. Además si no se hace ningún arreglo a ELISA, esta no diferencia entre animales infectados y vacunados. En consecuencia, esta prueba de segunda generación no debe ser utilizada como única para la detección de *B. burgdorferi* (Straubinger, 2006).

La evaluación serológica para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme no es precisa por varios factores, que incluyen una alta prevalencia de perros clínicamente sanos que resultan como seropositivos, la persistencia de anticuerpos, y la introducción de vacunas que inducen anticuerpos detectables por ensayos de inmunofluorescencia, análisis de ELISA a base de células completas y Western blot. Por lo tanto evaluaron la utilidad de un paquete Snap 3DX para la detección simultánea de anticuerpos de *B. burgdorferi* y *Ehrlichia canis*, y para antígenos de *Dirofilaria immitis*, se evaluó su habilidad para detectar exposición de *B. burgdorferi* en animales vacunados y no vacunados de

un área con alta incidencia de la enfermedad de Lyme. Esta prueba es una ELISA que utiliza un péptido sintético C6. Se encontró que este kit es muy útil en áreas donde la enfermedad de Lyme es endémica porque puede ser usado confiablemente en las clínicas para determinar el estatus de infección de los perros sin importar la historia clínica en cuanto a vacunación (Levys et al., 2002).

Goossens et al. (2001) tomaron 440 muestras de suero humano de cazadores y 448 de sus perros y otras 53 de cazadores que no tenían perro, para determinar si los perros son un centinela para la enfermedad de Lyme en humanos. Las muestras fueron analizadas por ELISA esperando encontrar anticuerpos para *B. burgdorferi*. Se encontró una seroprevalencia de 18% en los perros, y en el mismo orden de un 17% para sus dueños. Con esto demostraron que un perro seropositivo no es un indicativo de riesgo para la enfermedad de Lyme en su dueño.

Martínez et al. (1999) recolectaron 350 muestras de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) con el objetivo de determinar la prevalencia de anticuerpos contra 5 enfermedades infecciosas transmisibles. El método de ELISA fue utilizado para determinar anticuerpos contra *B. burgdorferi*. De las 125 muestras que tomaron, el 6% (7 muestras) resultaron positivas y fueron confirmadas por el método de Western blot. Con esto se determinó que los venados son hospedadores finales de la garrapata *Ixodes scapularis*, usan al venado solo como hospedadores cuando estas se encuentran en estadios adultos, raramente transmiten la infección transversalmente. Esto significa que el principal papel epidemiológico del venado en la transmisión de la enfermedad

de Lyme es solo la de mantener al vector. Este es el primer reporte que indica la presencia de esta bacteria en el venado en México.

El rol de la garrapata *Ixodes pacificus* contra el de otros vectores potenciales en la epidemiología de la enfermedad de Lyme, fue evaluado por la determinación de la prevalencia de la saliva antiartrópodo anticuerpo (AASA) de una muestra de 104 residentes de una comunidad de alto riesgo. El suero de 50 y 51 residentes fueron utilizados como grupos comparativos. Se prepararon muestras con extractos de glándulas salivales de *I. Pacificus*, la garrapata de la costa del Pacífico (*Dermacentor occidentalis*), la chinche besucona (*Triatoma protacta*) y el mosquito (*Aedes sierrensis*) fueron analizados por ELISA. Para comprobar la presencia de ADN de *B. burgdorferi*, las muestras se analizaron por PCR. Los rangos de prevalencia encontrados fueron de 2% para *A. sierrensis* al 79% para *I. Pacificus* en individuos del estudio, 0% para *D. occidentalis* al 36% para *I. pacificus* y 6% para *I. pacificus* al 24% para *A. sierrensis*. La asociación entre AASA y los factores demográficos son un factor potencial de riesgo en la enfermedad de Lyme y los seropositivos para *B. burgdorferi* fueron 85 miembros de la comunidad de alto riesgo. Estos hallazgos reafirman la creencia de que *I. pacificus* es el principal vector de la enfermedad de Lyme, y que el AASA es una herramienta epidemiológica muy útil en infecciones causadas por garrapatas (Lane et al., 1999).

Gomes-Solecki et al. (2002) desarrollaron un nuevo método de ELISA, utilizando proteínas quiméricas recombinantes de *Borrelia* desprovistas de OspA (proteína de superficie) que puede ser usada para detectar anticuerpos para el diagnóstico de antígenos de *B. burgdorferi* en individuos vacunados y no

vacunados con la vacuna OspA. Este método fue comparado con dos pruebas comerciales que utilizan toda la célula completa. El rNon-OspA resultó ser tan sensible y específico como las pruebas comerciales ( $P > 0.05$ ). Además este método puede diferenciar entre poblaciones que comprenden las infectadas naturalmente y las vacunadas con la vacuna OspA ( $P < 0.05$ ). Los datos de este estudio demuestran que la ELISA rNon-OspA puede ser utilizada en los laboratorios para la detección de anticuerpos de *B. burgdorferi* a pesar de su estado de vacunación y reemplazar a los ensayos serológicos existentes para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.

En la ciudad de Mexicali, Baja California, un estudio piloto determinó una prevalencia de 6.6% (2/30) de *B. burgdorferi* en perros con historia de epistaxis, diagnosticados mediante ELISA con el kit INDX Canine Multi-Test Dip-S-Ticks® PanBio, con una sensibilidad de 94.8% y especificidad del 100% (Romano et al. 1998).

