

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Amplificación de una región del gen *Osp A* de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, en muestras sanguíneas de cánidos del área metropolitana de Monterrey, N. L. por la reacción en cadena de la polimerasa e identificación de los vectores potenciales de la enfermedad de Lyme.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA

BIOL. CUAUHTEMOC LARA CAMPOS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON
MARZO, 1997.

TM

Z5320

FCB

1997

L3



1020119186

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



Amplificación de una región del gen *Osp A* de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, en muestras sanguíneas de cánidos del área metropolitana de Monterrey, N. L. por la reacción en cadena de la polimerasa e identificación de los vectores potenciales de la enfermedad de Lyme.

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

PAZ, J

BIOL. CUAUHEMOC LARA CAMPOS

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON
MARZO, 1997.**

0116-28760

TM
Z5320
FCB
1997
L3



FONDO TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Amplificación de una región del gen Osp A de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, en muestras sanguíneas de cánidos del área metropolitana de Monterrey, N.L. por la reacción en cadena de la polimerasa e identificación de los vectores potenciales de la enfermedad de Lyme.

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

BIOL. CUAUHEMOC LARA CAMPOS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MARZO DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Amplificación de una región del gen Osp A de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, en muestras sanguíneas de cánidos del area metropolitana de Monterrey, N.L. por la reacción en cadena de la polimerasa e identificación de los vectores potenciales de la enfermedad de Lyme.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MEDICA

PRESENTA

~~BIOL. CUAUHTEMOC LARA CAMPOS~~

Dr. JUAN PABLO MARTINEZ SORIANO
DIRECTOR EXTERNO

COMISION DE TESIS APROBADA:

M.C. LUCIO GALAVIZ SILVA
PRESIDENTE

Ph.D. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS
SECRETARIO

M.C. FILIBERTO REYES VILLANUEVA
VOCAL

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

SEPTIEMBRE DE 1996

VUELVE A EMPEZAR

Aunque sientas el cansancio,
Aunque el triunfo te abandone,
Aunque el error te lastime,
Aunque una traición te hiera,
Aunque una ilusión se apague,
Aunque ignoren tus esfuerzos,
Aunque la ingratitud sea la paga,
Aunque la incomprensión corte tus risas,
Aunque todo parezca nada.....
¡VUELVE A EMPEZAR!

**EL SEÑOR
BUSCA TODAS
LAS OCASIONES
PARA VOLVER
A EMPEZAR.**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con infinito, cariño, amor y admiración a quienes me enseñaron a no desfallecer ante nada para lograr las metas propuestas, por duro que sea el camino. A quienes me brindaron el ser y me colmaron de cariño sin pedir nada a cambio.

A mis padres, Arturo Lara Prado y Amelia Campos Betancourt, de quien siempre he recibido todo su apoyo, amor y sabios consejos, para poder sobresalir ante todo y ante todos. ¡Dios los bendiga!

A mis hermanos Arturo, Ezequiel, Amalia, Arely y Juan José, quienes siempre confiaron en mí y me brindaron su apoyo y comprensión en todas mis alegrías y sinsabores.

A mis sobrinos Juan Arturo, Jesus Antonio, Jose Alejandro y María del Rosario (mi ahijada), en quienes veo lo que fui y lo que ellos pueden ser.

Especialmente a la persona que compartió conmigo toda esta etapa de mi vida, animandome a seguir y recordandome que hay capacidad para lograr todo lo que me proponga. Con amor a mi novia Lic. María Salomé Moreno Rodríguez.

A la familia Moreno Rodríguez, a todas las personas que integran este nucleo familiar por todas las atenciones brindadas.

A la familia Moreno Flores y Moreno Guerrero con quienes he compartido sólo momentos gratos, especialmente al lado de mi ahijado Luisito.

A mis inseparables amigos: Marco Antonio, Ramón, Noé y Julio Cesar con quien compartí los mejores momentos en la Facultad de Ciencias Biológicas.

RECONOCIMIENTOS ESPECIALES

Al Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de Maestría. Becario No. 82781

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.), Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Entomología Médica, por la gran oportunidad que me brindaron de continuar con mi superación académica y profesional.

Al Laboratorio de Parasitología, Centro Nacional de Sanidad Acuícola por permitirme las facilidades para llevar a cabo este estudio.

Al Laboratorio de Patología Molecular de la UANL/INIFAP por apoyarme en el trabajo de laboratorio del presente estudio.

Al M.C. Lucio Galaviz Silva, por su orientación y valiosa cooperación, fue posible lograr este anhelo. Por su tiempo, interés, paciencia y por ser más que un asesor, un amigo.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano, por su valiosa cooperación y por adentrarme en el interesante mundo de la Biología Molecular.

Al PhD. Ildfonso Fernández Salas, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi superación académica.

Al M.C. Filiberto Reyes Villanueva, por su importante colaboración y sugerencias en la redacción de este trabajo.

Al M.C. Fernando Jiménez Gúzman, por aceptarme como tesista en el Laboratorio de Parasitología/Centro Nacional de Sanidad Acuícola.

A la Q.I. Hilda Garza Fernández, por el apoyo brindado durante mi estancia en el Laboratorio de Parasitología/Centro Nacional de Sanidad Acuícola.

Al M.C. Andres Alvarez Jiménez, por su apoyo en las colectas de campo realizadas y por su amistad sincera.

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Alfonso Flores Leal, por su apoyo durante mis estudios de posgrado.

Al M.C. Feliciano Segovia Salinas, de quien recibí todo su apoyo e interesantes consejos para la realización del presente estudio.

Al QBP Juan Manuel Arredondo Cantú, por sus oportunas sugerencias en la redacción y por ser un excelente amigo.

Al Profr. José María Villarreal, Ing. Alfredo González y Lic. Javier Arturo Martínez, por su apoyo brindado y las facilidades prestadas para la culminación de mis estudios de posgrado.

A todo el personal del C.B.T.i.s. 258, por todas las atenciones brindadas y por el compañerismo mostrado.

A todos mis compañeros de maestría con quienes compartí grandes momentos (Ezequiel, Rene, Andres, Nereida, Eduardo, Cecilia, Blanca, Felipe, Jaime, Jorge, Rosario).

Al personal del Laboratorio de Parasitología, del Centro Nacional de Sanidad Acuícola, quienes siempre me estuvieron animandome a continuar y también hicieron tan llevadera mi estancia en el laboratorio (Asunción, doña Leo, Marina, Carlos y Tere).

A todos los compañeros del Laboratorio de Patología Molecular de la UANL/INIFAP, por todo el apoyo que me brindaron, se los agradezco sinceramente (Alberto, Irma, Humberto y Omar).

CONTENIDO

RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	2
II.- IMPORTANCIA	4
III.- ORIGINALIDAD	5
IV.- OBJETIVOS	6
V.- ANTECEDENTES	7
1.- Uso de técnicas tradicionales.	7
2.- Uso de la técnica de RCP.	16
VI.- MATERIAL Y METODOS	24
1.- Area de estudio.	24
2.- Colecta de Garrapatas.	25
3.- Detección de <i>B. burgdorferi</i> en garrapatas.	25
4.-Toma de muestra de sangre en los perros.	26
5.- Extracción de ADN de las muestras de sangre con anticoagulante.	26
6.- Purificación del ADN.	27
7.- Cepa de referencia.	27
8.- Tratamiento de las cepas de referencia.	28
9.- Reacción de RCP.	28
10.- Síntesis de iniciadores.	31
11.- Análisis estadístico.	31

VII.- RESULTADOS	32
1.- Tratamiento de las cepas de referencia.	32
2.- RCP de sangre.	32
3.- RCP de garrapatas.	33
4.- Prevalencia y abundancia de garrapatas.	33
5.- Análisis estadístico.	34
6.- Identificación taxonómica.	35
VIII.- DISCUSION	38
IX.- CONCLUSIONES	43
X.- LITERATURA CITADA	44
XI.- INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
<i>Alu I</i>	Enzima de restriccion
BSK	Medio de cultivo modificado de Kelly
CDC	Centros para el control de enfermedades
dNTP' s	Desoxinucleotidos trifosfatos
ECM	Eritema crónico migratorio
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
ELISA	Enzyme-Linked-Imunosorbent-Assay
<i>et al</i>	y colaboradores
E U.A.	Estados Unidos de America
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indi ecta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LCR	Líquido cefalorraquideo
LS	Líquido sinovial
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Milimetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
pBR	Plasmido de Bolívar y Rodriguez
PBS	Solución buffer de fosfatos
p/v	Partes por volumen
pmol	Picomoles
RCP	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundo
Taq	Enzima polimerasa de ADN proveniente de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato-EDTA
TE Buffer	Buffer tris-EDTA
U	Unidades
V	Voltios

RESUMEN

La enfermedad de Lyme afecta a una gran variedad de vertebrados incluyendo cánidos y humanos. El agente etiológico es la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (Johnson, 1984) y se transmite por picadura de garrapatas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *B. burgdorferi* en la población de cánidos pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) e identificar los vectores potenciales. Se estudiaron cuatro localidades (Monterrey 33, La Estanzuela, Proviación y el Centro Antirrábico de Guadalupe). El total de 235 muestras de sangre se ordenaron en 24 grupos para extraer el ADN y efectuar la reacción de amplificación de una región altamente conservada del gen Osp A de la cepa patógena B31 por RCP, empleando como iniciadores a los oligonucleótidos 5'CGAAGATACTAAATCTGT y 5'GATCA AATATTTTCAGCTT. Se obtuvieron dos grupos positivos provenientes del Centro Antirrábico Guadalupe (8/1, 12.5%) y La Estanzuela (4/1, 25%). De los 235 perros examinados se obtuvo un total de 1572 garrapatas, (633 machos y 939 hembras) que fueron identificadas como *Rhipicephalus sanguineus* (1565), *Amblyoma cajennense* (1) y *Dermacentor variabilis* (6). Se concluye que la enfermedad de Lyme está presente en el área metropolitana de Monterrey, debido a que se detectaron cánidos portadores de *B. burgdorferi* y además se encuentran los vectores potenciales.

INTRODUCCION

La enfermedad de Lyme ó borreliosis de Lyme, causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (Johnson, 1984,) fue reportada por primera vez en humanos en 1975 en el Sureste de Connecticut, E.U.A. El número de casos humanos reportados anualmente en los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) se ha incrementado notablemente; más de 40,000 entre 1982 y 1991, y el 81% de todos los casos de enfermedades transmitidas por artrópodos entre 1986 a 1990 correspondio a esta enfermedad. En 1993 los CDC reportaron que esta incidencia se elevó a más del 40%, con un total de 9,677 casos (Greene *et al.* 1988).

La espiroqueta *B. burgdorferi* infecta a una gran variedad de vertebrados (pájaros, perros, venados, ratones, humanos, etc.). La enfermedad se transmite principalmente a través de la picadura de garrapatas. El principal vector en los Estados Unidos es la “garrapata del venado” *Ixodes dammini*, Spielman, Clifford, Piesman & Corwin, 1979, la cual tiene una amplia distribución geografica, dada su alta dispersión por aves migratorias. La dinámica poblacional de este vector es muy importante, ya que el riesgo de los humanos para adquirir la enfermedad esta en función de la abundancia de la garrapata. El grado de infestación por *I. dammini*, a su vez se relaciona directamente con la densidad del venado “cola blanca”, *Odocoileus virginianus* (Zimmerman).

Poco después del descubrimiento de la bacteria *B. burgdorferi*, se desarrollaron pruebas serológicas para detectar la enfermedad como es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) de anticuerpos y ELISA. Dos desventajas de estos metodos son su limitada sensibilidad y especificidad ya que presentan reacciones cruzadas con otros patógenos. Debido a la

relativa precisión del diagnóstico temprano de la enfermedad es de gran relevancia para el control y/o erradicación de la misma; por lo tanto estos métodos deben complementarse o sustituirse por otros más confiables. En años recientes se ha diseñado y perfeccionado un método conocido como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), que permite la detección de una secuencia conocida de nucleótidos presente en el genoma o en mezclas de genomas, aún y cuando el número de copias de la secuencia sea muy pequeño (Saiki *et al.* 1988). Por su poder resolutivo, versatilidad y especificidad, este método tiene múltiples usos en la investigación. Es por lo anterior que se llevó a cabo este estudio; para con el nuevo método (RCP) hacer un diagnóstico rápido y altamente confiable de la enfermedad en las poblaciones de perros urbanos, los cuales podrían ser en un momento dado, un factor de alto riesgo para el hombre.

La enfermedad de Lyme se caracteriza por presentar tres estados patológicos. La fase inicial consiste en una lesión cutánea llamada eritema crónico migratorio (E.C.M.), la segunda fase se expresa en anomalías neurológicas y disturbios en la conducción cardíaca y en la tercera ocurre una artritis franca en las últimas etapas de la enfermedad. La manifestación de estas pueden variar de días a años después de la infección inicial. Los desordenes en los miembros y articulaciones se encuentran asociados con la presencia de anticuerpos IgG como indicadores de infecciones por *B. burgdorferi*. La enfermedad se manifiesta cuando los anticuerpos IgG son relativamente altos y las cantidades de anticuerpos IgM son bajas.

IMPORTANCIA

La enfermedad de Lyme es una de las de mayor prevalencia en los E.U.A., debido a la gran cantidad de hospederos y vectores involucrados. Esta ubicada entre las primeras cinco enfermedades transmitidas por artrópodos y ya se han reportado los primeros casos en el Norte de México.

Sin embargo, en nuestro país se le ha dado escasa importancia a pesar de la presencia de los principales vectores y hospederos. En Nuevo León se han reportado ocho casos humanos que resultaron positivos a la prueba de ELISA con títulos de 1:100 a 1:800 (Salinas-Meléndez *et al.* 1992). Recientemente se diagnosticó la presencia de la bacteria *B. burgdorferi* en biopsias de dos pacientes del Hospital Universitario(UANL), con los síntomas típicos de la enfermedad de Lyme. También se identificó de una muestra de líquido sinovial (LS) de un perro con artritis por medio de la técnica de RCP (Salinas-Meléndez *et al.* 1995). De aquí se deriva la necesidad de un programa de vigilancia epidemiológica en los perros urbanos, ya que su población es bastante alta en toda el área metropolitana.

ORIGINALIDAD

En Nuevo León sólo se han realizado dos estudios referentes a la serología de la enfermedad . El primero en (1992), se reportaron ocho pacientes con antecedentes de picadura por insectos hematófagos y que desarrollaron anticuerpos contra *B. burgdorferi*, mientras que en el segundo, se diagnosticó *B. burgdorferi* en dos biopsias de humanos y en un perro con artritis por medio de la prueba de la RCP. El presente estudio es el primero que se lleva a cabo de una manera sistemática, sobre el diagnóstico de *B. burgdorferi*, tanto en las principales garrapatas vectoras de la enfermedad, como en la población de cánidos en el área metropolitana de Monterrey, México.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Detectar la presencia de la bacteria *B. burgdorferi*, causante de la enfermedad de Lyme en las principales especies de garrapatas vectoras y en los cánidos presentes en el área Metropolitana de Monterrey, N.L.

Objetivos Particulares.

1.- Determinar las principales especies de garrapatas que parasitan a los cánidos del área metropolitana de Monterrey.

2.- Detectar la presencia de la bacteria *B. burgdorferi* en garrapatas por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

3.- Determinar la presencia de *B. burgdorferi* en la sangre de los cánidos pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, por medio de la RCP.

ANTECEDENTES

I.- USO DE TECNICAS TRADICIONALES.

En México no se le ha dado la importancia debida a la enfermedad de Lyme, por lo cual son escasos los trabajos que se han efectuado. Entre ellos destaca el de **Salinas-Meléndez et al.**(1992) quienes reportan un estudio en Nuevo León. En ocho pacientes con antecedentes de picadura por insectos hematófagos y que presentaron lesiones eritematosas anulares en la piel, artralgias en manos, rodillas y cuello, se determinó la presencia de anticuerpos para *B. burgdorferi* por medio de la técnica de ELISA. Los casos examinados resultaron positivos con títulos de 1:100 a 1:800 de IgG.

Posteriormente **Salinas-Meléndez et al.** (1995) usaron la técnica RCP para amplificar secuencias de ADN de *B. burgdorferi*, para su detección en muestras de humanos y canidos. Con un par de oligonucleótidos amplificaron un fragmento de 244 pares de bases que es parte de la región variable V4 del gen 16S rRNA de *B. burgdorferi*. Detectaron la espiroqueta en dos biopsias de piel en pacientes con acrodermatitis, y en el LS de un perro con artritis.

No obstante, ha sido en Estados Unidos de América y Europa donde se han realizado una gran cantidad de trabajos referentes a esta enfermedad. Los estudios realizados han incluido a los diversos vectores, así como también las técnicas de diagnóstico más utilizadas como la de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la RCP.

