

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Detección molecular de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, agente etiológico de la enfermedad de Lyme, en perros (*Canis familiaris*) y garrapatas (Acari:Ixodidae) en cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

TESIS

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

PRESENTA

M.V.Z. ANDRES ALVAREZ JIMENEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MAYO DE 1996

TM
RC1
.5
A5
C.1



1080072450

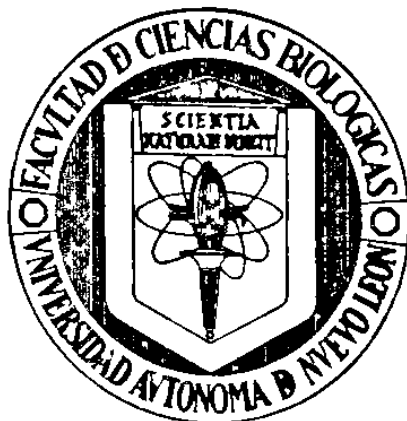
A JIMENEZ

MAYO OF 1990

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Detección molecular de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, agente etiológico de la enfermedad de Lyme, en perros (*Canis familiaris*) y garrapatas (Acari:Ixodidae) en cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

TESIS

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

PRESENTA

M.V.Z. ANDRES ALVAREZ JIMENEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MAYO DE 1996



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

Detección molecular de *Borrelia burgdorferi* (Spirochetaceae) Johnson, 1984, agente etiológico de la enfermedad de Lyme, en perros (*Canis familiaris*) y garrapatas (Acari: Ixodidae) en cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

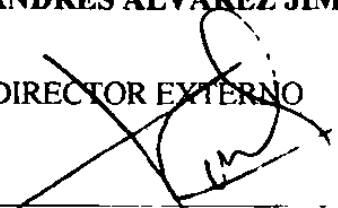
TESIS

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

PRESENTA

M. V. Z. ANDRES ALVAREZ JIMENEZ

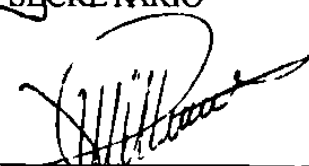
DIRECTOR EXTERNO


Dr. JUAN PABLO MARTINEZ SORIANO

COMISION DE TESIS APROBADA:


M. C. LUCIO GALAVIZ SILVA
PRESIDENTE


Dr. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS
SECRETARIO


M. C. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ
VOCAL

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MAYO DE 1996



GRACIAS SEÑOR

Gracias Señor, por amarnos tal como somos y permitirnos que tu espíritu nos forme hasta llegar a ser lo que tu quieres que seamos.

Gracias Señor, porque nos hablas de tu amor en medio del silencio y fortaleces nuestros corazones, dándonos el gozo de la vida.

Gracias Señor, por esos momentos que nos recuerdan que somos parte de tu cuerpo. ayúdanos a usar nuestros dones para dar a conocer tu amor.

Gracias Señor, por concedernos sabiduría para procurar sólo aquellas cosas que puedan agradarte. En el nombre de tu bendito hijo Jesucristo. Amén.

GRACIAS SEÑOR.....!

Nora Delia Bustamante Hernández
God bless you ☺

IN MEMORIA

La presente es dedicada a la memoria de mi padre **Epigmenio Alvarez Castro**, quien fue el mejor ejemplo a seguir, siendo un excelente padre, buen amigo, gracias por el sacrificio que realizaste por mí, por orientarme por el buen camino, aunque ya no estes con nosotros, queremos decirte algo, te queremos y te extrañamos.

DEDICATORIA

A mis padres:

Epigmenio Alvarez Castro (.)

y

Gregoria Jiménez Carrizalez

Con amor, cariño, respeto y admiración, por enseñarme el verdadero camino hacia Dios, además de que siempre me tuvieron fé y apoyaron en todo momento para hacer posible esta etapa de mi formación.

A mis hermanas:

María Elena, Alicia, Aurora e Irma

Por animarme a seguir adelante y ser un estímulo durante la trayectoria de mi formación académica.

A mis sobrinos:

Edyns, Diana y Rubi

A mi Tío:

Aurelio Alvarez Castro ()

Por que en vida me enseñaste tus conocimientos, experiencia, consejos, y aunque ya no estas con nosotros, estamos agradecidos de ti.

A mis tíos:

Gumerindo Briones Tovar

Beda Jimenez de Briones

Por darme su apoyo durante toda mi formación académica, excelentes tíos

RECONOCIMIENTOS ESPECIALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo para la realización de mis estudios de Maestría (Becario No. 82778).

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

Al laboratorio de Parasitología/Centro Nacional de Sanidad Acuícola FCB, U.A.N.L., por haberme permitido las facilidades de realizar el presente estudio.

Al laboratorio de Patología Molecular de la UANL/INIFAP por darme las facilidades de realizar el trabajo de laboratorio del presente estudio.

Al M. C. Lucio Galavíz Silva, por la oportunidad que me brindo para poder llevar a cabo este anhelo, por su amistad, enseñanza y asesoría.

Al Ph D Ildelfonso Fernández Salas, por ser uno de los impulsores de mi superación profesional.

Al M. C. Roberto Mercado Hernández, por su apoyo en la realización de la tesis, excelente maestro y por la revisión del manuscrito.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano por su gran apoyo y asesoría en el estudio molecular.

Al M. C. Fernando Jiménez Guzmán por su apoyo para poder realizar la tesis en el Laboratorio de Parasitología/Centro Nacional de Sanidad Acuicola.

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

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

Al M. C. Alfonso Flores Leal por todas las ayudas brindadas en el área de Entomología Médica.

A la Q. B. P. Zoraida Nava Morales por brindarme su ayuda para la culminación de esta etapa de mi formación profesional, por ser una excelente compañera de laboratorio.

A la M. C. Blanca Peña Treviño por brindarme su apoyo, amistad y compañerismo, excelente amiga.

A Nora Delia Bustamante Ojeda por su afecto, ayuda, preocupación y apoyo.

A la Q.B.P. Amparo Elizabeth Martínez Flores por los consejos recibidos para la realización de esta tesis, excelente amiga y compañera.

Al Biol. Cuauhtémoc Lara Campos por brindarme su apoyo en la elaboración de la tesis, excelente compañero de estudios y buen amigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Q.B.P. Juan Manuel Arredondo por sus acertadas indicaciones y consejos.

Al M. C. Feliciano Segovia Salinas por su apoyo en la realización del presente trabajo.

A la M Sc Diana Sara Leal Klevezas por su ayuda en la realización de la tesis.

A la Q.B.P. Martha Contreras Montemayor por su ayuda en la culminación de la tesis.

Al Biol. Salvador Flores por su apoyo en los análisis estadísticos, excelente amigo.

A la C. P. Cristina Briones Jiménez por su ayuda en la elaboración de figuras y por ser excelente prima.

A la Ing. Delia Briones Jiménez por su ayuda en la elaboración de la tesis

Al Lic. José Antonio Muñiz López por su ayuda en la culminación de la tesis.

A la Familia Bustamante Ojeda por su gran apoyo espiritual, para culminar esta etapa de mi formación académica.

A todos mis compañeros de la maestría Blanca Peña, Rosario Nájera, Norma Gorrochotegui, Nereida Velázquez, Adriana Solís, Cecilia Trujillo, Cuauhtémoc Lara Campos, Felipe Ramos, Jorge Martínez, Ezequiel Magallón, Rene Solís, Jaime Juárez y Eduardo Rebollar.

A los nuevos compañeros Carolina Briseño, Armando Ulloa, Arnoldo Bonilla, Angélica Herrera, Hector Orta, Rosa Maria Patiño, Armando Saldívar, Zinnia Molina, Yolanda, Hortensia, Javier, Saúl, Julián, Emilio.

A mis nuevos compañeros del Laboratorio de Parasitología Zoraida, Eva, Nelly, Raúl y Hugo.

Al personal del Laboratorio de Parasitología Lupita Dewitt, Asunción Sambrano Coronado, Raquel Serrato, Mayra N. Garza, Mónica C. Ramos, Teresita, Carlitos, Jose L. Limón y Lupita Rodríguez.

A la Sra. Irma González R. por su gran ayuda brindada a mi persona

A la Sra. Leo Flores Medina y Marina Moreno Regalado por darme ánimo para culminar esta tesis.

A todo el personal del laboratorio de parasitología/Centro Nacional de Sanidad Acuícola por haber hecho tan llevadera mi estancia en él. Y a todas las persona que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de ésta tesis y por consiguiente ésta etapa de mi formación, mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

Lista de abreviaturas	i
Resumen	iii
I.- Introducción	1
II.- Objetivos	4
III.- Hipótesis	5
IV.- Antecedentes	6
V.- Material y métodos	15
1.- Localización del área de estudio	15
2.- Hospederos (<i>Canis familiaris</i>) y vectores (<i>Acari:Ixodidae</i>)	15
3.- Material biológico	16
3.1.- Muestras de sangre	16
3.2.- Colecta de garrapatas	16
4.- Trabajo de laboratorio	16
4.1.- Marcador de pares de bases	16
4.2.- Cepa de <i>Borrelia burgdorferi</i>	17
4.2.1.- Preparación de cepa de referencia	17
5.5.- Tratamiento de las muestras de sangre	17
5.1.- Extracción de ADN bacteriano a partir de células sanguíneas	17
6.- Tratamiento de las muestras de garrapatas	19
7.- Amplificación de ADN	20
8.- Estudios taxonómicos	21
9.- Prevalencia y abundancia	21
VI.- Resultados	22
1.- Hospederos	22
2.- Vectores	22
3.- Cepa de referencia <i>Borrelia burgdorferi</i>	22
4.- PCR de muestras de sangre	24
5.- PCR de muestras de garrapatas	24
6.6.- Estudios taxonómicos	26

6.7.- Prevalencia y abundancia	34
VII.- Discusión y conclusiones	36
VIII.- Literatura citada	42
IX.- Anexos (Figuras y tablas)	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Acido desoxirribonucleico
<i>Alu</i> I	Enzima de restriccion
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
BSK	Medio de cultivo modificado de Kelly
Conn.	Estado de Connecticut, EUA.
CONN-2591	Cepa de <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Dde</i> I	Enzima de restriccion
DE	Desviacion Estandar
dNTP' s	Deoxinucleotidos trifosfatos
Fig.	Figura
ECM	Eritema cronico migratorio
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
EL	Enfermedad de Lyme
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas(Enzyme-Linked-Imunosorbent-Assay)
<i>et al.</i>	y colaboradores
Hrs.	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LCR	Liquido cefalorraquideo
Mass.	Estado de Massachusets, EUA
·MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
µg	Microgramos
mg	Miligramos
min	Minutos
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
M (carril)	Marcador de Pares de bases
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
pBR	Plasmido de Bolivar y Rodriguez
PBS	Solucion Buffer de Fosfato
PCR	Siglas en Ingles de la Reaccion en Cadena de Polimerasa
pH	Potencial hidrogeno
pmol	Picomoles
Primer	Nombre tecnico internacional para iniciador sintetico

rpm	Revoluciones por minuto
OspA	Siglas en inglés de Proteína externa de superficie (<i>Borrelia burgdorferi</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Lauril sulfato)
seg	Segundos
SEVAG	Cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1)
sp	Especie
spp	Especies
<i>Taq</i>	Enzima polimerasa de ADN proveniente de <i>Thermus aquaticus</i>
TE Buffer	Buffer Tris-EDTA
U	Unidades
V	Voltios
^o C	Grados centígrados
%	Porcentaje (Medida de cantidad)

RESUMEN

Hoy en día la enfermedad de Lyme causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi* es la entidad patológica más común transmitida por garrapatas en el mundo. Los vectores de este mal son los artrópodos hematófagos principalmente las garrapatas. Los reservorios son una gran variedad de animales silvestres, así como algunas aves. Entre las especies afectadas se encuentran el hombre y algunos animales domésticos. El estudio tuvo por objetivo detectar la presencia de *Borrelia burgdorferi* en sangre de perros y garrapatas asociadas mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México: Dulces Nombres, Pesquería, N. L., La Ciudadela, Juárez, N. L., El Ranchito y El Barrial de Santiago, N. L. Se realizó también el estudio taxonómico de las garrapatas. Para tal efecto en cada una de las localidades se colectaron la mayor cantidad de muestras de sangre de perros. Después, todos fueron inspeccionados detenidamente en busca de garrapatas y estas fueron colectadas en forma manual. Ambas muestras fueron procesadas en grupos de 10 para realizar la prueba molecular. Todas las garrapatas fueron identificadas y cuantificadas por medio de claves taxonómicas. Se muestrearon un total de 97 perros ordenandolos en 9 grupos. La prueba de PCR no reveló ninguna muestra positiva. De 651 garrapatas, se formaron 64 grupos de 10 especímenes. Los resultados mostraron que el 6.3% de 64 muestras resultaron positivas a la prueba. Del total de garrapatas colectadas se identificaron 521(80.0%) *Rhipicephalus sanguineus*, 57(8.8%) *Dermacentor variabilis*, 60(9.2%) *Amblyomma cajennense* y 13(2.0%) *Boophilus annulatus*. Este trabajo constituye el primer reporte de garrapatas *Dermacentor variabilis* como vectores de *Borrelia burgdorferi* colectadas en el estado de Nuevo León y en la República Mexicana.

I.- INTRODUCCION

Hoy en día se ha observado un incremento en el número de enfermedades de tipo infeccioso. Algunas, por su grado de infectividad han ocupado un lugar predominante en la lista de las enfermedades zoonóticas debido a que se presentan en seres humanos y animales. Una de ellas es la enfermedad de Lyme (EL), que recientemente ha tomado gran interés en medicina humana y medicina veterinaria (Tamez, 1994).

EL es un padecimiento multisistémico de origen infeccioso, producido por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (Johnson, 1984), la cual es transmitida por artrópodos hematófagos, principalmente las garrapatas (Cleven *et al.*, 1992). La especie *Ixodes dammini* Spielman, Clifford, Piesman & Corwin (Spielman *et al.*, 1979) es considerada como vector primario en el noreste y medio-oeste de los Estados Unidos de Norteamérica (Spielman *et al.*, 1985), pero también se ha comprobado como vector a *Ixodes pacificus* Cooley & Kohls, 1943, *Dermacentor occidentalis* Marx, 1892, *Dermacentor parumapertus* Neumann, 1901, *Dermacentor variabilis* Say, 1821, *Haemaphysalis leporispalustris* Packard, 1869, *Ixodes noetomae* Cooley, 1944, *Amblyomma americanum* Linnaeus, 1758 y *Ixodes scapularis* Manvelli, 1978, *ilus.* Say, 1979, en E.U.A (Lane *et al.*, 1991, Teltow *et al.*, 1991). Por otra parte *Ixodes ricinus* Linnaeus, 1758, es el vector principal en Europa y de igual manera *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, en Asia (Boerlin *et al.*, 1992). El venado cola blanca *Odocoileus virginianus* (Zimmerman) y los roedores *Peromyscus leucopus* (Rafinesque), se consideran como los principales reservorios (Burgess, 1991), pero los mapaches, osos, así como algunas aves, han presentado su papel como portadores. Entre las especies afectadas se encuentran el hombre, equinos, bovinos, ovinos, caninos, y felinos (Welsh *et al.*, 1992). Las principales manifestaciones clínicas de la EL, después de la mordedura de la garrapatas infectadas en su fase inicial, consisten en una lesión cutánea llamada eritema crónico migratorio (E.C.M.); la segunda fase presenta anomalías neurológicas y disturbios en la conducción cardíaca y en la tercera ocurren problemas de artritis crónica (Russell, 1991).