En esta misma ciudad, un estudio piloto realizado en el otoño de 2003, demostró que el 59.6% (56/94) de los perros estaban infestados con garrapatas, y el 100% de las garrapatas fueron *R. sanguineus* (Tinoco et al. 2009). Colateral a este estudio, se determinó la seroprevalencia de esta espiroqueta con *Borrelia burgdorferi* ELISA® Helica Biosystems, Inc., resultando 8.2% (95% I.C. 1.5-13.3%) en 94 perros analizados, con una sensibilidad de 96% y una especificidad de 95% (Tinoco et al. 2007).

**Western blot:** Esta técnica es usada para la detección y precisa identificación de anticuerpos o antígenos, utilizando preparaciones con células completas o con antígenos recombinantes. En contraste con IFA y ELISA, los

antígenos son separados de acuerdo a su tamaño en geles especiales de poliacrilamida y después son transferidos a unas membranas de nailon o nitrocelulosa antes de la detección con anticuerpos. Una reacción de color al final del análisis da como resultado un patrón de bandas que permite al examinador diferenciar entre específicos y no específicos, reacción cruzada y más tarde ayuda a hacer la distinción entre animales infectados, animales vacunados y animales que muestran la infección y vacunación al mismo tiempo. El tiempo y el trabajo intensivo de este protocolo unido a los altos costos, son las mayores desventajas de esta prueba. Por lo tanto, Western blot es utilizado solo para confirmación y diferenciación (Straubinger, 2006).

Magnarelli et al. (2001) realizaron un estudio para ver la reactividad de suero de perro a células enteras o antígenos recombinantes de *B. burgdorferi* por medio de ELISA y Western blot. Las muestras fueron de 36 perros no vacunados con las células enteras y 5 vacunados con la célula entera de este agente. Todos los animales vivían en zonas de alta incidencia de garrapatas. Las 36 muestras resultaron positivas en la prueba de ELISA. La reactividad del suero con análisis mediante antígenos recombinantes resultó menos frecuente, los anticuerpos de dos o más antígenos específicos fue detectado en 32 de los sueros (89%). Dieciséis muestras de perros no vacunados con células enteras y que dieron positivos para la ELISA, fueron analizadas por Western blot para obtener patrones de bandas y corroborar los resultados de ELISA. Los 16 sueros fueron positivos. Western blot es la prueba más recomendada para el análisis de suero de perro y es aceptable como una alternativa para diagnosticar la borreliosis.

Goldstein et al. (2007) compararon la prueba Western blot con ELISA para la detección de *B. burgdorferi* en perros asintomáticos de raza Labrador y Cobrador de Labrador, y su asociación con la presencia de microalbuminuria. Se analizaron muestras de sangre y orina de 268 perros. Se obtuvo un 18.7% de positivos a la exposición de *B. burgdorferi* por la prueba de ELISA, un 21.2% de expuestos naturalmente y un 11.5% para anticuerpos vacunales por Western blot. El rango de concordancia de ambas pruebas fue de 93% para los expuestos naturalmente. Este estudio confirma también que ELISA no detecta anticuerpos vacunales como lo hace la prueba de Western blot.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Es el avance más reciente en cuanto a diagnóstico de enfermedades transmitidas por garrapatas. A diferencia de otras pruebas serológicas, PCR busca la presencia del organismo y no la respuesta inmune de anticuerpos. Esto se traduce en identificar la infección contra, en la mayoría de los casos, la exposición. Esta prueba es usada para detectar el ADN, y en algunos casos el ARN, mediante la amplificación de varias copias de un fragmento específico de un gen por medio de una muestra sanguínea o de tejido donde la cantidad de ese gen es pequeña. La muestra es preparada con agentes que lo dejan listo para la amplificación del ADN. Los cebadores, que son fragmentos de oligonucleótidos complementarios al segmento del gen que se va a amplificar, son adicionados a la reacción de PCR. Cuando los cebadores se unen al segmento de ADN complementario, la enzima taq polimerasa extiende la secuencia de nucleótidos en orden para hacer una copia de ese gen específico. El proceso se repite

varias veces para hacer un número basto de copias de ese gen. Ahora se tiene un gran número de ADN para proceder a ser identificado (Lorentzen, 2007).

Recientemente las espiroquetas son referidas en conjunto a la especie *Borrelia miyamotoi sensu lato*, las cuales fueron descubiertas en la garrapata *Ixodes scapularis* en Estados Unidos e *I. ricinus* en Europa. Encontrar *B. miyamotoi* en esta variedad de garrapatas complica la interpretación epidemiológica de los estudios de la enfermedad de Lyme y otras enfermedades transmitidas por *Ixodes*. La mayoría de estos microorganismos son difíciles de cultivar o pobremente cultivables, es preferible un método de amplificación de ADN como el PCR (Bunikis et al., 2004).

El cultivo de las espiroquetas de tejido de mamífero es el que mejor evidencia la infección activa. La detección del ADN por PCR de *B. burgdorferi* es también de mucha ayuda. Sin embargo, el cultivo es muy caro y el PCR se puede ver limitado por la contaminación o por el efecto inhibitorio como el de la hemoglobina (Magnarelli et al., 2001).