Originalmente fue **Burgdorfer et al.** (1982) quienes aislaron la espiroqueta *B. burgdorferi* de garrapatas adultas de *I. dammini*, la garrapata incriminada como vector de

la enfermedad de Lyme. Los síntomas aparentes fueron las grandes lesiones cutáneas en conejos de 10 a 12 semanas después de que las garrapatas infectadas se alimentaron sobre ellos. Las muestras de suero provenientes de pacientes con enfermedad de Lyme fueron observadas por IFI por presentar anticuerpos de este agente.

Después **Benach et al.** (1983) detectaron y aislaron espiroquetas en la sangre de dos de 36 pacientes en Long Island y Westchester County, N.Y. , quienes presentaron síntomas sugestivos de la enfermedad de Lyme. Las espiroquetas fueron morfológicamente similares y serológicamente idénticas a los organismos encontrados recientemente infectados con *I. dammini*. Fueron colectados en una área endémica y fueron epidemiológicamente implicados como vectores de la enfermedad de Lyme. Ambos pacientes desarrollaron anticuerpos específicos en especímenes parecidos de suero.

Más tarde, fue **Piesman-Sinsky** (1988) quien estudió la habilidad de los estadios inmaduros de tres especies de garrapatas del Sureste de Estados Unidos para adquirir, mantener y transmitir *B. burgdorferi* bajo condiciones de laboratorio. Confirmó que las garrapatas *Dermacentor variabilis* (Say) y *Amblyomma americanum* (Linnaeus) adquirieron la infección como larvas con tasas de infección de 9% (16/178) y 1% (6/425) respectivamente. Esto indicó que la infección fue ineficiente y de corta vida. En contraste, *Ixodes scapularis* (Say) infectada como larva, sí logró mantener la infección transtadialmente, Así mismo en fase de ninfas fueron infectadas y lograron transmitir la infección a cuatro hamsters.

En otro estudio en Alabama, Luckhart *et al.* (1991) examinaron un total de 451 hospederos para determinar la presencia de garrapas, entre los cuales se muestrearon: “ratón algodón” (*Peromyscus gossypinus*), Rhodes, “rata algodón” (*Sigmodon hispidus*), Baird, “ratón de casa” (*Mus musculus*), Waterhouse, y “venado cola blanca” (*O. virginianus*).

De un total de 859 garrapatas de las especies *A. americanum*, *Dermacentor albipictus*, Packard, *D. variabilis*, Say, *I. scapularis* y *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, que fueron removidas de hospederos por medio de dragado, *A. americanum* e *I. scapularis* conformaron el 53.4% del total de garrapatas colectadas. Casi la mitad del total de garrapatas fueron examinados para determinar la presencia de *B. burgdorferi* por IFI. Los resultados revelaron que cuatro ninfas y dos adultos de *A. americanum* en “venado cola blanca” (*Odocoileus virginianus*) y tres larvas de *I. scapularis* en “ratón algodón” *S. hispidus* (Baird), presentaron la espiroqueta *B. burgdorferi*.

Posteriormente en Texas, Teltow *et al.* (1991) reportaron el aislamiento de *B. burgdorferi* en ocho de 1,093 especímenes de artrópodos, entre ellos varias garrapatas y una especie de mosca, incluyendo *A. americanum*, *A. maculatum*, *I. scapularis* y *Ctenocephalides felis*, Méndez. Los ocho aislamientos reaccionaron específicamente cuando se trataron con anticuerpos monoclonales para *B. burgdorferi*.

En Maryland, Amerasinghe *et al.* (1992) reportaron que en una colecta de garrapatas de un total de 3,437 especímenes de *I. dammini*, colectados en 538 (42%) de

1,281 venados, junto con 2,013 *D. albipictus* y 23 *A.a americanum* de 34(0.5%) venados *O. virginianus*, el rango de prevalencia de *I. dammini* varió de 0 a 79% en venados y la abundancia media fue de 0 a 7.3 garrapatas por venado en las diferentes areas de estudio. El promedio de infección de garrapatas (prueba de inmunofluorescencia indirecta) mostró un rango de 0 a 21% con una media de ocho. La densidad de garrapatas por venado y el promedio de infección de la espiroqueta vario con respecto a la región fisiográfica. El nivel de infección mas bajo fue en la region Appalachian, intermedia en la Piedmont y alta en el Oeste y Este de la region Costa Plana

Mukolwe et al. (1992) alimentaron a replesion *I. scapularis*, *A. americanum* y *D. variabilis* sobre conejos blancos de Nueva Zelanda infectados experimentalmente con *B. burgdorferi*. Solamente en *I. scapularis* las tasas de infección fueron 18 y 21%. Cuando las ninfas de cada especie mudaron y se alimentaron sobre conejos susceptibles, las espiroquetas nuevamente se aislaron en necropsias, pero solo de los conejos expuestos a *I. scapularis*

Finalmente, tambien fue en Texas donde **Rawlings-Teltow** (1994) reporto que las espiroquetas se detectaron en 1 03% de 5,141 *A. americanum* (adultos)

Anderson et al. (1983) observaron la espiroqueta en el intestino medio del 35% de 147 garrapatas *I. dammini* colectadas en tres localidades de Lyme y Este de Haddam,

Connecticut. (Las garrapatas positivas fueron removidas de “mapaches” (*Procyon lotor*, Wagler), “raton patas blancas” (*Peromyscus leucopus*, Rafinesque) y “ardillas rojas” (*Tamiasciurus hudsonicus*, Gordon). Tambien fueron aisladas espiroquetas a través del medio de cultivo modificado de Kelly (BSK) en nueve ninfas de *I. dammini* y adultas alimentadas parcialmente, así como de la sangre de un mapache y un raton patas blancas.

Burgdorfer et al. (1985) publicaron un estudio donde de 1,687 adultos de *I. pacificus* colectadas en la vegetacion 25 (1.48%) presentaron la espiroqueta *B. burgdorferi*. por medio de la tecnica de IFI. De 715 garrapatas de Oregon, 14(1.96%) resultaron infectadas, así como 11(1.13%) de 972 garrapatas de California. De un total de 25 garrapatas *I. pacificus* infectadas, 17 presentaron la espiroqueta solamente en intestino medio, las ocho restantes mostraron infeccion generalizada en todos los tejidos, lo que puede reflejar condiciones fisiológicas adversas para el desarrollo de la espiroqueta en el hemocele.

Magnarelli et al. (1985) efectuaron un estudio en regiones infestadas de garrapatas en el Sur de Connecticut por medio de la técnica de IFI en sueros de perros. Encontraron títulos de anticuerpos de 1:64 a 1:512 en 22 de 84 muestras de sueros. Un registro clínico de 52 perros seropositivos indicaron antecedentes de cojera intermitente en 19 de estos. Tambien presentaron inflamación de las articulaciones en miembros que se desarrollaron típicamente en perros sin anticuerpos IgM. Observaron una estrecha cercanía geográfica

para todos los perros confirmados con anticuerpos para *B. burgdorferi* en áreas del Surestero y Sureste de Connecticut, donde la enfermedad de Lyme es muy común.

Marcus et al. (1985) llevaron a cabo una investigación en Nueva Inglaterra para detectar anticuerpos para *B. burgdorferi* en caballos. Doce de 50 caballos seleccionados al azar en áreas endémicas, mostraron títulos de anticuerpos por IFI de 1:8 a 1:2,048 para *B. burgdorferi*. Uno de 50 caballos de áreas no endémicas mostró títulos de 1:8. También encontraron caballos seropositivos que no aglutinaron anticuerpos contra la reacción cruzada potencial con *Leptospira spp.*, lo cual indicó que los caballos en áreas endémicas están expuestos a la espiroqueta *B. burgdorferi*.

Burgess (1986) realizó un estudio referente a la infección natural de perros en Wisconsin. El 53% de 380 perros fueron positivos a anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta para *B. burgdorferi* a una dilución de 1:64 o más. La bacteria fue aislada de la sangre de los perros.

Rawlings et al. (1987) realizaron una investigación en Texas cultivando la espiroqueta *B. burgdorferi* en medio de cultivo de Kelly (BSK) en muestras de sangre, LCR, LS, piel, hueso y tejido de autopsia humana. Reportaron el 2% de 100 muestras de sangre como positivas y también 31 muestras de piel 8(14%). La espiroqueta fue observada en uno de siete (14%) cultivos de LCR. En dos autopsias la espiroqueta fue aislada del hígado y bazo. También de LS (rodillo) y hueso. Se utilizó la prueba de IFI para diagnosticar

la presencia de la espiroqueta confirmandose que siete de los aislamientos resultaron ser *B. burgdorferi* y el resto fueron otros géneros de *Borrelia*.

Greene et al. (1988) en un estudio en el Norte de Carolina para detectar anticuerpos de *B. burgdorferi* en perros, utilizaron IFI para detectar anticuerpos en sueros de 600 perros en 1983 y 402 perros en 1985. En ambos años los rangos de prevalencia fueron de 3.6% y 2.7% respectivamente.

Magnarelli et al. (1988) al estudiar equinos del Noreste de Estados Unidos, 705 muestras de sangre fueron examinadas por IFI. Los anticuerpos IgM e inmunoglobulinas totales fueron detectados en 37 (5.3%) y 90 (12.8%) muestras de suero respectivamente. La media geométrica más alta (140.4) de los títulos para anticuerpos IgM se encontró durante el mes de Julio.

En otro estudio, **Magnarelli et al.** (1988) trabajando con material de Connecticut, Maryland, Norte de Carolina, Georgia y Florida, para diagnosticar anticuerpos en venados (*O. virginianus*) y mapaches (*P. lotor*). La seropositividad para venados fue alta en Connecticut (56% de 353 sueros) y Maryland (51% de 35 sueros). Los mapaches en Connecticut, Maryland, Norte de Carolina y Florida, también presentaron anticuerpos, pero la prevalencia de sueros positivos fue alta en Maryland (79% de 14 muestras). Basados en pruebas de absorción, las inmunoglobulinas detectadas en estos mamíferos fueron

probablemente específicos para *B. burgdorferi*. La prueba de ELISA fue más sensible que la IFI y fue más apropiada para analizar un número mayor de muestras de suero.

Cohen et al. (1990) en un estudio realizado también en cánidos en Texas, de 2,409 muestras de suero analizadas por IFI, 132 (5.5%) resultaron positivas. Los perros macho, fueron más seropositivos que las hembras para *B. burgdorferi* y los signos clínicos más frecuentes en los perros seropositivos fueron cojera, alteraciones neurológicas, oftálmicas, dermatológicas, renales y hepática.

Magnarelli et al. (1990) desarrollaron pruebas de ELISA para detectar anticuerpos en conejos "cola de algodón". Cinco extractos antigénicos de *B. burgdorferi* fueron analizados para determinar la variabilidad en los resultados de las pruebas serológicas. En el análisis de 79 muestras, la seropositividad osciló en un 56% para cultivos de tejido de riñón, y un 68% presentaron seropositividad para un resultado de falsos-positivos cuando el antisuero de conejo de referencia para *B. hermsii* y *Treponema pallidum* fueron protegidos contra *B. burgdorferi*. Los conejos respondieron inmunológicamente a *B. burgdorferi*, pero se observaron variaciones en las pruebas serológicas.

También **Monsen et al.** (1990) colectaron muestras de suero de perro y fueron probadas por IFI. Dos muestras fueron positivas de 100. En colectas de ninfas y adultos de *I. pacificus* y *Dermacentor occidentalis*, Murr y probadas por IFI usando anticuerpos monoclonales H5332, la razón de infección total fue de 1.5% de 1,122 garrapatas *D.*

occidentalis colectadas no hubo positivas. En 1989 se presentó un total de 32 casos humanos reportados por el Departamento de Salud Pública.

Artsob et al. (1991) analizaron cultivos de intestino en siete garrapatas semi-alimentadas y colectadas entre 1991 y 1992, cinco *I. dammini* y dos *I. scapularis* removidas de un perro. Encontraron *B. burgdorferi* en una garrapata *I. dammini* que fue removida de un gato. Utilizaron la técnica de IFI sobre los sueros de 75 perros, siete gatos y ocho venados “cola blanca” colectados en Prince Edward Island entre 1989 y 1992, los cuales revelaron títulos de anticuerpo de 1:256. El reactor fue un perro con antecedente de haber viajado a los EUA Este estudio documentó el primer reporte de aislamiento de *B. burgdorferi* en el Atlántico en Canada, puza por la introducción de *Ixodes dammini* en aves migratorias.

Levine et al. (1991) por IFI, observaron que la bacteria estuvo presente en nueve (22%) *Ixodes cookei* Bishop, removidas de ratas “rice” (*Oryzomys palustris*), un raton “patas blancas” (*P. leucopus*) y mapaches (*P. lotor*). La espiroqueta *B. burgdorferi* fue detectada solamente en *Ixodes dentatus** colectadas en un Thrasher café (*Toxostoma rufum*). Todas las garrapatas infectadas y los hospederos seropositivos fueron colectados al Este de la costas de Virginia.

En Alemania, **Kahl et al.** (1992) colectaron ninfas sin alimentar *I. ricinus*, *Haemaphysalis concinna* Koch y adultos *D. reticulatus* Koch. En julio la abundancia de

ninfas de *I. ricinus* fue alrededor de dos a tres veces mas alto que las ninfas de *H. concinna*. En Septiembre la actividad de alimentación de ninfas *I. ricinus* fue nuevamente alta, así como en los adultos *D. reticulatus* y baja en ninfas de *H. concinna* por IFI. La prevalencia en *I. ricinus* varió de 12.1% a 21.0%. No se encontró *B. burgdorferi* en *H. concinna*. De los 116 *D. reticulatus* examinados el 11.3% resultaron positivas.

Magnarelli *et al.* (1992) usando IFI detectaron títulos de 1:64 a 1:512 en 22 de 84 muestras de suero de cánidos. Se hicieron pruebas en las muestras de suero pareadas de 20 perros seropositivos que revelaron diferencias temporales en títulos. Ocurrieron cambios breves durante un mes ó se extendieron por más de cuatro años en períodos de muestra.

Sharon *et al.* (1992) en colectas de *I. dammini* y también por IFI, encontraron que la tasa de infección varió estacionalmente. En primavera de 1990 fue de 38.1% de 105 especímenes, 60.3% de 151 especímenes en otoño de 1990 y 41.2% de 131 en primavera de 1991.

II.- USO DE LA TÉCNICA DE LA RCP.

Rosa *et al.* (1989) usaron una prueba altamente específica y sensitiva para *B. burgdorferi*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). La secuencia conservada de ADN blanco fue de origen cromosómico por pruebas de hibridación. Entre todas las cepas de *B. burgdorferi* probadas, no se presentó la estrecha relación con miembros del género *B. hermsii*. La prueba de RCP desarrollada de esta secuencia

reaccionó con 17 de 18 cepas de *B. burgdorferi* pero con ninguna otra especie de *Borrelia* probadas. La reacción fue sensitiva para menos de cinco copias del genoma de *B. burgdorferi*, igual en la presencia de 10^6 del exceso doble de ADN eucariótico.

Malloy et al. (1990) trabajaron con la técnica de IFD en muestras clínicas de sueros caninos. Los resultados revelaron que 76 de 308 sueros presentaron títulos de anticuerpos, con rango de 1:64 a 1:384. De las muestras positivas seleccionaron 15 muestras clínicas y dos de orina, para determinar la sensibilidad de la RCP. Solamente una muestra de sangre mostró reactividad para la RCP.

Nielsen et al. (1990) usaron la amplificación de ADN por RCP para detectar ADN de la espiroqueta. Los iniciadores de la amplificación específica originaron 145 pares de bases del fragmento de ADN del gen Osp A de *B. burgdorferi*. La amplificación del producto fue detectado por electroforesis de un gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio y también por hibridación en una prueba de oligonucleótidos radioetiquetados. El método de hibridación fue más sensitivo lograndose detectar títulos de 50 fg de ADN de *B. burgdorferi* lo cual corresponde a poco más de 50 espiroquetas. La especificidad de la RCP para *B. burgdorferi* fue probada mediante el uso de ADN de otros organismos en plantillas de amplificación. No se encontraron reacciones cruzadas.

Persing et al. (1990) trabajaron RCP para amplificar secuencias de ADN de *B. burgdorferi*, y fue aplicada para la detección de la espiroqueta en las garrapatas vectoras. El

blanco para la amplificación de RCP, fue el gen Osp A de la cepa B31. Los análisis de aislamientos de diferentes áreas geográficas, indicaron que este gen podría usarse para identificar más aislamientos en Norteamérica. Estos métodos fueron extendidos para el análisis de colonias de *I. dammini* y en colectas de campo. Las secuencias Osp A específico, e identificados en 15 de 15 colonias de ninfas de garrapatas, las cuales se habían alimentado previamente en un animal infectado; los productos amplificados fueron detectados en 8 garrapatas control. En tejidos de intestino de garrapatas adultas y ninfas colectadas en campo, se examinaron por IFI y RCP. La IFI identificó 16 garrapatas infectadas de 30 especímenes pareados; 15 de estos especímenes fueron positivos para RCP. Un espécimen fue positivo para RCP, el cual había sido negativo por IFI. Las garrapatas vivas y las disectadas fueron apropiadas para este análisis.