Desde el punto de vista epidemiológico se caracteriza por ser una enfermedad endémica considerada como la enfermedad más común transmitida por garrapatas en el mundo (Teltow *et al.*, 1991). Esta entidad patológica tiene amplia distribución, entre los países europeos incluyendo a Alemania, Austria, Francia, Holanda, Italia (Wilskes *et al.*, 1987; Schmid, 1984), Yugoslavia (Dekonenko *et al.*, 1989), Suiza (Bonard, 1990) y España (Font *et al.*, 1992). Ha sido reportada en la Ex-Unión Soviética, China, Japón y Australia (Stewart *et al.*, 1982; Schmid, 1984; Kawabata *et al.*, 1987 & Chengxu *et al.*, 1988), así mismo en Africa (Schafrank *et al.*, 1990) En el continente americano se ha presentado en Haití, Puerto Rico y Jamaica (Winward *et al.*, 1989). En América del Norte su ubica en los Estados Unidos (Burgdorfer *et al.*, 1985), donde en 1976 en Lyme, Connecticut se iniciaron por primera vez estos estudios.

Recientemente EL a tomado gran importancia en salud pública, pero esta no sólo depende de la presencia de los casos humanos en zonas endémicas, sino en qué los animales silvestres son portadores de la espiroqueta y migran a otras zonas en busca de alimento, e incluso, algunas especies de aves juegan un papel muy importante en la diseminación de la espiroqueta por desplazamiento de migración que abarca largas extensiones de terreno, que provoca una distribución amplia de la espiroqueta *B. burgdorferi*, (Anderson *et al.*, 1986; Weisbrod & Jonhson, 1989).

En México solo se conocen dos estudios, específicamente en el estado de Nuevo León, donde EL se diagnosticó mediante un estudio serológico y molecular (Welsh *et al.*, 1992; Salinas *et al.*, 1995), por lo tanto se consideró necesario implementar una técnica diagnóstica que permita identificar con mayor exactitud al microorganismo en hospederos y vectores asociados. En los últimos años se ha diseñado y perfeccionado un método diagnóstico molecular conocido como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la cual es posible detectar una secuencia conocida de oligonucleótidos en muestras de sangre o tejidos, aún y cuando el número de copias del templado sea muy pequeña (Saiki *et al.*, 1988).

PCR es una nueva e ingeniosa herramienta aplicable en la detección de material genético diverso, incluyendo al de organismos patógenos tales como bacterias, hongos y virus entre otros (Innis & Gelfand, 1990). Es un proceso *in vitro* de síntesis de ácidos desoxiribonucleicos, por el cual un segmento de ADN que sirve como molde o templado puede ser amplificado específicamente (Saiki *et al.*, 1990). La sensibilidad y especificidad de la PCR en muestras a partir de sangre de perros y garrapatas asociadas, así como la identificación taxonómica de los vectores fueron aplicadas en el presente estudio.

II.- OBJETIVOS

Determinar la presencia de *B. burgdorferi* en sangre de perros y garrapatas (Acari:Ixodidae), mediante la prueba de PCR en cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Conocer la ubicación taxonómica de las garrapatas considerando su papel como potenciales vectores de la enfermedad de Lyme en perros.

III.- HIPOTESIS DEL TRABAJO

En el estado de Nuevo León se presentan las condiciones ambientales adecuadas, así como hospederos susceptibles y vectores asociados por lo que existe la probabilidad de detectar a la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* mediante la prueba de PCR en sangre de perros y garrapatas asociadas en cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

IV.- ANTECEDENTES

En la actualidad existen una serie de investigaciones donde se determina la presencia de la espiroqueta *B. burgdorferi* en diferentes hospederos vertebrado e invertebrados, entre los cuales sobresalen:

GARRAPATAS

Anderson *et al.* (1983) reportan como zonas endémicas de EL a Lyme y Haddam, Connecticut. Identifican a la espiroqueta por preparaciones en fresco y la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en intestino medio del 35% de 147 garrapatas *I. dammini*. Las garrapatas positivas fueron removidas de mapaches *Procyon lotor* (Wagler), ratones *Peromyscus leucopus* y ardillas *Tamiasciurus hudsonicus* (Gordon). Las espiroquetas fueron aisladas en el medio de cultivo modificado de Kelly (BSK) en 9 *I. dammini* así como en la sangre de un mapache y un ratón patas blancas.

Burgdorfer *et al.* (1985) identifican a las garrapatas "western black legged" *I. pacificus* como vectores de *B. burgdorferi* mediante la técnica de IFI. Analizan en total a 1,687 garrapatas adultas colectadas de vegetación detectándose a 25 (1.48%) de ellas infectadas. En Oregon 14 de 715 fueron positivas y en California se identificó en 11 de 972. De las 25 *I. pacificus* infectadas, diecisiete presentaron la espiroqueta solamente en intestino medio, la 8 restantes mostraron infección generalizada en todos los tejidos, lo que refleja condiciones fisiológicas adversas para el desarrollo de la espiroqueta en el hemocele.

Piesman & Sinsky (1988) reportaron la capacidad de 3 estados inmaduros de especies de garrapatas en el sureste de Estados Unidos para adquirir, mantener y transmitir *B. burgdorferi* bajo condiciones de laboratorio, utilizando hamsters infectados con la bacteria como hospederos. Confirman que las garrapatas *D. variabilis* y *A. americanum* adquieren la infección espiroquetal como larvas en el 9% (178) y 1% (425) de las garrapatas respectivamente. En contraste, *I. scapularis* fue infectada como larva y mantuvo la infección espiroquetal transestadial. Las garrapatas *I. scapularis* infectadas, en etapa de

ninfas, transmitieron la espiroqueta en 4 hamsters. Este estudio mostró que *I. scapularis* fue un vector competente en laboratorio.

Weisbrod & Johnson (1989) presentan un estudio de la migración de pájaros donde se examinaron 9,200 aves representados en 99 especies en Saint Croix River Valley, USA, un área endémica de EL en el este central de Minnesota y noroeste de Wisconsin. Se encontró que 250 garrapatas *I. dammini* en etapa de larva y ninfa infestaron 58 pájaros de 15 especies migrantes: cincuenta y seis garrapatas resultaron positivas a *B. burgdorferi*. Se concluyó que los pájaros son importantes reservorios locales en la parte superior del Valle de Mississippi al recorrer grandes distancias durante su migración, durante la cual distribuyen la espiroqueta a otras regiones del continente.

Persing *et al.* (1990) amplificaron secuencias de ADN de *B. burgdorferi* por medio de PCR en 15 garrapatas *I. dammini* mantenidas en laboratorio, alimentadas sobre animales infectados, además fueron analizadas por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) y PCR el intestino medio de garrapatas adultas y ninfas colectadas en Nantucket Island, Mass. y la reserva de Crane Ipswich, Mass. Dieciséis de 30 garrapatas fueron positivas por medio de IFD, de los cuales 15 de estos fueron positivos por PCR. El uso de la PCR tuvo un amplio rango de positividad.

Levine *et al.* (1991) colectan garrapatas *Ixodidae* de hospederos y vegetación en áreas de la costa de Virginia y Carolina del Norte y detectan a *B. burgdorferi* por medio de IFI en 9 *Ixodes cookei* Bishopp, 1911, removidas de ratas *Oryzomys palustris* (Fain), un ratón patas blancas *P. leucopus* y mapaches *P. lotor*, así mismo en 4 *A. americanum* removidas de mapaches y en dos *D. variabilis* removidas de un mapache y un ratón rice. Una de 2 *I. dammini* colectados sobre vegetación en Parramore Island presentó *B. burgdorferi*. Ninguna espiroqueta se encontró en *A. Americanum* y *A. Maculatum* colectadas de la vegetación. Todas las garrapatas infectadas fueron colectadas al este de las costas de Virginia.

Luckhart *et al.* (1991) condujeron un estudio en el este central de Alabama para determinar la diversidad de especies de garrapatas presente en el área y su relación con hospederos, así como las especies de garrapatas y pequeños mamíferos naturalmente infectados con *B. burgdorferi*. Examinaron un total de 451 hospederos entre los cuales se citaron al ratón algodón *Peromyscus gossypinus*(Rhodes), rata algodón *Sigmodon hispidus*(Baird), ratón de casa *Mus musculus* (Waterhouse) y venado cola blanca *O. virginianus*. Enlistaron un total de 859 garrapatas colectadas de hospederos y por medio de la técnica de dragado entre las cuales se incluyeron *A. americanum*, *Dermacentor albipictus* Packard, 1869, *D. variabilis*, *I. scapularis* y *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. La mitad del total de garrapatas fueron examinadas para diagnosticar *B. burgdorferi* por medio de IFI. Los resultados revelaron que 4 ninfas y 2 adultos de *A. americanum* colectadas de venado cola blanca *O. virginianus* y 3 larvas de *I. scapularis* de ratón *S. hispidus* presentaron la espiroqueta *B. burgdorferi*.

Teltow *et al.* (1991) desarrollaron un estudio en el laboratorio del Departamento de Salud en Texas donde cultivan a *B. burgdorferi* mediante el medio BSK. en 7 de 1024(0.68%) grupos de 10 garrapatas y en 1 de 69 (1.4%) grupos de 10 pulgas. Los aislamientos espiroquetales fueron de varias garrapatas y una especie de pulga incluyendo *A. americanum*, *A. Maculatum*, *I. scapularis* y *Ctenocephalides felis* Bouché, Ilus., Méndez, 1977.

Mukolwe *et al.* (1992) mantuvieron garrapatas *I. scapularis*, *A. americanum* y *D. variabilis* alimentadas bajo condiciones de laboratorio sobre conejos blancos New Zelanda experimentalmente infectados con la espiroquetas *B. burgdorferi* (cepa JD1). La espiroqueta se detectó solamente en *I. scapularis* a través de microscopía de campo oscuro con promedios 18% y 21% de 100 garrapatas colectadas por medio de IFI. Los resultados mostraron que solamente las ninfas de *I. scapularis* alimentadas sobre conejos infectados transmitieron *B. burgdorferi*.

Sharon *et al.* (1992) colectaron garrapatas *I. dammini* en diferentes estaciones del año en área del suroeste de Wisconsin para detectar a *B. burgdorferi* por medio de IFI. El promedio de infección de la espiroqueta varió estacionalmente con 38.1% en primavera de 1990 de 105 garrapatas colectadas. 60.3% en otoño de 1990 de 151 y 41.2% en primavera de 1991 de 131 especímenes colectados. Los resultados reportan que este estudio fue similar o ligeramente más alto a resultados reportados anteriormente en el noreste de los Estados Unidos.

Feir *et al.* (1994) detectan a *B. burgdorferi* por medio de IFI en 1.9% de 443 *A. americanum* y 2.0% de 1,752 *D. variabilis* colectadas en el sureste de Missouri y a los alrededores de la ciudad de St Louis. La identidad de organismos positivos fueron corroborados por la prueba de PCR. Amplificaron 371 pb en 2 garrapatas colectadas en Missouri lo que mostró un 97-98% de identidad para la cepa B31 de la bacteria. Estos resultados confirman que *B. burgdorferi* esta presente en *D. variabilis* y *A. americanum* en áreas de Missouri.

Rawlings & Teltow (1994) reportaron a la espiroqueta *B. burgdorferi* por medio de IFD en garrapatas colectadas de 8 parques de Texas. Los resultados revelaron que el microorganismo fue detectado en 1.03% de 5,141 garrapatas adultas *A. americanum* examinadas. *A. americanum* fue una especie residente frecuentemente encontrada en Texas. Ninguna espiroqueta fue observada en otras especies de garrapatas examinadas.

Pichón *et al.* (1995) amplifican ADN de la espiroqueta mediante PCR en 30 de 249 ninfas *I. ricinus* sin alimentar colectadas de vegetación en Rambouillet Forest cerca de París.

Monsen *et al.* (1990) muestrean sueros de perros y detectan títulos de Ac a *B. burgdorferi* por medio de IFI en 2 de 100 perros examinados. Así mismo colectan ninfas y adultos de *I. pacificus* y *D. occidentalis* por medio de la técnica de dragado y determinan 1.5% de 1122 garrapatas *I. pacificus* por medio de la pruebas de IFI. En *D. occidentalis* se encontraron resultados negativos. Los datos recopilados dieron una información amplia sobre prevalencia de *B. burgdorferi* causante de la EL en la provincia de Butte, California.

BORREGOS

Fridriksdottir *et al.* (1992) realizaron un ensayo de la técnica de ELISA para detectar Ac contra *B. burgdorferi* en 327 sueros de borregos noruegos. Los resultados presentaron que 10% de los animales analizados fueron positivos. La proporción mas alta de animales seropositivos procedían del sur sobre las áreas costeras de Noruega. La mayoría de los animales infectados aparecieron durante los 2 primeros años de vida.

CABALLOS

Marcus *et al.* (1985) detectan a la bacteria por medio de IFI en 12 de 50 caballos en Lyme y East Haddam, Conn. e Ipswich, Mass. Uno de los 50 caballos era de un área no endémica y presentó títulos altos de Ac. Los caballos seropositivos no presentaron aglutinación de Ac contra la reacción cruzada potencial a *Leptospira* spp. esto indicó que los caballos en las áreas endémicas están expuestos a la bacteria e inducen una respuesta de Ac en los caballos.

Magnarelli *et al.* (1988) realizaron un estudio en Connecticut, Massachusetts, sureste de Nueva York (Provincia de Westchester), Rhode Island y Vermont, donde diagnostican a *B. burgdorferi* por medio de IFI en sangre de 705 equinos. Los resultados señalaron la presencia de títulos de Ac de IgM e IgG en 37(5.3%) y 90 (12.8%) de los sueros respectivamente. Ochenta y seis equinos con inmunoglobulina para *B. burgdorferi*

vivían en áreas de Connecticut donde el principal vector es la garrapata *I. dammini*. De los 86 equinos 9 eran de Lyme, Conn. y la provincia de Westchester, N.Y., los cuales desarrollaron inflamación de las articulaciones y episodios recurrentes de cojera.

HUMANOS

Benach *et al.* (1983) presentan un estudio realizado en Long Island y la provincia de Westchester, Nueva York, donde aislan en el medio BSK a *B. burgdorferi* de la sangre de 2 pacientes de 36 estudiados, los cuales presentaban signos y síntomas sugestivos. Para determinar la identidad de los aislamientos, las dos muestras positivas fueron analizadas mediante IFI. Los resultados obtenidos indicaron que la espiroqueta fue morfológica y serológicamente idéntica a microorganismos recientemente encontrados en garrapatas *I. dammini*, endémicas en el área e implicadas epidemiológicamente como vectores de EL.

Berger *et al.* (1985) confirman la presencia de la espiroqueta en 6 de 14 biopsias de piel aislándose en el medio BSK. En 2 de las muestras positivas se observó y corroboró a *B. burgdorferi* por medio de cortes histopatológicos. Consideran que este tipo de estudios son de gran ayuda para determinar los antibióticos específicos en el tratamiento de la EL, previamente observada en casos clínicos.

Rawlings *et al.* (1987) aislan a la bacteria en el medio BSK en 2% de 100 muestras de sangre. En 8(14%) de 31 muestras de piel, 1 de 7(14%) cultivos de líquido cefalorraquídeo(LCR), hígado y bazo de un paciente de 2 autopsias realizadas, en 1 de 3(33%) muestras de líquido sinovial(LS) (rodilla) y en una muestra de hueso. Pruebas de IFI confirman la identificación de la bacteria en 7 de los aislamientos, mientras que en el resto se presentaron otras especies de *Borrelia*.

Debue *et al.* (1991) utilizaron oligonucleótidos como iniciadores en un ensayo de PCR y amplifican ADN de *B. burgdorferi* en 2 de 3 muestras de LS y diez de 30 muestras

de LCR de pacientes. Cabe mencionar que estas muestras fueron corroboradas previamente por métodos inmunológico. Comunican que la técnica de PCR es confiable para la identificación de la bacteria en muestras biológicas de LS y LCR.

Kruger *et al.* (1991) amplificaron secuencias específica de ADN de *B. burgdorferi* a partir de la prueba de PCR en 4 cepas del microorganismos provenientes de casos clínicos y LCR de 2 pacientes con EI (neuroborreliosis). Observaron la amplificación de fragmentos de ADN de 290 pares de bases en todas las cepas de *B. burgdorferi* así como en ambas muestras de LCR. La prueba de PCR fue una técnica confiable y rápida para amplificar secuencias del gen codificante para la flagelina en pacientes con neuroborreliosis y en cepas de la bacteria. El gen amplificado permitió por primera vez demostrar un monitoreo efectivo de la terapia de pacientes con síntomas nerviosos causados por la EL.

