

## INDICE

1. INTRODUCCION . . . . .	1
2. REVISION DE LITERATURA . . . . .	2
2.1 Definición . . . . .	2
2.2 Sinonimias . . . . .	2
2.3 Historia . . . . .	3
2.4 Epizootiología y Características de la Enfermedad . . . . .	5
2.4.1 Distribución geográfica. . . . .	5
2.4.2 Especies afectadas . . . . .	5
2.4.3 Transmisión. . . . .	6
2.4.4 Etiología . . . . .	9
2.4.5 Patogenia . . . . .	12
2.4.6 Sintomatología. . . . .	14
2.4.7 Patología clínica. . . . .	16
2.4.8 Lesiones a la necropsia. . . . .	16
2.4.8.1 Lesiones microscópicas . . . . .	16
2.4.8.2 Lesiones macroscópicas . . . . .	17
2.5 Inmunidad. . . . .	18
2.6 Diagnóstico . . . . .	18
2.6.1 Diagnóstico diferencial . . . . .	20
2.7 Tratamiento . . . . .	22
2.8 Prevención . . . . .	24
3. MATERIAL Y METODOS . . . . .	25
3.1 Material . . . . .	25
3.1.1 Muestras procesadas . . . . .	25
3.1.2 Reactivos y Materiales . . . . .	25
3.2 Métodos . . . . .	26
3.2.1 Extracción de acidos nucleicos totales . . . . .	26
3.2.2 Protocolo detallado . . . . .	27
3.2.3 Determinación de la concentración y calidad de los acidos nucleicos . . . . .	29
3.2.4 Corroboración de la concentración del ADN por electroforesis . . . . .	30
3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa . . . . .	31
3.3.1 Descripción de los componentes utilizados en la RCP . . . . .	32
3.3.2 Oligonucleotidos utilizados. . . . .	37
3.3.3 Mezcla para la Reacción en Cadena de la Polimerasa . . . . .	37
3.3.4 Programa para el Termociclador. . . . .	38
3.3.5 Secuencia nucleotídica del gen V4 del ARNr 16S de Borrelia burgdorferi . . . . .	39
3.3.6 Fragmento esperado por la RCP . . . . .	41

4. RESULTADOS Y DISCUSION	42
5. CONCLUSIONES.	48
6. RESUMEN.	49
7. BIBLIOGRAFIA.	50
Tabla 1. Estudio cronológico de la Enfermedad de Lyme	
Tabla 2. Continuación de tabla 1.	
Tabla 3. Enfermedades zoonóticas y enfermedades específicas del humano.	21
Tabla 4. Dosificación de medicamentos específicos que son utilizados en humanos y en algunos animales para el tratamiento de la Enfermedad de Lyme	23
Tabla 5. Mezcla de los componentes para la Reacción en Cadena de la Polimerasa para <i>Borrelia burgdorferi</i>	38
Tabla 6. Programa utilizado en el termociclador para la amplificación del ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i>	39

#### INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata <i>Ixodes dammini</i>	8
Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
Figura 3. Fotografía al microscopio de fluorescencia de <i>Borrelia burgdorferi</i>	11
Figura 4. Patogenia de la Enfermedad de Lyme	13
Figura 5. Amplificación del ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i>	44
Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% del ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i>	45
Figura 7. Detección de <i>Borrelia burgdorferi</i> a partir de muestras de humanas y caninos por medio de la RCP.	46

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudio cronológico de la Enfermedad de Lyme . . .	3
Tabla 2. Continuación de tabla 1. . . . .	4
Tabla 3. Enfermedades zoonóticas y enfermedades específicas del humano. . . . .	21
Tabla 4. Dosificación de medicamentos específicos que son utilizados en humanos y en algunos animales para el tratamiento de la Enfermedad de Lyme . . .	23
Tabla 5. Mezcla de los componentes para la Reacción en Cadena de la Polimerasa para <u>Borrelia burgdorferi</u> . . .	38
Tabla 6. Programa utilizado en el termociclador para la amplificación del ADN de <u>Borrelia burgdorferi</u> . . .	39

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata <u>Ixodes dammini</u> . . .	8
Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de <u>Borrelia burgdorferi</u> . . . . .	10
Figura 3. Fotografía al microscopio de fluorescencia de <u>Borrelia burgdorferi</u> . . . . .	11
Figura 4. Patogenia de la Enfermedad de Lyme . . . . .	13
Figura 5. Amplificación del ADN de <u>Borrelia burgdorferi</u> . . . . .	44
Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% del ADN de <u>Borrelia burgdorferi</u> . . . . .	45
Figura 7. Detección de <u>Borrelia burgdorferi</u> a partir de muestras de humanos y caninos por medio de la RCP. . .	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

A:	Nucleotido de adenina
ADN:	Acido desoxirribonucléico
ARN:	Acido ribonucléico
ARNr:	Acido ribonucléico ribosomal
C:	Nucleotido de citosina
Conn:	Connecticut
dNTP's:	Desoxirribonucleótidos
ECM:	Eritema Crónico migratorio
EDTA:	Acido dietilamino tetra acético
G:	Nucleotido de guanina
gr:	Gramos
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
IM:	Intramuscular
IV:	Intravenoso
kg:	Kilogramos
M:	Molar
ml:	Mililitros
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro de magnesio
mg:	Miligramos
mm:	Milímetro
mm <sup>2</sup> :	Milímetro cuadrado
mM:	Milimolar
μ:	Micrómetro
μg:	Microgramo
μl:	Microlitro
μM:	Micromolar
pb:	Pares de bases
pH:	Potencial del ión hidrogenión
RCP:	Rección en cadena de la polimerasa
rpm:	Revoluciones por minuto
T:	Nucleotido de timina
Tm:	Temperatura media de fusión
Wi:	Winsconsin
U:	Unidades
UI:	Unidades internacionales
ULIEG:	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas
UV:	Ultravioleta

## DEDICATORIAS

A Dios: Por haberme permitido vivir para realizar una carrera universitaria.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez: Por su asesoría y ayuda para la realización de la presente.

A mis Padres: Roberto Tamez Cuellar y Blanca Rosa González de Tamez, por apoyarme durante toda la vida y darme un ejemplo de humildad y de servicio.

Al Dr. Hugo Al... por la oportunidad de realizar ésta en su laboratorio de la facultad de Medicina y también por ayudarme a canalizar productivamente mi interés en la Borreliosis de Lyme.

A mi Novia: Adriana González González, por su amor y cariño al haber compartido tantos años junto a mí.

Al Dr. Olivero Welsh Lozano: Por facilitarme pacientes.

A mis Compañeros: Miguel (Beduino) Socorro (Sorroco)  
Fernando (Pibe) Jorge (Chino)  
Alvaro (Coche) José (Chucha)  
Sergio (Coby) Edmundo (Pístian)  
Tania (Loca) David (Niña)  
César (Roñol)

A la Facultad de Veterinaria y Zootecnia: Por haber sido mi segunda casa.

Por haber compartido una de las mejores etapas de mi juventud y una de las mejores experiencias de la vida como lo es la amistad.

A mis Asesores: Por su ilustre experiencia que quisieron compartir con un servidor.

"El ser humano no logrará descubrirse a si mismo hasta que desglose el misterio de su mente y aprenda a ser hombre".

(R.T.G.)

## 1. INTRODUCCION

### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez: Por su asesoría y ayuda para la realización de la presente.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña: Por darme la oportunidad de realizar ésta en su laboratorio de la Facultad de Medicina y también por ayudarme a canalizar productivamente mi interés en la Borreliosis de Lyme.

Al Dr. Olivero Welsh Lozano: Por facilitarme pacientes.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano: Por haberme dedicado un espacio de su tiempo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Por haber sido mi segunda casa.

El nombre de esta enfermedad se debe a que durante el año de 1977 se presentaron numerosos casos clínicos en un grupo de niños que presentaban la misma sintomatología que la Artritis reumatoide, en un pueblo llamado Lyme en el estado de Connecticut en los Estados Unidos (23). Investigaciones realizadas por Burgdorfer y cols(23), indican que dicha enfermedad es transmitida por garrapatas del género *Ixodes dammini*, lo cual se demostró con el aislamiento del agente patógeno a partir de porciones intestinales de las garrapatas.

Debido a que se ha determinado la presencia serológica de la enfermedad de Lyme en el estado de Nuevo León (107), consideramos necesario realizar el presente trabajo de investigación mediante el diagnóstico molecular del agente patógeno como una contribución a al estudio epidemiológico en nuestro país.

## 1. INTRODUCCION

En los últimos años se ha observado un aumento en el número de enfermedades de tipo infeccioso. Algunas de éstas por su grado de infectividad han ocupado un lugar dentro de las denominadas enfermedades zoonóticas, debido a que pueden producir grados diversos de patogenicidad en seres humanos y en animales. Una de éstas infecciones es la enfermedad de Lyme que recientemente ha tomado gran importancia tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Por su rápida propagación a una gran diversidad de especies animales afectadas, en Estados Unidos la enfermedad de Lyme está considerada como la principal enfermedad transmitida por insectos hematófagos y la segunda de carácter infeccioso.

El nombre de esta enfermedad se debe a que durante el año de 1977 se reconocieron numerosos casos clínicos en un grupo de niños que presentaban la misma sintomatología que la Artritis reumatoide, en un pueblo llamado Lyme en el estado de Connecticut en los Estados Unidos (23). Investigaciones realizadas por Burgdorfer y cols(23), indican que dicha enfermedad es transmitida por garrapatas del género *Ixodes dammini*, lo cual se demostró con el aislamiento del agente patógeno a partir de porciones intestinales de las garrapatas.

Debido a que se ha determinado la presencia serológica de la enfermedad de Lyme en el estado de Nuevo León (107), consideramos necesario realizar el presente trabajo de investigación mediante el diagnóstico molecular del agente patógeno como una contribución a al estudio epidemiológico en nuestro país.

## 2.0 REVISION DE BIBLIOGRAFIA

### 2.3 Historia

#### 2.1 Definición

La enfermedad de Lyme es un padecimiento de origen infeccioso producido por la bacteria Borrelia burgdorferi que afecta a la mayoría de los animales domésticos, así como también a el hombre, por lo que se le ha integrado dentro de las enfermedades zoonóticas (10,22,27,58).

Esta infección es transmitida por algunos insectos hematófagos (33,79,80), y el padecimiento en sus primeras etapas se caracteriza por la aparición de una lesión anular expansiva en la piel, a la cual se le ha denominado eritema crónico migratorio (ECM) (46,81,133). En su etapa siguiente se desarrollan patologías en el sistema nervioso y en el corazón (1,66,91,105); posteriormente en su etapa final se presentan secuelas de tipo artrítico (26,70,120).

#### 2.2 Sinonimias

Durante el transcurso del tiempo se le han atribuido diversos nombres a la enfermedad como borreliosis de Lyme (13), borreliosis por garrapatas (63), espiroquetosis de Lyme (33), espiroquetosis por garrapatas (63), artritis de Lyme (119,121) artritis crónica de Lyme (122), eritema crónico migratorio (119,121) enfermedad del gran imitador (41), neuroborreliosis (65) y simplemente enfermedad de Lyme (33,63,134).