Debue et al. (1991) utilizaron oligonucleótidos como iniciadores en un ensayo de la RCP para la amplificación de ADN en *B. burgdorferi* de tres muestras de LS y 30 de líquido cefalorraquídeo (LCR). Estas muestras fueron previamente positivas por medio de métodos inmunológicos, con anticuerpos IgG e IgM anti *B. burgdorferi*, excepto en una muestra de LS y tres de LCR. Se detectó ADN de *B. burgdorferi* en 10 muestras de LCR y dos en LS, confirmando los resultados inmunológicos.

Kruger et al. (1991) se apoyaron en la RCP para amplificar secuencias específicas de ADN en diferentes aislamientos clínicos de *B. burgdorferi* y LCR en dos pacientes con la enfermedad. El producto de amplificación fue visto por medio de un gel de poliacrilamida

para electroforesis y tñido con bromuro de etidio para ser visualizado. La amplificaci3n de ADN confirm3 un fragmento de 290 pares de bases en las muestras de cultivo de las diferentes cepas de *B. burgdorferi* y en muestras de LCR de ambos pacientes.

Melchers *et al.* (1991) aplicaron la RCP para el diagn3stico en biopsias de piel en pacientes con eritema cr3nico migratorio (ECM) y acrodermatitis cr3nica atr3fica (ACA). Inicialmente la espiroqueta no se detect3 microsc3picamente en 15 biopsias obtenidas de nueve pacientes; sin embargo *B. burgdorferi* se aisl3 en siete de ocho de estas muestras a trav3s del medio de cultivo BSK. Por medio de la RCP, se detectaron secuencias espec3ficas de *B. burgdorferi* en 12 de las biopsias. En tres de cuatro pacientes se present3 ECM y cuatro de cinco pacientes presentaron ACA. La espiroqueta se aisl3 de una biopsia en un paciente con ECM que fue negativo a RCP lo que se indic3 como falso negativo, quiz3 por el bajo n3mero de espiroquetas presentes en la lesi3n. Los positivos de la RCP con ACA confirmaron el concepto de que *B. burgdorferi* persiste en la piel por largo tiempo.

Rosa *et al.* (1991) por medio de secuencias de cromosomas hom3logos, aislaron *B. burgdorferi*, as3 como la espiroqueta de la fiebre recurrente, *B. hermsii*. La comparaci3n de secuencias de inter-intraespecies, permitieron el dise1o de iniciadores espec3ficos de *B. burgdorferi* para la RCP de todas las cepas examinadas. Los iniciadores de *B. burgdorferi* se subdividieron en dos grupos: todos los aislamientos norteamericanos y los pocos europeos formaron un primer grupo, y un segundo lo formaron los aislamientos europeos y los asi3ticos.

Wise *et al.* (1991) reportaron que una región de 419 pares de bases del gen de la flagelina en la secuencia de *B. burgdorferi* fue utilizado como un blanco para la RCP. Con una prueba de un gen específico y no radioetiquetado, la sensibilidad fue baja observándose en uno de 10 espiroquetas. El fragmento del gen blanco fue conservado en las cepas americanas y europeas de *B. burgdorferi* probadas y entre varias otras borrelias patogénicas.

Lebech *et al.* (1992) usaron la RCP para identificar *B. burgdorferi* en orina y LCR en pacientes con neuroborreliosis de Lyme. Las muestras de orina y LCR se procesaron antes, durante y ocho meses después de una terapia. Se detectó ADN de *B. burgdorferi* en muestras de orina en nueve pacientes, incluyendo dos pacientes con neuroborreliosis crónica por medio de la RCP antes del tratamiento; mientras que las muestras de orina de 4 pacientes restantes obtenidos de tres a seis días después del inicio de la terapia resultaron positivos por la RCP. Todas las muestras de orina obtenidas cuatro semanas después de la terapia fueron negativas. La RCP fue menos sensitiva para LCR, con cuatro pacientes positivos solamente incluyendo uno con neuroborreliosis crónica.

Lebech *et al.* (1992) desarrollaron la técnica de la RCP para utilizarla en la identificación de fragmentos de flagelina de 248 pares de bases de *B. burgdorferi* en orina y fluido cerebroespinal en pacientes. Las especificidades de los productos de la RCP se confirmaron por hibridación de ADN-ADN con una prueba interna. La prueba tuvo una detección límite de 10 *B. burgdorferi* cultivadas *in vitro*. La prueba de RCP fue específica

para el DNA de todos los 21 aislamientos de *B. burgdorferi* en humanos examinados, pero no se logró amplificar *B. hermsii* o *Treponema pallidum*. El ADN de *B. burgdorferi* fue detectado en muestras de orina de nueve pacientes con neuroborreliosis crónica, las cuáles fueron positivos para RCP anterior al tratamiento. La RCP para fluido cerebroespinal fue menos sensitiva, y las muestras de solo cuatro pacientes incluyendo uno con neuroborreliosis crónica fueron positivos.

Rabb et al. (1992) identificaron *B. burgdorferi* en una caso reportado en 1988 de un hombre de 35 años con antecedentes clínicos de la enfermedad de nódulos eritematosos de varios meses de duración. Se analizó una muestra de sangre para diagnosticar por RCP y determinar la secuencia de ADN de la bacteria. El resultado reveló que la bacteria estuvo presente en la muestra probada. Se analizaron biopsias para corroborar la presencia de esta bacteria por medio de la RCP con resultados también positivos.

Andrew et al. (1993) inocularon *B. burgdorferi* en ratones para ver cultivos, sangre e histología de órganos blanco y comparados con la RCP. De un total de 247 muestras de corazón, cerebro, vejiga y sangre, las pruebas coincidieron en un 72% entre la RCP y el cultivo. De 69 especímenes 51 fueron positivos para RCP y 18 en cultivo. La RCP fue 93% mas sensible en los órganos examinados. Los órganos comunmente positivos en cultivo y RCP fueron corazón y vejiga. El cerebro se encontró infectado en 26% de los animales, lo que determinó que después de la inoculación intradermal los órganos más sensibles fueron el corazón y vejiga.

Feir et al. (1994) estudiaron la presencia de *B. burgdorferi* en garrapatas colectadas en el Sureste de Missouri y a los alrededores de la ciudad de St Louis. La espiroqueta fue detectada e identificada por IFI en 1.9% de 443 *A. americanum* y 2.0% de 1,752 *D. variabilis*. Los organismos positivos por IFI fueron verificados por la RCP, por lo que se utilizaron iniciadores específicos de *B. burgdorferi*. La secuencia de ADN amplificó 371 pares de bases como productos de RCP en dos garrapatas positivas de Missouri, lo que mostró un 97-98% de identidad.

Pichon et al. (1995) en una investigación en primavera de 1994 en Rambouillet Forest, Paris, colectaron un total de 249 ninfas de *I. ricinus* sin alimentar para amplificar ADN de la bacteria por la RCP. Los resultados revelaron que 30 de 249 especimenes fueron positivos a *B. burgdorferi*.

Una forma de complementar el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, es el aislamiento del agente causal de la enfermedad, la espiroqueta *B. burgdorferi*, tal como lo hicieron en los trabajos siguientes:

Berger et al. (1985) estudiaron a *B. burgdorferi* previamente aislada con dificultad en lesiones de eritema crónico migratorio en la piel de humanos. La espiroqueta se diagnosticó en seis de 14 biopsias de piel y cultivada en un medio de cultivo BSK . En dos muestras donde se realizó el cultivo de la espiroqueta *B. burgdorferi*; esta fue observada y

se corroboró en cortes histopatológicos. Estos hallazgos *in vitro* puede ser una ayuda para determinar antibióticos específicos para el tratamiento de la enfermedad.

Boyce et al. (1992) reportaron el aislamiento de *B. burgdorferi* a través del medio de cultivo modificado BSK en sangre de una rata *Neotoma fuscipes** en California. Este es el primer reporte del aislamiento de *B. burgdorferi* en el Sur de California, donde se demostró que la espiroqueta es enzootica en las montañas cerca de la mayoría de las poblaciones humanas en el centro del Estado.

MATERIAL Y METODOS

AREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en cuatro colonias pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México: La Estanzuela en Monterrey, Centro antirrábico de Guadalupe, Fomerrey 33 en San Nicolás de los Garza y Provileon en Escobedo respectivamente. (Fig 1)

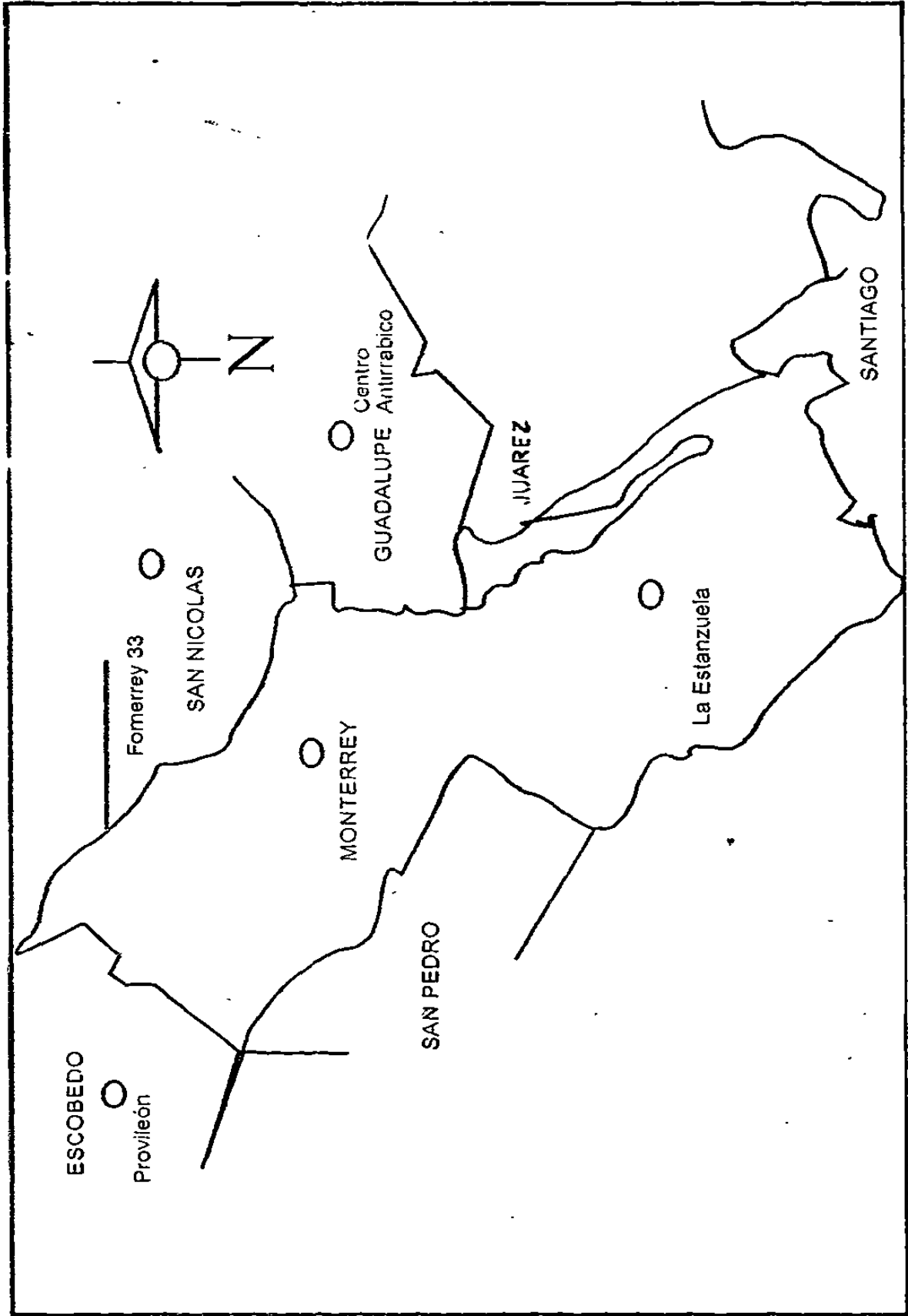
COORDENADAS

Las cuatro localidades corresponden a cuatro municipios del área metropolitana y su ubicación se describe con las coordenadas del siguiente cuadro:

CIUDAD	LONG. NORTE	LAT.OESTE	ALTITUD
Monterrey	25° 40'	100° 19'	540 msnm
Escobedo	25° 49'	100° 19'	500 msnm
Guadalupe	25° 41'	100° 14'	500 msnm
San Nicolás de los Garza	25° 44'	100° 18'	500 msnm

El área metropolitana de Monterrey, México, presenta un clima semiseco, cálido y muy cálido con una temperatura media de 22.1°C. Durante la época de lluvia se presenta una precipitación de 623.5 mm anuales (INEGI, 1984).

Fig. 1.- Area de estudio, (Estanzuela, Centro Antirribico, Fomerrey 33 y Provileón), localizadas en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.



COLECTA DE GARRAPATAS

Las colectas se llevaron a cabo de Marzo de 1994 hasta Agosto de 1995. Los muestreos en las colonias se hicieron completamente al azar, sobre una superficie de aproximadamente el 33% del tamaño total de la colonia, realizando un muestreo aleatorio entre las viviendas con o sin perros en su domicilio. El número de casas muestreadas por colonia varió entre 40 y 100, dependiendo del tamaño de la colonia y de las casas.

Se colectaron garrapatas en los cánidos presentes en cada una de las casas de las localidades estudiadas. Fueron removidas en forma manual ó con pinzas (estadios ninfales) inspeccionando durante 5 minutos las partes más irrigadas del cuerpo del perro (orejas, cuello, etc.) según la técnica descrita por Amerasinghe (1992). Las garrapatas se depositaron en tubos de ensayo de 13 X 100 con tapon y previamente etiquetados, con el fin de transportarlas al laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio de Parasitología para su posterior identificación taxonómica, mediante las claves de Furman y Loomis (1984).

DETECCION DE *Borrelia burgdorferi* EN GARRAPATAS

La detección de *B. burgdorferi* en garrapatas, se realizó de acuerdo a la forma descrita por Persing *et al.* (1990), mediante la homogenización del contenido estomacal de garrapatas en buffer TE, con un pistilo Deltawere No. 95100. El extracto se centrifugó 10 min. a 14,000 rpm y después se enjuagó con buffer de fosfatos (PBS), desechándolo por centrifugación para posteriormente resuspenderlo en agua bidestilada estéril y calentarlo a

94°C por 10 min., para lisar las células y utilizar las muestras directamente para las reacciones de RCP.

TOMA DE MUESTRA DE SANGRE EN LOS PERROS

Las muestras de sangre fueron tomadas con jeringas estériles de 3ml y con aguja de 18 X 14 1/4. Se extrajo de la extremidad anterior mediante canalización de la vena cúbito radial, e inmediatamente después fue transferida a un tubo de ensaye heparinizado estéril y almacenada en hielo para su transporte al laboratorio.

EXTRACCION DE DNA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE CON ANTICOAGULANTE.

El aislamiento de ADN genómico de alto peso molecular de la sangre, se realizó mediante la lisis de membranas celulares, desnaturalización y degradación de las proteínas asociadas al ADN, la extracción con fenol y solución Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1) y la precipitación del ADN con etanol. (Martínez-Soriano *et al.* 1993)

Para conducir este experimento, se extrajeron 3ml de sangre por punción venosa y los linfocitos obtenidos fueron sometidos a un proceso con las siguientes etapas:

- 1.- Las muestras se homogenizaron para evitar la hemolisis. Se colocaron 400µl de sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugaron 5 min. a 5,000 rpm (microcentrifuga Bekman-5415) a 4°C.
- 2.- Separación de las muestras centrifugadas y observación de la formación de tres capas, de las cuáles se extrajo la capa blanca o de leucocitos en un tubo eppendorf.