Rabb *et al.* (1992) analizaron una muestras de sangre de un paciente con antecedentes clínicos de la EL para diagnosticar a *B. burgdorferi* mediante de la prueba de PCR. Un estudio adicional de PCR revelo que varias muestras de biopsias del mismo paciente fueron positivas lo que corroboró la presencia de esta bacteria.

Welsh *et al.* (1992) iniciaron un estudio en Nuevo Leon, México para diagnosticar a *B. burgdorferi* por medio de la técnica de ELISA en sangre pacientes con edades entre 7 y 65 años con antecedentes de haber sufrido picaduras de artrópodos hematofagos en el campo y que presentaban lesiones eritematosas en la piel ligeramente pruriginosas, así como malestar general. Los resultados reportaron que 8 pacientes fueron positivos a la bacteria con títulos de Ac.

VARIOS

Artsob *et al.* (1992) presentan un trabajo realizado en Prince Edward Island, Canadá donde determinan la presencia de *B. burgdorferi* por medio de IFI en 5 de 75 sueros de perros, 1 de 8 venados y en ningún gato de 7 analizados. El reactor fue un perro con antecedentes de haber viajado a los EU. Este reporte documentó el primer diagnóstico de *B. burgdorferi* en el Atlántico de Canadá, quizá por la introducción de *I. dammini* en la migración de aves. Los estudios serológicos indicaron que *B. burgdorferi* no se encontró ampliamente diseminada en Prince Edward Island.

Salinas *et al.* (1995) amplificaron secuencias de ADN de *B. burgdorferi* mediante la prueba de PCR en muestras de humanos y caninos. Se utilizó un par de oligonucleótidos que amplificaron un fragmento de 244 pb que representan parte de la región variable V4 del gen 16S rRNA de *B. burgdorferi*. Utilizando la técnica de PCR, se pudo detectar al microorganismo en dos biopsias de piel de pacientes con acrodermatitis, y en líquido sinovial de un perro con artritis. Estos datos sugieren la presencia de la enfermedad en el estado de Nuevo León, Mexico.

V.- MATERIAL Y METODOS

1.- Localidad del área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en cuatro localidades rurales del estado ubicadas al este y sureste del área metropolitana de Monterrey N. L., (Fig. 1), dentro de la provincia fisiográfica de la Llanura Costera del Golfo Norte (Dulces Nombres, N.L. y La Ciudadela, N.L.) y Sierra Madre Oriental (El Ranchito, N.L. y El Barrial, N.L.) situada entre las coordenadas siguientes.

MUNICIPIO	LOCALIDAD	LAT. NORTE	LONG. ESTE
Pesquería, N. L.	Dulces Nombres	25° 43' 6"	100° 04' 9"
Juárez, N.L.	La Ciudadela	25° 34' 0"	100° 07' 7"
Santiago, N. L.	El Ranchito	25° 29' 2"	100° 11' 6"
Santiago, N.L.	El Barrial	25° 28' 1"	100° 11' 2"

(INEGI, 1984)

En todas las localidades predomina un clima semicálido, subhúmedo a húmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual oscila de 18 a 22°C, registrándose la máxima en Junio, Julio y Agosto con 25°C a 30°C y la mínima de 4°C a 16°C en Diciembre y Enero (SARH, 1988). La precipitación media anual va de 600 a 800 mm. El tipo de vegetación que predomina es el matorral submontado y matorral espinoso con algunos mezquitales y pastizales naturales e inducidos. La altitud fluctúa entre 500 a 800 m sobre el nivel del mar (SPP, 1981).

2.- Hospederos (*Canis familiaris*) y vectores (Acari: Ixodidae)

Previo a la obtención de sangre de perros y colecta de garrapatas se realizó la visita a los domicilios en cada una de las 4 localidades de estudio para localizar la mayor cantidad de perros y garrapatas por lo cual a cada propietario se le solicitó la colaboración para obtener los ejemplares.

3.- MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.- Muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron a través de la canalización de la vena radial ubicada sobre la parte anterior de los miembros anteriores, previa a la depilación y desinfección de el área de punción. Posteriormente las muestras de sangre fueron colocadas en tubos de ensayo estériles al vacío con citrato de sodio como anticoagulante para realizar la prueba molecular, después todas las muestras se colocaron a 4° C en cajas de hielo seco para su conservación. Posterior a la toma de sangre se registraron una serie de datos acerca del perro tales como la localidad, nombre del perro, raza, sexo, edad y presencia o ausencia de ectoparásitos.

3.2.-Colecta de garrapatas

Los perros de cada localidad fueron inspeccionados detenidamente y las garrapatas se colectaron en forma manual mediante la técnica de Amerasinghe *et al.* (1992), que consiste en coleccionar todas las garrapatas observadas por espacio de 5 min de un sólo lado del animal generalmente de cabeza, cuello y axila. Posteriormente los especímenes fueron colocados en tubos de ensayo con alcohol etílico al 70% para preservarlas hasta realizar la prueba molecular y la identificación taxonómica; finalmente cada tubo fue etiquetado.

4.- TRABAJO DE LABORATORIO

4.1.- Marcador de pares de bases

Para este trabajo se utilizó el ADN del plásmido pBR322 (Sigma) digerido con la enzima de restricción *Alu I* y *Dde I* (GIBCO BRL). Al conocer los patrones de restricción obtenidos, los fragmentos de ADN esperado sirvieron como marco de referencia. El plásmido al ser tratado de esta manera, presentó un número de fragmentos de ADN con tamaño de 910 a 11 pb cuando fue cortado con la enzima *Alu I* y cuando fué digerido con la enzima *Dde I* este presentó fragmentos de 1653 a 162 pb. (Sambrook *et al.*, 1988).

4.2.- Cepa de *Borrelia burgdorferi*

Fue usada una cepa canónica de *B. burgdorferi* (cepa CONN-2591) como referencia, la cual se utilizó como testigo positivo mantenida en un medio de cultivo. La cepa fue proporcionada amablemente por el Dr. John F. Anderson de The Connecticut Agricultural Experiment Station en New Haven, Conn., E.U.A. y el Dr. Robert S. Lane del Colleague of Natural Resources, Department of Entomology Science, University of California, Berkely.

4.2.1.- Preparacion de cepa de referencia

Se empleó 1 ml del medio de cultivo de *B. burgdorferi* y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml Posteriormente fue centrifugado brevemente a 13,000 rpm por 10 min (Eppendorf 5415 C), el sobrenadante se desecho y el paquete celular fue resuspendido para lavarlo en una solución de buffer de fosfato (PBS) pH 7.5. Esta suspensión fue agitada por 4 min en vortex (VWR Scientific) y centrifugada por 10 min a 13,000 rpm; se desechó igualmente el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 100 µl de agua destilada y se calentó a 100°C durante 10 min. Finalmente una alícuota 20 µl de la muestra fue conservada en refrigeración a 4°C hasta el momento de realizar la prueba de PCR.

5.5.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

5.1.- Extracción de ADN bacteriano a partir de células sanguíneas

Una vez colectadas las muestras se realizó la extracción de ADN bacteriano para lo cual se tomaron 400 µl de cada una de la 97 muestras de sangre de perros con citrato de sodio para depositarse en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Los tubos fueron centrifugados a 5,000 rpm por 5 min (microcentrífuga Brinkmann-5415c).

El sobrenadante se desechó y el paquete celular se le agregó 1 ml de solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl al 155mM; NaHCO₃ al 10 mM; NH₄EDTA pH 7.4 al 0.1 mM). Los tubos fueron mezclados hasta obtener la lisis de los glóbulos rojos y posteriormente

fueron centrifugados a 6,000 rpm por 3 min repitiendo el procedimiento hasta la completa aclaración del paquete celular.

El paquete de glóbulos blancos fue resuspendido en 400 μ l de buffer TE (10mM de Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM de Na₂EDTA). Luego fueron agregados 400 μ l de solución de lisis total (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 8.0) mas 10 μ l de la enzima proteinasa K (10 mg/ml, Gibco). Las muestras fueron agitadas suavemente e incubadas por 30 min a una temperatura de 50°C en baño de agua.

Posteriormente se agregaron 400 μ l 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 los tubos fueron agitados en vortex por 10 seg y centrifugados a 10,000 rpm por 10 min.

El precipitado fue descartado y al sobrenadante se le agregaron 400 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la mezcla fue agitada en vortex brevemente y después se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min.

La fase superior acuosa fue obtenida y colocada en un tubo nuevo al cual le fueron agregando 200 μ l de acetato de amonio al 7.5 M, la mezcla se dejó reposar en hielo por 10 min. Para luego ser centrifugada a 10,000 rpm por 10 min.

El sobrenadante fue separado y colocado en tubos nuevos, para luego ser mezclados con 1 ml de etanol al 95%. Posteriormente se refrigeró a una temperatura de -20°C por un mínimo de 2 hrs.

Los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue desechado y los tubos se colocaron en posición invertida sobre papel absorbente hasta evaporar los restos de alcohol.

Después les fue agregado 1 ml de etanol frío al 70%, los tubos fueron mezclados suavemente y luego centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue desechado y los tubos se pusieron a secar en posición invertida sobre papel absorbente.

Secos los tubos, se les agregó a cada uno 20 μ l de TE. Los ácidos nucleicos extraídos fueron conservados en centrifugación a 4°C hasta el momento de ser utilizados en PCR siguiendo el protocolo anteriormente descrito, sólo que con iniciadores (primers) diferente. (Martinez 1993).

Finalmente de las 97 muestras de ADN extraído, 5 μ l de cada muestra fueron depositados en un tubo nuevo en grupos de 10 perros hasta realizar la prueba molecular.

6.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE GARRAPATAS

Para obtener el extracto de garrapatas, previamente fueron colocadas sobre papel secante y se dejó reposar por espacio de 5 min para eliminar los residuos de alcohol. después fueron lavadas con agua destilada y secadas.

Posteriormente todos los órganos internos de cada espécimen se extirparon y fueron separados en grupos de 10 garrapatas, (excepto 1 grupo de 3) en un tubo eppendorf de 1.5 ml resuspendiéndose en 50 μ l de TE (10mM de Tris-Cl pH 8.0 y 1 mM de Na₂EDTA) y se maceraron con una pipeta homogenizadora de pistilo (Deltawere No. 95100) por 5 min.

Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 95°C por 10 min. Después se colocaron en hielo por 10 min. Finalmente se usaron 4 μ l de sobrenadante para PCR. (Persing *et al.*, 1990).

7.- Amplificación de ADN

Para iniciar los dos ensayos se utilizaron tubos eppendorf de 500 μ l en los cuales se agregaron, 4 μ l que contenía un promedio de 100 ng de ADN de sangre y 4 μ l del extracto de garrapatas, en ambos se agregaron 2 μ l (10 pmol) de cada iniciador o primer (Fig. 2), 5 μ l (10 mM) de Tris-HCl, 3 μ l (3.0 mM) de cloruro de magnesio, 1 μ l (200mM) de cada deoxinucleótidos trifosfatados y 2 μ l (2.5. unidades) de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Gibco. USA), obteniéndose un volumen final de 50 μ l. Finalmente se depositaron 45 μ l de aceite mineral con el fin de evitar evaporaciones.

La reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 480 siguiendo un programa diseñado específicamente para este caso y con una duración aproximada de 3 hrs.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización	94°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	30
Alineamiento	45°C	1 min	30
Extensión	72°C	1 min	30
Extensión	72°C	2 min	1

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

El fraccionamiento en geles de agarosa se realizó bajo una corriente de 60v y 100v. Para esto se tomaron 8 μ l de cada porción y fueron mezcladas con 3 μ l de solución Halt (25% de glicerol, 0.25% de Xilencianol, 0.25% de azul de bromofenol, 50 mM 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 depositados 200 ng del marcador de pares de bases. como un marco de referencia para el tamaño de nuestra banda esperada.

El gel permaneció siempre sumergido en una solución amortiguadora TBE 0.5X. Al término del fraccionamiento el gel fue visualizado en un transiluminador 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 (Sambrook *et al.*, 1988).

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

8.-Estudio taxonómico

La identificación y cuantificación de las garrapatas se llevaron a cabo en el laboratorio, utilizándose las claves taxonómicas para garrapatas de Keiran & Litwak. (1989) y de Furman & Loomis, (1984) para especies de California.

9.- Prevalencia y abundancia

Los índices de densidad de garrapatas se determinaron por la prevalencia (porcentaje de perros infestados con garrapatas) y la abundancia por sexo y total (media aritmética y desviación estándar [DE]) de el número de garrapatas por perros (incluyendo garrapatas positivas y perros sin garrapatas).

Cabe mencionar que los índices de densidad fueron reportados y graficados por especie y por localidad.

El término de "garrapatas por perro" se refirió al número colectado en 5 min. de colección como lo detalló anteriormente Amerasinghe *et al.*, (1992) y no al número total de garrapatas infestando el cuerpo del perro.

VI.- RESULTADOS

1.- Hospederos

En este estudio se colectaron un total de 97 perros durante Agosto 18 de 1994 a Mayo 5 de 1995 de los cuales 65 (67.1%) fueron machos y 32 (32.9%) hembras distribuidos en cada localidad de estudio con 32(32.9%) perros en Dulces Nombres, 23(23.8%) perros en La Ciudadela, 15 (15.4%) en El Ranchito y 27 (27.9%) en El Barrial. Predominó la cruce de razas (criollo) con 83 (85.6%) perros y con 14(14.4%) de razas puras (Tabla 1). Las edades fluctuaron entre 3 meses a 15 años (Tabla 2). Los perros de todas las edades presentaron garrapatas (Tabla 3).

2.- Vectores

Se colectaron un total de 651 garrapatas (Acari: Ixodidae) en el período de estudio, 332 51.0 % machos y 319 49.0 % hembras en 70 72.16% de 97 perros muestreados en la 4 localidades de estudio, la densidad media de garrapatas por perros fue de 6.7, con una intensidad de infestación de 9.3 garrapatas por perro infestado, de los cuales 484 74.34% garrapatas (224 machos, 240 hembras) fueron colectadas de 29 perros estudiados en Dulces Nombres, 76/11.68% garrapatas (39 machos, 37 hembras) de 14 perros muestreados en La Ciudadela, 20/3.08% garrapatas (11 machos, 9 hembras) de 7 perros provenientes de El Ranchito y 71/10.90% garrapatas(38 machos, 33 hembras) de 20 perros muestreados en El Barrial, (Tabla 4).

3.- Cepa de referencia *Borrelia burgdorferi*

En la figura 3 se observa un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestra la amplificación de la cepa de referencia despues de someterla a PCR. En el carril M se observa el marcador de pares de bases pBR322+*Alu* I fragmentadas de 910 a 11 pares de bases. En el carril 1 se observa la banda amplificada de aproximadamente 373 pb. proveniente del gen *OspA* de *B. burgdorferi* cepa CONN-2591 utilizada como testigo positivo.

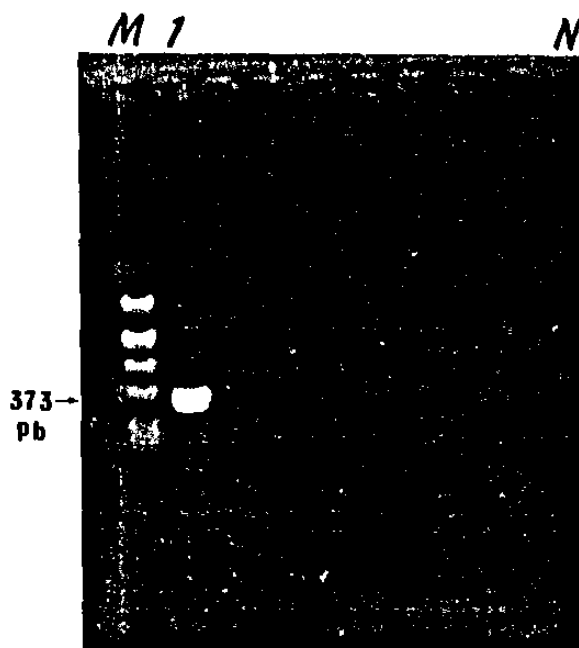


Fig. 3.- Gel de agarosa al 1.5% conteniendo una banda amplificada del ADN de la cepa de *Borrelia burgdorferi*. En el carril M: el marcador de pares de bases pBR322+*Alu* I. En el carril 1: se observa una banda de *B. burgdorferi* CONN-2591. Carril N: control negativo.