## 2.3 Historia

A continuación se describe una breve cronología de los hallazgos más representativos de la enfermedad de Lyme (tabla 1).

**Tabla. 1** Estudio cronológico de la enfermedad de Lyme.

AÑO	ACONTECIMIENTO
1909	En Europa era conocida como Eritema Crónico Migratorio (4).
1966	En Noruega, <i>Hjelle</i> reporta el aislamiento de organismos parecidos a la <i>Borrelia burgdorferi</i> a partir de muestras de orina de borregos que padecían eccema facial (47).
1977	<i>Steere</i> y cols reconocieron una enfermedad caracterizada por producir artritis oligoarticular en un reducido grupo de niños y adultos en la comunidad de Lyme, Connecticut, EUA, llamándola así por el nombre de la comunidad ya que anteriormente se le denominaba Artritis de Lyme (120).
1977	<i>Main</i> y cols describen la enfermedad en 31 de 85 gatos (9).
1978	<i>Wallis</i> y cols. involucran al <i>Ixodes dammini</i> a la bacteria, de la enfermedad (21).
1979	<i>Steere</i> y cols. describen al <i>Ixodes dammini</i> como transmisor de la enfermedad (22).
1979	<i>Steere</i> y <i>Malawista</i> describen la enfermedad en vacas en E.U.A. (79,121,123,134).
1982	<i>Burgdorfer</i> y cols descubren el agente causal de la enfermedad de Lyme en Montana, E.U.A. (23).
1983	<i>Benach</i> y cols. aislan la espiroqueta de la sangre de dos pacientes humanos en New York (15).
1983	<i>Steere</i> y cols. encuentran y determinan al agente etiológico como una espiroqueta, aislándola de cerebro, piel, líquido cefalorraquídeo y en garrapatas ninfas y adultas en Connecticut (124).

Tabla 2. Continuación de la tabla 1.

- 
- 1984 Schulze y cols. reconocen a la garrapata Ixodes dammini como hospedera del venado cola blanca en New Jersey (112).
- 1985 Marcus y cols. confirman por métodos serológicos anticuerpos contra Borrelia burgdorferi en 12 de 50 caballos muestreados en New York (84).
- 1985 Magnarelli y cols. (27) confirman serológicamente la
- 1985 Kornblatt y cols. (63) infección en perros con
- 1986 Burgess y cols. (74) Borrelia burgdorferi (CO. y WI.)
- 1986 Anderson y cols. reportan el primer aislamiento de la bacteria en aves silvestres y de larvas de Ixodes dammini en el noreste de los Estados Unidos (6).
- 1986 Park confirma la Borreliosis en bovinos en Alemania (92).
- 1986 Hovmark y cols. encontraron evidencia serológica de Borrelia burgdorferi en borregos en Suecia (50).
- 1986 Angulo demostró en Austin Texas títulos altos de anticuerpos contra B. burgdorferi en 31 de 85 gatos (9).
- 1988 Burgess y cols. encuentran 282 muestras seropositivas a la bacteria, de 430 bovinos apartir de suero, leche y líquido sinovial en Wisconsin (28).
- 1988 Post y cols. confirmaron serológicamente la enfermedad en vacas en E.U.A. (95).
- 1990 Mörner y cols. en Suecia demostraron un 12.5 % de perros seropositivos en 501 animales muestreados (86).
-

## 2.4 Epizootiología y Características de la enfermedad

### 2.4.1 Distribución Geográfica

La existencia de la enfermedad de Lyme, desde su descubrimiento a principios de siglo en Europa, ha sido reportada en el mundo teniendo una amplia distribución en países europeos tales como Alemania (67,68,92,133), Holanda (18), Francia (20), Yugoslavia (36), Suiza (17,128), Bulgaria (129), Dinamarca (41), Polonia (99), Suecia (50,86), Rumania (51,59), España (40) y las Repúblicas de Checos y Eslovaquia (41,59,131). También se ha encontrado en Asia (54), Australia (103), Africa (108) y la Comunidad de Estados independientes (34,35). En el continente Americano, se han reportado casos en la mayor parte de los Estados Unidos, donde la incidencia es mayor que en el resto del mundo (5,21,22,28,73,116,123). En la región del Caribe (Haití, Puerto Rico y Jamaica) se han encontrado casos de la enfermedad (138), así como en América central (139) y en México, en donde se han confirmado alrededor de 5 casos tan solo en la ciudad de Monterrey, Nuevo León (107).

### 2.4.2 Especies Afectadas

Entre las especies afectadas se encuentra una gran diversidad de mamíferos, dentro de los cuales se incluyen el hombre, animales domésticos y animales salvajes, así como también varias especies de aves. Estrado experimentalmente en perros y conejos (19,22,25), así por infección transplacentaria en bovinos (28,50,95,96) y en el

Dentro de los animales domésticos que pueden ser portadores de la bacteria, se encuentran los bovinos (28,50), equinos (26,28), ovinos(50), caninos (10,21,27,29,40) y felinos (9). Otros animales de vida salvaje que están implicados como reservorios de la espiroqueta son mapaches, zarigüeyas, osos, venados (21), ratones y algunas aves (6), entre otros.

Las aves juegan un papel muy importante como transmisores de la enfermedad de Lyme, ya que son tanto hospederos de las fases larvarias de las garrapatas que pueden estar infectadas, así como de la bacteria, siendo el único grupo de animales hasta la fecha que no ha presentado sintomatología clínica de la Borreliosis (5,6). Un punto importante en la diseminación de la enfermedad lo juegan las aves migratorias, ya que a través de su migración pueden diseminar la bacteria en las diferentes regiones de la tierra (6).

Las especies que han sido utilizadas para estudios epidemiológicos dentro de los laboratorios son los perros, conejos y los hamsters (7,13,25,57).

#### 2.4.3 Transmisión

Las diversas formas de contagio de la enfermedad de Lyme hacen posible que esta bacteria tome diversas rutas dentro de su patogenia, debido a que presenta vías muy diferentes de transmisión, tales como la picadura de insectos hematófagos y contacto directo a través de la orina. Esto último ha sido demostrado experimentalmente en perros y conejos (19,22,25), así por infección transplacentaria en bovinos (28,50,95,96) y en el

humano (38).

Los insectos implicados en la transmisión de la enfermedad de Lyme son las garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Amblyoma* y *Dermacentor*; moscas de las familias *Tabanidae* y *Cuterebidae*; mosquitos de la familia *Culicidae* y las pulgas del género *Siphonaptera* (2,44,89). La inoculación del agente se realiza al momento de la picadura del insecto al organismo por medio de la vía cutánea de la especie afectada (23,24,104).

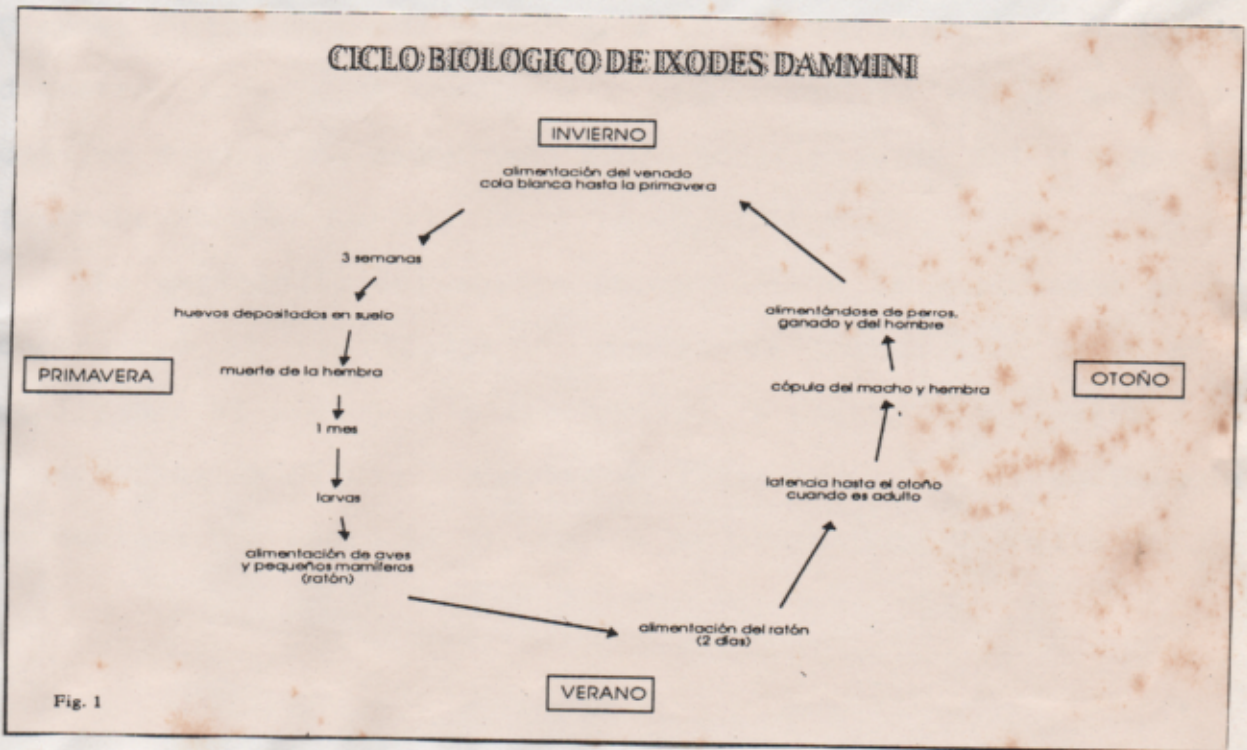
Los diferentes géneros de garrapatas que han sido estudiados y que se ha demostrado que son vectores de la infección por *Borrelia burgdorferi* son principalmente *Ixodes* siendo las especies *dammini*, *pacificus*, *scapularis* y *cookei* las mas comunes en los Estados Unidos (5,33,44,48,78,80,94), mientras que en Europa el primer lugar lo ocupa *Ixodes ricinus* (49,67).

Otras garrapatas que se incluyen como vectores de la Borreliosis en los E.U.A. son *Amblyoma americanum* y *Dermacentor variabilis* (80,115,116,123). En la figura 1 se aprecia el ciclo biológico para la garrapata *Ixodes dammini*.

Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata *Ixodes dammini* mostrando las diferentes etapas durante su desarrollo. (112,116,135,140).

### 2.4.4 Etiología

El microorganismo causante de la enfermedad pertenece al orden de los Spirochaetales, familia Spirochaetaceae del género Borrelia, especie burgdorferi. Es un bacilo largo de constitución helicoidal, similares a los treponemas por su número de flagelos, ya que posee alrededor de 7 situadas entre la capa de peptidoglicana y la membrana externa. Al Gram adquiere una coloración negativa, siendo también posible tinción con naranja de acridina y tinción de



**Figura 1.** Ciclo biológico de la garrapata *Ixodes dammini* mostrando las diferentes etapas durante su desarrollo.

(112, 116, 135, 140).