Santino et al. (2008) mencionan que los análisis serológicos son la principal herramienta diagnóstica para la enfermedad de Lyme. Recientemente la técnica de PCR ha sido aplicada para el diagnóstico de *B. burgdorferi* s.l. pero hasta ahora no ha sido descrito un método confiable, fácil y sensible. Debido a esto, desarrollaron un método de PCR basado en la detección tanto de *B. burgdorferi* s.l. como el ADN de genoespecies de *Borrelia*. El estudio incluyó 265 muestras sanguíneas de pacientes, el 7.5% resulto positivo, 1.9% sospechoso y el 90.6% fue negativo por Western blot e IFA. Por PCR resultaron

positivos también los mismos que por serología y dos de los sospechosos. El nuevo protocolo puede ser considerado como confiable y sensible.

Bauerfeind et al. (1998) compararon el método de PCR anidado con un cultivo *in vitro* para la detección de *B. burgdorferi* en muestras de orina de perro. Se analizaron 216 perros, los cuales resultaron negativos para cultivo y también por microscopia de campo oscuro. En contraste, el ADN de esta bacteria fue encontrado en 32 muestras mediante PCR. Los resultados demuestran que el PCR anidado basado en el gen de flagelina es un procedimiento altamente sensible para el diagnóstico de borreliosis en perros.

Speck et al. (2007) tomaron un total de 302 muestras de sangre de perro. El grupo A era de perros con signos clínicos sugestivos a borreliosis, el grupo B de perros sanos y el grupo C de perros con signos o lesiones que posiblemente se podrían asociar con borreliosis. El 21% del grupo A, 7% del B y 6% del grupo C fueron positivos por pruebas serológicas contra anticuerpos de *B. burgdorferi* s.l. La seroprevalencia entre los tres grupos fue significativamente diferente. Ninguna de las pruebas correspondientes fue positiva por análisis de PCR y cultivo. Este estudio afirma que un diagnóstico definitivo de borreliosis canina no puede ser dado únicamente por síntomas clínicos y serología en una simple consulta.

Dietrich et al. (2008) analizaron la córnea de un hombre de 67 años con historial médico de iridociclitis y artritis con progresión bilateral, queropatía cristalina asimétrica con mayor pronunciación en el extremo temporal superior de la cornea. La muestra fue analizada por luz y por microscopia electrónica así como por PCR. Se detectaron fragmentos y cuerpos espiroquetales. ADN de

*Borrelia burgdorferi* s.l. fue detectada utilizando el gen 16S rDNA. Los análisis serológicos específicos para *Borrelia* mostraron bajos títulos por IFA y muy pobre reacción por Western blot. Los análisis serológicos pueden arrojar falsos negativos. Las muestras de córnea deben ser analizadas por microscopía electrónica o PCR.

En otro estudio se comparó la sensibilidad de dos tipos de PCR y cultivo para la detección de *Borrelia spp.* en muestras de piel de 150 pacientes que presentaban eritema migrante. *B. burgdorferi* fue aislada de 73 de las 150 biopsias. Utilizando un PCR anidado con una región blanco rrf-rrl y un PCR basado en el gen de flagelina, 107(71%) y 36 (24%) respectivamente fueron positivas. Con ambos PCR los que resultaron positivos fueron más frecuentemente en cultivos positivos que en cultivos negativos. El PCR anidado mostró tener mayor sensibilidad (Cerar et al., 2008).

Cleary y Theis (1999) realizaron una investigación epizootiológica para identificar una nueva cepa de *Borrelia hermsii*. El análisis se realizó mediante PCR. Se tomaron 211 garrapatas *Ornithodoros hermsii* y 180 muestras de ratones. Solo 6 de las 211 garrapatas resultaron positivas. La secuencia única de ADN encontrada en la región amplificada de *Borrelia*, revela que se trata de una nueva cepa de *B. hermsii*.

Gil et al. (2005) identificaron una nueva especie de *Borrelia* presente en pequeños mamíferos, los cuales son principales portadores de esta bacteria causante de la enfermedad de Lyme. Los rangos de infestación encontrados con esta nueva especie fueron del 8.5 al 12% mediante PCR. Concluyendo con esto que los nucleótidos encontrados en la secuencia de 16S rRNA, les permitió

diseñar un método de diagnóstico que puede ser útil en la determinación de la distribución actual de este agente.

Foley et al. (2005), realizaron un estudio con coyotes de la parte Norte y Costa de California, para determinar la epidemiología de la garrapata *I. pacificus*, la cual es el principal vector de transmisión de *Anaplasma phagocitophilum*. y *B. burgdorferi*. Se utilizaron dos métodos para detectar ambas bacterias, PCR e Inmunofluorescencia. Para el PCR, se utilizaron muestras sanguíneas y de tejido de riñón utilizando el kit Dneasy, Quiagen Va. Los resultados de PCR fueron negativos en todas las muestras de sangre y tejido. Por inmunofluorescencia se encontró una seroprevalencia de 39.5% para *B. burgdorferi* y de 18.9% para *A. phagocitophilum*. En contraste con el PCR, la inmunofluorescencia resultó ser un método más sensible para evaluar coyotes expuestos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este trabajo incluyó el análisis molecular por PCR y secuenciación de ADN extraído del cultivo de tejidos de perros seropositivos a *Borrelia burgdorferi* de la zona urbana de Mexicali, Baja California. La duración del estudio fue de 8 meses, a partir de septiembre de 2009. Los análisis de las muestras y el cultivo se realizaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, México.

### **Colección e identificación de garrapatas**

La colecta de las garrapatas se realizó siguiendo los procedimientos previamente descritos (Farley, 1996; Lyon y Restifo, 2000), en tubos recolectores estériles de 10 ml con tapadera hermética y éstas se conservaron a -20°C hasta realizar su identificación taxonómica bajo observación estereoscópica (Quiroz, 1999).