4.-PCR en muestras de sangre

Los resultados obtenidos indican que de 9 muestras de sangre de grupos de 10 perros analizadas por PCR, ninguna reveló resultados positivos a la prueba (Tabla 5).

5.- PCR en muestras de garrapatas

Se analizaron 64 grupos de garrapatas por medio de PCR, los resultados revelaron que 4 (6.3%) grupos de 10 garrapatas fueron positivos a la prueba (Tabla 6). En la figura N° 4 se observa un gel de agarosa al 1.5% donde se apreció la amplificación lograda a partir de ADN de *B. burgdorferi* encontrados en garrapatas removidas de perros. En el carril M se indica la fragmentación del marcador de pares de bases, en los carriles 2 a 5 se muestra la amplificación de 4 bandas correspondiente al ADN de *B. burgdorferi* cepa CONN-2591, localizado en este tipo de muestras y por último el carril N se observa el control negativo. Estos resultados coinciden con el testigo positivo de *B. burgdorferi* cepa CONN-2591 previamente establecida en carril 1.

Los resultados obtenidos indicaron que los 2 (3.1%) grupos positivos correspondieron a la especie *D. variabilis* obtenidas de perros de la localidad de Dulces Nombres, 1(1.6%) grupo positivo en *D. variabilis* colectadas de perros de la localidad La Ciudadela y 1 (1.6%) el restante (grupo de 3 garrapatas) en *D. variabilis* colectadas de perros de la localidad de El Ranchito. (Tabla 7).

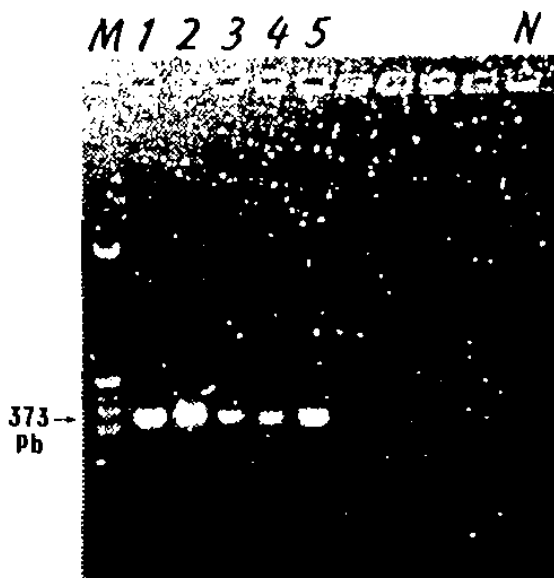


Fig. 4.- Gel de agarosa al 1.5% que nos muestran el resultado de la prueba de PCR a partir de un extracto de grupos de 10 garrapatas. Carril M: el marcador de pares de bases pBR322+*Dde* I. Carril 1: testigo positivo. Carril 2-5: muestras positivas. Carril N: control negativo.

6.6.- ESTUDIO TAXONÓMICO:

La identificación taxonómica de las garrapatas removidas de perros localizados en Dulces Nombres, N.L., La Ciudadela, N.L., El Ranchito, N.L. y El Barrial, N.L. se efectuaron mediante las claves anteriormente mencionadas.

Del total de garrapatas colectadas se identificaron 521(80.0%) garrapatas *R. sanguineus* (278 machos, 243 hembras), 57(8.8%) *D. variabilis* (20 machos, 37 hembras), 60(9.2%) *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (30 machos, 30 hembras) y 13(2.0%) *Boophilus annulatus* Salmon & Stiles, 1901, (4 machos, 9 hembras).(Tabla 8 y 9; Fig. 5 y 6).

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

CLASE: *Arachnida* (Lamark, 1815)

SUBCLASE: *Acari* (Leach, 1817)

ORDEN: *Parasitiforme* (Reuter, 1909)

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

FAMILIA: *Ixodidae* (Canestrini 1890)

GENERO: *Rhipicephalus* (Koch 1844, Nuttall and Warburton 1911, Cooley 1946, Hoogstraal 1956)
(Beaver 1986)

Rhipicephalus sanguineus

(Latreille, 1806; Koch, 1844; Cooley 1946)

(Figs. 7 y 8)

Descripción:

Hembra: En vista dorsal son organismos que presentan cuerpo oval, algunos más ancho en su parte posterior, generalmente de color café. Partes bucales con palpos cortos y anchos. Hipostoma igual a los palpos. Capitulo hexagonal con proyecciones latero-triangular, áreas porosas sobre el capítulo. Cornua presente como esquinas salientes. Escudo sin

ornamentación. Ojos laterales presentes y 11 festones ubicados en la parte posterior del abdomen. En vista ventral coxa I con dos aguijones un externo delgado y otro interno de forma más puntiaguda. coxa II a IV con aguijones externos redondo y pequeños. coxa II y III aguijones internos más pequeños en forma de pequeñas protuberancias. Plato espiracular corto en forma de coma.

Macho: En vista dorsal son organismos de cuerpo oval, más amplio en su parte posterior. Las partes bucales con palpos cortos y anchos. Capitulo hexagonal con proyecciones latero-triangular. cornua presente. Escudo mucho más amplio que en las hembras sin ornamentaciones. Festones presentes en la misma cantidad a las hembras. En vista ventral presentan las coxas similares a las hembras pero la única diferencia es la coxa IV con un pequeño aguijón interno. Platos o escudos accesorios anal y adanal. Plato espiracular elongado en forma de coma.

Hospedero: Perros (*C. familiaris*)

Localización: principalmente de cabeza, orejas, cuello y axilas

Distribución geográfica: Dulces Nombres perteneciente a Pesqueria, N.L., La Ciudadela perteneciente a Juárez, N.L., El Ranchito y El Barrial perteneciente a Santiago, N.L.

Comentarios: *R. sanguineus* pudo ser distigible de otras garrapatas generalmente por la base del capítulo hexagonal con proyecciones latero-triangular y la presencia de festones en su parte posterior del abdomen. La base del capítulo de la garrapata *B. annulatus* (Salmon & Stiles) es algo parecida a *R. sanguineus* pero lo que distingue a esta especie fácilmente es que *B. annulatus* no presenta festones en la parte posterior del cuerpo.

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

(Say, 1821; Bank, 1908; Cooley, 1938; Arthur 1960)

(Figs. 9 y 10)

Descripción:

Hembras: En vista dorsal son organismos que presenta cuerpo oval elongado con un patrón de coloración café con pequeña ornamentación. La partes bucales con palpos cortos anchos y moderados. Base del capítulo rectangular ligeramente más ancho que largo, cornua ancha y corta. Presenta surcos cervicales poco profundo posterior a la base del capítulo. Escudo con un patrón coloración de gris a plata típicamente de variable formas y el rojo-café presente como coloración de fondo y pequeñas puntuaciones numerosas a lo largo del escudo. En la parte posterior al abdomen presentan 11 festones. En vista ventral coxa I con largo aguijón interno ligeramente triangular, aguijón externo es más pequeño pero delgado, coxa II y III con aguijones externos más pequeños y aguijones internos redondos, coxa IV con pequeño aguijón externo, aguijón interno ausente o en algunas se observo pequeños abultamientos. Platos espiraculares en forma variable típicamente ancho con ligero despunte en la prolongación posterodorsal, células muy redondas y numerosas con pequeñas puntuaciones cerca de los bordes y en la prolongación posterodorsal.

Macho: En vista dorsal son organismos de forma oval elongada con una coloración blanca y café donde predomina la ornamentación. Las partes bucales con palpos cortos anchos. Base del capítulo tan ancho como largo. Escudo más amplio que las hembras con patrón de coloración de gris a plata y un color rojo-café de fondo. escudo con surcos cervicales profundos y cortos posterior a la base del capítulo. Festones presentes en misma cantidad a las hembras. En vista ventral agujones coxales presentes iguales a las hembras pero la diferencia en machos es que no hay ningún vestigio del aguijón interno sobre la coxa IV. Platos espiraculares anchos con células redondas numerosas y puntuaciones igual a las hembras.

Hospedero: perros (*C. familiaris*)

Localización: principalmente de cabeza, orejas, cuello y axilas

Distribución geográfica: Dulces Nombres perteneciente a Pesqueria, N.L., La Ciudadela Perteneciente a Juárez, N.L. y El Ranchito perteneciente a Santiago, N.L.

Comentario: *D. variabilis* es una especie muy semejante a *Dermacentor andersoni* Marx, 1897, *D. occidentalis* en la ornamentación del escudo, pero *D. variabilis* difiere de todas las especies de *dermacentor* en la apariencia granular muy pequeñas, fina y numerosa en los platos espiraculares.

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,

Robinson, 1929, Cooley and Kohls, 1944)

(Beaver 1986)

Amblyomma cajennense

(Fabricius, 1787)

(Figs. 11 y 12)

Descripción:

Hembra: En vista dorsal son organismos de forma redonda a oval. La coloración predomina la ornamentación blanca y un fondo amarillo-café. Las partes bucales con palpos delgados y elongados; el segmento 2 mucho más grande que el segmento 3. La base del capítulo rectangular. Escudo ornamentado con coloración blanca de forma radiada. 11 festones presentes en forma de tubérculos quitinosos en el ángulo postero-interno. En vista ventral la coxa I con aguijón externo ampliamente más largo que el aguijón interno. Espiráculo subtriangular en forma de coma.

Macho: En vista dorsal son organismos de forma redonda a oval. La coloración con ornamentación mucho más amplia que las hembras. Las partes bucales con palpos delgados y elongados igual a la hembras. La base del capítulo rectangular. Escudo con un patrón amplio de coloración blanca con un fondo de rojo-café radiada desde el centro a la periferia con más prevalencia en área central y anterior al escudo. Festones presentes. En vista ventral se observó que la coxa I con aguijón external mucho más largo que el aguijón interno. Espiráculo subtriangular en forma de coma.

Hospedero: perros (*C. familiaris*)

Localización: principalmente de cabeza, orejas, cuello y axilas

Distribución geográfica: El Barrial perteneciente a Santiago, N.L.

Comentario: *A. cajennense* presenta una semejanza a *A. americanum* en la forma delgada y elongada de las partes bucales (palpos e hipostoma) y en la forma oval de su cuerpo, pero difieren en la coloración de los escudos. La hembras *A. americanum* presenta escudo típicamente con una macha blanca en la parte posterior del escudo y el macho *A. americanum* presentó un escudo típicamente más amplio con 2 pares de líneas blancas semicirculares en las áreas anterolateral y posterolateral a nivel de los festones y en cambio la hembra *A. cajennense*, el escudo presentó una coloración blanca uniforme de variables formas, y el macho *A. cajennense* presenta un escudo más amplio por lo que la coloración variable se observó con más claridad.

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: *Boophilus* (Curtice 1891, Neumann
1907, Salmon y Stiles 1901, Cooley 1946,
Arthur 1960)
(Beaver 1986)

Boophilus annulatus

(Salmon & Stiles 1901, Cooley 1946 & Arthur 1960)

(Figs. 13 y 14)

Descripción:

Hembra: En vista dorsal son forma oval con un patrón de coloración café. Las partes bucales con palpos mucho más cortos que el hipostoma. La base del capitulo mucho más ancho que largo, con márgenes laterales formando cortas extremidades, cornua ausente. Escudo ancho en su parte anterior, con márgenes anterolaterales casi paralelos y rectos, ojos presentes. Festones ausentes. En vista ventral coxas sin aguijones excepto un corto aguijón redondo externo sobre la coxa I. Tarso II y IV con subapical aguijón ventral. Espiráculos redondos a ovals.

Macho: En vista dorsal de forma oval. Predomina un color café en su cuerpo. Las partes bucales con palpos mucho más cortos que el hipostoma. Presentan la base del capitulo mucho más ancho que largo, cornua presente con margen posterior recto. Escudo ligeramente estrecho. En vista ventral coxa I con aguijón externo e interno de igual medida y variable anchura. Coxa II a IV sin aguijones. Platos espiraculares igual a las hembras.

Placas adanales y accesorias. Platos o escudos accesorios anal y adanal. Espiráculos redondos a ovales.

Hospedero: perros (*C. familiaris*)

Localización: principalmente de cabeza, orejas, cuello y axilas

Distribución geográfica: La Ciudadela Perteneciente a Juárez, N.L.

Comentario: *B. annulatus* se diferencia de otras especies de garrapatas ya que es una especie que presenta palpos típicamente cortos y anchos que los hace ser una de las características taxonómicas muy notables de otras especies de garrapatas así mismo como ausencia de festones en la parte posterior del abdomen.

6.7.- PREVALENCIA Y ABUNDANCIA:

La prevalencia fue determinada por el promedio de perros con garrapatas observándose que para las garrapatas *R. sanguineus* el promedio más alto fue en la localidad de Dulces Nombres, N.L. con 90.62% de 32 perros muestreados y el más bajo en El Barrial, N.L. con 22.22% de 27 perros muestreados. La abundancia de total fue determinada por el número de (garrapatas por perros \pm desviación standard) en todas las localidades muestreadas, observándose que la máxima fue para Dulces Nombres con (14.15 ± 17.84) de 453 garrapatas colectadas, y la mínima fue en El Barrial con (0.40 ± 0.93) de 11 colectadas. La abundancia por sexo, se presentaron valores máximos para Dulces Nombres y los mínimos en El Barrial. (Tabla 10).

Las prevalencia y abundancia en *D. variabilis* mostró promedios casi equivalentes en las localidades de Dulces Nombres, N.L., La Ciudadela, N.L. y El Ranchito, N.L. presentándose la prevalencia más alta en la localidad de Dulces Nombres con 37.50% de 32 perros muestreados y una abundancia total de (0.96 ± 2.26) de 31 garrapatas colectadas. la prevalencia más baja se presentó en La Ciudadela con 17.39% de 23 perros muestreados y la abundancia total más baja se presentó en El Ranchito con (0.20 ± 0.41) . Cabe señalar que en El Barrial, N.L. no se presentó ningún perro con garrapatas por lo tanto no se registró ninguna *D. variabilis*, (Tabla 11).

De las 4 Localidades muestreadas *A. cajennense* sólo se observó en la localidad El Barrial, N.L. con una prevalencia de 74.07% de 27 perros muestreados y una abundancia total de (2.22 ± 2.24) de 60 garrapatas colectadas. No hay una diferencia significativa en la abundancia por sexo en esta especie de garrapatas. (Tabla 12).

B. annulatus presentó una prevalencia de 8.69% de 23 perros muestreados y una abundancia total de (0.56 ± 1.87) de 13 garrapatas colectadas en la localidad de La Ciudadela, N.L. En el resto de las localidades, los hospederos no presentaron garrapatas por

lo que no se registró la prevalencia y lógicamente también la abundancia de *B. annulatus*.
(Tabla 13).