#### 2.4.4 Etiología

El microorganismo causante de la enfermedad pertenece al orden de los *Spirochaetales*, familia *Spirochaetaceae* del género *Borrelia*, especie *burgdorferi*. Es un bacilo largo de constitución helicoidal, similares a los treponemas por su número de flagelos, ya que poseen alrededor de 7 situados entre la capa de peptidoglicana y la membrana externa. Al Gram adquiere una coloración negativa, siendo también posible teñirlo con naranja de acridina y tinción de Giemsa. Su tamaño puede variar de 4-30  $\mu$  de largo por 0.18-0.25 $\mu$  de diámetro. Crecen en condiciones microaerófilas en un medio de cultivo específico denominado medio modificado de Kelly o BSK II (Barbour-Stonner-Kelly), (8,11,12,46,55,61,80).

La morfología del agente etiológico de la enfermedad puede observarse en las figuras 2, donde fue tomada una fotografía utilizando el microscopio electrónico, a partir de un cultivo en desarrollo. La figura 3 muestra en forma más clara la morfología bacteriana por medio de la técnica de inmunofluorescencia.

Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de *Borrelia burgdorferi*.

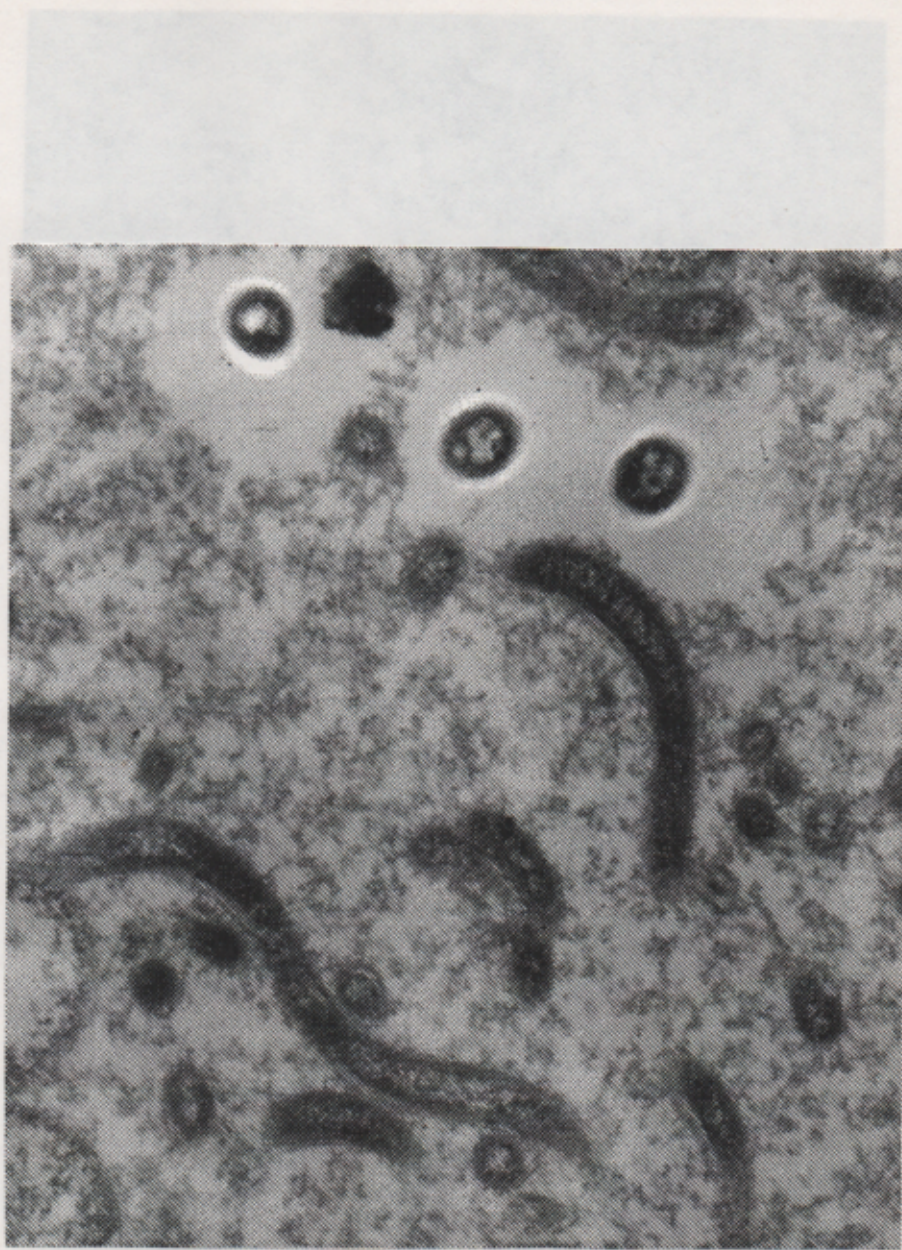


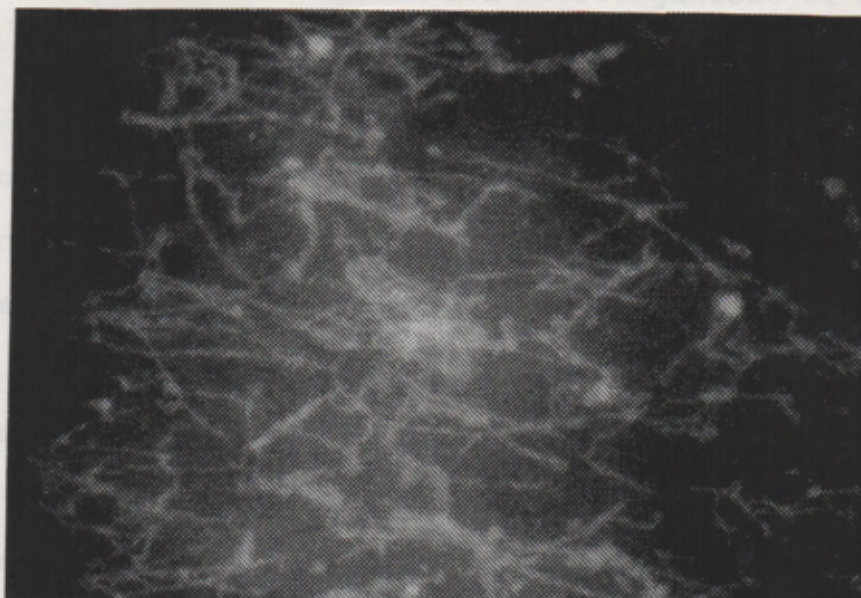
Figura 3. Fotografía al microscopio de fluorescencia de *Borrelia*

Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de *Borrelia burgdorferi*. (x).

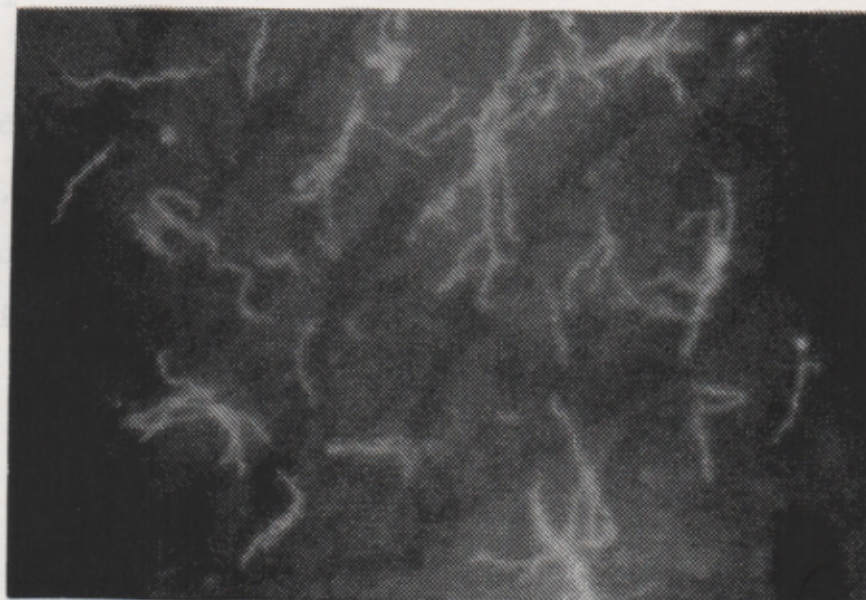


### 2.4.3 Patogenia

La principal vía de entrada del microorganismo al hospedero es por la picadura del vector hematofago, a través de la cual se ha demostrado (6,132,134) que el microorganismo puede viajar por vía linfática al sistema nervioso central, al sistema musculoesquelético y al riñón (19). Entre las especies más importantes de tipo inf...



Debido a su capacidad de transmisión en animales, la enfermedad puede ser transmitida por vía transplacentaria y por vía alternativa...



**Figura 3.** Fotografía al microscopio de fluorescencia de Borrelia burgdorferi en una prueba de inmunofluorescencia indirecta (40X).

#### 2.4.5 Patogenia

La principal vía de entrada del microorganismo al hospedero es por la inoculación cutánea a través de la picadura del vector hematófago donde se desarrolla la lesión patognomónica, la cual se ha denominado eritema crónico migratorio (46,132,134). Posteriormente el germen se difunde por vía sanguínea y linfática a todo el organismo pero con afinidad patológica al sistema nervioso central y periférico (134,88,105,137), sistema musculoesquelético (46,70,82) y órganos como el corazón (49,66), riñón(19), hígado (39), ojo (31,87,137,138) y bazo (13), entre los mas importantes donde se desarrollan lesiones principalmente de tipo inflamatorio (1,19,34,39,49,66,82,129).

Debido que se han identificado otras formas de transmisión en animales, tales como el contacto con orina infectada y por vía transplacentaria, es necesario tomar en cuenta todas estas alternativas de la patogenia (figura 4).