### **Análisis serológico**

Se analizaron 40 sueros sanguíneos de perros para identificar los seropositivos a borreliosis, los cuales fueron capturados por el personal del Centro Municipal de Control Animal de Mexicali.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por personal calificado. A cada perro se le colectaron 3 ml de sangre por punción de la vena cefálica después de la asepsia del área con alcohol isopropílico y colocados en tubos Vacutainer® de 3 ml sin EDTA. Después de identificadas todas las muestras fueron centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos para separar el suero del

coágulo. El suero fue transferido a viales de plástico de 1.5 ml con tapa, identificados y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la prueba serológica.

Se utilizó el kit semicuantitativo de *Borrelia burgdorferi* ELISA<sup>®</sup> Helica Biosystems, Inc., que detecta IgG canino con una sensibilidad y especificidad de 95.8 y 94.7%, respectivamente; esta prueba utiliza como antígenos extractos de la bacteria entera de tres diferentes especies, *B. burgdorferi*, *B. afzelli* y *B. garinii*. La densidad óptica (DO) fue determinada a 450 nm. Se consideraron como casos positivos a los perros con muestras serológicas con  $\text{DO} \geq 0.3$ , de acuerdo al protocolo del fabricante. Los perros seropositivos fueron eutanasiados y se les practicó necropsia para obtener las muestras de tejido.

### **Cultivo**

Las muestras de tejidos de los perros seropositivos se cultivaron con el medio BSK-H completo y fueron observadas en un microscopio de campo oscuro cada semana. El cultivo consistió en colocar de cada perro, una muestra de vejiga urinaria con una superficie de  $25 \text{ mm}^2$  y una muestra de membrana sinovial de la misma medida individualmente en un tubo de 4 ml de capacidad, conteniendo 3 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado fue BSK-H con el 6% de suero de conejo, 6% de gelatina y la adición de los antibióticos, rifampicina (100mg/L), fosfomicina (50mg/L) y anfotericina B (2.5mg/L). Posteriormente se procedió a realizar un subcultivo, colocando 250  $\mu\text{L}$  del tubo 8 a un tubo con medio BSK-H, completando 3 ml por tubo (Pollack et al., 1993).

## Caracterización molecular

Todas las extracciones de ADN, tanto de garrapatas de los perros muestreados, de vejiga de los perros seropositivos, así como del cultivo positivo de vejiga, se realizaron utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, California, E.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El diagnóstico molecular de *B. burgdorferi* se llevó a cabo aplicando la técnica de PCR (Thomas et al., 2001) con el kit GoTaq® Hot Start Green Master Mix (PROMEGA, Madison, Wisconsin, E.U.), se utilizaron como blanco dos genes, uno codificante de la flagelina (*fla*) de la bacteria y el otro de *16S rRNA*; el primero para distinguir *Borrelia burgdorferi* sensu lato y el segundo para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. El producto de PCR de *fla* tiene un tamaño de 256 pares de bases (pb) con los siguientes iniciadores: FLA 107 (5' TTAATCGAGCTTCTGATGATGCTGC3') y FLA 335 (5' ATTCGTCTGTAAGTTGCTCTATTTCAA3') (Germer et al., 1999) y el producto de PCR de *16S rRNA* tiene un tamaño de 574 pb con los siguientes iniciadores: BB+ (5' GGGATGTAGCAATACATTC3') y BB- (5' ATATAGTTTCCAACATAGG3') (Marconi y Garon, 1992).

Las condiciones de la reacción de PCR para *fla* fueron: calentamiento a 95°C por 5 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, hibridación a 55°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min. Después se hizo una extensión adicional a 72°C por 7 min. Para *16S rRNA*, se requirió realizar un PCR anidado, iniciando con un calentamiento a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 53°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Después una extensión adicional a 72°C por 2 min.

El PCR anidado fue con un calentamiento a 95°C por 5 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 55°C por 2 min y extensión a 72°C por 30 s. Después una extensión adicional a 72°C por 7 min.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.5%, colocando 15µl de productos de PCR en cada carril. Se tomó como control positivo al ADN bacteriano del cultivo sonicado de *B. burgdorferi* N40 amablemente patrocinado por Dr. Javier Vinasco y Dr. Manuel Moro de la Universidad de Kansas State. Como control negativo se utilizó agua.

Para prevenir la contaminación de las muestras, la extracción del ADN, la amplificación y la detección de productos de PCR fueron realizados en diferentes áreas de laboratorio (Chang et al., 2000).

Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar y la alineación de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa BLAST.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 100% de las garrapatas colectadas en los sujetos de estudio fueron identificadas por su morfología como *R. sanguineus*.

De los 40 sueros analizados, 4 (10%) resultaron positivos a *B. burgdorferi* por ELISA y a éstos se les obtuvo muestra de vejiga, membrana y líquido sinovial para realizar el cultivo.

Una de las muestras de garrapatas y en otra de vejiga de perros seropositivos mostraron en el diagnóstico molecular, la banda correspondiente al producto de PCR del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato (Figura 1-A). En uno de los tubos de cultivo con muestra de tejido vesical, se observó crecimiento bacteriano de *B. burgdorferi*, éste fue evidente 86 días después de la siembra, del cual se realizó un subcultivo que manifestó crecimiento de esta espiroqueta 21 días después. En el cultivo se detectó por PCR una fracción del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato (Figura 1-B). La secuencia de los productos de PCR obtenidos mostró 100% de homología con *B. burgdorferi* sensu lato (número de acceso AF416447.1 del Genbank). Por otra parte, también se detectó una fracción del gen *16S rRNA* de *B. burgdorferi* sensu stricto (Figura 1-C). La secuencia de los productos de PCR obtenidos mostró 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto (número de acceso AE000783.1 del Genbank).