VII.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados indicaron que del total de muestras de sangre procesadas por PCR, ninguna fue positiva. La utilización de muestras de sangre de perros para diagnóstico es excelente ya que se puede obtener una gran cantidad de DNA, pero al no encontrar ninguna muestra positiva podemos pensar que sea debido a ciertas limitantes como puede ser la baja espiroquetemia en sangre o la presencia de inhibidores en la reacción de amplificación. Opiniones que fortalezcan los resultados negativos obtenidos en nuestro estudio son las escritas por Johnson *et al.*, (1984) quienes mencionan que existen experimentos en animales que han mostrado que la espiroqueta ha sido diagnosticada en sangre dos semanas después de la infección. Sin embargo Duray *et al.*, (1986) menciona la presencia de la espiroqueta en sangre de corazón varios meses después de la infección. Así mismo Moody *et al.*, (1990) detectan la espiroqueta en sangre de ratas Lew/N 30 días después de inoculación de la espiroqueta. A todo lo anterior le agregamos la evidente propagación del agente causal en el hospedero, además de ser una enfermedad de largo término, se concluye que quizá haya una espiroquetemia intermitente Bosler *et al.* (1984).

La falta de diagnóstico de la espiroqueta *B. burgdorferi* en sangre de perros puede ser debido a una intermitencia de la bacteria en la sangre. Pachner *et al.*, (1993) refuerza esto mismo al mencionar que la prueba de PCR 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.

Malloy *et al.* (1990) escogen 15 muestras de sangre de caninos previamente diagnosticadas como positivas en base a síntomas clínicos y serológicos a la EL y las analizan por PCR. Los resultados revelaron que sólo 1 de las 15 muestras de sangre fue positiva. Artsob *et al.*, (1992) realizaron un estudio en Price Edward Island, Canadá donde detectan *B. burgdorferi* por medio de la IFI en 7 de 75 sueros de perros. Benach *et al.*, (1983) realizan un trabajo en Long Island y la provincia de Weschester, N.Y. donde aíslan la espiroqueta 2 de 36

muestras de sangre en pacientes en quien presentaron signos y síntomas sugestivos de la EL. Se concluyó que un bajo porcentaje en los aislamientos (2 de 36), se debió probablemente a la persistencia de la espiroqueta en sangre (espiroquetemia) y la baja densidad en estas condiciones. Otros estudios realizados en sangre son los de Rawlings *et al.*, (1987) quien conducen un trabajo en el laboratorio del Departamento de Salud de Texas para aislar la bacteria *B. burgdorferi* en sangre de pacientes. Se determinó que 2 de 100 pacientes resultaron positivos. Burgess *et al.*, (1986) determinaron *B. burgdorferi* por medio de hemocultivo. Se confirmaron que 8 de 111 perros fueron positivos, ellos mencionan que el nivel y duración de la espiroquetemia en perros es incierta. La espiroqueta fue aislada de animales clínicamente normal. Se mencionó que se debe tener cuidado en la toma de sangre de animales, ésta técnica podría ser una buena práctica para la prueba de PCR y detectar *B. burgdorferi* en perros.

Los resultados indicaron que la prueba de PCR a partir de extracto de garrapatas resultó ser positiva en el 6.3% de las garrapatas *D. variabilis*, de lo cual el 3.1% de los especímenes fueron de la localidad de Dulces Nombres perteneciente a Pesquería, N. L. y 1.6% fue para la localidad La Ciudadela perteneciente a Juárez, N. L. y 1.6% fue para la localidad El Ranchito perteneciente a Santiago, N.L.

En la actualidad no existen en el estado de Nuevo León así mismo como en el país, un estudio semejante en garrapatas para realizar su comparación con los resultados obtenidos, en Nuevo León se han realizado dos estudios acerca de la EL que representan un valor diagnóstico, uno es el descrito por Welsh *et al.*, (1992) que reportan en localidades sin conocer del estado de Nuevo León la presencia de *B. burgdorferi* por medio de la técnica de ELISA en sangre de 8 pacientes con edades entre 7 y 65 años con antecedentes de haber sufrido picaduras de artrópodos hematófagos y que presentaban lesiones eritematosas anulares en la piel ligeramente pruriginosa, así como malestar general. Estos hallazgos refuerzan la importancia clínica que tiene la EL en México, y más aun, la necesidad de contar con un procedimiento diagnóstico acertado y oportuno en la población humana, pues

con el presente trabajo se comprueba la existencia de artrópodos transmisores que conviven en el medio doméstico rural. Así mismo el segundo trabajo, reforzando el estudio diagnóstico anterior, Salinas *et al.*, (1995), detectan la bacteria mediante la prueba de PCR en dos biopsias de piel de pacientes y en líquido sinovial de un perro con artritis, éstos resultados nos confirman la presencia de la espiroqueta en el estado de Nuevo León. Por otra parte en algunos países el estudio de los vectores transmisores de *B. burgdorferi* tiene gran importancia epidemiológicamente, por ejemplo en los Estados Unidos de Norteamérica donde la incidencia de casos humanos en 1990 fue de 7,943 casos y en 1991 llegó a 9,344 casos reportados por U.S. Center for Disease Control, (CDC) Guyette *et al.*, (1993), los trabajos sobre vectores toman gran interés. En la actualidad existen algunos autores que han detectado la bacteria *B. burgdorferi* en forma natural o experimentalmente en garrapatas. En los Estados Unidos Persing *et al.* (1990) detectan por medio de la prueba de PCR 15 de 15 garrapatas *I. dammini* mantenidas en laboratorio. Teltow *et al.*, (1991) cultivaron *B. burgdorferi* mediante el medio BSK 7 de 1024 grupos de garrapatas. De los aislamientos espiroquetales, la garrapatas involucradas fueron *A. americanum*, *A. maculatum* e *I. scapularis*. Feir *et al.*, (1994) condujeron un trabajo de investigación para detectar DNA de *B. burgdorferi* en 54 garrapatas *A. americanum* y *D. variabilis* por medio de PCR. Los resultados mostraron que 38(70%) de 54 garrapatas fueron positivas cabe mencionar que las garrapatas previamente fueron muestras positivas por medio de la técnica de IFI. Todas las garrapatas fueron colectadas en el Sureste de Missouri y los alrededores de St. Louis. Los resultados obtenidos, corroboran lo hecho en el presente trabajo donde se determina la presencia de *B. burgdorferi* en garrapatas *D. variabilis* en un 6.3%.

Otros estudios son los Piesman & Sinsky (1988) quienes conducen un trabajo para ver la habilidad de las garrapatas *D. variabilis* y *A. americanum* para adquirir la bacteria *B. burgdorferi* bajo condiciones de laboratorio, los resultados mostraron que 16(9%) de 178 *D. variabilis* resultaron positivas y al igual 6(13%) de 45 *A. americanum*. La presencia de la espiroqueta *B. burgdorferi* en 9% de las garrapatas *D. variabilis* en el estudio anterior y el 6.3% en la misma especie en nuestro trabajo, nos mostró un porcentaje de infección casi

similar en ambos estudios. Reportes más recientes son los hechos por Pichón *et al.*, (1995) quienes en la región de Rambouillet cerca de París, Francia detectan la espiroqueta por medio de la PCR. Los resultados revelaron que 30 de 249 ninfas *I. ricinus* fueron positivos. Burgdorfer *et al.* (1985) menciona que *B. burgdorferi* comúnmente es detectada en garrapatas del género *Ixodes* sp. pero también en otras especies de garrapatas tales como *D. variabilis*, *H. leporispalustris* y *A. americanum*. Así también Teltow *et al.*, (1991) refuerza lo anterior y menciona que *B. burgdorferi* ha sido aislada de ciertas especies de garrapatas que no son del género *Ixodes* como la garrapata “Dog American Tick” *D. variabilis* y “Lone Star Tick” *A. americanum*.

El presente trabajo ha desarrollado un ensayo basado sobre la PCR para la detección de *B. burgdorferi* y esta técnica ha sido aplicada para la detección de secuencias del gen OspA de la bacteria en garrapatas removidas de perros en 4 localidades rurales del estado de Nuevo León. La ventaja potencial de usar PCR en este contexto incluye. (i) La producción de una secuencia amplificada que puede ser usada para caracterizar o demostrar la clasificación de un patógeno, (ii) la habilidad para detectar el organismo en especímenes muertos considerados un análisis inadecuados por otros medios convencionales y (iii) amplificar secuencias múltiples de un producto dentro de algún espécimen Persing *et al.*, (1990).

Este trabajo registra la presencia de garrapatas *D. variabilis* con un segundo lugar en abundancia por localidades de estudio, y la única especie portadora de *B. burgdorferi* en tres localidades rurales del estado de Nuevo León de las cuatro estudiadas, constituyendo así el primer reporte de éste microorganismo en garrapatas en el estado de Nuevo León, Mex. Lo anterior nos explica que *D. variabilis* presenta buena competencia vectorial y quizá tenga un impacto epidemiológico de la EL en el estado.

Consideramos necesario efectuar estudios adicionales para determinar el papel de esta especie de garrapatas en la epidemiología de la EL en el estado de Nuevo León y los estados vecinos.

Del total de perros muestrados se colectaron en total de 651 garrapatas, de los cuales, los resultados taxonómicos nos indicaron una abundancia total de *R. sanguineus*(80.0%), *A. cajennense*(9.2%), *D. variabilis*(8.8%) y *B. annulatus*(2.0%). Estudios taxonómicos de garrapatas colectadas de perros como potenciales vectores de la EL no se conoce en el estado de Nuevo León. En la actualidad en países extranjeros donde la EL toma gran importancia se ha realizado estudio por ejemplo Teltow *et al.*, (1991) examinaron de Noviembre de 1988 a Diciembre 1989 en Texas artrópodos para aislar *B. burgdorferi* por medio del cultivo modificado de BSK en animales domésticos. La espiroqueta fue aislada de 8 de 1,093 pools de artrópodos cultivados. Se colectaron 9 *A. cajennense*, 57 *D. variabilis*, 91 *R. sanguineus*, 244 *A. americanum*, 11 *A. maculatum*, 5 *D. albipictus*, 28 *Dermacentor nigrolineatus* Packard, 2 *D. Parumapertus*, 5 *H. leporispalustris* y 445 *Ixodes scapularis*. Rawlings & Teltow (1994) realizaron un trabajo en Texas entre 1990 y 1992 para determinar la prevalencia de la espiroqueta *B. burgdorferi* en garrapatas. La espiroqueta se detectó en 1.03% de 5,141 garrapatas. Estudio taxonómico identificaron garrapatas de siete diferente especies de las cual se incluyen 2,901 fueron *A. americanum*, 1 *A. maculatum*, 70 *D. nigrolineatus*, 44 *D. variabilis*, 1021 *H. leporispalustris*, 20 *R. sanguineus*, 326 *Ixodes sp.* Keirans & Litwak (1989) realizaron claves taxonómicas para garrapatas del género *Ixodes* para ser usadas como una herramienta para identificar garrapatas potenciales vectores de la EL en el este de Mississippi. Se identificaron 6 géneros 27 especies de garrapatas dura(Ixodidae) de las cuales incluyeron géneros tales como 3 *Amblyomma* (*A. americanum*, *Amblyomma dissimile* Koch, 1844, *Amblyomma tuberculatum* Marx) 1 *Boophilus* (*B. annulatus*), 3 *Dermacentor* (*D. albipictus*, *Dermacentor nitens* Neumann y *D. variabilis*), 2 *Haemaphysalis*(*Haemaphysalis chordelis* Packard y *H. Leporispalustris*), 16 *Ixodes* (*Ixodes affinis* Neumann, *Ixodes angustus* Neumann, *Ixodes baergi* Cooley & Kohls,

Ixodes banksi Bishopp, *Ixodes brunneus* Koch, *I. cookei*, *I. dammini*, *I. dentatus*, *Ixodes kingi* Bishopp, *Ixodes marxi* Banks, *Ixodes minor* Neumann, *Ixodes muris* Bishopp, *Iscapularis*, *Ixodes sculptus* Neumann, *Ixodes texanus* Banks e *Ixodes woodi* Bishopp) y 1 Rhipicephalus (*R. sanguineus*).

VIII. LITERATURA CITADA

- Anderson, J. F.; L. A. Magnarelli, W. Burgdorferi & A. G. Barbour. 1983.** Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from Connecticut. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:818-824.
- Anderson, J. F.; R. C. Johnson, L. A. Magnarelli & F. W. Hyde. 1986.** Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease. *Infect. Immun.* 51:394-396.
- 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, Canadá. *J. Med. Entomol.* 29:1063-1066.
- Beaver, P.CH.; R. C. Jung & E. W. Cupp. 1986.** Parasitología Clínica. Segunda edición Editorial Salvat, pp 601-615.
- Benach, J. L.; E. M. Bosler, J. P. Hanrahan, J. L. Coleman, G. S. Habicht, T. F. Bast, D. J. Cameron, J. L. Ziegler, A. G. Barbour, W. Burgdorfer, R. Edelman & R. A. and R. A. Kaslow. 1983.** Spirochetes isolated the blood of two patients with Lyme disease. *The New England Journal of Medicine.* 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.

- Boerlin, P.; O. Peter, A. G. Bretz, D. Postic, G. Baranton & J. C. Piffaretti. 1992.** Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infection and Immunity*. 60:1677-1683.
- Bonard, E. C. 1990.** Borrelioses. *Rev. Med. Suisse. Romande*. 110:489-490.
- Bosler, E. M.; B. G. Ormiston, J. L. Coleman, J. P. Hanrahan & J. L. Benach. 1984.** Prevalence of the Lyme disease spirochete in populations of white-tailed deer and white-foot mice. *Yale J. Biol. Med.* 57:201-209.
- 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*. pp 288-290.
- Burgess, E. C. 1991.** The role of wild mammals in the transmission of *Borrelia burgdorferi*. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 16:50-58.
- Chengxu, A.; W. Yuxin, Z. Yongguo, W. Shaoshan, Q. Quicheng, S. Zhixue, L. Deyou, C. Dongquan, L. Xiaodong & Z. Jienhua. 1988.** Clinical manifestations and epidemiological characteristics of Lyme Disease in Hailin Coung. Heilongjiang Province, China. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 539:352-353.
- Cleven, T. D.; E. C. Burgess, R. W. Howe & A. Y Goldsby. 1992.** Absence of *Ixodes dammini* (Deer Ticks) on *Peromyscus leucopus* (White-Footed mice) in brown and door counties, Wisconsin. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 17:70-74.

- 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.
- Dekonenko, E. P.; A. C. Steere & K. G. Umanskii. 1989.** Peculiarities of clinical picture of a new tick borne spirochetosis (Lyme disease). Zhurnal-Neuropatologii-i-Psikhiatrii-Imeni-s-s-Korsovoka. 89:15-18.
- Duray, P. H. & R. C. Johnson. 1986.** The histopathology of experimentally infected hamsters with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* (42251). Proc. Soc. Exp. Biol. Med.181:263-269.
- 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.
- Font, A.; J. M. Closa & J. Masoret. 1992.** Lyme disease in dogs in Spain. Vet. Rec. 130: 227-228.
- Fridriksdottir, V.; L. L. Nesse & R. Gudding. 1992.** Seroepidemiological studies of *Borrelia burgdorferi* infection in sheep in Norway. Journal of Clinical Microbiology. 30:1271-1277.
- 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

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.* 494:473-476.

Guyette, J. E. 1993. Lyme Disease: Epidemic or problem under control?. *Pest control.* 61:52-54.

Harwood, F. R. & T. M. James. 1987. *Entomologia Medica y Veterinaria*. Primera edición. Editorial LIMUSA. pp 431-432.

Innis, M. A. & D. H. Gelfand 1990. Optimization of PCRs. in: *PCR protocols. Guide to methods and Application*. Edited Academic Press, Inc., San Diego, California, USA. pp 3-4.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 1984. *Nomenclátor 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.

Kaslow. 1983. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *J. Of Medicine.* 308.

Kawabata, M.; S. Baba, Y. Kazuyuki, N. Yamaguti & H. Russel. 1987 Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector. *Ixodes persucatus*. *J. Int. Dis.* 156:854.