2.4.4 Sintomatología

La enfermedad de Lyme es una infección multisistémica que presenta una gran diversidad de su sintomatología, por lo cual se ha dividido en tres etapas de acuerdo al sistema anatómico que

Patogenia enfermedad de LYME

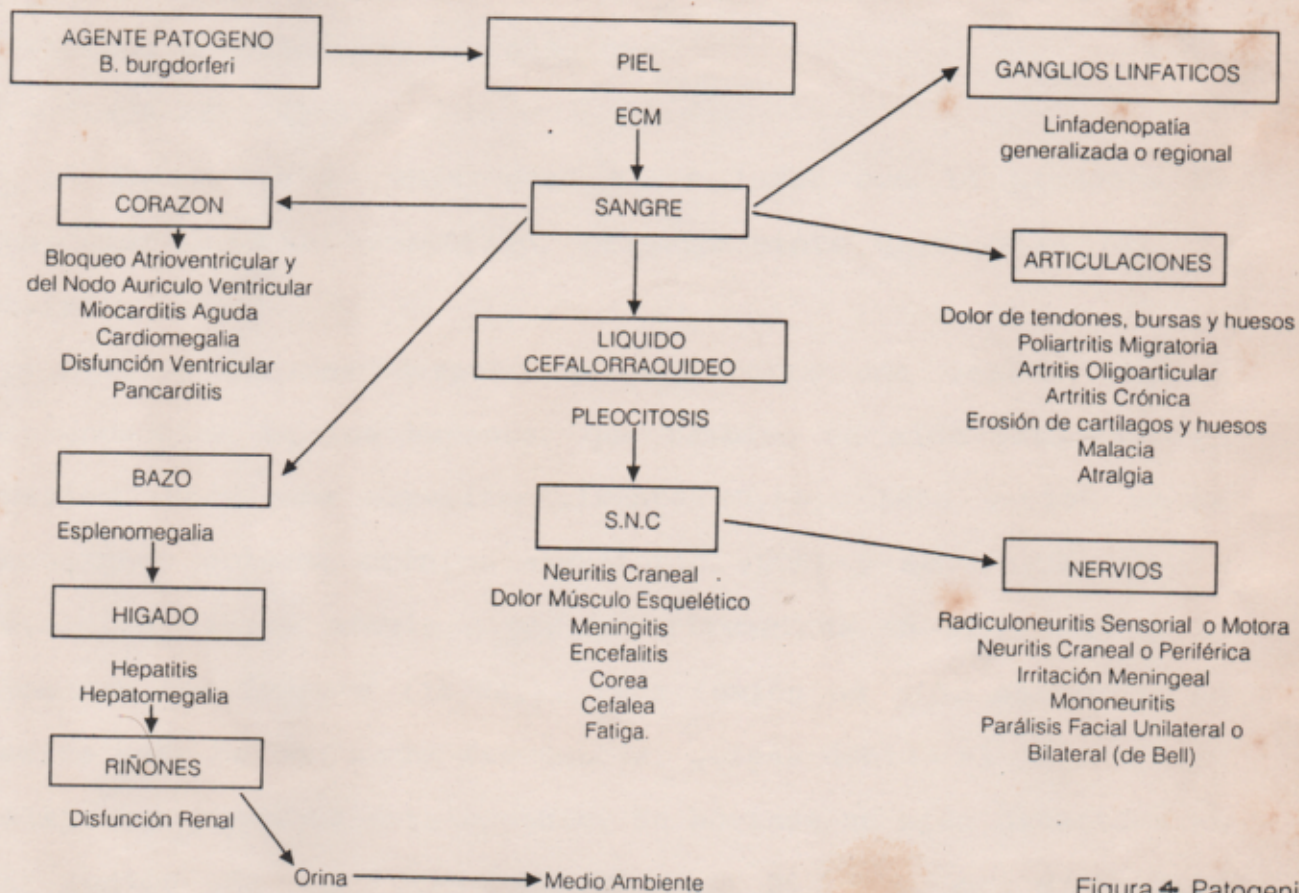


Figura 4. Patogenia.

Figura 4. Patogenia de la Enfermedad de Lyme.

#### 2.4.6 Sintomatología

La enfermedad de Lyme es una infección multisistémica que presenta una gran diversidad de su sintomatología, por lo cual se ha dividido en tres etapas de acuerdo al sistema anatómico que afecta durante el transcurso de la enfermedad.

- 1.- Etapa Cutánea.
- 2.- Etapa Cardíaca y/o Neurológica.
- 3.- Etapa Artrítica.

El inicio de la enfermedad tiene lugar con la picadura de cualquier insecto hematófago, principalmente garrapatas (24,72,75,104).

Días o semanas después se desarrolla una lesión cutánea patognomónica en los humanos, que también ha sido detectada en conejos inoculados experimentalmente (5,90). Esta lesión se ha denominado eritema crónico migratorio (ECM) y se inicia con la formación de una mácula o pápula eritematosa en el lugar de la picadura del insecto (15,34,). Esta lesión ha sido observada en perros pero no con mucha frecuencia, quizás debido al pelo que presenta esta especie. En bovinos ha sido detectada en la región de la ubre (50,95,96). El ECM es acompañado frecuentemente de cefalea, fatiga, rigidez de cuello y fiebre (13,24,25). Se han encontrado otras lesiones dermatológicas tales como la linfadenosis benigna cutis, acrodermatitis atrófica crónica y morfea (98,132); (etapa 1). Esta sintomatología (ECM) ha sido inducida al exponer conejos a garrapatas infectadas con la bacteria (5).

2.4. En esta etapa los animales pueden presentar cojera asociada con dolor y/o inflamación de la articulación carpal (63). La cojera dura solo unos días y en algunas ocasiones es recurrente. Otras articulaciones que pueden ser afectadas son las interfalanges, escapulohúmeral, húmeroradio-cubital, tarsiana y la tibiorotuliana (24,43,70,82), observándose síntomas consecuentes como anorexia, letargia, emaciación, en algunos casos edema de las extremidades, parálisis de cola y abortos en bovinos (25,38,95,96). En las siguientes semanas o meses la enfermedad puede ser acompañada con anormalidades cardíacas y/o neurológicas (1,34,88) (etapa 2) en donde se han encontrado casos de parálisis facial uni o bilateral, corea, radiculoneuropatías, así como cambios en la conducta del animal debido a las afecciones en el sistema nervioso central. Los trastornos renales como la glomerulonefritis pueden estar presentes en esta etapa (19,47); una de las anormalidades más frecuentes del corazón es el bloqueo gradual atrioventricular (49,66).iones debido a las arritmias (122).

La enfermedad puede manifestarse meses o años después de haber sufrido la picadura, presentándose un cuadro artrítico crónico (etapa 3), observado comúnmente acompañado con problemas neurales que pueden producir una parálisis permanente (88,138). Al tiempo de aparecer los signos artríticos normalmente desaparecen las lesiones cutáneas (122). las porciones de los apéndices de todas las capas de la dermis, así como intracelular y extracelularmente con un adelgazamiento de la placa de queratina en la epidermis.

#### 2.4.7 Patología clínica

Las muestras de suero presentan un aumento de crioglobulinas principalmente de IgM y de IgG. El tiempo de sedimentación de los eritrocitos puede decrecer ( $< 0.025$  en humanos), En algunos pacientes pueden encontrarse los componentes C3 y C4 del sistema de complemento con niveles por debajo de lo normal; nunca se han presentado anticuerpos antinucleares, hematuria, proteinuria o creatinina elevada. La media leucocitaria puede ser de 24,250 células/mm<sup>3</sup> (rango de 2,100 a 72,250), principalmente granulocitos, el líquido cefalorraquídeo presenta una pleocitosis moderada con preponderancia de linfocitos, además de una ligera elevación de proteínas circulantes (122).

En corazón se pueden encontrar anomalías en la conducción entre la 1<sup>a</sup> a la 6<sup>a</sup> semana de la aparición de la lesión cutánea (49,66,122), el padecimiento cardíaco es principalmente el bloqueo atrioventricular (49,66), algunos desarrollan mareos y palpitaciones debido a las arritmias (122).

#### 2.4.8 Lesiones a la necropsia

##### 2.4.8.1 Lesiones microscópicas

En las lesiones cutáneas las biopsias presentan una alta infiltración de células mononucleares alrededor de los vasos sanguíneos y en las porciones de los apéndices de todas las capas de la dermis, así como intracelular y extracelularmente con un adelgazamiento de la placa de queratina en la epidermis.

Las muestras que son tomadas del borde externo presentan principalmente cambios dermales pero no epidermales. En algunas áreas de la superficie puede existir un denso coágulo de fibrina y otras como cicatrices de fibrina.

En muestras obtenidas del tejido sinovial se observa una hipertrofia de las vellosidades sinoviales, hiperplasia de las células de la sinovia, microvascularización prominente, infiltración linfoplasmacelular y algunas veces folículos linfoides; pudiendo presentarse tallos polipoides, edema central, congestión y proliferación alrededor del córe central primordialmente de células mononucleares (192).

#### 2.4.8.2 Lesiones macroscópicas

En humanos y en algunos animales el eritema crónico migratorio es característico de la enfermedad (119,121,132), así como la inflamación de las articulaciones en forma oligoarticular y/o poliarticular de manera migratoria (120,121,122). Entre otras lesiones que han sido observadas comunmente en organismos infectados por este padecimiento se encuentran las siguientes: hepatomegalia, hepatitis (25), esplenomegalia (7), linfadenitis regional o generalizada (74), meningitis (128), encefalitis (122), neuritis craneal y/o periférica, irritación meníngea (65), radiculoneuritis, mononeuritis (105), uveitis y/o panuveitis (31,87,138), pericarditis, miocarditis y cardiomegalia (66); así como una gran diversidad de patologías que afectan a un sin número de tejidos y órganos.

## 2.5 Inmunidad

La bacteria responsable de la enfermedad de Lyme ha sido asociada dentro del organismo con los macrófagos del sistema retículo endotelial, pero nunca se ha demostrado su fagocitosis; solo se ha comprobado la adherencia a células T y B, y como resultado se ha especulado que son las responsables de la destrucción de las Borrelias (13,52).

Algunos investigadores han comprobado que la inmunidad es mediada por los antígenos producidos por la espiroqueta y que a su vez producen la reacción inmunológica para la producción de los anticuerpos que son principalmente las inmunoglobulinas IgG e IgM (13,52).

En los Estados Unidos de Norte América se ha desarrollado una bacterina a base de las proteínas capsulares de la Borrelia las cuales son la Osp A y Osp B que se ha comprobado que son las que desencadenan el efecto patológico en la especie afectada (52).

Algunos perros vacunados han sido expuestos cinco meses después al agente infeccioso, observándose inmunidad protectora contra el microorganismo(52).

## 2.6 Diagnóstico

Debido a que las pruebas de diagnóstico rutinarias tanto de laboratorio como clínicas no han demostrado ser lo suficientemente efectivas para diagnosticar la enfermedad de Lyme (101,125), se han desarrollado diversos métodos alternativos, los cuales han



contribuido a su diagnóstico. Entre las metodologías que mejor han dado resultado se encuentran las de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa, la cual detecta secuencias nucleotídicas específicas del ácido nucléico de la bacteria (59,64,65,83,85,93,97,98,102,109,110,139). Otras pruebas que han sido empleadas para el diagnóstico de la enfermedad lo son la electroforesis con enzima para multilocus (16), expresión de proteínas flagelares (30), amplificación por biotina-estreptavidina (65), pruebas de biología molecular no radioactivas (139) y las serológicas como las de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y la inmunofluorescencia indirecta, las cuales han sido efectivas para determinar la presencia del agente etiológico y/o anticuerpos en el organismo afectado (45,450,54,74,75,88,99,136,138).