- 3.- Después se agregó 1ml de solución de lisis de eritrocitos(NH_4Cl al 155 mM; NaHCO_3 al 10 mM; Na_2EDTA pH 7.4 al 0.1 mM), y se agitó con el vortex para luego centrifugar 3min. a 6,000 rpm, repitiendo el procedimiento hasta la completa aclaración del paquete celular.
- 4.- Una vez desechado el sobrenadante, al paquete de glóbulos blancos se le añadieron 400 μl de Buffer TE (10mM de Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM de Na_2EDTA), y después 400 μl de solución de lisis absoluta (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 100mM de Tris-HCl pH 8.0) más 10 μl de la enzima Proteinasa K (10 microgramos/ml). Las muestras se agitaron suavemente e incubaron por 30 min a 50°C en baño de agua.
- 5.- Posteriormente se agregaron 400 μl de fenol saturado y estabilizado (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y 0.2% de 2-mercaptoetanol, 0.1% de hidroxiquinoleína) [Sambrook *et al.*, 1988], y se agitaron los tubos en vortex VWR Scientific por 10 seg y centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min.
- 6.- Luego de descartar el precipitado, al sobrenadante se le agregaron 400 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se agitó la mezcla en vortex brevemente y centrifugó a 10,000 rpm por 5 min.
- 7.-Posteriormente se obtuvo la fase superior acuosa y se colocó en un tubo nuevo, al cual se le agregaron 200 μl de acetato de amonio al 7.5 M. Se dejó reposar la mezcla en hielo por 10 min para luego centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.
- 8.-Finalmente se separó el sobrenadante en tubos nuevos, para luego mezclar con 1 ml de etanol al 95% . Posteriormente refrigerar a -20°C por un mínimo de dos horas.

PURIFICACION DEL ADN

- 1.- Después de haber conservado las muestras por lo menos 2 horas a -20°C , se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm por 5 min. Después de desechar el sobrenadante, fueron colocados en posición invertida sobre papel absorbente por 2 min, o hasta evaporar los residuos de alcohol.
- 2.- Se agregó 1ml de etanol frío al 70%, y los tubos fueron mezclados suavemente con la mano, para luego centrifugar a 10,000 rpm por 5min. Se desechó el sobrenadante y los tubos se pusieron a secar en posición invertida sobre papel absorbente.
- 3.- Por último, se secaron los tubos y se agregó a cada uno 20 μl de Buffer TE. Los ácidos nucleicos extraídos se conservaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de ser utilizados en la reacción de RCP.

CEPA DE REFERENCIA

Las cepas de referencia utilizadas como testigo positivo fueron la *Borrelia burgdorferi* 2591 y la *B. burgdorferi* B31, las cuáles fueron donadas por el Dr. John F. Anderson, de The Connecticut Agricultural Experimental Station, 123 Huntington Street, New Haven, Connecticut, U.S.A. y por el Dr. Robert, S. Lane University of California, Entomology and Parasitology, College of Natural Resources, Berkeley, California 94720. Estas cepas se obtuvieron a partir de aislamientos de garrapatas.

TRATAMIENTO DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

Un ml del medio de cultivo BSK de *B. burgdorferi* fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad centrifugado por 10 min a 14,000 rpm para eliminar el medio de cultivo y precipitar bacterias. Después estas se lavaron en buffer de fosfatos (PBS pH 7.5), y se centrifugaron por 5 min a 14,000 rpm. Luego fueron resuspendidas en 100µl de agua bidestilada y lisadas por calor a 100°C/10 min, para posteriormente alicuotar 20 µl de la muestra y usarse directamente en las reacciones de amplificación de ADN (Debue *et al.*, 1991).

REACCION DE RCP

Para este método se utilizaron tubos eppendorf de 500µl de capacidad. Esta se llevó a cabo en un volumen total de 50µl, que contenía 125 ng aproximadamente del templado de DNA (3µl), 25 pmol (2µl) de cada iniciador (oligonucleótidos sintéticos diseñados para *Borrelia burgdorferi*), 3.0 mM MgCl₂ (3µl) , 200 mM (1µl) de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) y 2.5 unidades (2µl) de la enzima polimerasa Taq (Perkin Elmer. U.S.A.). Para prevenir la evaporacion de las muestras, les fueron agregados 50µl de aceite mineral estéril.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 480, por un lapso aproximado de tres horas a temperaturas apropiadas para la amplificación del ADN. Las muestras fueron inicialmente desnaturalizadas por 2 min a 94°C. Subsecuentemente los ciclos térmicos fueron a 94°C por 1 min (desnaturalización), 55°C por 1 min (alineamiento), y 72°C por 1 min (extensión), mediante el siguiente programa:

ETAPA	TEMP.	TIEMPO	CICLOS
DESNATURALIZACIÓN	94°C	2 min	1
ALINEAMIENTO	94°C	1min	30
ALINEAMIENTO	45°C	1min	30
ALINEAMIENTO	72°C	1min	30
EXTENSION	72°C	2min	1

Una vez terminada la reacción de polimerización, la amplificación se confirmó al fraccionar las muestras en un gel de agarosa al 1.5% (Sambrook *et al.*, 1988), preparado con 1.5% (p/v) de agarosa (SIGMA USA) disuelto en TBE 10X (0.89 mM ácido bórico, 25mM Na₂EDTA pH 8.3) y teñido con bromuro de etidio (0.8 µg/ml).

El fraccionamiento en geles de agarosa se realizó bajo una corriente de 60V y 100V. Para esto se tomaron 8µl de cada porción y fueron mezcladas con 3µl de solución Halt (25% de glicerol, 0.25% de xilencianol, 0.25% de azul de bromofenol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM Na₂EDTA, 1% SDS, en agua bidestilada estéril). Con la ayuda de una micropipeta Eppendorf, cada mezcla fue depositada en orden en los pozos del gel. En los extremos del mismo, fueron colocados 200ng del marcador de pares de bases pBR *Alu* 322) como un marco de referencia para el tamaño de banda esperada.

El gel permaneció siempre sumergido en una solución amortiguadora TBE 0.5X (0.89 mM Tris-HCl, 0.89 mM ácido bórico, 25mM Na₂EDTA pH 8.3). Al término del fraccionamiento el gel fue visualizado en un transluminador de luz ultravioleta (Fotodyne,

modelo UV-440/RM-4), para detectar los fragmentos amplificados y compararlos con el testigo positivo y el marcador de pares de bases preestablecido (Sambrook *et al.* 1988).

Posteriormente los geles fueron fotografiados con una cámara Fotodyne-Polaroid, FCR-10, filtro Tiffen 40.5 MM Red 23A, provista de película Polaroid 667 instantánea.

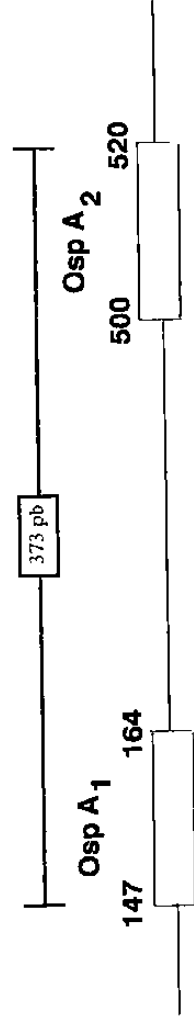
SINTESIS DE INICIADORES

La amplificación de las muestras se realizó utilizando los iniciadores sintéticos diseñados por Rosa *et al.* (1989), los cuales pertenecen a la región del gen OspA de la cepa de referencia *B. burgdorferi* y denominados como 1 y 2. Estos se obtuvieron de un fragmento de 1725 pares de bases de la cepa B31, situados entre las bases nucleotídicas 147 a la 520. El primer iniciador se encuentra en la secuencia nucleotídica 147 a 164, 5'CGA AGA TAC TAA ATC TGT 3'y el segundo iniciador presenta una secuencia oligonucleotídica en la posición de 500 a 520 pb, 5'GAT CAA ATA TTT CAG CTT 3'.(Fig. 4)

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos en el presente estudio fueron ingresados a una base de datos utilizando el programa de cálculo Microsoft Excel. Se realizó un análisis de varianza de tipo factorial para la comparación del número de garrapatas entre localidades. En los casos donde se observaron diferencias significativas en cuanto al número de garrapatas presentes entre localidades, se compararon las medias por una prueba de rango múltiple de Tukey (Zar, 1984).

Fig. 4.- Síntesis de oligonucleótidos (iniciadores), empleados en la amplificación de la cepa patógena de *B. burgdorferi*, perteneciente a la región del gen Osp A.



OspA Iniciador No.1: 5' CGA AGA TAC TAA ATC TGT 3'

OspA Iniciador No. 2: 5' GAT CAA ATA TTT CAG CTT 3'

RESULTADOS

TRATAMIENTO DE LA CEPA DE REFERENCIA

Para constatar la amplificación de las muestras, se obtuvo un control positivo (Fig. 2) a partir de una cepa de referencia 2591 aislada de garrapatas. En la Fig. 3 se observa un fraccionamiento en gel de agarosa 1.5% que nos muestra la amplificación de la cepa de referencia en el carril T, con aproximadamente 373 pares de bases y que proviene del gen de la proteína A en la superficie externa (OspA) de *B. burgdorferi* (Rosa y Schwan, 1993) y en el carril M se aprecia el marcador de pares de bases pBR *Alu* 322 (SIGMA), que nos fragmenta de 1653 a 162 pares de bases y el cuál es el indicado para apreciar el tamaño de banda que amplifica para *B. burgdorferi*.

RCP DE SANGRE

Durante los muestreos realizados de Marzo de 1994 a Agosto de 1995, se obtuvieron un total de 235 muestras de sangre de perro, de las cuatro localidades pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, N.L., las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: Fomerrey 33, 35 muestras, (14.9%), la Estanzuela, 44 (18.7%); C.A. de Guadalupe, 81 (34.5%) y Provileon 75,(31.9%) (Tabla 3). Estas muestras se ordenaron en 24 grupos, los cuáles fueron analizados por RCP, encontrándose dos grupos que amplificaron para el gen OspA, uno de cuatro (25 %) pertenecía a la colonia la Estanzuela y de uno de ocho (12.5%) para el C.A. de Guadalupe (Tabla 6). En la Fig. 3 se pueden observar en el carril 1 y 2 respectivamente con un tamaño de banda de 373 pares de bases aproximadamente.

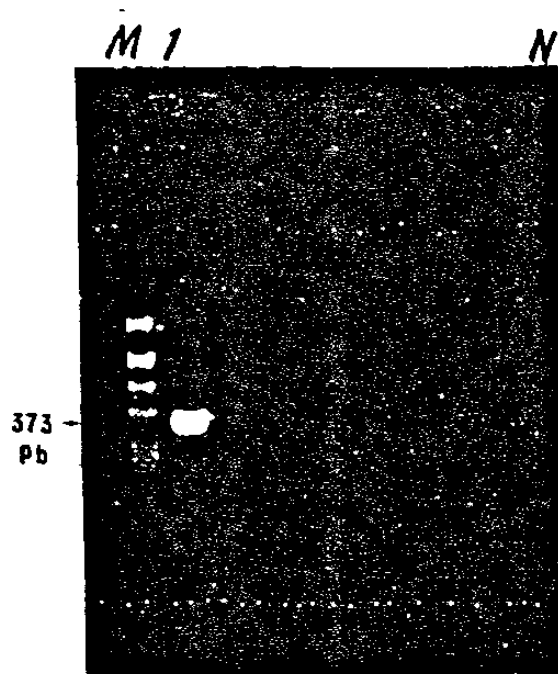


Fig. 2.- Amplificación del ADN de *Borrelia burgdorferi* obtenido a partir de la cepa de referencia CONN-2591. Carril M: Marcador de pares de bases pBR 322 - *alu*. Carril 1: Control positivo. Carril N: Control negativo.

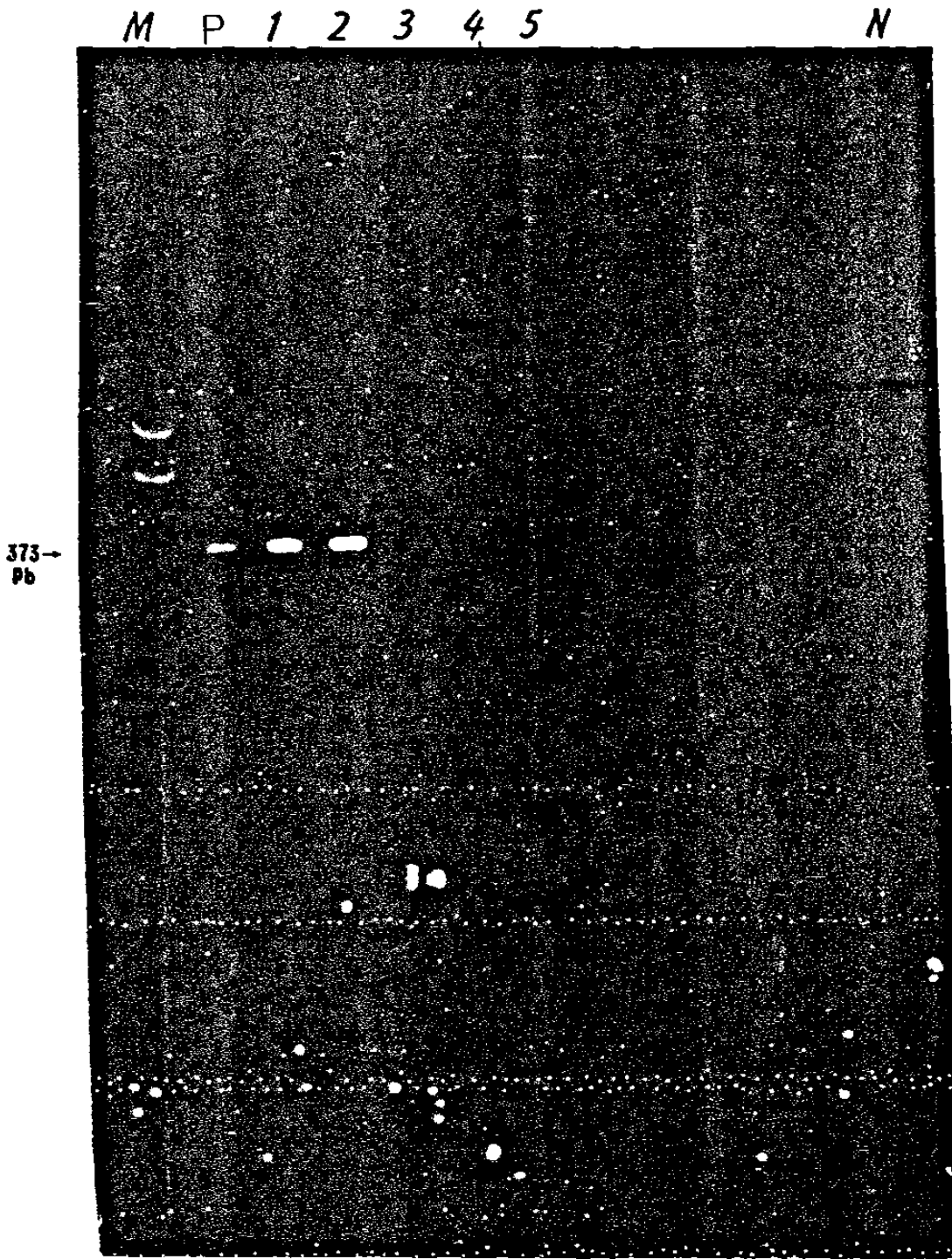


Fig. 3.- Fraccionamiento en gel de agarosa 1.5% que nos muestra el resultado de la amplificación de las muestras positivas. Carril M: Maracador de pares de bases pBR 322+ *alu*. Carril P: Testigo positivo. Carril 1 y 2: Muestras positivas. Carril N: Control negativo.

RCP DE GARRAPATAS

Para el diagnóstico de la presencia de *B. burgdorferi* en las garrapatas obtenidas en los muestreos, estas fueron procesadas según la técnica implementada por Persing *et al.* (1990). Una vez procesadas las muestras se ordenaron en grupos de aproximadamente 10 muestras/tubo de reacción. Un total de 75 grupos fueron probados por medio de la técnica de RCP para la amplificación del gen que codifica para la proteína A de la superficie externa (Osp A), obteniendo resultados negativos en el 100% de las muestras probadas.

PREVALENCIA Y ABUNDANCIA DE GARRAPATAS

Un total de 235 perros fueron muestreados para determinar la prevalencia de *R. sanguineus* por localidad los cuáles se distribuyeron de la siguiente manera: Fomerrey 33/21/35 (60%), Estanzuela 29/44 (65.9%), C.A. Guadalupe 65/81 (80.2%) y Provileon 51/75 (68%) (Tabla 5).

En los grupos etarios del total de perros examinados, de acuerdo a la presencia o ausencia de garrapatas en las cuatro localidades, se observó que en la edad de 1 a 2 años fue donde se encontró el mayor número de perros con garrapatas (n=83), seguido por la edad de 2.1 a 4 años con un total de 33 perros con garrapatas (Tabla 4).