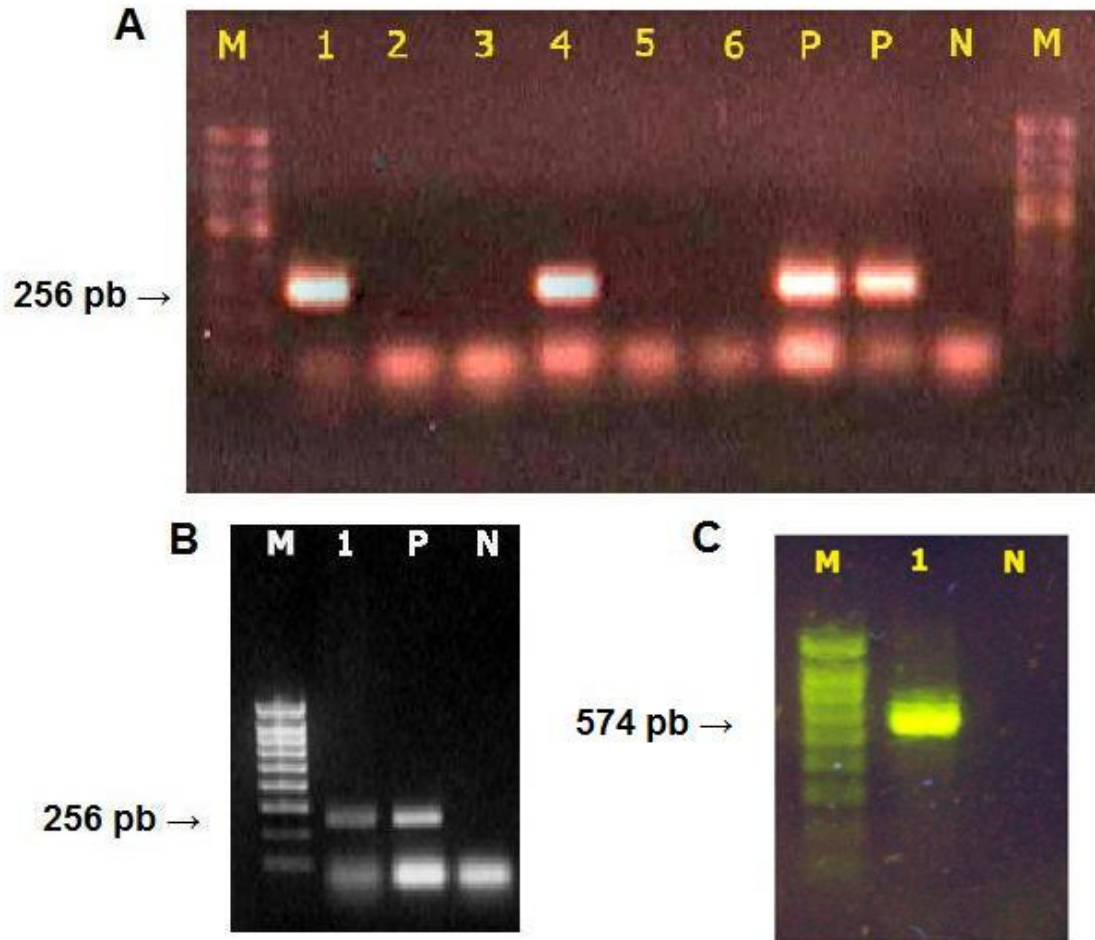


Figura 1. Análisis de la electroforesis en gel de productos de PCR para *B. burgdorferi* de tejidos, garrapatas y cultivo de vejiga de perros seropositivos a borreliosis.

(A) PCR de *fla* para *B. burgdorferi* sensu lato. M) Marcador BioLadder 100, carriles 1-3) ADN de garrapatas *R. sanguineus* de diferentes perros, carriles 4-6) ADN de muestras de vejiga de diferentes perros, P) Control positivo, N) Control negativo y M) Marcador BioLadder 100.

(B) PCR de *fla* para *B. burgdorferi* sensu lato. M) Marcador Ladder II, 1) ADN del cultivo de vejiga, P) Control positivo y N) Control negativo.

(C) PCR de *16S rRNA* para *B. burgdorferi* sensu stricto. M) Marcador Ladder II, 1) ADN del cultivo de vejiga y N) Control negativo.



Figura 2.- Cromatograma de la secuenciación de 16S rRNA de *B. burgdorferi* del cultivo de vejiga de un perro seropositivo de la ciudad de Mexicali, B.C., México, mostrando 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto (número de acceso AE000783.1 del Genbank).