El diagnóstico por medios microbiológicos para la detección de la espiroqueta a partir de muestras de sangre, piel, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido sinovial y órganos afectados no es del todo práctico debido a sus requerimientos específicos para su crecimiento en medio de cultivo (59,101,126).

El haber sufrido alguna picadura por insectos hematófagos es un indicio como anamnesis para su posible diagnóstico; otros hallazgos clínicos como el eritema crónico migratorio, la infiltración linfocitaria benigna, la morfea y la acrodermatitis son algunas de las patologías cutáneas que se han observado en el hombre y algunos animales, como el conejo (5).

Se debe tener atención en las anormalidades del tipo de claudicación por dolor y/o inflamación de una o varias

articulaciones ( 70, 120 ), así como problemas cardíacos (bloqueo del miocardio) (66) ó bien complicaciones neurológicas como parálisis de Bell, meningoencefalitis ó meningopolineuritis (1,34,88,105,128,137).

### 2.6.1 Diagnóstico diferencial

Debido a la amplia sintomatología y la ruta patogénica que sigue la bacteria en el curso de la enfermedad de Lyme, existe cierta similitud con los cuadros clínicos que presentan otras enfermedades con diferente etiología, como podrían ser una infección por influenza virus hasta padecimientos crónicos como el lúpus eritematoso.

En la tabla 4 se describe una lista de las enfermedades más comunes con las cuales es necesario hacer un diagnóstico diferencial de la enfermedad, las cuales se han dividido en zoonóticas y algunas que se pueden presentar en diversas especies animales, así como específicas de la especie humana.

\* Enfermedades presentes también en los animales.

**Tabla 3.** Enfermedades zoonóticas y enfermedades específicas del

humano que deben ser tomadas en cuenta dentro del diagnóstico diferencial (13, 63).

ZOONOTICAS	HUMANO
Septicemias en cualquier estadio	Infecciones gonococales de la
Fiebre de las montañas rocallosas	Neurosífilis
Artritis séptica	Fiebre reumática atípica de la
Tuberculosis	Artritis reumatoide
Meningitis aséptica enteroviral	Enfermedad degenerativa de las articulaciones
Erisipelas	Lúpus eritematoso sistémico
Úlcera tularémica	Artropatías inmunomediadas
Sarcoidosis	Síndrome de Guillian-Barré
	Síndrome de Reiter
	Influenza
	Meningitis fungal *
	Hepatitis anictérica *
	Eritema nodoso
	Eritema multiforme
	Sarpullido urticarial o enfermedad del suero
	Esclerosis múltiple

\* Enfermedades presentes también en los animales.

## 2.7 Tratamiento

Entre los fármacos de elección que se encuentran para combatir la enfermedad de Lyme están los antibióticos, entre los cuales se recomiendan las tetraciclinas, penicilinas y eritromicina (20,125,127), debido a que son medicamentos que han resultado ser efectivos contra *Borrelia burgdorferi*; éstas han sido utilizados en cualquier estadio durante el transcurso de la enfermedad (10,13,15,17,18,58).

Estudios realizados *in vitro* de la susceptibilidad de la espiroqueta demuestran que es combatible con penicilina, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, cloranfenicol, mezlocilina, cefotaxime y ceftriaxone (13,60).

En la medicina humana y veterinaria, las tetraciclinas son el fármaco que más se ha empleado en el inicio del padecimiento, generalmente en la etapa del eritema crónico migratorio ú otras dermatopatías (60), así como también para evitar el desarrollo de lesiones posteriores como la miocarditis, meningoencefalitis y la artritis recurrente (13,20,127). En casos de pacientes con hipersensibilidad a la penicilina se debe administrar eritromicina (20).

El uso de glucocorticoides en perros infectados experimentalmente ha provocado el incremento de los signos clínicos como la claudicación (52).

Para el tratamiento durante la etapa artrítica se puede aplicar fenilbutasona y/o dexametasona junto con la antibioterapia (10,13,15,20,60,125,126).

En la tabla 4 se muestran los diversos farmacos que son empleados en el tratamiento de la enfermedad de Lyme.

**Tabla 4.** Dosificación de medicamentos específicos que son utilizados en humanos y en algunos animales para el tratamiento de la Enfermedad de Lyme.

---

MEDICAMENTO	DOSIFICACION/INTERVALO/FRECUENCIA/VIA
Tetraciclinas	250 mg. c/6 hrs./10 días vía oral (humano)
	250 mg. c/6 hrs./20 días si es necesario
Fenoximetil penicilina	500 mg. c/6 hrs./10-20 días vía oral adultos 50 mg./kg./día vía oral niños (no menos de 1 gr. y no más de 2 gr. por día)
Penicilina benzatiazinica	2.4 millones de U.I. vía I.M. (humano)
Eritromicina	30 mg./kg./día /15-20 días vía oral niño
Ampicilina	500 mg./día/10 días oral (caninos)
Tetraciclina	6 gr.c/12 hrs./4 días I.V. (bovinos)

---

## 2.8 Prevención

3.1 La mejor medida de prevención de la enfermedad de Lyme es evitar las áreas infestadas con garrapatas. También efectuar la programación de baños garrapaticidas de los animales en las áreas en donde ésta enfermedad se presente en forma endémica. La aplicación de la bacterina en los Estados Unidos ha sido un método efectivo en la prevención de la enfermedad de Lyme en perros. (22,33).

La erradicación de la bacteria en el medio ambiente es imposible debido a la gran diversidad de animales que pueden ser portadores de la espiroqueta, así como de los hospederos de los diferentes insectos que son vectores de la Borreliosis (22).

cloroformo, alcohol isomilico alcohol etilico, así como los equipos siguientes: centrífuga clínica refrigerada, y un espectrofotómetro de luz ultravioleta para la cuantificación del ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con los oligonucleótidos para *Borrelia burgdorferi*, cepa B31 que fueron obsequiados por el Dr. Ulf B. Göbel de la Universidad de Medicina, Microbiología e Higiene de Freiburg Alemania, y con la enzima Taq ADN polimerasa (Promega, Inc. EUA), desoxirribonucleosidos trifosfatos y suero mineral estéril. Los equipos empleados incluyeron una cámara de corrimiento de gales para electroforesis, un termociclador y un equipo fotográfico para revelado instantáneo.

También se requirieron gales de agarosa TBE 1X al 2 %.

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Muestras procesadas

Las muestras que se utilizaron en el estudio fueron obtenidas de bacterinas, medios de cultivo, biopsias de pacientes, así como de un perro sospechoso que presentaba sintomatología relacionada con la enfermedad de Lyme; dicho perro murió semanas después, pero al momento de la necropsia se tomó una muestra del líquido sinovial de la articulación húmeroradiocubital.

#### 3.2 Métodos

##### 3.1.2 Reactivos y Materiales

Para la realización de la extracción del ácido nucleico se utilizó los siguientes materiales: base trizma, fenol, cloroformo, alcohol isoamílico alcohol etílico, así como los equipos siguientes: centrífuga clínica refrigerada, y un espectrofotómetro de luz ultravioleta para la cuantificación del ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con los oligonucleótidos para *Borrelia burgdorferi*, cepa B31 que fueron obsequiados por el Dr. Ulf B. Göbel de la Universidad de Medicina, Microbiología e Higiene de Freiburg Alemania, y con la enzima Taq ADN polimerasa (Promega, Inc. EUA), desoxirribonucleosidos trifosfatos y aceite mineral estéril. Los equipos empleados incluyeron una cámara de corrimiento de geles para electroforesis, un termociclador y un equipo fotográfico para revelado instantáneo.

También se requirieron geles de agarosa TBE 1X al 2 %,

poliacrilamida al 8 %, el colorante bromuro de etidio y finalmente, los tubos para microcentrifuga de 0.5 y 1.5 ml., las puntillas de 0.2 y de 1.0 ml.; así como también los tubos cónicos de 15 y 50 ml. Todos estos materiales fueron proporcionados por el Laboratorio de Medicina Molecular del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma Nuevo León, donde se realizó el trabajo experimental.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Extracción de ácidos nucleicos totales.

Para las extracciones de los ácidos nucleicos totales de las diferentes muestras que fueron empleadas para la implementación del diagnóstico de la enfermedad de Lyme por la reacción en cadena de la polimerasa se realizaron dos diferentes técnicas, las cuales debido a que originalmente fueron diseñadas para obtener ácido desoxirribonucleico se readaptaron para obtener las dos clases de ácidos nucleicos celulares.

A continuación se exponen los procedimientos indispensables para la detección de la secuencia específica del ácido nucleico bacteriano, que comienzan con las extracciones de ácidos nucleicos, de biopsias del paciente, del perro, de las bacterinas y de cultivo de la espiroqueta y finaliza con el análisis de las bandas que corresponden al producto amplificado a partir de una región del gen V4 del RNAr 16s de *Borrelia burgdorferi*.



### 3.2.2 Protocolo detallado

Para la realización de este experimento se tomaron 400  $\mu$ l. de la bacterina comercial la cual se usa para prevenir la enfermedad en caninos y del medio de cultivo, 2-5 mm<sup>2</sup> de tejido cutáneo por punción del paciente y así como 1 ml de líquido sinovial de un perro sospechoso. Dichas muestras fueron sometidas al proceso de extracción de ácidos nucleicos, empleando dos distintas metodologías de acuerdo a su origen.

#### a) Técnica para el aislamiento de ACIDOS NUCLEICOS totales de bacterinas y bacterias cultivadas (ULIEG).

- 1.- Tomar 400  $\mu$ l. de la muestra y centrifugarla por 5 minutos a 13,000 rpm.
- 2.- Decantar el sobrenadante y conservar la pastilla de células.
- 3.- Agregar 0.4 ml. de TSNT (2% triton 100x, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH=8) y mezclar por 1 minuto.
- 4.- Agregar 0.2 ml. de Fenol y 0.2 de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1).
- 5.- Mezclar de 3-4 minutos al vortex y agregar 0.2 ml. de TE (pH=8).
- 6.- Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm. Tomar la fase superior y transferirla a otro tubo Eppendorf nuevo.
- 7.- Repetir la extracción con Fenol-Sevag; centrifugar y tomar la fase acuosa y transferirla de nuevo a un tubo sin usar y esterilizado, como en el paso 6.

- 8.- Agregar 50  $\mu$ l. de Acetato de Sodio 3 M y 1 ml. de etanol al 100% e Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Sevag y centrifugar 5
- 9.- Centrifugar a 13,000, descartar el sobrenadante y sacar la
10. pastilla y resuspenderla en 50  $\mu$ l. de TE. te para utilizarse

en la reacción en cadena de la polimerasa.