Se colectaron un total de 1,572 garrapatas (Acari: Ixodidae) las cuales se obtuvieron en los muestreos realizados de Marzo de 1994 hasta Agosto de 1995 y de las cuales 633 (40.3%) fueron machos y 939 (59.7%) hembras. De los perros muestreados en las cuatro localidades, la abundancia media de garrapatas por perro, fue de cinco en Fomerrey 33, cuatro en la Estanzuela, siete del C.A. de Guadalupe y nueve de Provileon (Tabla 7). Se

presentó una intensidad de infestación media de aproximadamente siete garrapatas por perro. El total de garrapatas se distribuyó de la siguiente manera, por localidad y especie: 164 (10.43%) garrapatas (47 machos y 117 hembras *R. sanguineus*) fueron colectadas en 35 perros muestreados de la colonia Fomerrey 33, 173 (11%) garrapatas, (84 machos y 87 hembras, *R. sanguineus* y dos hembras de *D. variabilis*) de 44 perros muestreados en La Estanzuela, 581 (37%) garrapatas (237 machos y 342 hembras, *R. sanguineus*, una hembra *D. variabilis* y una hembra *A. cajennense*) de 81 perros muestreados en El Centro Antirrábico de Guadalupe. y 654 (41.6%) garrapatas(262 machos y 391 hembras, *R. sanguineus* y 1 macho *D. variabilis*) de 75 perros muestreados en la colonia Provileon en Escobedo, N.L. (Tabla 8).

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis de varianza de tipo factorial para la comparación del número de garrapatas entre localidades, donde se puede observar que hay diferencias significativas en cuanto al número de garrapatas entre localidades. Cabe señalar que la diferencia entre las localidades La Estanzuela y Fomerrey 33 la fue significativa.

Para la comparación de sexo se realizó un analisis de varianza de tipo factorial, y se encontraron diferencias significativas en cuanto al sexo, excepto en la localidad de la Estanzuela.

IDENTIFICACION TAXONOMICA

Del total de garrapatas colectadas se identificaron 1,567 como *Rhipicephalus sanguineus*, cuatro *Dermacentor variabilis* y una *Amblyomma cajennense*, las cuales se encuentran distribuidas geográficamente en una forma amplia, y se pueden encontrar en nuestro país. La ubicación taxonómica de cada una de estas es la siguiente:

1).- PHYLUM: **Arthropoda**(V. Siebold & Stannius, 1845)

CLASE: **Arachnida** (Lamarck, 1815)

SUBCLASE: **Acari** (Acari, 1817)

ORDEN: **Parasitiforme** (Reuter, 1909)

SUBORDEN: **Ixodida** (Van der Hammen, 1968)

FAMILIA: **Ixodidae** (Canestrini 1890)

GENERO: *Rhipicephalus* (Koch 1844, Nuttall y Warburton 1911, Cooley 1946, Hoogstraal 1956)

(Beaver 1986)

Rhipicephalus sanguineus

(Latreille 1806, Koch 1844, Cooley 1946,)

CARACTERISTICAS:

Son artrópodos de cuerpo oval, generalmente de color café, y partes bucales con palpos tan cortos como anchos, hipostoma igual a los palpos. El capítulo de forma hexagonal y con proyecciones triangulares lateralmente. El escudo no presenta ornamentación y sí ojos laterales. Parte posterior del abdomen con un número de 11 festones y ventralmente se observa la coxa I bifurcada y coxa II a IV con pequeños aguijones externos redondos. El plato espiracular es corto y en forma de coma. Los machos presentan un escudo mucho más amplio que las hembras y sin ornamentaciones. En la coxa IV se observa un pequeño aguijón interno. Platos o escudos accesorios anal y adanal, con el plato espiracular elongado en forma de coma. Su principal hospedero es el perro (*Canis*

familiaris) de ahí el nombre de “garrapata café del perro”; esta presenta una amplia distribución geográfica que abarca desde Canada, E.U.A., México, Argentina, Venezuela, Colombia, Brasil, Australia, Isla Galapagos, etc.(Goddard, 1989).

2).- PHYLUM: **Arthropoda**(V. Siebold & Stannius, 1845)

CLASE: **Arachnida** (Lamarck, 1815)

SUBCLASE: **Acari** (Leach, 1817)

ORDEN: **Parasitiformes** (Reuter, 1909)

SUBORDEN: **Ixodida** (Van der Hammen, 1968)

FAMILIA: **Ixodidae** (Canestrini 1890)

GENERO: **Dermacentor** (Koch, 1844; Nuttal & Warburton 1911 y Cooley 1938) (Beaver 1986)

Dermacentor variabilis

(Cooley, 1938; Gregson, 1956 y Stile, 1908)

CARACTERISTICAS:

Son artrópodos de cuerpo oval y elongado con una coloración café y pequeñas ornamentaciones. Las partes bucales presentan palpos cortos, anchos y moderados, con una base del capítulo rectangular y ligeramente más ancho que largo. Espinas en la coxa I paralelas o con solamente una pequeña divergencia, coxa II y III con aguijones externos mas pequeños y aguijones internos redondos. coxa IV con un pequeño aguijón externo, Platos espiraculares con globetes pequeños y muy numerosos. Los machos presentan una coloración blanca y café donde predomina la ornamentación, el escudo es más amplio que en las hembras y con un patron de coloración gris a plata y un color rojo-café de fondo. En los machos no hay ningún vestigio del aguijón interno sobre la coxa IV. Uno de sus principales hospederos es el perro *C. familiaris*, y de ahí se deriva el nombre de “garrapata del perro americano” y su distribución alcanza del sur de Canada, E.U.A. (excepto en la región de las Montañas Rocallosas) y algunos estados de México, como Tamaulipas, Hidalgo, Chiapas.

Yucatán, etc. Sus principales hospederos en las etapas inmaduras son pequeños mamíferos (roedores), y los adultos prefieren el perro doméstico y ocasionalmente puede alimentarse de humanos.

3).- PHYLUM: **Arthropoda** (V. Siebold & Stannius, 1845)

CLASE: **Arachnida** (Lamarck 1815)

SUBCLASE: **Acari** (Leach 1817)

ORDEN: **Parasitiforme** (Reuter 1909)

SUBORDEN: **Ixodida** (Van der Hammen 1968)

FAMILIA: **Ixodidae** (Canestrini 1890)

GENERO **Amblyomma** (Koch 1844, Robin
Robinson 1929, Cooley and Kohls, 1944)
(Beaver 1986)

Amblyomma cajennense

(Fabricius, 1787)

CARACTERISTICAS:

Artrópodos de forma redonda a oval, predomina la ornamentación blanca y un fondo amarillo-café. Las partes bucales constan de palpos delgados y elongados; el segmento 2 mucho más grande que el segmento 3 y la base del capítulo es rectangular. Presentan un escudo ornamentado con coloración blanca de forma radiada, y con un número de 11 festones presentes en forma de tubérculos quitinosos en la parte posterior. La coxa I con un aguijón externo y ampliamente más largo que el aguijón interno. Espiráculo subtriangular en forma de coma. En el macho la ornamentación es mucho más amplia que en las hembras. *A. cajennense* tiene una distribución desde el extremo sur de Texas, México y América Central. Esta garrapata es considerada de las más agresivas y que puede atacar comunmente al hombre y animales domésticos y silvestres.

DISCUSION

Aunque la enfermedad de Lyme es considerada como la infección más común de las transmitidas por artrópodos en los Estados Unidos y Europa, el diagnóstico se basa generalmente en manifestaciones clínicas, siendo los resultados serológicos de laboratorio de escaso valor epidemiológico debido a una baja producción de anticuerpos en las primeras 3 a 6 semanas de la enfermedad, lo cuál resta valor al diagnóstico ya que se pueden presentar falsos positivos (Salinas-Meléndez *et al.*, 1995). Además el desarrollo de *B. burgdorferi* es lento y esto dificulta el aislamiento en tejidos infectados (Salinas-Meléndez *et al.*, 1995). Por esta razón un sinúmero de investigadores trata de implementar nuevas técnicas diagnósticas basadas en la tecnología del ADN. (Salinas-Meléndez *et al.*, 1995)

La serología puede ser negativa o equívoca en las primeras etapas de la enfermedad ya que la respuesta inmune es escasa. Las reacciones cruzadas de anticuerpos puede causar falsos positivos en pacientes con otras infecciones causadas por espiroquetas (Salinas-Meléndez *et al.*, 1995).

La amplificación de ADN es altamente sensible y específica, por lo que se le ha considerado una excelente herramienta para la identificación del agente causal de la enfermedad de Lyme en muestras clínicas, así cómo en vectores y reservorios. Este sistema se aplica en la detección de patógenos en sangre, fluidos del cuerpo, muestras de tejido, así como en algunos artrópodos considerados como vectores potenciales de la enfermedad (Salinas-Meléndez *et al.*, 1995).

La amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa fue adaptada en este trabajo por rápida, sensible y específica en la detección de

B. burgdorferi. La secuencia de los blancos para la amplificación por la RCP, se realizó en el gen que codifica la proteína A de la superficie externa (Osp A). El diagnóstico de *B. burgdorferi*, fue realizado a partir de 235 muestras de sangre de perros, (ordenadas en 24 grupos) colectadas durante un muestreo aleatorio en cuatro localidades del área metropolitana de Monterrey, N.L. Los resultados obtenidos nos muestran la presencia de *B. burgdorferi* en dos grupos, uno de ellos proveniente del Centro Antirrábico de Guadalupe, N.L., y el otro en la localidad de la Estanzuela, lo cual nos confirma la sensibilidad y especificidad de la RCP, en la detección de la espiroqueta *B. burgdorferi*. Los resultados obtenidos coinciden con los de Salinas-Mélendez *et al.* quienes en 1992 reportan la presencia de *B. burgdorferi* por medio de la técnica de ELISA en 8 pacientes del estado de N.L. con antecedentes de picadura por insectos hematófagos. Después, en 1995 Salinas-Meléndez *et al.* detectaron la espiroqueta en dos biopsias de piel en pacientes con acrodermatitis y en el LS de un perro por medio de la técnica de RCP. Estos resultados muestran la importancia que representa la enfermedad de Lyme en la República Mexicana, así como la importancia que tienen los cánidos considerados hospederos de la *B. burgdorferi*. Tal como lo reportó Magnarelli *et al.*, en 1985 al encontrar 52 perros seropositivos en el Sureste y Surcentro de Connecticut. Un año después Burgess encontró un 53% de 380 perros, positivos a anticuerpos por IFI en Wisconsin. También Greene *et al.* en 1988 detectaron un 3.6% de 600 perros como positivos a anticuerpos contra *B. burgdorferi*. Por otra parte Cohen *et al.*, utiliza la técnica de IFI para diagnosticar la presencia de anticuerpos para *B. burgdorferi* en perros de Texas y encuentra un 5.5% positivos. En 1990, Artsob *et al.* realizaron una investigación en suero de 75 perros de

Canadá y reportaron títulos de 1:256. La técnica de la RCP también es utilizada en el diagnóstico de *B. burgdorferi* en perros, tal es el caso de Malloy *et al.*, (1990) quienes demostraron la presencia de la espiroqueta en perros por la RCP:

El diagnóstico del agente causal de la borreliosis de Lyme en sangre, corrobora lo realizado por Rabb *et. al* en 1992 al identificar la bacteria *B. burgdorferi* en la sangre de un hombre de 35 años, con antecedentes clínicos de la enfermedad de Lyme, mediante la RCP. Aunado al estudio de Andrew *et. al* en 1993 quienes utilizaron la RCP para diagnosticar *B. burgdorferi* en sangre y cultivos.

Sin embargo, se tiene la creencia que el diagnóstico de *B. burgdorferi* en sangre tiene algunas limitantes, a las que hace referencia Malloy *et al.* (1990) quienes escogieron un total de 15 muestras de sangre diagnosticadas previamente como positivas a la enfermedad de Lyme por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estas fueron escogidas para un análisis de RCP en base a los síntomas clínicos y serológicos (títulos 1:64). Los resultados revelaron que 1 de 15 muestras de sangre demostró sensibilidad y especificidad a la prueba a lo que atribuyen que haya una baja prevalencia de la infección. Así mismo Benach *et al.* (1983) realizaron un trabajo en Long Island y la provincia de Weschester, N.Y. donde aislaron la espiroqueta en 2 de 36 muestras de sangre en pacientes en quien presentaron signos y síntomas sugestivos de la enfermedad de Lyme. Se concluye que la baja frecuencia de los aislamientos es probablemente asumidos a la persistencia de la espiroqueta en sangre (espiroquetemia) y la baja densidad en estas condiciones. A todo lo anterior le agregamos la evidente propagación del agente causal en el hospedero, además de ser una enfermedad de largo término, lo que abre la posibilidad de que quizá haya una

espiroquetemia intermitente. Pachner *et al* (1993) refuerza esto mismo al mencionar que la prueba de RCP es menos sensitiva que los cultivos en la detección de *B. burgdorferi* en muestras de sangre, posiblemente por la presencia de inhibidores de la sangre.

La secuencia de ADN blanco utilizado en la amplificación, fue el gen que codifica para la proteína externa A (Osp A), diseñado por Rosa *et al.* en 1989, al realizar el primer estudio en el cual utilizaron la RCP para la detección de *B. burgdorferi*, en cultivos de esta bacteria. El gen Osp A también fue amplificado en el estudio realizado por Nielsen *et. al* (1990), donde utilizaron la amplificación de ADN en un fragmento de 145 pares de bases del gen Osp A. Así mismo Wise *et. al* (1991) emplearon al gen Osp A de una región de 419 pares de bases en cepas Americanas y Europeas.

La reacción en cadena de la polimerasa también es utilizada en el diagnóstico de *B. burgdorferi* en las garrapatas vectoras. En el presente estudio se analizaron un total de 1,572 garrapatas (1,567 *R. sanguineus*, 4 *D. variabilis* y 1 *A. cajennense*), con las cuales se organizaron grupos de 10 garrapatas c/u, dando resultados negativos en su totalidad, en contraste a lo realizado por Persing *et. al* en 1990 al emplear la RCP en la amplificación de el gen Osp A de la cepa B 31 para identificar *B. burgdorferi* en 15 de 15 colonias de ninfas de *I. dammini* , así mismo Feir *et al* en su estudio realizado en Missouri y St Louis donde diagnostican la presencia de *B. burgdorferi* en garrapatas *A. americanum* y *D. variabilis*, por medio de la IFI y verificados por la RCP, utilizando iniciadores específicos para *B. burgdorferi*. La secuencia de ADN amplificada fue de 371 pares de bases. Un año mas tarde Pichon *et al.* realiza una investigación en París, donde utilizó 249 ninfas de *I. ricinus* para amplificar ADN de la bacteria *B. burgdorferi* por medio de la RCP, donde obtienen 30

especímenes positivos. La especie *D. variabilis* , aunque fue negativa a la presencia de *B. burgdorferi* en este estudio, ya se ha reportado como vector de la enfermedad en otras latitudes, según el estudio realizado por Piesman-Sinsky (1988), en E.U.A. donde esta adquiere y transmite la infección aún bajo condiciones de laboratorio. En otro estudio Luckhart *et al.*, (1991) en Alabama diagnostica la presencia de *B. burgdorferi* en garrapatas *A. americanum*, *D. variabilis*, *I. scapularis* y *R. sanguineus* por medio de IFI. También Mukolwe *et al.* en 1992 reportaron a *D. variabilis* como vector de *B. burgdorferi*.

La enfermedad de Lyme representa un gran problema de salud pública en los Estados Unidos de América y Europa debido a la alta prevalencia que muestra en los últimos años, esto aunado a la extensa variedad de vectores y hospederos con que cuenta. En México ha tomado importancia a partir del primer reporte de Salinas-Meléndez en 1992, por lo cuál ya es considerada como un problema relacionado con la entomología médica, debido a esto el presente estudio debe dar paso a otros subsecuentemente para realizar programas de vigilancia epidemiológica en los perros urbanos ya que representan un factor de alto riesgo para la comunidad.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio referente a la enfermedad de Lyme en cánidos pertenecientes a el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León nos llevan a las siguientes conclusiones:

- 1.- La espiroqueta *B. burgdorferi*, agente causal de la enfermedad de Lyme, está presente en la población de cánidos del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.
- 2.- La prueba de la RCP, es una técnica altamente confiable para el diagnóstico de *B. burgdorferi* en sangre, debido a la sensibilidad y especificidad que presenta hacía esta bacteria.
- 3.- El gen de la superficie de la proteína externa A (Osp A), resulta ser un buen blanco para la amplificación del ADN de la espiroqueta *B. burgdorferi*.
- 4.- No se encontró la espiroqueta *B. burgdorferi* en muestras de garrapatas, probablemente debido a una baja espiroquetemia.
- 5.- En los cánidos del área metropolitana se detectaron tres especies de garrapatas: *D. variabilis*, *A. cajennense* y *R. sanguineus*.
6. La especie de garrapata más comunmente encontrada en las localidades de estudio fue *R. sanguineus*, probablemente debido a su amplia distribución geográfica.
7. De las garrapatas identificadas en la zona de estudio, solo *D. variabilis* ha sido reportada como vector de la enfermedad de Lyme en otros países, pero en este estudio fue negativa según el análisis por RCP.