En Mexicali, trabajos previos, solo habían detectado evidencia serológica de *B. burgdorferi* (Tinoco-Gracia et al., 2009a; Tinoco-Gracia et al., 2008), y ahora las evidencias de cultivo y biomoleculares en este trabajo confirman por primera vez la existencia de *B. burgdorferi* sensu stricto en perros y en garrapatas *R. sanguineus* de la ciudad. Además, en los perros de esta región sólo se han encontrado únicamente garrapatas *R. sanguineus* (Tinoco-Gracia et al., 2008; Tinoco-Gracia et al., 2009b), lo que sugiere que éstas podrían participar en la transmisión de borreliosis en perros, aunque no se han reportado como un vector importante de *B. burgdorferi* en otras regiones del mundo, incluso algunos autores indican que no participan en la transmisión (Baptista et al., 2004; Bouattour et al., 1999; Costa et al., 2002; Chao et al.,

2009; Filippova, 1990; Luckhart et al., 1991; Merino et al., 2005; Miserez et al., 1990; Nebreda Mayoral et al., 2004; Nijhof et al., 2007; Toledo et al., 2009; Walker et al., 1998). Publicaciones recientes indican que existen receptores que permiten la colonización de *B. burgdorferi* en *I. scapularis* (Pal et al., 2004), los cuales no se han encontrado en *R. sanguineus*, esto sugiere que si éstas participan en la transmisión probablemente se trate de una mutación de éste vector o de la borrelia, o que éstos posean un tipo de receptor diferente que permita la colonización de dicha bacteria (De la Fuente et al., 2008a; De la Fuente et al., 2008b; Pal et al., 2004; Revel et al., 2005).

En Mexicali, B.C., (Quintero et al., 2004) y en Cuernavaca, Morelos, México (Cruz-Vazquez y García-Vazquez, 1999), así como en Brasil (Szabo et al., 2001), se ha demostrado que la garrapata *R. sanguineus*, puede ser la única especie que parasite a los perros en una misma ciudad, y que ésta es una especie potencialmente capaz de transmitir enfermedades zoonóticas, tales como erliquiosis y riquetsiosis (Marquez-Jímenez et al., 2005; Merino et al., 2005), y posiblemente borreliosis tal como lo sugieren los resultados del presente estudio, aunque no exista en la región un vector conocido, como lo es *I. scapularis*. Además, existe el riesgo zoonótico, considerando que *R. sanguineus* está relacionado con casos de mordedura en humanos (Carpenter et al., 1990; Dantas-Torres et al., 2006; Quintero et al., 2004), afectando hasta 500 personas por cada 100,000 como sucede en Italia, de las cuales el 10% son atribuidas a *R. sanguineus* (Manfredi et al., 1999).

La presencia de *B. burgdorferi* en perros y garrapatas *R. sanguineus*, es un dato importante a considerar en la implementación de medidas preventivas y terapéuticas contra borreliosis por los médicos veterinarios, médicos y demás profesionales de la salud pública, ya que los resultados de este trabajo sugieren que es posible la infección de borreliosis en regiones donde no se encuentren los vectores comunes como los son la garrapata *I. scapularis* e *I. pacificus* (Barbour y Hayes, 1986; Greene et al., 2000; Magnarelli et al., 1987), sino *R. sanguineus*.

## 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.

## LITERATURA CITADA

- Afzelius, A. 1910. Report to Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm on December 16, 1909. Arch. Dermatol. Syph. 101:405-406.
- Appel, M. J., S. Allan, R. H. Jacobson, T. L. Lauderdale, Y. F. Chang, S. J. Shin, J. W. Thomford, R. J. Todhunter y B. A. Summers. 1993. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. The Journal of infectious diseases. 167: 651-664.
- Baptista, S., A. Quaresma, T. Aires, K. Kurtenbach, M. Santos-Reis, M. Nicholson y M. Collares-Pereira. 2004. Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. Int. J. Med. Microbiol. 293 (37): 109-116.
- Bauerfeind, R., U. Kreis, R. Weiss, L. Wieler y G. Baljer. 1998. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction. Zentralbl. Bakteriol. 287(4): 347-361.(Abst.)
- Barbour, A. G. y S. F. Hayes. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50: 381-400.
- Bouattour, A., M. A. Darghouth y A. Daoud. 1999. Distribution and ecology of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Tunisia: an overview of eighth years field collections. Parassitologia. 41(1): 5-10.
- Bunikis, J., U. Garpmo, J. Tsao, J. Berglund, D. Fish y A. G. Barbour. 2004. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. Microbiology. 150:1741-1755.
- Burgess, E. C. 1986. Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg [A]. 263:49-54.
- Carpenter, T. L., M. C. McMeans y C. P. McHugh. 1990. Additional instances of human parasitism by the brown dog tick (Acari: Ixodidae). Journal of medical entomology. 27:1065-1066.
- Cerar, T., E. Ruzik-Sabljić, U. Glinsek, A. Zore y F. Strle. 2008. Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp. in patients with erythema migrans. Clin. Microbiol. Infect. 14(7):653-658. (Abst.)
- Cleary, M. y J. Theis. 1999. Identification of a novel strain of *Borrelia hermsii* in a previously undescribed northern California focus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(6):883-887.
- Costa, I. P., V. L. Bonoldi y N. H. Yoshinari. 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.
- Coulter, P., C. Lema, D. Flayhart, A. S. Linhardt, J. N. Aucott, P. G. Auwaerter y J. S. Dumler. 2005. Two-Year Evaluation of *Borrelia burgdorferi* Culture and Supplemental Tests for Definitive Diagnosis of Lyme Disease. J. Clin. Microbiol. 44: 1616-1617.