**b) Técnica para la extracción de ACIDOS NUCLEICOS totales para biopsias (ULIEG).** la concentración y calidad de los ACIDOS

- 1.- El tejido se coloca en un tubo de 0.5 ml. con 140  $\mu$ l. de (50 mM de Tris, pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS). medio
- 2.- Si la muestra es grande se puede diseccionar dentro del tubo hasta alcanzar el tamaño mas pequeño posible. al 1%, con jab
- 3.- Agregar 10  $\mu$ l. de proteinasa K (1 mg/ml.). Incubar entre 8 y 18 horas o toda la noche a  $55^{\circ}\text{C}$ . trofotométrica se colocó 1
- 4.- Hacer una extracción con medio volumen de fenol saturado, mezclando por inversión completamente durante 2 minutos. espec
- 5.- Agregar otro medio volumen de solución Sevag y realizar el mismo procedimiento. absor
- 6.- Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm. se calculó utilizando
- 7.- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y esterilizado
- 8.- El tubo el cual contiene el fenol-cloroformo (la fase orgánica) se le agregan 100  $\mu$ l. de TE y se mezcla por inversión por 2 minutos, para reextraer acidos nucléicos remanentes. ADN = (Factor de dilución) (50) (lectura  $\times$  260
- 9.- Centrifugar la muestra por 5 minutos a 13,000 rpm y la fase acuosa se recupera y se agrega al tubo que contiene la fase acuosa de la primera extracción. un valor entre 1.8 y 2.0

- 9.- Extraer el producto de la combinación de ambas fases acuosas con un volumen de 100  $\mu$ l. de solución Sevag y centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm.
10. Transferir nuevamente y utilizar una alícuota para utilizarse en la reacción en cadena de la polimerasa.

### 3.2.3 Determinación de la concentración y calidad de los ACIDOS NUCLEICOS.

Una vez que el ARN y ADN se ha resuspendido, se procedió a determinar su concentración y calidad por medición espectrofotométrica y electroforesis en minigel de agarosa al 1%, con las siguientes instrucciones.

Para la determinación en el espectrofotométrica se colocó 1 ml. de buffer TE en una celda para UV, calibrando a cero el espectrofotómetro. Posteriormente se añadió 1  $\mu$ l. de la muestra, mezclándose por inversión, tomándose las lecturas a 260 y 280 nm de absorbancia.

La determinación de la concentración del ADN se calculó utilizando el siguiente fórmula.

Volumen total en la celda que muestra la lectura a 260 nm.  
 Factor de dilución =  $\frac{\text{lectura a 260 nm}}{\text{lectura a 280 nm}}$

Volumen de la muestra  
 Concentración de ADN = (Factor de dilución) (50) (lectura a 260 nm.). La concentración estará dada en  $\mu$ g/ml. La calidad del ADN se determina dividiendo la lectura a 260 nm entre la lectura de 280 nm. Un ADN de buena calidad deberá dar un valor entre 1.8 y 2.0 .

3.3 Ejemplo: Lectura 260 nm. 0.140

Lectura 280 nm. 0.075

Factor dilución =  $1001/1 = 1001$

Concentración de ADN:  $(1001)(50)(0.140) = 7007.0 \mu\text{g/ml} = 7\text{ng}/\mu\text{l}$ .

Calidad del ADN:  $0.140/0.075 = 1.87$

### 3.2.4 Corroboración de la concentración del ADN por electroforesis.

En un minigel de agarosa al 1 %, se colocaron diferentes estándares de concentración conocida, ejem. 100, 200, 400, 600 ng de ADN's; se mezcló 1  $\mu\text{l}$ . de jugo azul 6 con 1  $\mu\text{l}$ . de la muestra a cuantificar más 4  $\mu\text{l}$ . de TE ; posteriormente fueron colocadas las muestras en los carriles del minigel, corriéndose la electroforesis por 1.5 horas a 80 volts. Una vez concluida la electroforesis, se colocó el minigel en solución de bromuro de etidio al 1 % durante 10 a 15 minutos.

Se lavó y se observó el minigel en un transluminador de luz UV determinándose la concentración por comparación visual con los estándares. La intensidad de barrido desde la banda del ADN hacia la porción inferior del gel determina el grado de degradación del ADN durante el asilamiento. La ausencia de tal barrido indica que el ADN extraído se encuentra íntegro. Sin embargo, si el ARN está presente, como en éste caso, deberá observarse un barrido desde la mitad del gel hacia abajo de éste, pero sin conectarse con el ADN arriba del gel.

### 3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP), consiste en la síntesis enzimática específica *in vitro* de ADN mediante el cual las tiras monocatenarias del ADN blanco desnaturalizado son copiadas a tiras bicatenarias por la ADN polimerasa, a partir de iniciadores apareados en los extremos de dichas tiras. Esto ocurre en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. En general los componentes que se requieren para realizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa son: 1) ácido nucleico (ADN), 2) iniciadores específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación (oligonucleotidos o primers), 3) mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), 4) solución amortiguadora para la reacción y 5) Taq ADN polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son: 1) Desnaturalización (92-98°C por 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco, 2) Alineamiento (50-60°C durante 30 a 60 segundos), en el que se realizan un apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco recién desnaturalizado y 3) Extensión (70-74°C por 30 a 90 segundos), en el que la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores

apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxirribonucleótidos libres, dando como resultado nuevas cadenas complementarias para las dos cadenas sencillas presentes desde el inicio de la reacción. (14,37,53).

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero ahora contiene el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo estas en cadenas dobles.

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial del segmento de ADN blanco, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la RCP es el resultado de la suma de la longitud de los dos iniciadores más la distancia del ADN blanco flanqueado por éstos. (14,48,53).

### 3.3.1 Descripción de los componentes utilizados en la RCP.

Los oligonucleótidos: La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. En cada 100  $\mu$ l. de reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 a 1.0  $\mu$ M.

El ADN blanco: La reacción en cadena de la polimerasa es tan sensible, que la amplificación puede hacerse a partir de una sola molécula de ADN. La concentración del ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada e idealmente se requieren

aproximadamente  $10^5$  copias de ADN blanco, esto es, de 300 ng. a 1  $\mu\text{g}$ . de ADN genómico humano o animal. (14,48,53,106).

La enzima Taq ADN polimerasa: De las enzimas ADN polimerasas termoestables actualmente utilizadas para la RCP, la ADN polimerasa Taq es la más ampliamente usada por su fácil estandarización y su bajo costo. Esta enzima tiene actividad de ADN polimerasa, de exonucleasa 3'a 5' (correctora de prueba) y de exonucleasa 5'a 3'. Su índice de error de incorporación es de 1 en  $4 \times 10^{-4}$  bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3,000 pares de bases (pb). (14,37,48,53).

La mayoría de los protocolos recomiendan del uso de 1 a 2.5 U de la enzima por cada reacción de 100  $\mu\text{l}$ .

El magnesio y los dNTP's: La concentración de iones magnesio en la RCP es también determinante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimizar la concentración de  $\text{MgCl}_2$  en cada reacción. Para una reacción estandar se recomienda utilizar una concentración final entre 0.5 mM. y 2.5 mM. Si se disminuye demasiado la concentración de  $\text{MgCl}_2$ , la actividad de la enzima disminuye al grado de que algunas veces la amplificación es nula. (14,37,53).

Las concentraciones mínimas de los dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la

reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe optimizarse. Concentraciones entre 20 y 200  $\mu\text{M}$  proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's.

El número de ciclos: Teóricamente en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en la RCP aumenta en forma exponencial con cada ciclo, sin embargo en la práctica, después de determinado el número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente, entrando a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se le denomina fase de "meseta", siendo ésta debida al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del masivo número de complejos ADN blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a éste fenómeno. (14,37,53,106).

Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción ó si se aumenta la cantidad de la enzima; aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse los niveles máximos de la amplificación en una reacción que presente comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de ADN inicial.

Temperaturas: La de desnaturalización ( $92^\circ$  a  $98^\circ\text{C}$ ) y extensión ( $70^\circ$  a  $74^\circ\text{C}$ ) son generalmente estándares para todas las reacciones. La temperatura que resulta tener el efecto más crítico en la especificidad es la de alineamiento, la cuál está determinada principalmente por la temperatura media de fusión ( $T_m$ ) de los



oligonucleótidos. La temperatura de alineamiento, es a la cual los oligonucleótidos se aparean por complementariedad al ADN blanco.

El alto grado de complementariedad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y el ADN blanco, permite utilizar altas temperaturas de alineamiento, lo cual favorece la especificidad de la reacción. No obstante, es importante notar que no siempre es necesario un 100 % de complementariedad entre estos componentes. Si se trabaja con temperaturas de alineamiento demasiado bajas, se origina cierta inespecificidad en la amplificación. (14,37,48,53,106).

Cuando la temperatura de alineamiento es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del ADN blanco y estos oligonucleótidos mal apareados pueden también ser extendidos, ya que la polimerasa Taq posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55° a 65°C se reduce enormemente los eventos de apareamiento inespecífico.

Para calcular la temperatura óptima de alineamiento para un par de oligonucleótidos, puede emplearse diversas fórmulas empíricas. Una es adicionando 2°C por cada A y T presentes en el oligonucleótido y 4°C por cada G y C, y restando 5°C del resultado final de la suma de cada uno de los oligonucleótidos.

Los problemas de contaminación en la RCP: Debido a la alta sensibilidad de la RCP, los problemas de contaminación con ADN diferente al que se quiere analizar, y sobre todo con productos de amplificaciones anteriores, pueden fácilmente presentarse y

ocasionar serios problemas sino se extreman las precauciones en el montaje de la reacción. La fuente mas frecuente de contaminación es la acumulación de productos de RCP producidos por amplificaciones repetidas de la misma secuencia blanco. Esta contaminación es muy nociva y es muy probable que ocurra por el gran número de moléculas que son producidas en una reacción estandar. Cada reacción de RCP puede contener hasta  $10^{12}$  copias de un producto amplificado por lo tanto, aún la más pequeña gota de aerosol ( $10^{-6}$   $\mu$ l.) podría contener más de  $10^5$  blancos potenciales. Se deben incluir siempre testigos negativos en cada amplificación y debe contarse con una área especial y restringida únicamente para el montaje de la RCP. (14,37,48,53,106).

#### Detección y analisis del producto amplificado en la RCP:

Probablemente una de las características que más influyó en la diseminación de esta metodología fué la facilidad para detectar el producto amplificado. Al final de la reacción existen millones de copias del fragmento de interés, por lo que es suficiente con colocar en un gel de agarosa una décima parte (aproximadamente 5-7  $\mu$ l) del volumen total de la reacción, correr la electroforésis y teñir con bromuro de etidio. Para poder verificar el éxito de la amplificación se pueden realizar diferentes metodologías elegidas para cada circunstancia particular, como pueden ser electroforésis en gel de poliacrilamida, digestiones con enzimas de restricción seguidas por electroforésis en gel, así como también mediante hibridación con sondas y/o por secuenciación nucleotídica, (14,37,48,106).

### 3.3.2 Oligonucleótidos utilizados.

Las secuencias oligonucleotídicas que fueron utilizadas para la amplificación de un segmento del genoma del agente patógeno son las siguientes.