LITERATURA CITADA

- Amerasinghe, F.P.; W.L. Breish, A.F. Azad, W.F. Gimpel, M. Grep, K. Weidhart, B. Pagac, J. Piesman, J. Sandt, T.W. Scott & K. Sweeney. 1992. Distribution, density and Lyme disease spirochaete infection in *Ixodes dammini* (Acari, Ixodidae) on white tailed deer in Maryland J Med. Entomol 29: 54-61
- Anderson, J. F.; L. A. Magnarelli, W. Burgdorfer & A. G. Barbour. 1983. Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from Connecticut. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:818-824
- Artsob, H.; M. Garvie, R. J. Cawthorn, B. Horney, R. Maloney, D. Dick & S. Mcburney. 1992. Isolation of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from *Ixodes dammini* (Acari Ixodidae) collected on Prince Edward Island, Canada J. Med Entomol 29 1063-1066
- Benach, J. L.; E. M. Bosler, J. P. Hanrahan, J. I. Coleman, G. S. Habicht, T. F. Bast, D. J. Cameron, J. L. Ziegler, A. G. Barbour, W. Burgdorfer, R. Edelman R. A. & R. A. Kaslow. 1983. Spirochetes isolated the blood of two patients with Lyme disease The New England J Med 308 740-742
- Berger, B. W.; M. H. Kaplan, Y. R. Rothenberg & A. G. Barbour. 1985. Isolation and characterization of the Lyme disease spirochete from the skin of patients with erythema chronicum migrans Journal of the American Academy of Dermatology. 13:444-449.
- Boyce, W. M.; R. N. Brown, B. C. Zinge, R. B. Lefebvre & R. S. Lane. 1992 First isolation of *Borrelia burgdorferi* in southern California J. Med Entomol. Vol. 23. No. 3. Pp. 496-500
- Burgdorfer, W.; R. S. Lane, A. G. Barbour, R. A. Gresbrink & J. R. Anderson. 1985. The "Western Black-legged" tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. Am. J. Trop Med Hyg 35 925-930.
- Burgess, E. C. 1986. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme Disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) American Association for laboratory animal Science 42:288-290.
- Cohen, N. D.; C. N. Carter, M. A. Thomas, A. B. Angulo & A. K. Eugster. 1990. Clinical and epizootiologic characteristic of dogs seropositive for *Borrelia burgdorferi* in Texas 110 cases. JAVMA 197 893-898
- Debue, M.; P. Gautier, C. Hackel, A. V. Elsen, A. Hersog, G. Bigaignon & A. Bollen. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in biological samples using the polymerasa chain reaction assay Res Microbiol 142 565-572

- Feir, D.; C. R. Santanello, B. L. Song-Xie, E. Masters, R. Marconi & G. Weil. 1994.** Evidence supporting the presence of *Borrelia burgdorferi* in Missouri. Am. J. Trop. Hyg. 51:475-482.
- Furman, D. P. & E. C. Loomis. 1984.** The ticks of California (Acari: Ixodida). Bulletin of the California insect survey, Volumen 25, University of California Publications.
- Gordard, J. 1989.** Ticks and tickborne disease affecting military personnel. Medical Entomology Section, Epidemiology Division, USAF, School of Aerospace Medicine, Human Systems Division (AFSC), Brooks Air Force Base, Texas.
- Greene, R. T.; J. F. Levine, E. B. Breitschwerdt & H. A. Berkhoff. 1988.** Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in North Carolina. Am. J. Vet. Res. 49:473-476
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1984.** Nomenclator de Nuevo León. Dirección General de Geografía.
- Johnson, R. C.; G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt & D. J. Brenner. 1984.** *Borrelia burgdorferi* sp. nov. etiologic agent of Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:496-497.
- Kahl, O.; C. Janetzki, J. S. Gray, J. Stein & R. J. Bauch. 1992.** Tick infection rates with *Borrelia. Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. Medical and Veterinary Entomology 363-366.
- Kruger, W. H. & M. Pulz. 1991.** Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid by the polymerase chain reaction. J. Med. Microbiology 35:98-102
- Lebech, A. M. & K. Hansen. 1992.** Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. J. Of Clinical Microbiology. 1646-1653.
- Levine, J. F.; D. E. Sonenshine, W. L. Nicholson & R. T. Turner. 1991.** *Borrelia burgdorferi* in Ticks (Acari: Ixodidae) from coastal Virginia. J. Med. Entomol. 668-674.
- Luckhart, S.; G. R. Mullen & 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. 652-657.
- Magnarelli, L. A.; J. F. Anderson & J. B. McAninch. 1990.** Serologic analyses of cottontail rabbit for antibodies to *Borrelia burgdorferi*. J. of Clinical Microbiology. 890-893

- Magnarelli, L. A.; J. F. Anderson, PhD, E. Shaw, BS, J. E. Post, DVM, PhD, F. C. Palka, DVM.** 1988. Borreliosis in equids in northeastern United States. *Am. J. Vet. Res.* 359-362
- Magnarelli, L. A.; J. M. Oliver, H. J. Hutcheson & J. F. Anderson.** 1992. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in deer and raccons. *J. Of Wildlife Disease.* 562-568.
- Magnarelli, L. A.; PhD, J. F. Anderson, PhD, A. F. Kaufmann, DVM, L. L. Lieberman & DVM, G. D. Whitney, DVM.** 1985. Borreliosis in dogs from Southern connecticut. *JAVMA.* Vol. 186. No. 9.
- Malloy, D. C.; R. K. Nauman & H. Paxton.** 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction *J Clinical Microbiol* 28 1089-1093.
- Marcus, L. C.; M.M. Paterson, R. E. Gilfillan, & P. H. U rband.** 1985. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England Horses serologic survey *Am. J. Vet. Res.* 46.2570-2571.
- Martínez Soriano, J.P.; E.L. Cab-Barrera; R. Tamez-Gonzalez y D.S. Leal-Klevezas.** 1993. Deteccion de Brucella abortus por medio de la reaccion en cadena de la polimerasa *Bioquimica* 18 P P 10-16
- Martínez, V. I.O.** 1995. Deteccion molecular de *Brucella* sp en muestras de sangre y leche de caprinos Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Biologicas U A N.L Monterrey, N L.
- Melchers, W.; J. Meis, P. Rosa, E. Claas, L. Nohlmans, R. Koopman, A. Horrevort & J. Galama.** 1991. Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsias from patients with Lyme disease *Journal of Clinical Microbiology.* 2401-2406.
- Monsen, S. E.; W. E. Hazeltine & T. L. Henderson.** 1990. Lyme Borreliosis surveillance in Butte County, California. *Bull Soc Vector Ecol* 15.63-72.
- Mukolwe, S. W.; A. A. Kocan, R. W. Barker, K. M.Kocan & G. L. Murphy.** 1992. Attempted transmission of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales:spirochetaeaceae) (JDI Strain) by *Ixodes scapularis* (Acari Ixodidae) *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum*. *J Med Entomol.* Vol 29. No. 24. Pp. 673-677
- Nielsen, S. L.; K. K. Y. Young & A G. Barbour.** 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by the polymerase chain reaction Molecular and cellular probes, Academic press limited. Vol 4 pp 73-79
- Pachner, A.R.; N. Ricalton & Delaney.** 1993. Comparison of polimerasa chain reaction with culture and serology for diagnosis of murine experimental Lyme borreliosis. *J. Clinical Microbiol* 31: 208-214.

- Persing, D. H.; S. R. Telford III, A. Spielman & S. W. Barthold. 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. J. Microbiol 28:566-572
- Pichon, B.; E. Godfroid, B. Hoyois, A. Bollen, F. Rodhain & C. P. Eid. 1995. Simultaneous infection of *Ixodes ricinus* nymphs by two *Borrelia burgdorferi* sensu lato species: possible implications for clinical manifestations. Emerging Infectious Diseases.1:89-90.
- Piesman, J. & R. J. Sinsky. 1988. Ability of *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* (Acari Ixodidae) to Acquire, Maintain and Transmit Lyme Disease Spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) J Med Entomol 25:336-339.
- Rabb, D. C.; J. L. Leshner, & F. W. Chandler. 1992. Polymerase chain reaction confirmation of *Borrelia burgdorferi* in benign lymphocytic infiltrate of dermis J. Of the American Academy of Dermatology. 26 1:267-268
- Rawlings J. A.; P. V. Fournier & G. J. Teltow. 1987. Isolation of *Borrelia* Spirochetes from Patients in Texas Journal of clinical Microbiology 1148-1150
- Rawlings, J. A. & G. J. Teltow. 1994 Prevalence of *Borrelia* (Spirochataceae) Spirochetes in Texas ticks J Med Entomol 297-301
- Rosa, P.A. & T.G. Schwan. 1989. A specific assay for the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* using the polimerase chain reaction J Infect Diss. 44 1018-1029
- Rosa; P.A., D. Hogan & T. G. Schwan 1991 Polymerase Chain Reaction Analyses Identify Two Distinct Classes of *Borrelia burgdorferi*. Journal of Clinical Microbiology 524-532
- Saiki, R. K.; D. H. Gelfand S. Stoffer, S. J. Scharf, H Higuchi, G. R. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich. 1988. Primers directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. Science 239 487-491
- Salinas, M. J. A.; R. G. Tamez, C. Arroyave & O. L. Welsh. 1992. Enfermedad de Lyme en Nuevo Leon Memorias de las "VI jornadas Medicas" del Hospital Metropolitano "Dr Bernardo Sepulveda" v I Encuentro de Investigacion Biomedica. Facultad de Medicina de la U.A.N.L. efectuado del 19 al 23 de Octubre de 1992 pp. 37.
- Salinas, M. J. A.; R. G. Tamez, O. L. Welsh & H. A. S. Barrera. 1995 Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in human skin biopsies and dog synovial fluid by the Polymerase Chain Reaction.Rev. Lat.-Amer Microbiol 37 7-10

- Sambrook, J.; E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1988.** Molecular cloning A Laboratory Manual. Second edition Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1988.** Normales Climatológicas (1941-1970). Dirección General de Estudios, Información y Estadística Sectorial. Segunda Edición pp 509 y 518.
- Sharon, M. D.; W. A. Rowley, M. G. Novak & K. B. Platt. 1992.** Rates of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* (Acari Ixodidae) in Southwestern Wisconsin J. Med. Entomol Vol 29 No. 2 pp. 314-317.
- Teltow, G.L.; P. V. Fournier & J. A. Rawlings. 1991.** Isolation of *Borrelia burgdorferi* from arthropods collected in Texas Am J Trop Med. Hyg 44 469-474
- Zar, J:H: 1984.** Biostatistical Analysis 2da. edición Prentice-Hall inc Englewood Cliffs. New Jersey. pp 718

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.- Area de estudio, (Estanzuela, Centro Antirrábico, Fomerrey 33 y Proviléon), localizadas en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.
- Fig. 2.- Amplificación del ADN de *Borrelia burgdorferi* obtenido a partir de la cepa de referencia CONN-2591.
- Fig. 3.- Fraccionamiento en gel de agarosa 1.5% que nos muestra el resultado de la amplificación de las muestras positivas.
- Fig. 4.- Síntesis de oligonucleótidos (iniciadores), empleados en la amplificación de la cepa patógena de *Borrelia burgdorferi*, perteneciente a la región del gen Osp A.
- Fig. 5.- *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille). Vista dorsal, hembra. Garrapata con amplia distribución geográfica y la más abundante en los cánidos del área metropolitana de Mty, N.L.
- Fig. 6.- *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille). Vista ventral, hembra. Garrapata comunmente encontrada en los cánidos pertenecientes al área metropolitana de Mty, N.L.
- Fig. 7.- *Dermacentor variabilis* (Say). Vista dorsal, macho. Garrapata reportada como uno de los principales vectores de la enfermedad de Lyme en los E.U.A.
- Fig. 8.- *Dermacentor variabilis* (Say). Vista ventral, Macho. Garrapata considerada como vector potencial de la enfermedad de Lyme.

Fig. 9.- *Amblyomma cajennense* (Fabricius). Vista dorsal hembra. Garrapata poco abundante en los cánidos del área metropolitana de Mty, N.L.

Fig. 10.- *Amblyomma cajennense* (Fabricius). Vista ventral hembra. Garrapata poco abundante en los cánidos del área metropolitana de Mty, N.L.

Fig. 11.- Placa espiracular de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) hembra.

Fig. 12.- Placa espiracular de *Dermacentor variabilis* (Say) hembra.

Fig. 13.- Placa espiracular de *Amblyomma cajennense* (Fabricius) hembra.

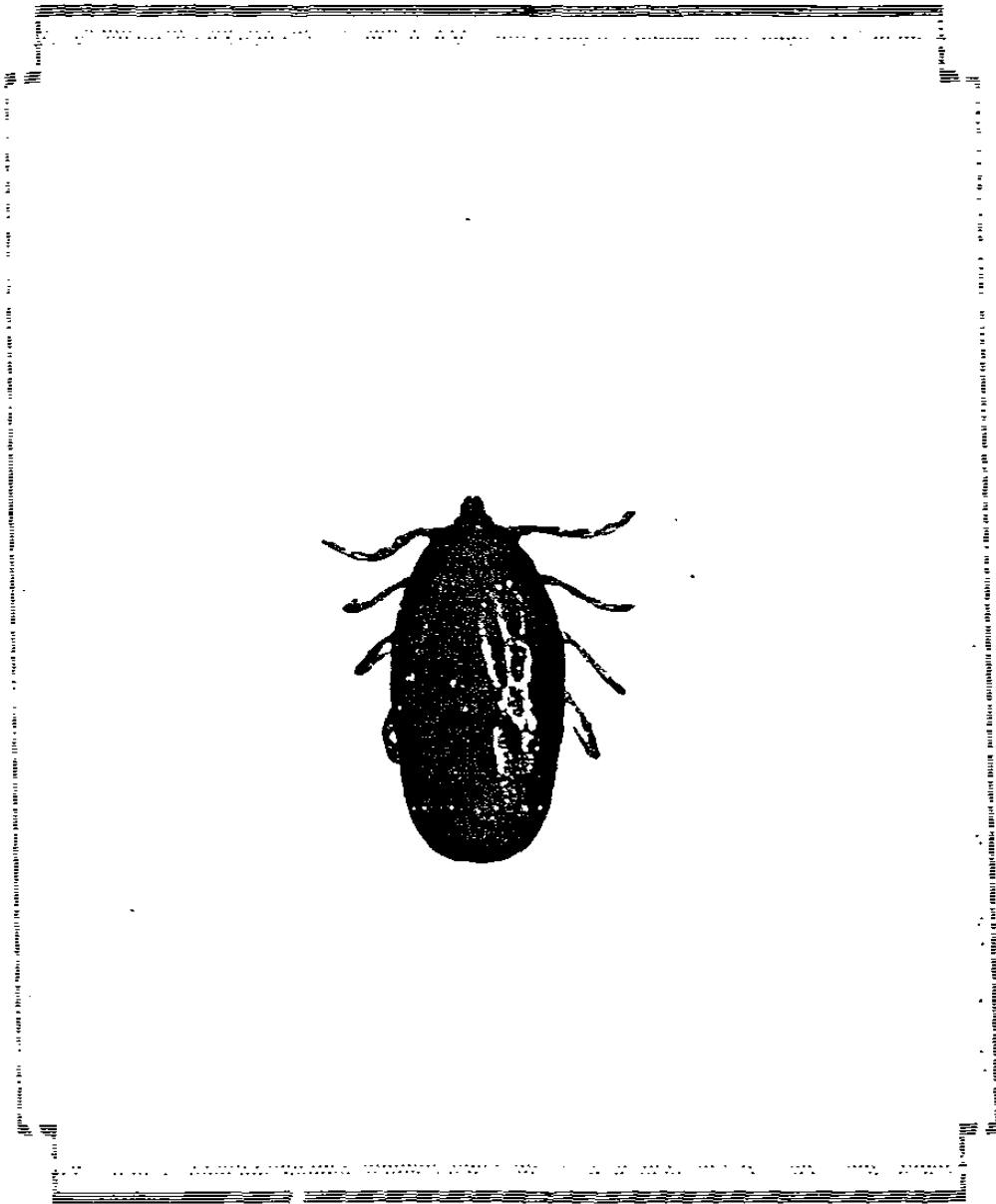


Fig. 5.- *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) Vista dorsal, hembra. Garrapata. con amplia distribución geográfica y la mas abundante en los cánidos dei área metropolitana de Mty, N.L.