- Keiran, J. E. & T. R. Litwak. 1989.** Pictorial key to the adults of hard ticks family Ixodidae (Ixodida:Ixooidea). East of the Mississippi River. J. Med. Entomol. 26:435-448.
- Kruger, W. H. & M. Pulz. 1991.** Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid by the polymerase chain reaction. J. Med. Microbiology. 35:98-102.
- Lane, R. S.; J. Piesman & W. Burgdorfer. 1991.** Lyme Borreliosis: Relation of its causitive agent to its vectors and hosts in North America and Europe. Annu. Rev. Entomol.. 36:587-609.
- 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. 28:668-674.
- 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. 28:652-657.
- Magnarrelli, L. A.; J. F. Anderson, A. F. Kaufmann, L. L. Lieberman & G. D. Whitney. 1985.** Borreliosis in dogs from Southern connecticut. JAVMA. 186:359-362.
- Magnarelli, L. A.; J. F. Anderson, E. Shaw, J. E. Post & F. C. Palka. 1988.** Borreliosis in equids in northeastern United States. Am. J. Vet. Res. 49:359-362.
- Malloy, D. C.; R. K. Nauman & H. Paxton. 1990.** Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J. Of Clinical Microbiology. 28:1089-1093.

- Marcus, L. C.; M.M. Paterson, R. E. Gilfillan, & P. H. Urband. 1985.** Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England Horses: serologic survey. *Am. J. Vet. Res.* 46:2570-2571.
- Martínez, V. I.O. 1995.** Detección molecular de *Brucella* sp. en muestras de sangre y leche de caprinos. Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.I.. Monterrey, N.L.
- Monsen, S. E.; W. E. Hazeltine & T. L. Henderson. 1990.** Lyme Borreliosis surveillance in Butte County, California. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 15:63-72.
- Moody, D. K; S. W. Barthold, G. A. Terwilliger, D. S. Beck, G. M. Hansen & R. O. Jacoby. 1990.** Experimental chronic Lyme Borreliosis in Lewis Rats. *Am. J. Trop. Hyg.* 42:165-174.
- 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.* 29:673-677.
- Pachner, A. R.; N. Ricalton & G. J. Teltow. 1987.** Comparison of Polimerase chain reaction with culture and serology for diagnosis of murine experimental Lyme Borreliosis. *J. Of Clinical Microbiology.* 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. Of Microbiology.* 28:566-572.

- 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.
- Pichón, 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.
- 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)parte 1:267-268.
- Rawlings, J. A. & G. J. Teltow. 1994. Prevalence of *Borrelia* (Spirochaetaceae) Spirochetes in Texas ticks. J. Med. Entomol. 31:297-301
- Rawlings, J. A.; P. V. Fournier & G. J. Teltow. 1987. Isolation of *Borrelia* Spirochetes from Patients in Texas. Journal of clinical Microbiology. 25:1148-1150.
- Rusell, R. C. 1991. The Lyme disease situation in Australia. Bull. Soc. Vector Ecol. 16:227-229.
- 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, 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.
- Schafrank, S. N.; A. K. Kurban & G Martone. 1990.** Lyme Disease acquired in southeast Africa. Arch. Dermatol. 126:685-686.
- Schmid, G. P. 1984.** The global distribution of Lyme Disease. Yale J. Biol. Med. 57:618-619.
- Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos (SARH). 1988.** Normales Climatológicas (1941-1970). Dirección General de Estudios, Información y Estadística Sectorial. Segunda Edición. pp 509 y 518.
- Secretaría de Programación y Presupuesto. 1981.** Síntesis Geográfica de Nuevo León y Anexos Cartográficos. Coordinación Nacional de los Servicios Nacionales de Estadística e Informática. Gobierno Federal Mexicano.
- 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. 29:314-317.
- Spielman, A.; C. M. Clifford, J. Piesman & M. D. Corwin. 1979.** Human babesiosis on Nantucket Island U.S.A.: a description of the vector *Ixodes dammini*, n. sp.(Acari:Ixodidae). J. Med. Entomol. 15:218-234.
- Spielman, A.; M. L. Wilson, J. F. Levine & J. Piesman. 1985.** Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. Annu Rev. Entomol. 30:439-460.

- Stewart, A.; J. Glass & A. Patel. 1982.** Lyme arthritis in the hunter Valley. *Med. J. Aust.* 1:139.
- Tamez, G. R. 1994.** Diagnóstico molecular de *Borrelia burgdorferi*, agente causal de la enfermedad de Lyme, por la reacción en cadena de polimerasa. Tesis presentada en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnista, U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 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.
- Weisbrod, A.R. & Johnson R.C. 1989.** Lyme Disease and migrating birds in the Saint Croix River Valley. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1921-1924.
- Welsh, O. L.; J. A. M. Salinas, R. G. Tamez & C. Arroyave. 1992.** Enfermedad de Lyme en Nuevo León. Memorias de las "VI Jornadas Médicas" del Hospital Metropolitano "Dr. Bernardo Sepúlveda" y I Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina de la U.A.N.L. efectuado del 19 al 23 de Octubre de 1992 pp. 37.
- Wilskes, B.; R. Steinhuber, H. Bermeister, V. Fingerle, G. Schierz, V. Preacmursic, E. Vanek & B. Lorbeer. 1987.** Lyme Borreliosis in Suddeutschland. *Duet. Mediz. Woch.* 112:1730-1736.
- Winward, K. E. & J. L. Smith. 1989.** Ocular disease in caribbean patients with serologic evidence of Lyme Borreliosis. *J. Clin. Neuro. Ophthalmol.* 9:65-70.

IX.- ANEXOS (FIGURAS Y TABLAS)

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número total de perros, sexo y raza, muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 2. Estratificación de edades del número total de perros muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 3. Número total de perros con o sin ectoparásitos(garrapatas) muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 4. Número total de perros muestreados y garrapatas involucradas, colectadas en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 5. Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en perros muestrados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 6. Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en garrapatas colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 7. Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense* y *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 8. Número total de garrapatas por especie, colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 9. Número total de garrapatas por especie y sexo, colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 10. Prevalencia y abundancia de *Rhipicephalus sanguineus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 11. Prevalencia y abundancia de *Dermacentor variabilis* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 12. Prevalencia y abundancia de *Amblyomma cajennense* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Tabla 13. Prevalencia y abundancia de *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mapa de distribución de las cuatro localidades de estudio.

Fig. 2. Representación del gen OspA y la localización de los iniciadores usados en la amplificación por PCR.

Fig. 3. Gel de agarosa al 1.5% que nos muestra una banda amplificada de ADN de la cepa de *Borrelia burgdorferi*.

Fig. 4. Gel de agarosa al 1.5% que nos muestra el resultado de la prueba de PCR a partir de extractos de grupos de 10 garrapatas.

Fig. 6. Porcentaje de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense* y *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Fig. 7. Porcentaje de garrapatas por sexo *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense* y *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

Figs. 7 y 8. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille): **Fig. 7.** Vista dorsal, hembra; **Fig. 8.** Vista ventral, hembra.

Figs. 9 y 10. *Dermacentor variabilis* (Say): **Fig. 9.** Vista dorsal, macho; **Fig. 10.** Vista ventral, macho.

Figs. 11 y 12. *Amblyomma cajennense* (Fabricius): **Fig. 11.** Vista dorsal, hembra;
Fig. 12. Vista ventral, hembra.

Figs. 13 y 14. *Boophilus annulatus* (Salmon & Stiles): **Fig. 13.** Vista dorsal,
hembra; **Fig. 14.** Vista ventral, hembra.

Tabla 1. Número total de perros, sexo y raza, muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	HOSPEDERO	RAZA					
		SEXO		CRUZA			
		MACHO	HEMBRA	MACHO-HEMBRA	MACHO-HEMBRA		
DULCES NOMBRES	32	22	10	19	10	3	0
LA CIUDADELA	23	12	11	10	9	2	2
EL RANCHITO	15	11	4	10	4	1	0
EL BARRIAL	27	20	7	10	5	4	2
TOTAL	97	65	32	55	28	10	4

TABLA 2. Estratificación de edades del número total de perros muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

EDAD	DULCES NOMBRE	LA CIUDADELA	EL RANCHITO	EL BARRIAL
MENOS DE 1 AÑO	11 (34.37)	11 (47.82)	4 (26.67)	7 (25.93)
DE 1 A 5	15 (46.87)	10 (43.48)	8 (53.33)	10 (37.03)
DE 5 A 10	6 (18.75)	2 (8.70)	2 (13.33)	9 (33.33)
MÁS DE 10 AÑOS	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.67)	1 (3.70)
TOTAL	32	23	15	27

() Porcentaje de perros muestreados bajo estratificación de edades por localidad.

TABLA 3. Número total de perros con o sin ectoparásitos(Garrapatas), muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México

EDAD	DULCES NOMBRE		LA CIUDADELA		EL RANCHITO		EL BARRIAL					
	POSIT. NEG.	TOTAL	POSIT. NEG.	TOTAL	POSIT. NEG.	TOTAL	POSIT. NEG.	TOTAL				
DUL. NOMBRES	10	1	11	7	4	11	2	2	4	5	2	7
LA CIUDADELA	14	1	15	5	5	10	4	4	8	9	1	10
EL RANCHITO	5	1	6	2	0	2	1	1	2	5	4	9
EL BARRIAL	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
TOTAL^d	29	3	32	14	9	23	7	8	15	20	7	27

Numero total de perros con garrapatas (a)

Numero total de perros sin garrapatas (b)

Numero total de perros muestreados (c)

Numero total de perros con o sin garrapatas por localidad (d)

TABLA 4. Número total de perros muestreados y garrapatas involucradas, colectadas en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

CARACTERÍSTICAS	DUL. NOMBRES	LA CIUDADELA	EL RANCHITO	EL BARRIAL	TOTAL
TOTAL DE PERROS	32	23	15	27	97
PERROS/GARRAPATAS	29	14	7	20	70
TOTAL DE GARRAPATAS	484(74.34)	76(11.68)	20(3.08)	71(10.90)	651

() Porcentaje de garrapatas por localidad

TABLA 5. Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en perros muestreados en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

PERROS MUESTREADOS			
LOCALIDAD	TOTAL PERROS	PERROS EXAMINADOS	NUM. DE POOLS ^a POOLS POSITIVOS
DULCES NOMBRES	32	30	3
LA CIUDADELA	23	20	2
EL RANCHITO	15	10	1
EL BARRIAL	27	27	3(1/7) ^b
TOTAL	97	87	9

(a) Muestras con grupos de 10 perros

(b) Una muestra con grupo de siete perros por los pocos ejemplares localizados

TABLA 6. Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en garrapatas colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León México.

GARRAPATAS COLECTADAS				
LOCALIDAD	TOTAL	EXAMINADAS	NUMERO DE POOLS^a	POOLS POSITIVOS
DULCES NOMBRES	484	480	48	2
LA CIUDADELA	76	70	7	1
EL RANCHITO	20	13	2(1/3)^b	1
EL BARRIAL	71	70	7	0
TOTAL	651	633	64	4

(a) Muestras con grupos de 10 garrapatas.

(b) Una muestra con grupo de 3 garrapatas por la falta de especímenes.

TABLA 7. Prevalencia de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* en *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense* y *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	R. S.		D. D.		R. C.		B. A.			
	GARRAPATAS COLECTADAS	No DE PUNOS POSIT.	GARRAPATAS COLECTADAS	No DE PUNOS POSIT.	GARRAPATAS COLECTADAS	No DE PUNOS POSIT.	GARRAPATAS COLECTADAS	No DE PUNOS POSIT.		
DUL. NOMBRES	453	45	0	31	3	2	0	0	0	0
LA CIUDADELA	40	4	0	23	2	1	0	0	0	13
EL RANCHITO	17	1	0	3	1	1	0	0	0	0
EL BARRIAL	11	1	0	0	0	0	60	6	0	0
TOTAL	521	51	0	57	6	4	60	6	0	13

R. S. *Rhipicephalus sanguineus*

D. D. *Dermacentor variabilis*

R. C. *Amblyomma cajennense*

B. A. *Boophilus annulatus*

TABLA 8. Número total de garrapatas por especie, colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	E S P E C I E					TOTAL ^e
	R.S. ^a	D.U. ^b	A.C. ^c	B.A. ^d		
DULCES NOMBRES	453	31	0	0	0	484
LA CIUDADELA	40	23	0	13	0	76
EL RANCHITO	17	3	0	0	0	20
EL BARRIAL	11	0	60	0	0	71
TOTAL^f	521(80.0%)	57(8.7%)	60(9.2%)	13(2.0%)	0	651

R.S. *Rhipicephalus sanguineus* (a)

D.U. *Dermacentor variabilis* (b)

A.C. *Amblyomma cajennense* (c)

B.A. *Bombus annulatus* (d)

Total de garrapatas colectadas en perros por localidad (e)

Total de garrapatas colectadas en perros por especie (f)

Tabla 9. Número total de garrapatas por especie y sexo, colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	E S P E C I E								TOTAL ^e	
	R.S. ^a		D.U. ^b		A.C. ^c		B.A. ^d		MACHO	HEMBRA
	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA		
DUL. NOMBRES	233	220	11	20	0	0	0	0	244	240
LA CIUDADELA	26	14	9	14	0	0	4	9	39	37
EL RANCHITO	11	6	0	3	0	0	0	0	11	9
EL BARRIAL	8	3	0	0	30	30	0	0	38	33
TOTAL^f	278	243	20	37	30	30	4	9	332	319

R.S. *Rhipicephalus sanguineus* (a)

D.U. *Dermacentor variabilis* (b)

A.C. *Amblyomma cajennense* (c)

B.A. *Boophilus annulatus* (d)

Total de garrapatas colectadas en perros por sexo, por localidad (e)

Total de garrapatas colectadas en perros por sexo, por especie (f)

TABLA 10. Prevalencia y abundancia de *Rhipicephalus sanguineus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	ABUNDANCIA ^b			ABUNDANCIA TOTAL ^c
	PREVALENCIA ^a	MACHO	HEMBRA	
DULCES NOMBRES	90.62 (32)	7.28±8.81 (233)	6.86±9.50 (220)	14.15±17.84 (453)
LA CIUDADELA	39.13 (23)	1.13±2.32 (26)	0.60±1.03 (14)	1.73±3.07 (40)
EL RANCHITO	33.33 (15)	0.73±2.75 (11)	0.46±0.83 (7)	1.20±3.29 (18)
EL BARRIAL	22.22 (27)	0.29±0.91 (8)	0.11±0.32 (3)	0.40±0.93 (11)

(a) Porcentaje de perros infestados (Número total de perros examinados)

(b) Media: Desviación Standard de garrapatas por perros, por sexo (Número de garrapatas colectadas)

(c) Media: Desviación Standard del total de garrapatas por perros (Número de garrapatas colectadas).

TABLA 11. Prevalencia y abundancia de *Dermacentor variabilis* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

<i>Dermacentor variabilis</i>					
LOCALIDAD	ABUNDANCIA ^b			ABUNDANCIA TOTAL ^c	
	PREVALENCIA ^a	MACHO	HEMBRA		
DULCES NOMBRES	37.50 (32)	0.34±0.93 (11)	0.62±1.66 (20)	0.96±2.26 (31)	
LA CIUDADELA	17.39 (23)	0.39±1.03 (9)	0.60±1.61 (14)	1.00±2.54 (23)	
EL RANCHITO	20.00 (15)	0.0±0.0 (0)	0.20±0.41 (3)	0.20±0.41 (3)	
EL BARRIAL	0.0 (27)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	0.0±0.0 (0)	

(a) Porcentaje de perros infestados (Número total de perros examinados)

(b) Media±Desviación Standard de garrapatas por perros, por sexo (Número de garrapatas colectadas)

(c) Media±Desviación Standard del total de garrapatas por perros (Número de garrapatas colectadas).

TABLA 12. Prevalencia y abundancia de *Amblyomma cajennense* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	ABUNDANCIA ^b			ABUNDANCIA TOTAL ^c
	PREVALENCIA ^a	MACHO	HEMBRA	
DULCES NOMBRES	0.0 (32)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)
LA CIUDADELA	0.0 (23)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)
EL RANCHITO	0.0 (15)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)
EL BARRIAL	74.07 (27)	1.11±1.25 (30)	1.11±1.42 (30)	2.22±2.24 (60)

(a) Porcentaje de perros infestados (Número total de perros examinados)

(b) Media±Desviación Standard de garrapatas por perros, por sexo (Número de garrapatas colectadas)

(c) Media±Desviación Standard del total de garrapatas por perros (Número de garrapatas colectadas).