TP1 (609-634) 5'-TAC CAC AGC TCA ACT GTG GA [A,C,G] CTA TG-3'

RT1 (830-852) 5'-TCG GTA CTA ACT TTT AGT TAA CA- 3'

### 3.3.3 Mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa.

El procedimiento previo a la reacción en cadena de la polimerasa, es la preparación de la mezcla correspondiente a dicha metodología, la aplicación de los 25  $\mu$ l de agua estéril en un tubo Eppendorf de 1.5  $\mu$ l es el primer paso ya que posteriormente se agregaran los primers 1 y 2, seguido de la muestra sospechosa para amplificar. Los dNTP's, el buffer y el Mg Cl<sub>2</sub> seran aplicados en el orden que mejor convenga; como último paso se debe agregar la enzima Taq polimerasa, la cual deberá permanecer el menor tiempo posible arriba de los -20 °C debido ha que puede iniciar amplificaciones inespecíficas, virtiéndose hasta el final con un calentamiento anterior del termociclador. A continuación se muestran las cantidades y concentraciones de la mezcla para la RCP.

En la tabla 5 se muestran los diferentes componentes utilizados para la amplificación de la fracción correspondiente a la Borrelia burgdorferi.

**Tabla 5.** Mezcla de los componentes para la reacción en cadena de la polimerasa para Borrelia burgdorferi

	Cantidad	Concentración
1.- Acido nucléico (ADN)	4 $\mu$ l.	250 ng./ $\mu$ l.
2.- Primer RT1	2 $\mu$ l.	2.5 $\mu$ M
3.- Primer TP1	2 $\mu$ l.	2.5 $\mu$ M
3.- dNTP's	4 $\mu$ l.	8 $\mu$ M
4.- Buffer	5 $\mu$ l.	10 X
5.- Mg Cl <sub>2</sub>	6 $\mu$ l.	25 mM
6.- Agua estéril	25 $\mu$ l.	
7.- Enzima Taq polimerasa	2 $\mu$ l.	10 U
	50 $\mu$ l.	

### 3.3.4 Programa para el termociclador.

En la tabla 6 se observan los parámetros correspondientes a la temperatura y tiempo del programa de ciclos utilizado en el termociclador para lograr la amplificación del fragmento específico de la Borrelia burgdorferi.

**Tabla 6.** Programa utilizado en el termociclador para la amplificación del ADN de *Borrelia burgdorferi*.

- 1.- Desnaturalización 94°C por 2 minutos
- 2.- Alineamiento 50°C por 2 minutos
- 3.- Extensión 70°C por 2 minutos
- 4.- Volver al paso (1) 35 veces
- 5.- Fin

### 3.3.5 Secuencia nucleotídica del gen V4 del ARNr 16s de *Borrelia*

*burgdorferi*, N representa cualquier nucleótido y subrayadas están las regiones correspondientes a los oligonucleotidos utilizados.

1	NNNAATAACG	AAGAGTTTGA	TCCTGGCTTA	GAACTAACGC	GGCAGTGCG
51	TCTTAAGCAT	GCAAGTCAAA	CGGGATGTAG	CAATACATTC	AGTGGCGAAC
101	GGGTGAGTAA	CGCGTGGATG	ATCTACCTAT	GAGATGGGGA	TAACTATTAG
151	AAATAGTAGC	TAATACCGAA	TAAGGTCAGT	TAATTTGTTA	ATTGATGAAA
201	GGAAGCCTTT	AAACGTTCGC	TTGTAGATGA	GTCTGCGTCT	TATTAGCTAG
251	TTGGTAGGGT	AAATGCCTAC	CAAGGCAATG	ATAAGTAACC	GGCCTGAGAG
301	GGTGAACGGT	CACACTGGAA	CTGAGATACG	GTCCAGNCTC	CTACGGGAGG
351	CAGCAGCTAA	GAATCTTCCG	CAATGGGCGA	AAGCCTGACG	GAGCGACACT

401 GCGTGAATGA AGAAGGTCGA AAGATTGTAA AATTCTTTTA TAAATGAGGA  
 451 ATAAGCTTTG TAGGAAATGA CAAAGTGATG ACGTTAATTT ATGAATAAGC  
 501 CCCGGCTAAT TACGTGCCAG NAGCCGCGGT AATACGTAAG GGNNNAGCGT  
 551 TGTTCGGGAT TATTGGGCGT AAAGGGTGAG TAGGCGGATA TATAAGTCTA  
 601 TGCATAAAAT ACCACAGCTC AACTGTGGAC CTATGTTGGA AACTATATGT  
 651 CTAGAGTCTG ATAGAGGAAG TTAGAATTTT TGGTGTAAGG GTGGAATCTG  
 701 TTGATATCAG AAAGAATACC GGAGGCGAAG GCGAACTTCT GGGTCAAGAC  
 751 TGACGCTGAG TCACGAAAGC GTAGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG  
 801 TAGTCTACGC TGTAACGAT GCACACTTGG TGTAACTAA AAGTTAGTAC  
 851 CGAAGCTAAC GTGTAAAGTG TGCAGCCTGG GGAGTATGCT CGCAAGAGNG  
 901 AAACTCAAAG GNATTNANN GNGCCNGCAC AAGNNGTGA GCATGTGGTT  
 951 TNNNNNNANN NTACGCGAGG AACCTTACCA GGGCTTGACA TATATAGGAT  
 1001 ATAGTTAGAG ATAATTATTC CCCGTTTGGG GTCTATATAC AGGTGCTGCA  
 1051 TGGTTGTCGT CAGCTCGTGC TGTGAGGTGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA  
 1101 GCGCAACCCT TGTTATCTGT TACCAGCATG TAATGGTGGG GACTCAGATA  
 1151 AGACTGCCGG TGATAAGTCG GAGGAAGGTG AGGATGACGT CAAATCATCA  
 1201 TGGCCCTTAT GTCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCC TGTACAAAGC  
 1251 GAAGCGAAAC AGTGATGTGA AGCAAAACGC ATAAAGCAGG TCTCAGTCCG  
 1301 GATTGAAGTC TGAAACTCGA CTTCATGAAG TTGGAATCGC TAGTAATCGT  
 1351 ATATCAGAAT GATACGGTGA ATACGTTCTC GGCNNTGTA CACACCGCCC  
 1401 GTCACACCAC CCGAGTTGAG GATACCCGAA GCTATTATTC TAACCCGTAA  
 1451 GGGAGGAAGG TATTTAAGGT ATGTTTAGCA

**3.3.6 Fragmento esperado en la reacción en cadena de la polimerasa, núcleo de un tamaño de 244 (pb) pares de bases nitrogenadas.**

609 TACCACAGCTC AACTGTGGAC CTATGTTGGA AACTATATGT  
 651 CTAGAGTCTG ATAGAGGAAG TTAGAATTTT TGGTGTAAGG GTGGAATCTG  
 701 TTGATATCAG AAAGAATACC GGAGGCGAAG GCGAACTTCT GGGTCAAGAC  
 751 TGACGCTGAG TCACGAAAGC GTAGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG  
 801 TAGTCTACGC TGTAAACGAT GCACACTTGG TGTTAACTAA AAGTTAGTAC  
 852 CGA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras procedentes de biopsias cutáneas se utilizó la técnica para la extracción de ADN de colas de ratones transgénicos, la cual fue modificada en el tiempo de la digestión, cambiándolo de 12 hrs. a 48 hrs.

Los ADN extraídos fueron analizados para medir su concentración por espectrofotometría de luz ultravioleta, procediendo para ello a diluir 0.5 µl de la solución del ADN en 1 ml de agua destilada estéril. El resultado obtenido siguiendo la fórmula para medir la concentración de ADN de cada una de las muestras procesadas fue de 0.004 de densidad óptica para el medio de cultivo, 0.002 para la bacteria comercial, 0.001 para el líquido sinovial del perro y 0.001 para las biopsias cutáneas. Esto indica una concentración de 400 ng/µl, 200 ng/µl, 50 ng/µl y 20 ng/µl respectivamente, para cada una de las muestras. Para estimar la concentración y calidad de los ácidos nucleicos, se procedió a determinar su concentración por medio de electroforesis

#### 4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Las diferentes metodologías para la extracción de los ácidos nucleicos totales fueron rediseñadas en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina, tomándose como base a las que ordinariamente son utilizadas para su uso en sangre y tejidos. La técnica empleada para la extracción del ADN a partir de sangre periférica fue adaptada para cultivos y bacterinas comerciales que son usadas en la prevención de la enfermedad en caninos, así como también para el líquido sinovial de un perro sospechoso de Borreliosis.

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras procedentes de biopsias cutáneas se utilizó la técnica para la extracción de ADN de colas de ratones transgénicos, la cual fue modificada en el tiempo de la digestión, cambiándolo de 12 hrs. a 48 hrs.

Los ADN extraídos fueron analizados para medir su concentración por espectrofotometría de luz ultravioleta, procediendo para ello a diluir 0.5  $\mu$ l de la solución del ADN en 1 ml de agua destilada estéril. El resultado obtenido siguiendo la fórmula para medir la concentración de ADN de cada una de las muestras procesadas fue de 0.004 de densidad óptica para el medio de cultivo, 0.002 para la bacterina comercial, 0.001 para el líquido sinovial del perro y 0.001 para las biopsias cutáneas. Esto indica una concentración de 400 ng/ $\mu$ l, 250 ng/ $\mu$ l, 50 ng/ $\mu$ l y 20 ng/ $\mu$ l respectivamente, para cada una de las muestras. Para estimar la concentración y calidad de los ácidos nucleicos, se procedió a determinar su concentración por medio de electroforesis



observándose resultados similares a los obtenidos por espectrofotometría. Estos además se relacionan con la cantidad de material biológico presente en cada muestra.

La amplificación del fragmento esperado para confirmar la presencia del ADN de la Borrelia burgdorferi fue llevado a cabo utilizando los primers ó iniciadores TP1 y RT1, los cuales generan un fragmento de 244 pb que representan parte de la región variable V4 del gen 16S rARN (3). El fragmento específico de Borrelia burgdorferi esperado en las muestras anteriormente descritas y que fueron procesadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa resultaron positivas en su totalidad. La concentración utilizada de ADN para todas las muestras fue de 250 ng/ $\mu$ l. La técnica también se empleó para tratar de diagnosticar la enfermedad a partir de ADN aislado de sangre periférica, pero con resultado negativo, reafirmando esto la necesidad de practicarla a partir de biopsias cutáneas, donde la bacteria es mas abundante. El resultado del presente estudio corroboró el trabajo realizado por Adam en 1992, en el cual demostró la especificidad de los oligonucleótidos para las diferentes cepas del agente etiológico, amplificando un segmento de 244 pb. Así mismo, se utilizó como control negativo ADN de Escherichia coli, comprobando la especificidad de los primers al no existir amplificación con el ADN de esta bacteria (figuras 5, 6 y 7). Los estudios realizados demostraron que la Borreliosis de Lyme se encuentra presente en el estado de Nuevo León, ya que los pacientes aquí estudiados radican en la ciudad de Monterrey.