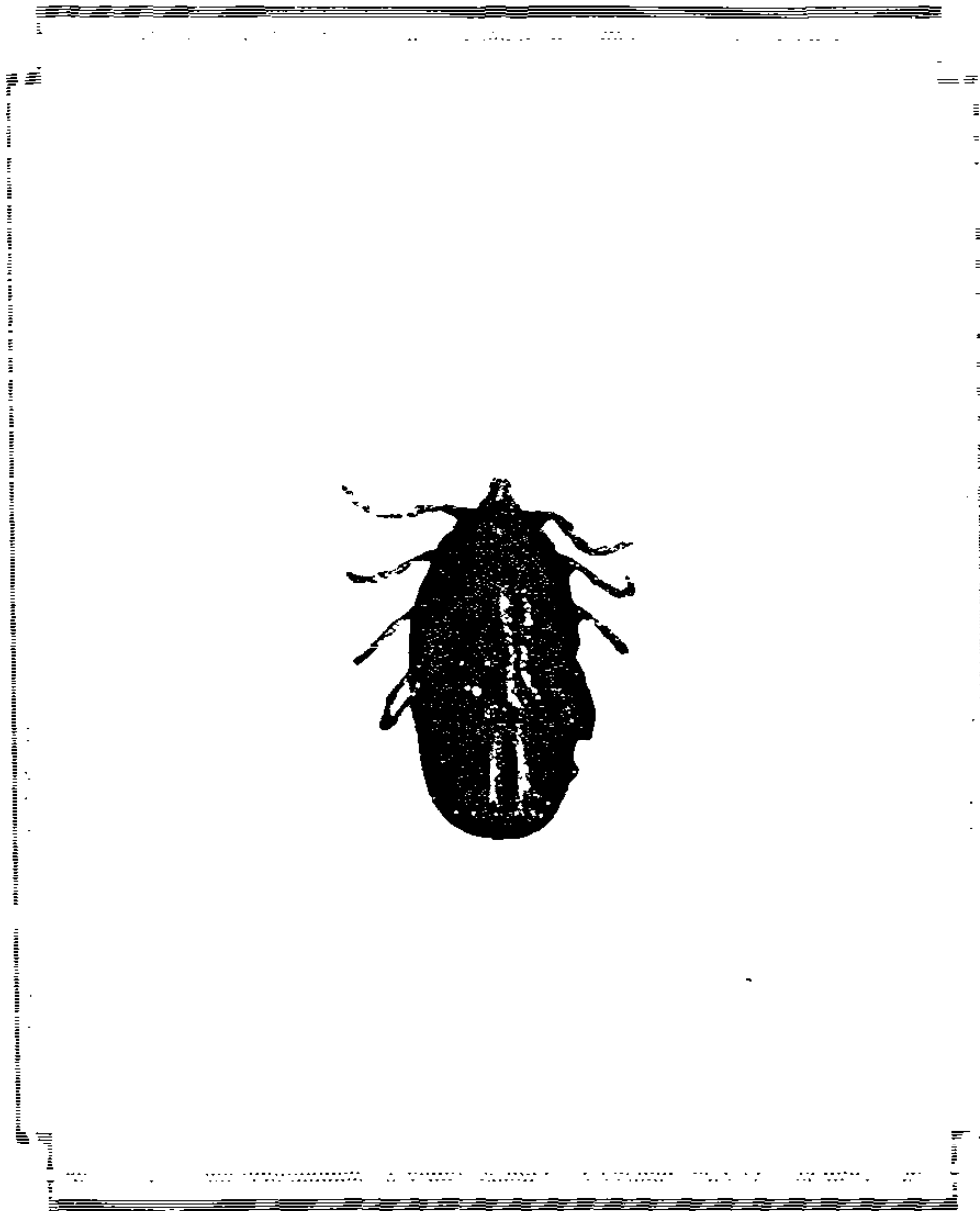


Fig. 6.- *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) Vista ventral, hembra. Garrapata comunmente encontrada en los cánidos pertenecientes al área metropolitana de Mty, N.L.



Fig. 7.- *Dermacentor variabilis* (Say). Vista dorsal, macho. Garrapata reportada como uno de los principales vectores de la enfermedad de Lyme en los E.U.A.

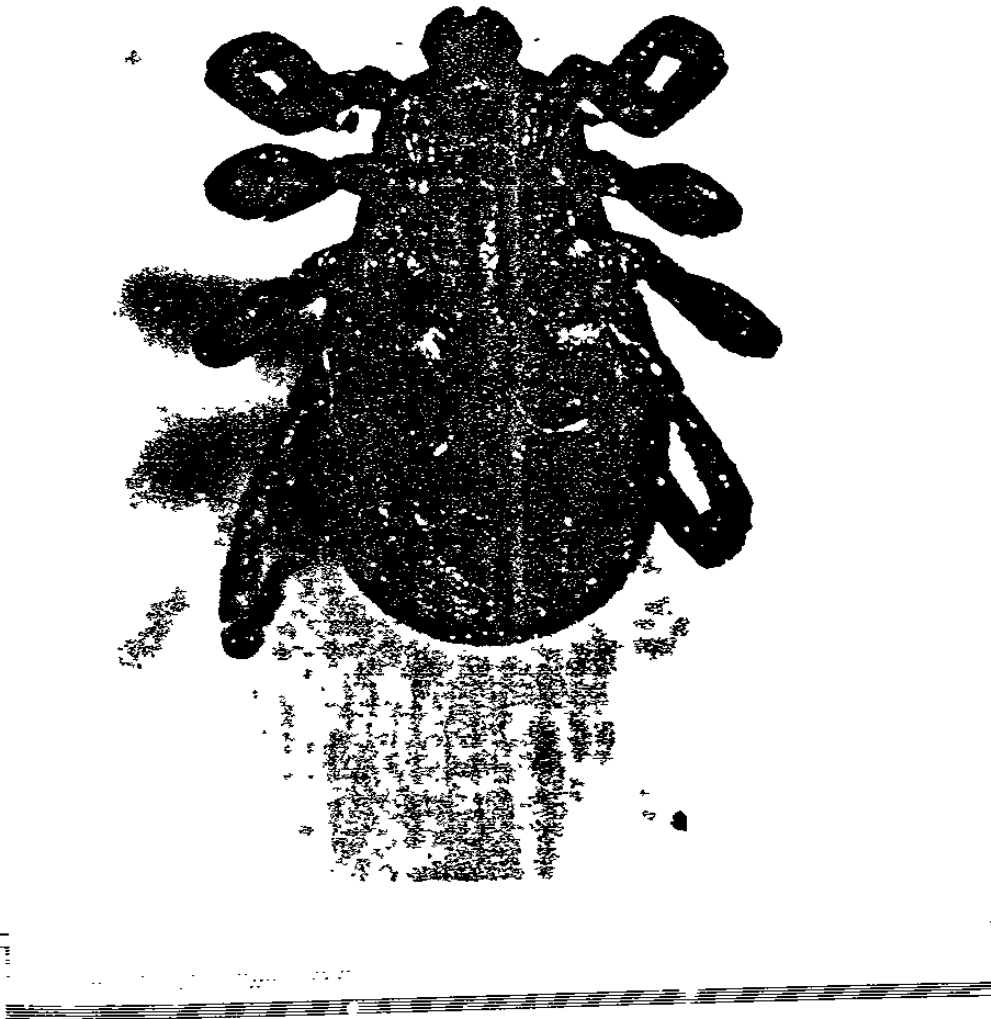


Fig. 8.- *Dermacentor variabilis* (Say). Vista ventral. macho. Garrapata considerada como un vector potencial de la enfermedad de Lyme.

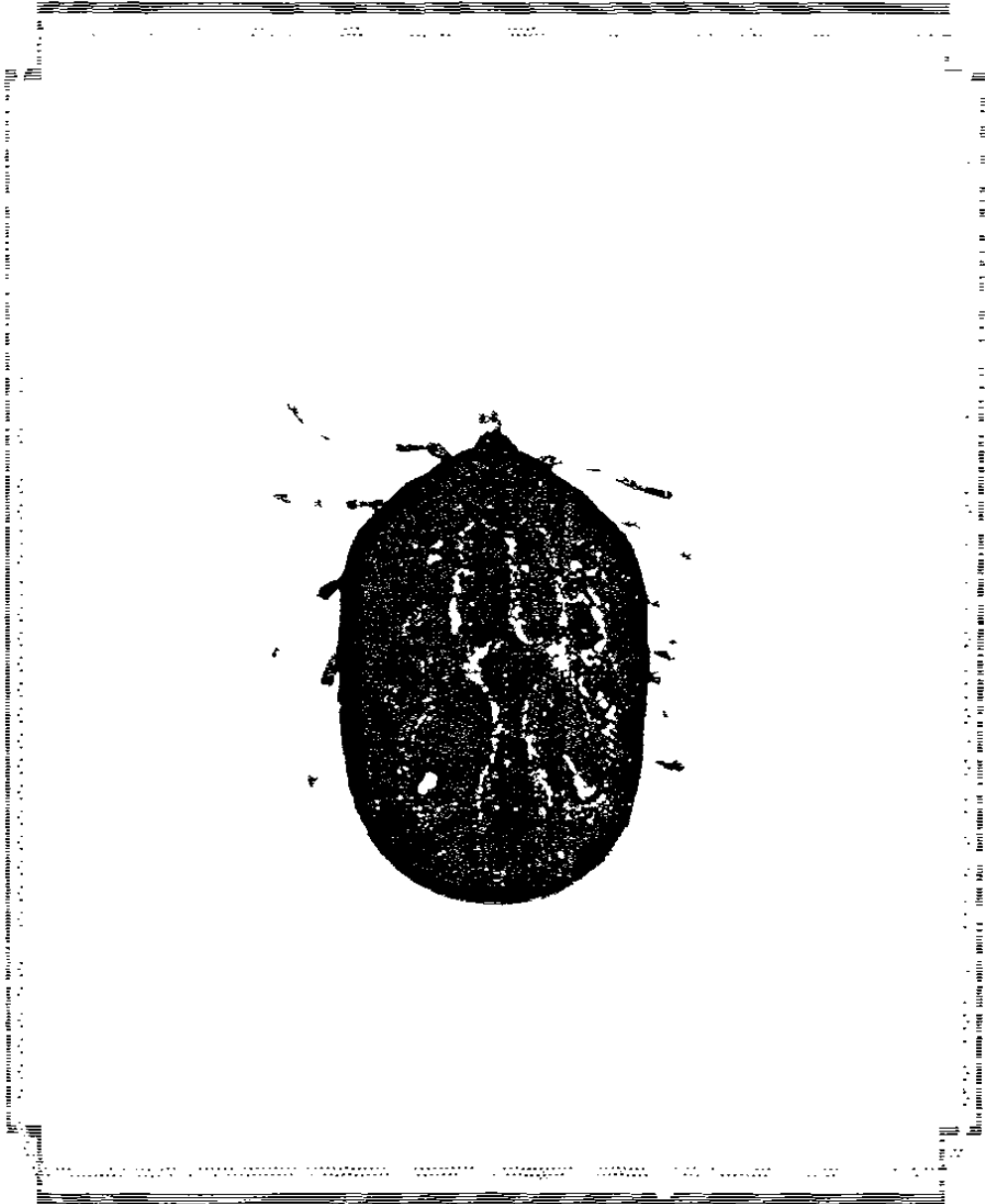


Fig. 9.- *Amblyomma cajennense* (Fabricius). Vista dorsal hembra. Garrapata poco abundante en los cánidos del area metropolitana de Mty, N L.

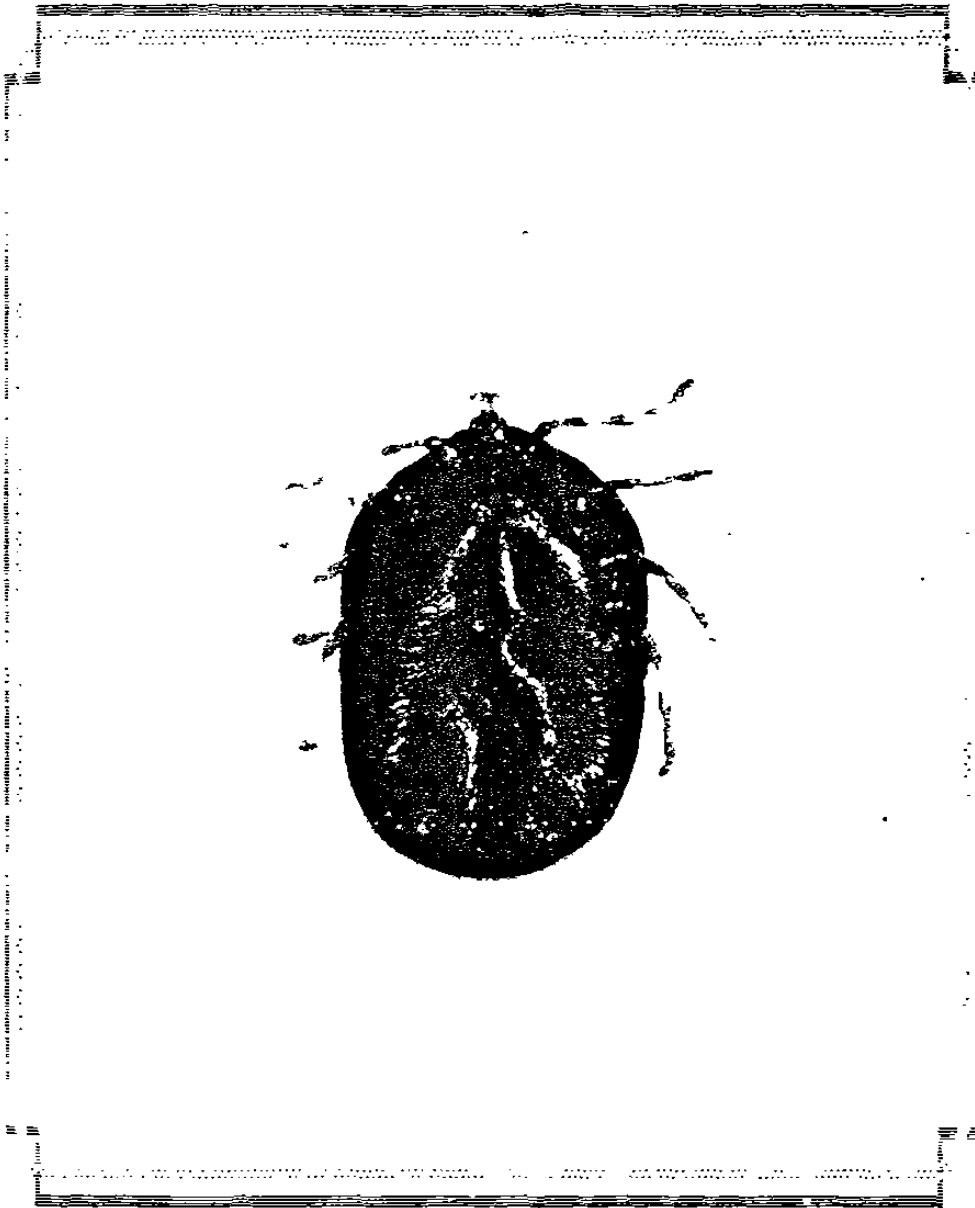


Fig. 10.- *Amblyomma cajennense* (Fabricius). Vista ventral hembra. Garrapata poco abundante en los cánidos del area metropolitana de Mty, N.L.

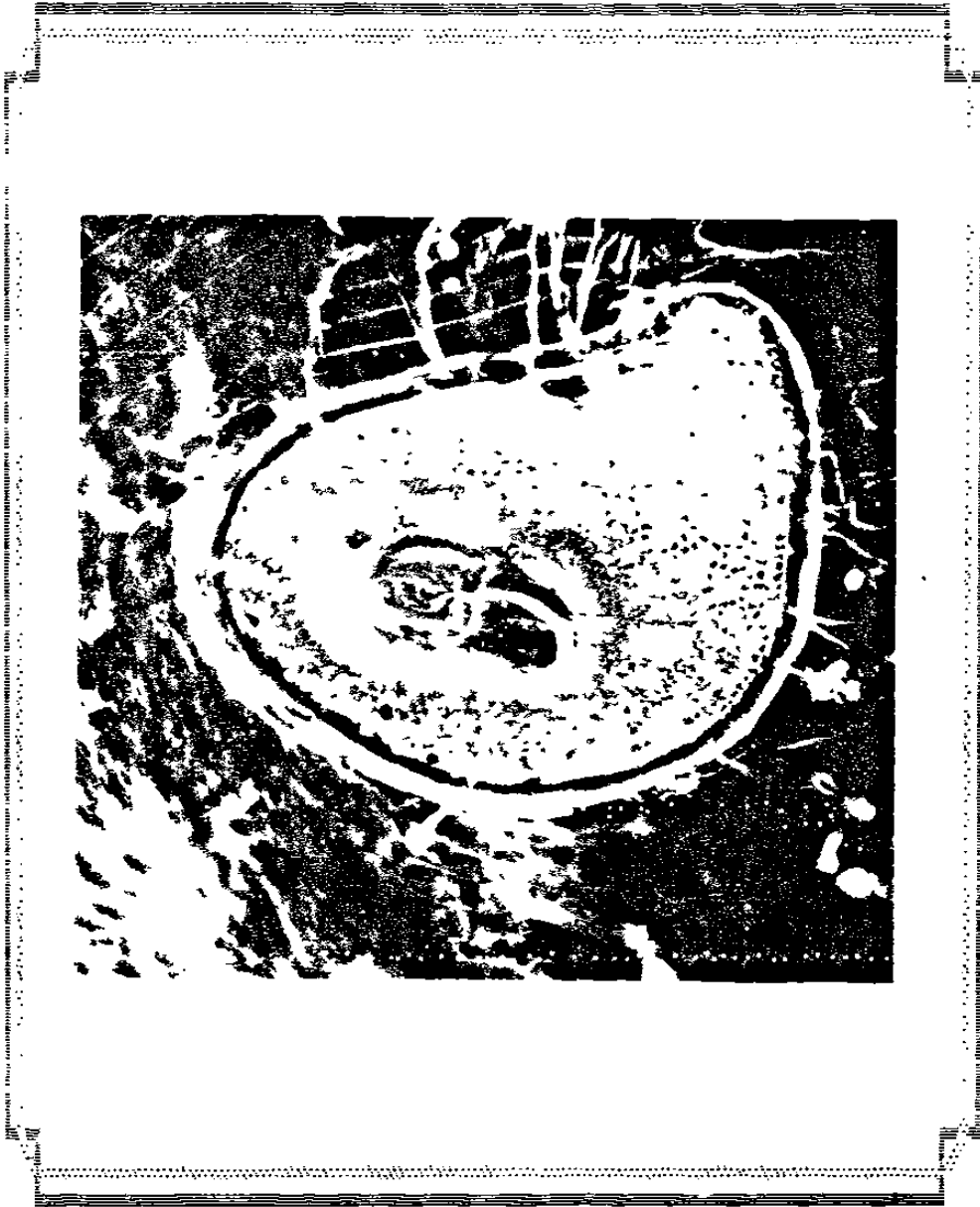


Fig. 11.- Placa espiracular de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) hembra.