TABLA 13. Prevalencia y abundancia de *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

LOCALIDAD	ABUNDANCIA ^b			ABUNDANCIA TOTAL ^c
	PREVALENCIA ^a	MACHO	HEMBRA	
DULCES NOMBRES	0.0 (32)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)
LA CIUDADELA	8.69 (23)	0.17±0.57 (4)	0.39±1.30 (9)	0.56±1.87 (13)
EL RANCHITO	0.0 (15)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)
EL BARRIAL	0.0 (27)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)	0.0±0.0 (0.0)

(a) Porcentaje de perros infestados (Número total de perros examinados)

(b) Media ± Desviación Standard de garrapatas por perros, por sexo (Número de garrapatas colectadas)

(c) Media ± Desviación Standard del total de garrapatas por perros (Número de garrapatas colectadas).

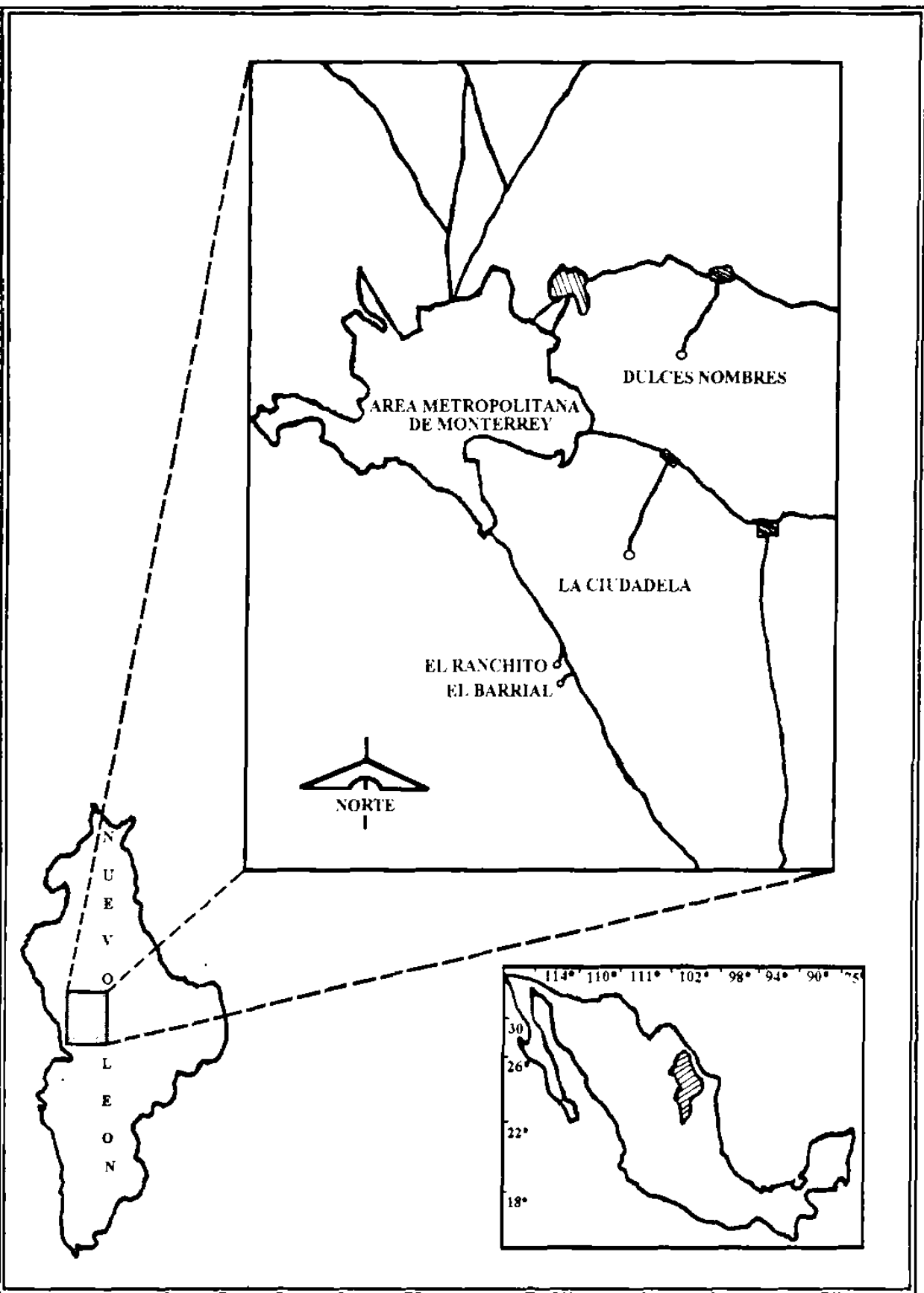
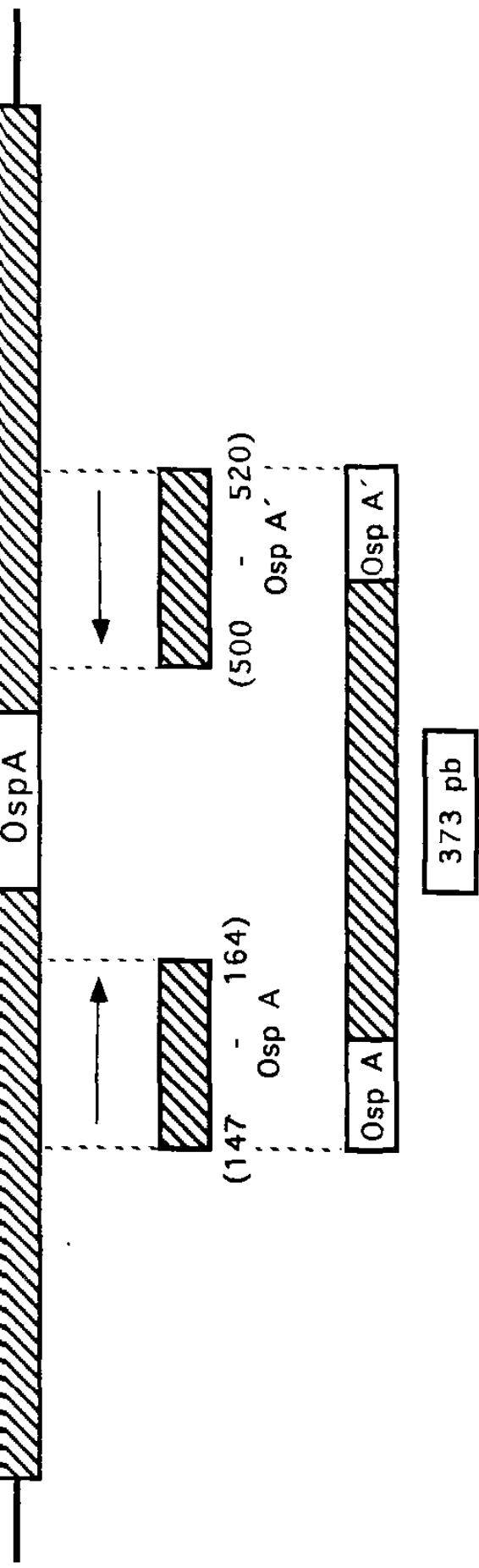


Fig.1. Mapa de distribución de las cuatro localidades de estudio.



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

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

Fig. 2. Representación de gen *OspA* y la localización de los iniciadores usados en la amplificación por PCR. La localización de los iniciadores usados en la reacción de PCR son indicados en los parentesis y son numerados de acuerdo al primer nucleotido del gen *OspA*; la orientación de cada iniciador es mostrado con una flecha en la dirección 5' a 3'.

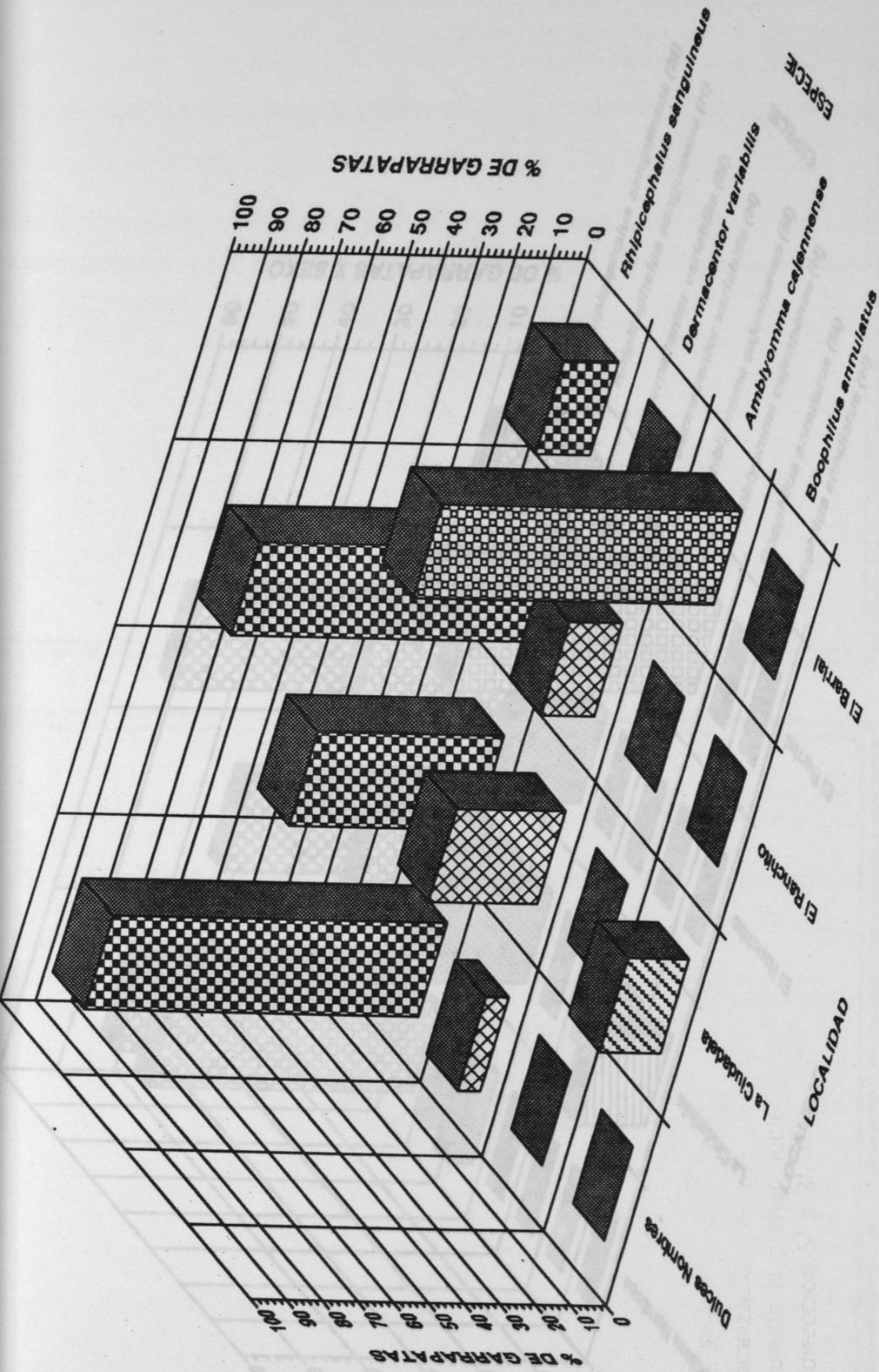


Fig. 5. Porcentaje de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense* y *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

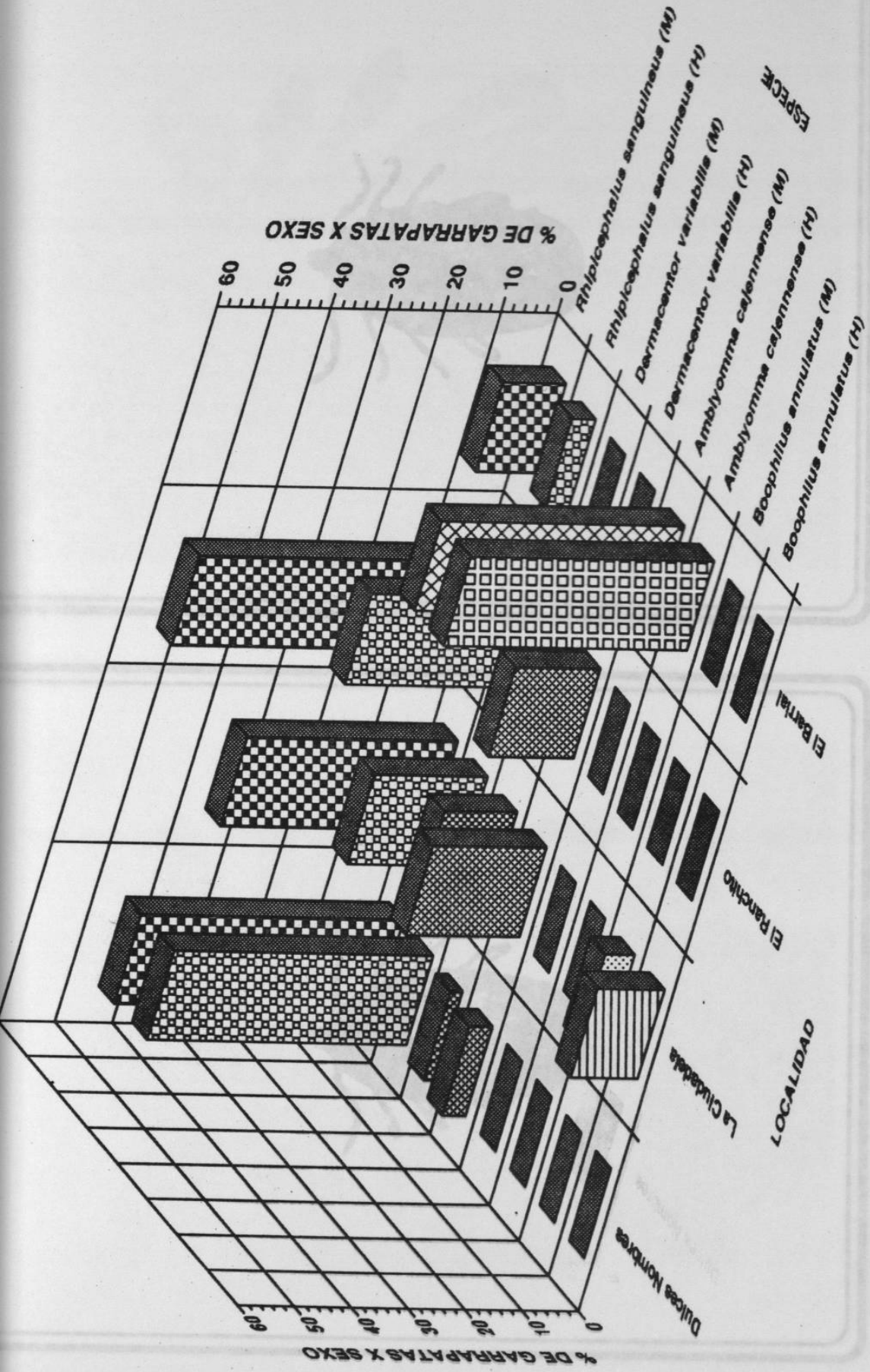
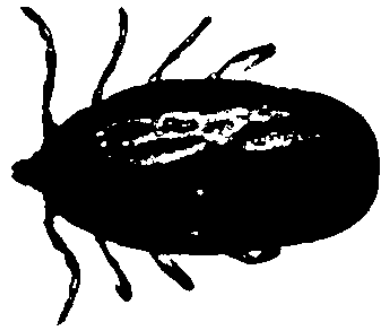
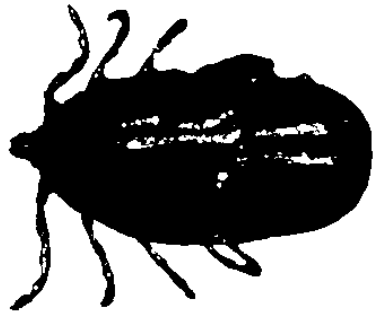


Fig. 6. Porcentaje de garrapatas por sexo *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense* y *Boophilus annulatus* colectadas de perros en las cuatro localidades rurales del estado de Nuevo León, México.