- Cruz-Vazquez, C. y Z. Garcia-Vazquez. 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., V. Novosol, S. P. McDonough, C. F. Chang, R. H. Jacobson, T. Divers, F. W. Quimby, S. Shin y D. H. Lein. 2000. Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. *Vet. Pathol.* 37:68-76.
- Chao, L. L., W. J. Wu y C. M. Shih. 2009. Molecular analysis of *Ixodes granulatus*, a possible vector tick for *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Taiwan. *Exp. Appl. Acarol.* 48:329-344.
- Dantas-Torres, F., L. A. Figueredo y S. P. Brandao-Filho. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39:64-67.
- De la Fuente, J., A. Estrada-Pena, J. Venzal, K. Kocan y D. Sonenshine. 2008a. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13:6938-6946.
- De la Fuente, J., K. Kocan, C. Almazan y E. Blouin. 2008b. Targeting the tick-pathogen interface for novel control strategies. *Front. Biosci.* 13:6947-6956.
- Dietrich, T., W. Geissdorfer, U. Schlotzer-Schredardt, L. Holbach, C. Shoerner and B. Seitz. 2008. *Borrelia*-associated crystalline keratopathy with intracorneal detection of *Borrelia garinii* by electron microscopy and polymerase chain reaction. *Cornea.* 27(4): 498-500. (Abst.)
- Escudero, R., M. Barral, A. Pérez, M. M. Vitutia, A. L. García-Pérez, S. Jiménez, R. E. Sellek and P. Anda. 2000. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates from Spain. *J. Clin. Microbiol.* 38(11): 4026-4033.
- Farley, D. 1996. Fighting Fleas and Ticks. Preventing Tick-Borne Disease. FDA Consumer magazine.
- Filippova, N. A. 1990. [The taxonomic aspects of the transmission of the causative agent of Lyme disease]. *Parazitologija.* 24:257-267.
- Foley, J. E., E. V. Queen, B. Sacks y P. Foley. 2005. GIS- facilitated spatial epidemiology of tick-borne diseases in coyotes (*Canis latrans*) in northern and coastal California. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 28: 197-212.
- Garin, C. y R. Bujadoux. 1922. Arthritis par tiques? . *J. Med. Lyon.* 71:765-772.
- Germer, J., B. Ryckmann, M. Moro, E. Hofmeister, S. W. Barthold, L. Bockenstedt y D. H. Persing. 1999. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* with a microtiter-based competitive polymerase chain reaction assay. *Molecular diagnosis.* 4:185-193.
- Gil, H., M. Barral, R. Escudero, A. L. García-Pérez y P. Anda. 2005. Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in areas of Northern Spain where Lyme disease is endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3): 1336-1345.

- Goldstein, R. E., A. P. Cordner, J. L. Sandler, B. A. Bellohusen and H. N. Erb. 2007. Microalbuminuria and comparison of serologic testing for exposure to *Borrelia burgdorferi* in nonclinical Labrador and Golden Retrievers. J. Vet. Diagn. Invest. 19: 294-297.
- Gomes-Solecki, M. J. C., G. P. Wormser, M. Shriefer, G. Neuman, L. Hannafey, J. D. Glass y R. J. Dattwyler. 2002. Recombinant assay for serodiagnosis of Lyme disease regardless of OspA vaccination status. J. Clin. Microbiol. 40(1): 193-197.
- Goossens, H. A. T., A. E. Van den Bogaard and M. K. E. Nohlmans. 2001. Dogs as sentinels for human lyme borreliosis in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 39(3): 844-848.
- Greene, C. E., M. J. G. Appel y R. K. Straubinger. 2000. Enfermedades Infecciosas en perros y gatos. Borreliosis de Lyme, Tercera edición Edition. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F. 311-324 pp.
- Hanincová, K., K. Kurtenbach, M. Diuk-Waser, B. Brei y D. Fish. 2006. Epidemic spread of lyme borreliosis Northeastern United States. Emerging infectious diseases. 12(4): 604-611.
- Johnson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt y D. J. Brenner. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: ethiologic agent of Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:496-497.
- Jovic, V. L., E. M. Grego, B. L. Lako, B. M. Ristovic, Z. A. Lepsanovic y N. T. Stajkovic. 2003. Improved serodiagnosis of early Lyme borreliosis: Immunoblot with local *Borrelia afzelii* strain. APMIS. 111:1053-1059.
- Lane, R. S., R. B. Moss, Y. Hsu, T. Wei, M. L. Mesirov y M. M. Kuo. 1999. Anti-Arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(5): 850-859.
- Levys, S., T. P. O'connor, J. L. Hanscom y P. Shields. 2002. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status dogs of naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. Vet. Ther. 3(3):308-315. (Abst.)
- Lorentzen, L. 2007. Tick borne disease diagnostics-Sorting through the options. International Veterinary Information Service. North American Veterinary Conference Proceedings 2007. Ithaca, N. Y.
- Luckhart, S., G. R. Mullen y J. C. Wright. 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. y R. A. Restifo. 2000. Ticks. Tick removal. . Ohio State University Extension Fact Sheet Entomology HYG. 2073-2098.
- Magnarelli, L. A., J. F. Anderson, A. B. Schreier y C. M. Ficke. 1987. Clinical and serologic studies of canine borreliosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 191:1089-1094.
- Magnarelli, L. A., S. A. Levy, J. W. Ijdo, C. Wu, S. J. Padula y E. Fikrig. 2001. Reactivity of dog sera to whole-cell or recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* by ELISA and Immunoblot analysis. J. Med. Microbiol. 50:889-895.
- Manfredi, M. T., V. Dini, S. Piacenza y C. Genchi. 1999. Tick species parasitizing people in an area endemic for tick-borne diseases in north-western Italy. Parassitologia. 41:555-560.