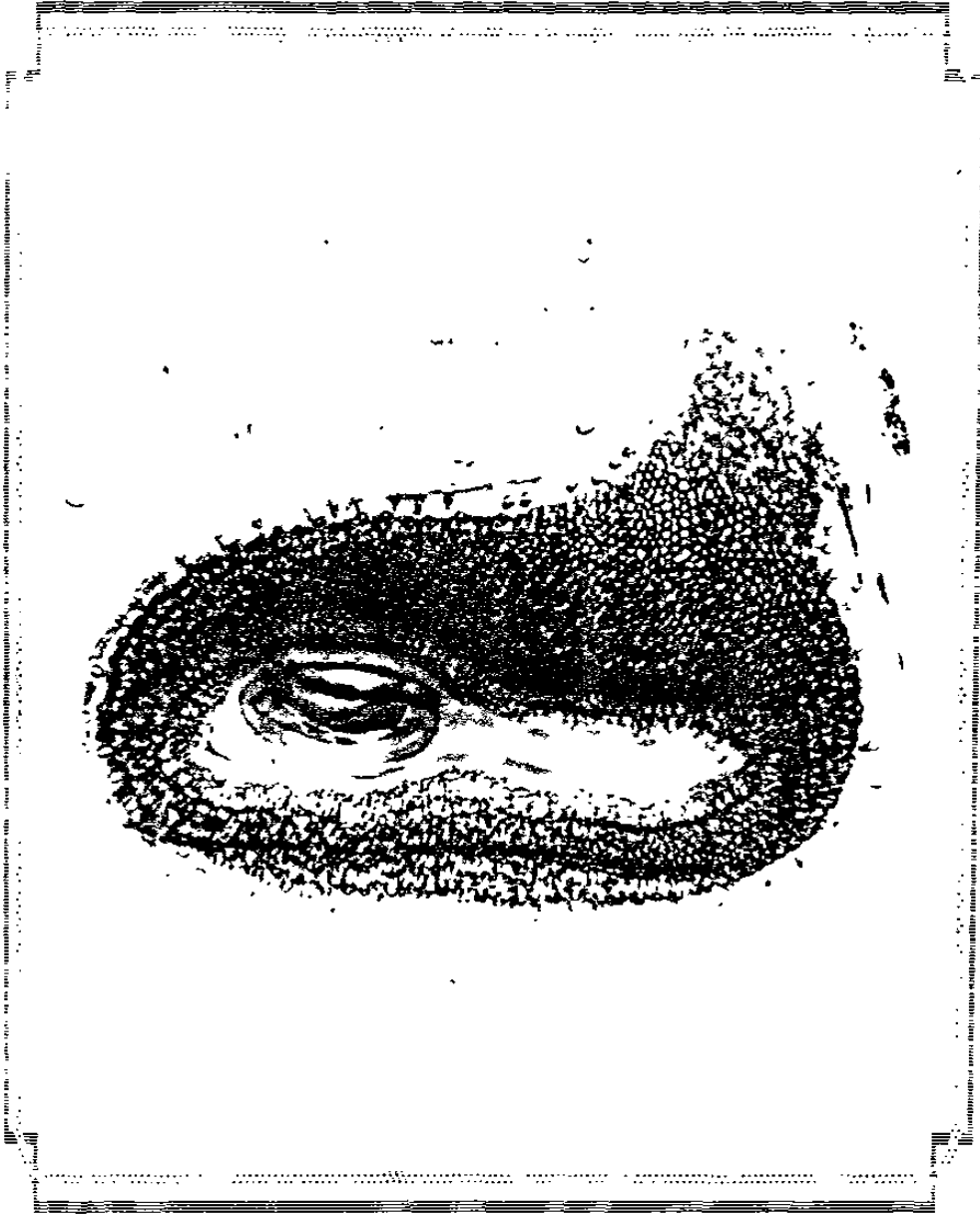


Fig. 12.- Placa espiracular de *Dermacentor variabilis* (Say) hembra.



Fig. 13.- Placa espiracular de *Amlyomma cajennense* (Fabricius) hembra.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Lista de especies de vertebrados y artrópodos vectores, de las cuáles se ha aislado *Borrelia burgdorferi*, por medio de las técnicas serológicas tradicionales.

Tabla 2.- Lista de especies de vertebrados y artrópodos vectores, de las cuáles se ha aislado *Borrelia burgdorferi*, por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 3.- Grupos etarios del total de perros muestreados pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

Tabla 4.- Grupos etarios del total de perros muestreados de acuerdo a la presencia ó ausencia de garrapatas, en cuatro localidades del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Tabla 5.- Porcentaje de infestación por *Rhipicephalus sanguineus* en perros de cuatro localidades pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

Tabla 6.- Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en sangre de perros muestreados en cuatro localidades del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Diagnosticada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 7.- Media \pm error standard del número de garrapatas por perro en cada una de las localidades monitoreadas en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

Tabla 8.- Cantidad de garrapatas colectadas por especie en perros de cuatro localidades pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

Tabla 1.- Lista de especies de vertebrados y artrópodos vectores, de las cuales se ha aislado *Borrelia burgdorferi*, por medio de las técnicas serológicas tradicionales

I.- USO DE TÉCNICAS TRADICIONALES.

N. Científico	N. Común	Técnica	Localidad	Autor	Año
a) Cánidos y otros vertebrados domésticos					
<i>C. familiaris</i>	perro	IFI	Connecticut	Magnarelli <i>et al.</i>	1985
<i>E. equus</i>	caballo	IFD	Nueva Inglaterra	Marcus <i>et al.</i>	1985
<i>C. familiaris</i>	perro	IFI	Wisconsin	Burgess	1986
<i>C. familiaris</i>	perro	"	Carolina Norte	Greene <i>et al.</i>	1988
<i>E. equus</i>	caballo	"	EU A Norte	Magnarelli <i>et al.</i>	1988
<i>C. familiaris</i>	perro	"	Texas	Cohen <i>et al.</i>	1990
<i>C. familiaris</i>	perro	"	EU A	Monsen <i>et al.</i>	1990
<i>C. familiaris</i>	perro	"	Canada	Arstob <i>et al.</i>	1991
<i>C. felis</i>	gato	"	Canada	Arstob <i>et al.</i>	1991
<i>C. familiaris</i>	perro	"	Connecticut	Magnarelli <i>et al.</i>	1992
b) Vertebrados silvestres					
<i>O. cuniculus</i>	conejo	"	EU A	Burgdorfer <i>et al.</i>	1982
<i>T. striatus</i>	ardilla rayada	"	Connecticut	Anderson <i>et al.</i>	1983
<i>P. lotor</i>	mapache	"	Connecticut	Anderson <i>et al.</i>	1983
<i>O. virginianus</i>	venado C B	"	Connecticut	Magnarelli <i>et al.</i>	1988
<i>P. lotor</i>	Mapache	ELISA	Maryland	Magnarelli <i>et al.</i>	1988
<i>S. floridanus</i>	conejo C A	"	Millbrook, N Y	Magnarelli <i>et al.</i>	1990
<i>O. virginianus</i>	venado C B	IFI	Alabama	Luckhart <i>et al.</i>	1991
<i>S. hispidus</i>	musarana	"	Alabama	Luckhart <i>et al.</i>	1991
<i>O. virginianus</i>	venado C B	"	Maryland	Amerasinghe	1992
<i>O. virginianus</i>	Venado C B	"	Canada	Arstob <i>et al.</i>	1991
<i>P. leucopus</i>	raton P B	"	Virginia	Levine <i>et al.</i>	1991
<i>P. lotor</i>	mapache	"	Carolina Norte	Levine <i>et al.</i>	1991
c) Vectores					
<i>I. dammini</i>	garrapata VCB	"	Connecticut	Anderson <i>et al.</i>	1983
<i>I. pacificus</i>	garrapata	"	California Norte	Burgdorfer <i>et al.</i>	1985
<i>D. variabilis</i>	garrapata PA	comp vectorial	EU A	Piesman-Sinsky	1988
<i>A. americanum</i>	garrapata ES	"	EU A	Piesman-Sinsky	1988
<i>A. americanum</i>	garrapata ES	IFI	Texas	Teltow <i>et al.</i>	1991
<i>A. maculatum</i>	garrapata	"	Texas	Teltow <i>et al.</i>	1991
<i>I. scapularis</i>	garrapata	"	Texas	Teltow <i>et al.</i>	1991
<i>C. felis</i>	pulga	"	Texas	Teltow <i>et al.</i>	1991
<i>I. dammini</i>	garrapata VCB	cultivo BSK	Canada	Arstob <i>et al.</i>	1991
<i>I. scapularis</i>	garrapata	"	Canada	Arstob <i>et al.</i>	1991
<i>I. dammini</i>	garrapata VCB	IFI	Wisconsin	Sharon <i>et al.</i>	1992
<i>I. ricinus</i>	garrapata	comp vectorial	Alemania	Kahl <i>et al.</i>	1992
<i>H. concina</i>	garrapata	"	Alemania	Kahl <i>et al.</i>	1992
<i>D. reticulatus</i>	garrapata	"	Alemania	Kahl <i>et al.</i>	1992
<i>A. americanum</i>	garrapata ES	prevalencia	Texas	Rawlings-Teltow	1994
d) Humanos					
	Humano	IFI	Westcher, N Y	Benach <i>et al.</i>	1983
	Humano	cultivo BSK	Texas	Rawlings <i>et al.</i>	1987

Tabla 2.- Lista de especies de vertebrados y artrópodos vectores, de las cuáles se ha aislado *Borrelia burgdorferi*, por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

II.- USO DE LA RCP.

N. Científico	N. Común	Técnica	Localidad	Autor	Año
a) Cánidos y otros vertebrados domésticos					
<i>C. familiaris</i>	perro	RCP,	EUA	Malloy <i>et al.</i>	1990
<i>C. familiaris</i>	perro	"	Monterrey	Salinas-Melendez <i>et al.</i>	1995
b) Vertebrados silvestres					
<i>N. fuscipes</i>	raton de madera	RCP, cult BSK	California Sur	Boyce <i>et al.</i>	1992
<i>P. leucopus</i>	raton	"	EU A	Andrew <i>et al.</i>	1993
c) Vectores.					
<i>I. dammini</i>	garrapata VCB	RCP, IFD	Ipswich	Persing <i>et al.</i>	1990
d) Cepa de <i>B. burgdorferi</i> .					
<i>B. burgdorferi</i>	cepa	RCP, hibridacion	FUA	Rosa <i>et al.</i>	1989
<i>B. burgdorferi</i>	cepa	"	EUA	Nielsen <i>et al.</i>	1990
<i>B. burgdorferi</i>	cepa	RCP	EUA, Europa	Rosa <i>et al.</i>	1991
<i>B. burgdorferi</i>	cepa	"	EU A, Europa	Wise <i>et al.</i>	1991
e) Humanos					
	Humanos	RCP, cult BSK	FUA	Berger <i>et al.</i>	1985
	Humanos	RCP, IFI	EUA	Debue <i>et al.</i>	1990
	Humanos	RCP	FUA	Kruger <i>et al.</i>	1991
	Humanos	RCP, cult BSK	FUA	Melchers	1991
	Humanos	RCP	FUA	Lebech <i>et al.</i>	1992
	Humanos	RCP, hibridacion	EU A	Lebech <i>et al.</i>	1992
	Humanos	RCP	EUA	Rabb <i>et al.</i>	1992
	Humanos	"	Monterrey	Salinas-Melendez <i>et al.</i>	1995

Tabla 3.- Grupos etarios del total de perros muestreados pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

GRUPOS ETARIOS	FOMERREY	33	ESTANZUELA	C.A. GUADALUPE	PROVILLON
MENOS DE 1 AÑO	7		11	7	18
1 A 2 AÑOS	15		19	48	35
2.1 A 4 AÑOS	8		6	23	11
4.1 A 6 AÑOS	2		6	3	7
6.1 A 8 AÑOS	3		1	0	3
MAS DE 8.1 AÑOS	0		1	0	1
TOTAL	35		44	81	75

Tabla 4.- Grupos etarios del total de perros muestreados de acuerdo a la presencia ó ausencia de garrapatas, en cuatro localidades de área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

GRUPOS ETARIOS	FOMERREY 33		ESTANZUELA				C.A. GUADALUPE				PROVILEON	
	POS	NEG	TOT	POS	NEG	TOT	POS	NEG	TOT	POS	NEG	TOT
MENOS DE 1 AÑO	3	4	7	7	4	11	7	0	7	8	10	18
1 A 2 AÑOS	10	5	15	12	7	19	37	11	48	24	11	35
2 1 A 4 AÑOS	4	4	8	4	2	6	17	6	23	8	3	11
4.1 A 6 AÑOS	1	1	2	5	1	6	3	0	3	6	1	7
6.1 A 8 AÑOS	2	1	3	0	1	1	0	0	0	3	0	3
MAS DE 8.1 AÑOS	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
TOTAL	20	15	35	28	16	44	64	17	81	50	25	75

Tabla 5.- Porcentaje de infestacion por *Rhipicephalus sanguineus* en perros de cuatro localidades pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

LOCALIDAD	No PERROS EXAMINADOS	No PERROS POSITIVOS	INFESTACION (%)
FOMERREY 33	35	21	60
ESTANZUELA	44	29	65.9
C A. GUADALUPE	81	65	80.2
PROVILEON	75	51	68
TOTAL	235	166	70.6

Tabla 6.- Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en sangre de perros muestreados en cuatro localidades del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Diagnosticada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

LOCALIDAD	MUESTRAS DE SANGRE		No GRUPOS	GRUPOS POSITIVOS/%
	No MUESTRAS	No MUESTRAS EXAM		
FOMERREY 33	35	35	4	0
ESTANZUELA	44	44	4	1 25%
C.A. GUADALUPE	81	81	8	1 12 5%
PROVILEON	75	75	8	0
TOTAL	235	235	24	2 8.3%

TABLA 7.- Media \pm error standard del número de garrapatas por perro en cada una de las localidades monitoreadas en el arca metropolitana de Monterrey, N.L.

LOCALIDAD	Nº DE PERROS MUESTRADOS	Nº INFESTADOS	Nº GARRAPATAS COLECTADAS	$\bar{x} \pm FS$ (Nº GARRAPATAS PERRO)
FOMERREY 33	35	21	164	(4.67 \pm 6.31)
ESTANZUELA	44	29	173	(3.93 \pm 6.12)
C.A. GUADALUPE	81	65	581	(7.17 \pm 8.02)
PROVILEON	75	51	654	(8.72 \pm 9.10)

Tabla 8.- Cantidad de garrapatas colectadas por especie en perros de cuatro localidades pertenecientes al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

LOCALIDAD	<i>R. sanguineus</i>	<i>D. variabilis</i>	<i>A. cajennense</i>	TOTAL
FOMERREY 33	164	0	0	164
ESTANZUELA	171	2	0	173
C.A. GUADALUPE	579	1	1	581
PROVILEON	653	1	0	654
TOTAL	1567	4	1	1572