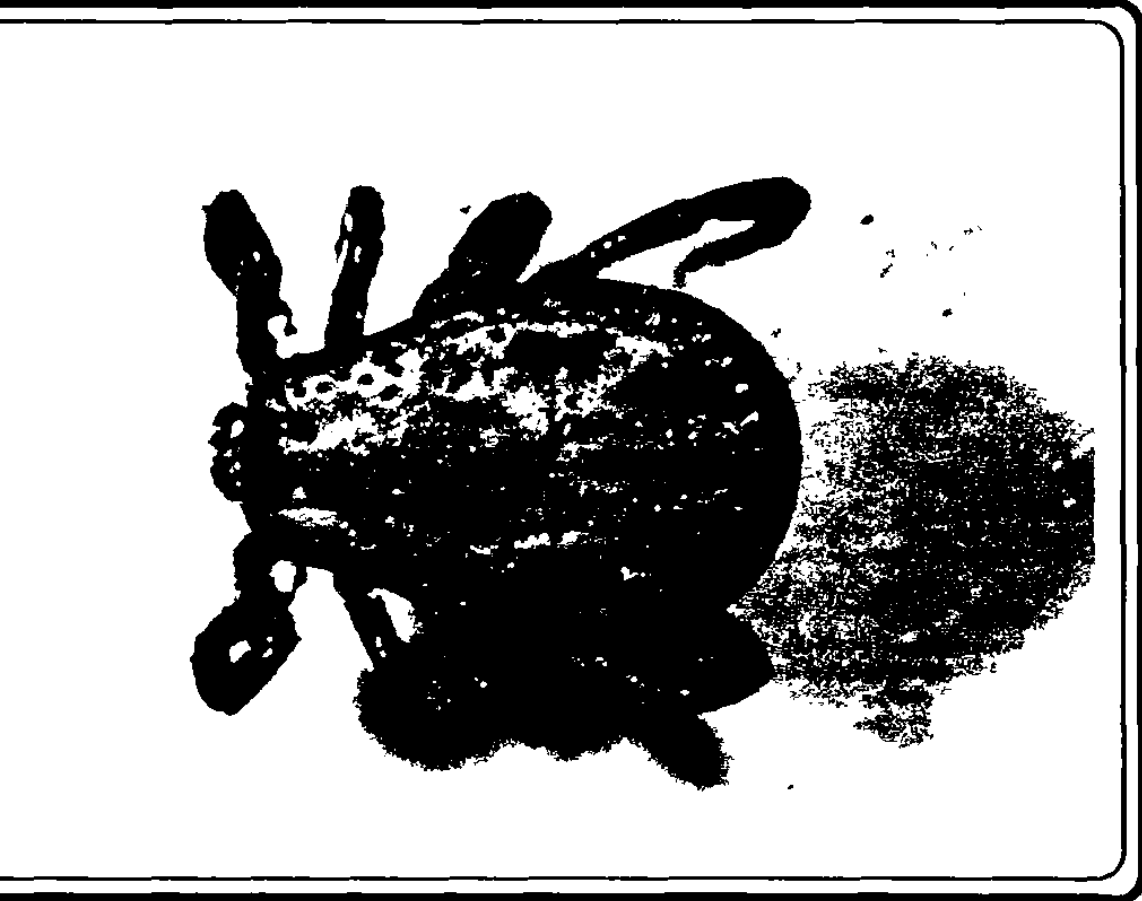


7

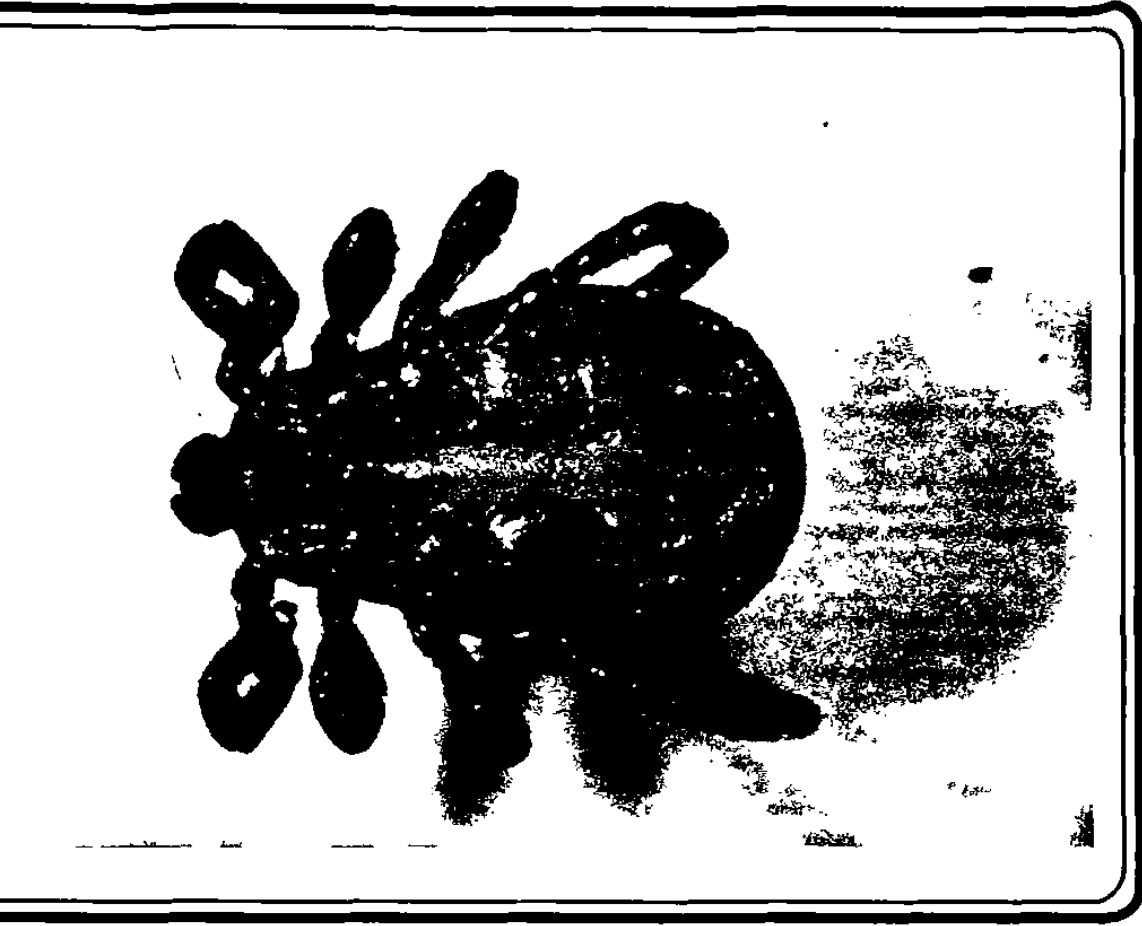


8

Figs. 7 y 8. *Rhipicephalus sanguineus* (Letreille): Fig. 7. Vista Dorsal, hembra; Fig. 8. Vista ventral, hembra.

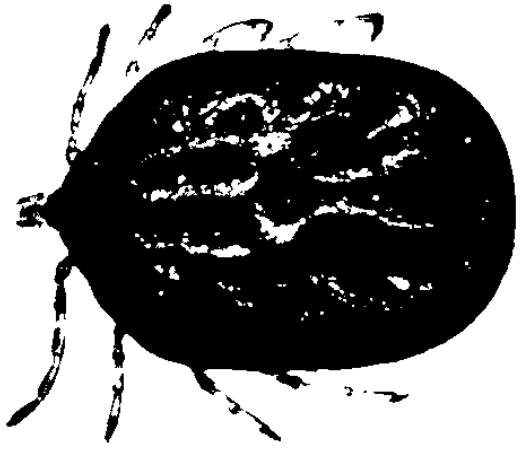


9



10

Figs. 9 y 10. *Dermacentor variabilis* (Say): Fig. 9. Vista Dorsal, macho; Fig. 10. Vista ventral, macho.



11



12

Figs. 11 y 12. *Amblyomma cajennense* (Fabricius): Fig. 11. Vista Dorsal, hembra; Fig. 12. Vista ventral, hembra.



13



14

Figs. 13 y 14. *Boophilus annulatus* (Salmon & Stiles): Fig. 13. Vista Dorsal, hembra; Fig. 14. Vista ventral, hembra.

APENDICE

**LISTA DE HOSPEDEROS VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS DONDE SE HA
PRESENTADO *Borrelia burgdorferi*.**

Desde el inicio de la presencia de la espiroqueta *B. burgdorferi* en humanos, vectores, animales domésticos y silvestres, varios autores han realizado estudios sobre este tema entre los cuales se enlistan:

Lista de vectores donde se ha detectado a *Borrelia burgdorferi*

N. CIENTIFICO	N. COMUN	TECNICA		AUTOR	AÑO
		DE ESTU DIO	LUGAR		
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata	BSK	Lyme y Haddam, Conn	Anderson <i>et al</i>	1983
<i>Ixodes pacificus</i>	Garrapata	IFI	Oregon y California	Burgdorfer <i>et al</i>	1985
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata		Saint Cruz Valley USA	Weisbrod & Johnson	1989
<i>Dermacentor variabilis</i>	Garrapata	IFD	Birmingham, Alabama	Piesman & Sinsky	1988
<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	IFD	Birmingham, Alabama	Piesman & Sinsky	1988
<i>Amblyomma americanum</i>	Garrapata	IFD	Birmingham, Alabama	Piesman & Sinsky	1988
<i>Ixodes pacificus</i>	Garrapata	IFI	Ouville California	Monsen <i>et al</i>	1990
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata (lab)	PCR	Great I. West Yarmouth, Mass.	Persing <i>et al</i>	1990
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata (campo)	PCR	Nantucket Island, Mass	Persing <i>et al</i>	1990
<i>Ixodes cookei</i>	Garrapata	IFI	Virginia y Carolina del Norte	Levine <i>et al</i>	1991
<i>Amblyomma americanum</i>	Garrapata	IFI	Virginia y Carolina del Norte	Levine <i>et al</i>	1991
<i>Dermacentor variabilis</i>	Garrapata	IFI	Virginia y Carolina del Norte	Levine <i>et al</i>	1991
<i>Ixodes dentatus</i>	Garrapata	IFI	Virginia y Carolina del Norte	Levine <i>et al</i>	1991
<i>Huemaphysalis leporispalustris</i>	Garrapata	IFI	Virginia y Carolina del Norte	Levine <i>et al</i>	1991
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata	IFI	Virginia y Carolina del Norte	Levine <i>et al</i>	1991
<i>Amblyomma americanum</i>	Garrapata	IFI e IFD	Este Central de Alabama	Luckhart <i>et al</i>	1991
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata	IFI e IFD	Este Central de Alabama	Luckhart <i>et al</i>	1991
<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	IFI e IFD	Este Central de Alabama	Luckhart <i>et al</i>	1991
<i>Amblyomma americanum</i>	Garrapata	BSK e IFI	Texas	Teltow <i>et al</i>	1991
<i>Amblyomma maculatum</i>	Garrapata	BSK e IFI	Texas	Teltow <i>et al</i>	1991
<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	BSK e IFI	Texas	Teltow <i>et al</i>	1991
<i>Ctenocephalides felis</i>	Pulga	BSK e IFI	Texas	Teltow <i>et al</i>	1991
<i>Dermacentor variabilis</i>	Garrapata	BSK e IFI	Texas	Teltow <i>et al</i>	1991
<i>Ixodes scapularis</i>	Garrapata	ELISA e IFI	Oklahoma	Mukolve <i>et al</i>	1992
<i>Ixodes dammini</i>	Garrapata	IFI	Wisconsin	Sharon <i>et al</i>	1992
<i>Dermacentor variabilis</i>	Garrapata	IFI	Missouri y St. Louis	Feir <i>et al</i>	1994
<i>Amblyomma americanum</i>	Garrapata	IFI	Missouri y St. Louis	Feir <i>et al</i>	1994
<i>Amblyomma americanum</i>	Garrapata	IFD	Texas	Rawhngs & Teltow	1994
<i>Ixodes ricinus</i>	Garrapata	PCR	Paris, Francia	Pichor <i>et al</i>	1995

Lista de hospederos (Perros) donde se ha detectado a *Borrelia burgdorferi*

N. CIENTIFICO	N. COMUN	TECNICA DE ESTUDIO	LUGAR	AUTOR	AÑO
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Connecticut	Magnarelli <i>et al</i>	1985
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Wisconsin	Burgess	1986
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Carolina del Norte	Greene <i>et al</i>	1988
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Texas	Cohen <i>et al</i>	1990
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Baltimore, Maryland	Malloy <i>et al</i>	1990
<i>Canis familiaris</i>	Perro	PCR	Baltimore, Maryland	Malloy <i>et al</i>	1990
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Oroville, California	Monsen <i>et al</i>	1990
<i>Canis familiaris</i>	Perro	IFI	Price Edward Island, Canada	Arstob <i>et al</i>	1992
<i>Canis familiaris</i>	Perro	PCR	Nuevo Leon, Mexico	Salinas <i>et al</i>	1995

Otros animales domesticos y silvestres donde se ha detectado a *Borrelia burgdorferi*

N. CIENTIFICO	N. COMUN	TECNICA DE ESTUDIO	LUGAR	AUTOR	AÑO
<i>Procyon lotor</i>	Mapache	BSK	Lyme y Haddam, Conn.	Anderson <i>et al</i>	1983
<i>Peromyscus leucopus</i>	Ratón patas blancas	BSK	Lyme y Haddam, Conn.	Anderson <i>et al</i>	1983
<i>Ovis aries</i>	Borrego	El ISA	Noruega	Franksdotter <i>et al</i>	1985
<i>Equus caballus</i>	Caballo	IFI	Connecticut y Massachusetts	Marcus <i>et al</i>	1985
<i>Equus caballus</i>	Caballo	IFI	Connecticut y Massachusetts y Sureste de Nueva York	Magnarelli <i>et al</i>	1985
<i>Odocoileus virginianus</i>	Venado cola blanca	IFI	Prince Edward Island, Canada	Arstob <i>et al</i>	1992

Lista de estudios en humanos donde se a detectado a *Borrelia burgdorferi*

N. CIENTIFICO	N. COMUN	TECNICA DE ESTUDIO	LUGAR	AUTOR	AÑO
<i>Homo sapiens</i>	Humano	BSK e IFI y IFD	Long Island y la Provincia Westchester, N Y	Benach <i>et al</i>	1983
<i>Homo sapiens</i>	Humano	BSK	New York, Manhasset, NY y Hamilton, MT	Berger <i>et al</i>	1985
<i>Homo sapiens</i>	Humano	BSK	Texas	Rawlings <i>et al</i>	1987
<i>Homo sapiens</i>	Humano	PCR	Belgica	Debie <i>et al</i>	1991
<i>Homo sapiens</i>	Humano	PCR	Alemania	Kruger <i>et al</i>	1991
<i>Homo sapiens</i>	Humano	PCR	Augusta, Georgia	Rabb <i>et al</i>	1992
<i>Homo sapiens</i>	Humano	El ISA	Nuevo Leon, Mexico	Welsh <i>et al</i>	1992
<i>Homo sapiens</i>	Humano	PCR	Nuevo Leon, Mexico	Salinas <i>et al</i>	1995

Cepa de *Borrelia burgdorferi*

N. CIENTIFICO	N. COMUN	TECNICA DE ESTUDIO	LUGAR	AUTOR	AÑO
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Bacteria (espiroqueta)	PCR	Alemania	Kruger <i>et al</i>	1991