- Marconi, R. T. y C. F. Garon. 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.
- Márquez-Jiménez, F. J., A. Hidalgo-Pontiveros, F. Contreras-Chova, J. J. Rodríguez-Liebana y M. A. Muniain-Ezcurra. 2005. [Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain.]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23:94-102.
- Martínez, A., A. Salinas, F. Martínez, A. Cantu y D. K. Miller. 1999. Serosurvey for selected disease agents in White-tailed deer from México. *Journal of Wildlife diseases.* 35(4): 799-803.
- Merino, F. J., T. Nebreda, J. L. Serrano, P. Fernandez-Soto, A. Encinas y R. Perez-Sanchez. 2005. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiol. Infect.* 133:943-949.
- Miserez, V., L. Gern y A. Aeschlimann. 1990. *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). *Parassitologia.* 32:293-299.
- Nebreda Mayoral, T., F. J. Merino, J. L. Serrano, P. Fernandez-Soto, A. Encinas, y R. Perez-Sanchez. 2004. Detection of antibodies to tick salivary antigens among patients from a region of Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 19: 79-83.
- Nijhof, A. M., C. Bodaan, M. Postigo, H. Nieuwenhuij, M. Opsteegh, L. Franssen, F. Jebbink y F. Jongejan. 2007. Ticks and Associated Pathogens Collected from Domestic Animals in the Netherlands. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 7: 585-596.
- Pal, U., X. Li, T. Wang, R. R. Montgomery, N. Ramamoorthi, A. M. Desilva, F. Bao, X. Yang, M. Pypaert, D. Pradhan, F. S. Kantor, S. Telford, J. F. Anderson y E. Fikrig. 2004. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell.* 119:457-468.
- Pollack, R. J., S. R. Telford y A. Spielman. 1993. Standardization of Medium for Culturing Lyme Disease Spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* 31(5): 1251-1255.
- Quintero, M. T., C. S. Gaxiola, M. A. Castillo y V. G. Juárez. 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.
- Revel, A.T., J. S. Blevins, C. Almazan, L. Neil, K. M. Kocan, J. de la Fuente, K. E. Hagman y M. V. Norgard. 2005. bptA (bbe16) is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *PNAS.* 102:6972-6977.
- Romano-Osuna, M., L. Tinoco-Gracia, y F. Covarrubias-Pimentel. 1998. Demostración de *Ehrlichia canis* mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, B.C. *Revista AMMVEPE.* 9:86.

- Santino, I., F. Berlutti, F. Pantanella, R. Sessa y M. del Piano. 2008. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA by PCR in serum of patients with clinical symptoms of Lyme borreliosis. FEMS. Microbiol. Lett. 283(1): 30-35. (Abst.)
- Speck, S., B. Reiner, W. J. Streich, C. Reusch y M. M. Wittenbrink. 2007. Canine borreliosis: a laboratory diagnostic trial. Vet. Microbiol. 120(1-2): 132-141. (Abst.)
- Steere, A. C., R. T. Schoen y E. Taylor. 1987. The clinical evolution of Lyme arthritis. Annals of internal medicine. 107:725-731.
- 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.
- Straubinger, R. K. 2006. What are ticks doing these days? Emerging diagnostic research and vaccine management considerations. International Veterinary Information Service. North American Veterinary Conference Proceedings 2006. Ithaca, N. Y.
- Szabo, M. P., T. M. Cunha, A. Pinter y F. Vicentini. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, Sao Paulo, Brazil. Exp. Appl. Acarol. 25:909-916.
- Thomas, V., J. Anguita, S. W. Barthold y E. Fikrig. 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., H. Quiroz-Romero, M. M. T. Quintero, T. B. Rentería-Evangelista, A. Barreras-Serrano, S. Hori-Oshima, G. López-Valencia, A. R. Tamayo-Sosa, O. Rico, M. Moro y J. Vinasco. 2007. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in dogs from a México-U.S. border desert region: pilot study. Journal of Animal and Veterinary Advances. 6:787-789.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz, M. M. T. Quintero, T. B. Rentería-Evangelista, A. Barreras Serrano, S. Hori-Oshima, G. Medina-Basulto, J. Vinasco y M. H. Moro. 2008. Prevalence and Risk Factors for *Borrelia burgdorferi* Infection in Mexicali, Baja California, a México-US Border City. The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine. 6:161-165.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz-Romero, M. T. Quintero-Martinez, T. B. Rentería-Evangelista, A. Barreras-Serrano, S. Hori-Oshima, G. López-Valencia, A. R. Tamayo-Sosa, G. Medina-Basulto, P. Haro-Alvarez, M. H. Moro y J. Vinasco. 2009a. Prevalence and Risk Factors for *Borrelia burgdorferi* Infection in Dogs of Animal Control Centers from Mexicali, Baja California: A México-US Border City. Journal of Animal and Veterinary Advances. 8:251-254.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz, M. M. T. Quintero, T. B. Rentería-Evangelista, Y. González-Medina, A. Barreras Serrano, S. Hori-Oshima, M. Moro y J. Vinasco. 2009b. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the México-USA border. Vet. Rec. 164:59-61.

- Toledo, A., A. S. Olmeda, R. Escudero, I. Jado, F. Valcarcel, M. A. Casado-Nistal, M. Rodriguez-Vargas, H. Gil y P. Anda. 2009. Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Ticks Collected from Central Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81:67-74.
- Walker, E. D., M. G. Stobierski, M. L. Poplar, T. W. Smith, A. J. Murphy, P. C. Smith, S. M. Schmitt, T. M. Cooley y C. M. Kramer. 1998. Geographic distribution of ticks (Acari: Ixodidae) in Michigan, with emphasis on *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* 35: 872-882.