En la figura 5 se aprecia un gel de agarosa al 2 %, donde se llevo a cabo el corrimiento de muestras de ADN sometidas a la RCP, y que corresponden a las cepas obtenidas a partir de Borrelia burgdorferi y de Escherichia coli procedentes de medios de cultivo, así como de células humanas; éstas dos últimas fueron utilizadas como testigos negativos. La banda de 244 pares de bases que confirmaría la presencia de ADN de la bacteria causante de la enfermedad de Lyme, fue observada únicamente en el carril 1, corroborando lo observado por Adam en 1992.

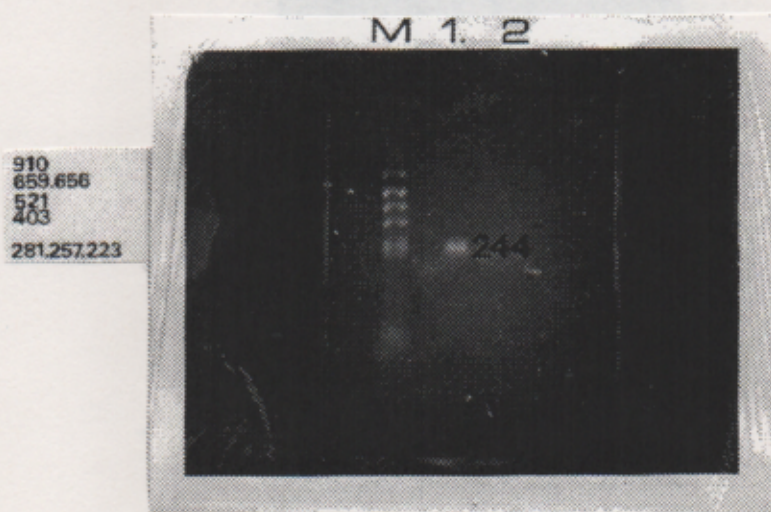


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % mostrando la amplificación del ADN de Borrelia burgdorferi a partir

**Figura 5.** Amplificación del ADN de Borrelia burgdorferi obtenido a partir de un medio de cultivo: M marcador de peso molecular PBR 322 + Alu I, carril 1. Producto amplificado de la espiroqueta, carril 2 ADN de Escherichia coli, carril 3 ADN humano como control negativo.

La figura 6 muestra una fotografía después de la electroforesis del gel de poliacrilamida al 8%, donde se observa el fragmento amplificado esperado de 244 pb correspondiente al ADN del agente etiológico procedente de la bacterina utilizada en los procesos de inmunización para la prevención de enfermedad en caninos. En este gel se confirmó la efectividad de los primers ó iniciadores específicos para detectar el fragmento del genoma de la bacteria.

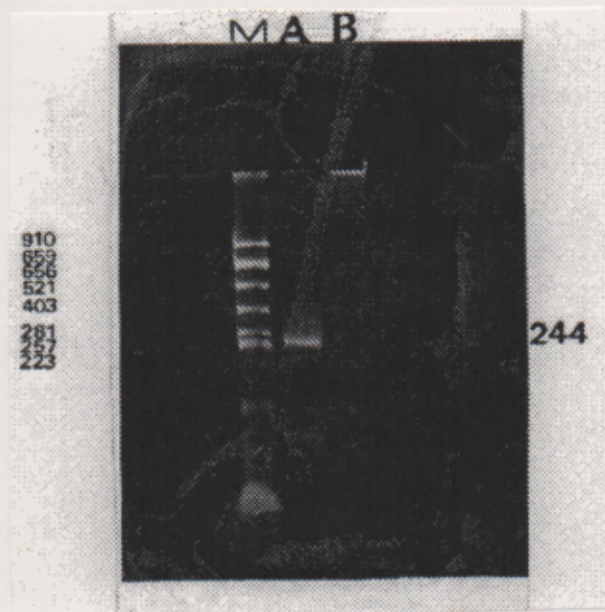
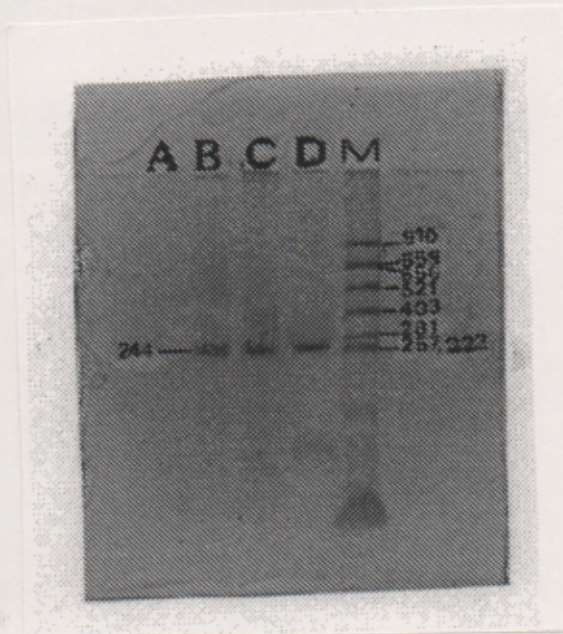


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % mostrando la amplificación del ADN de *Borrelia burgdorferi* a partir de la bacterina utilizada como vacuna en caninos: M marcador de peso molecular PBR 322 + Alu I, A producto amplificado de *Borrelia burgdorferi*, B ADN de *Escherichia coli* como control negativo.

En el gel de poliacrilamida al 8% de la figura 7 se observa nuevamente el producto específico esperado para la Borrelia burgdorferi, el cual fue amplificado en dos muestras correspondientes a biopsias cutaneas de origen humano, así como a partir de una muestra de líquido sinovial procedente de la articulación húmeroradiocubital de un canino; lo que confirma la presencia de la enfermedad también en esta especie animal.



**Figura 7.** Detección de Borrelia burgdorferi a partir de muestras de humanos y caninos por medio de la RCP: A ADN de Escherichia coli como control negativo, B y C producto amplificado a partir de muestras cutáneas de humanos, D región amplificada de Borrelia burgdorferi del líquido sinovial de perro, M marcador de peso molecular PBR 322 + Alu I.

Los resultados obtenidos en ambos geles nos confirman la amplificación específica esperada correspondiente de 244 pb para la *Borrelia burgdorferi* en las muestras probadas procedentes de la especie humana y animal que presentaban sintomatología sugestiva de la enfermedad, por lo tanto, esto nos sugiere que las modificaciones realizadas en la metodología empleada en el laboratorio fue la apropiada para lograr el diagnóstico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, el objetivo inicial de la misma, consistente en la implementación del método de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la bacteria *Borrelia burgdorferi* (agente causal de la enfermedad de Lyme) fue cumplido exitosamente. Logramos amplificar el fragmento esperado de 244 pb correspondiente a una parte de la región variable V4 del gen *16S rRNA* en las muestras procesadas tanto en la especie humana como en la especie canina. Así también, se logró la amplificación del fragmento correspondiente en la bacteria elaborada con la *Borrelia burgdorferi*, utilizada en la prevención de la enfermedad en caninos, lo que confirma la efectividad de la técnica empleada.

## 5.0 CONCLUSIONES

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme hasta hace algunos años era del todo clínico, pero con la aplicación de pruebas serológicas su prevalencia e incidencia comenzó a conocerse mejor percatándose de su subestimación.

Con la aparición del diagnóstico molecular a nivel de ADN se ha dado un gran paso adelante en cuanto a la corroboración de diagnósticos clínicos de algunas enfermedades de tipo infeccioso, ya que el agente etiológico de las mismas puede ser detectado aún tiempo antes del desarrollo de alguna sintomatología por el organismo afectado.

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, el objetivo inicial de la misma, consistente en la implementación del método de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la bacteria Borrelia burgdorferi (agente causal de la enfermedad de Lyme) fue cumplido exitosamente. Logramos amplificar el fragmento esperado de 244 pb correspondiente a una parte de la región variable V4 del gen 16S rARN en las muestras procesadas tanto en la especie humana como en la especie canina. Así también, se logró la amplificación del fragmento correspondiente en la bacterina elaborada con la Borrelia burgdorferi, utilizada en la prevención de la enfermedad en caninos, lo que confirma la efectividad de la técnica empleada.

## 6.0 RESUMEN

### 7.0 BIBLIOGRAFIA

1. El presente trabajo documenta la implementación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para la detección de *Borrelia burgdorferi*, agente causal de la enfermedad de Lyme, en la cual se utilizaron secuencias de ADN sintéticas específicas del gen del ácido ribonucléico ribosomal 16S de la espiroqueta, con las cuales se amplifica una región de 244 pares de bases (pb), probándose esta metodología en bacterinas, medios de cultivos, biopsias cutáneas de dos pacientes humanos y una muestra de líquido sinovial de la articulación húmeroradiocubital de un perro, lográndose en todas las muestras amplificar el fragmento específico para el agente etiológico, demostrando ser una herramienta eficiente en su diagnóstico. Esta es la primera vez que se utiliza la RCP para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme en Latinoamérica.

2. - Anderson J. P., L. A. Magnarelli, K. C. Stafford; 1990; Bird-feeding ticks transstadially transmit *Borrelia burgdorferi* that infect syrian hamsters; *Journal of the Wildlife Disease*; 26:1;10-19.
3. - Anderson W. A.; 1984; Causative agent. *Yale J. Biol. Med.* 57:555-556.
4. - Angulo A. B.; 1986; Lyme disease in cats. *Southwest Vet.* 37:108-109.
5. - Appel M. J. G.; 1990; Lyme disease in dogs and cats. *Compendium Small Animal.* 12:5;617-625.
6. - Barbuor A. G.; 1984; Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:221-225.
7. - Barbuor A. G.; 1984; Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:581-586.
8. - Barbuor A. G.; 1985; Laboratory aspects of Lyme Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:4;399-414.

## 7.0 BIBLIOGRAFIA

1. - Ackermann R., P. Hörstrup, R. Schmidt; 1984; Tick-borne meningopolyneuritis (Garin-Bajadoux, Bannwarth). *Yale J. Biol. Med.* 57:485-490.
2. - Ackermann R., J. Kabatzki, H. P. Boisten, A. C. Steere, R. L. Grodzicki, S. Hartung, V. Runne; 1984; *Ixodes ricinus* spirochete and european erythema chronicum migrans disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:573-580.
3. - Adam T., B. Graf, U. Neubert, B. Goebel; 1992; Detection and Clasification of *Borrelia burgdorferi* by direct sequencing of 16S rRNA amplified after reverse transcription. *Med Microbiol Lett.* 1: 120-126.
4. - Afzelius A.; 1909; Report to: Verhandlungen den dermalotogischen Gesellschaft zu Stockolm. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 101;405-406.
5. - Anderson J. F., Magnarelli L. A.; 1984; Avian and mammalian hosts for spirochete infected ticks and insects in Lyme disease focus in Conneticut. *Yale J. Biol. Med.* 57:627-641.
6. - 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.* 51:2;394-396.
7. - Anderson J. F., L. A. Magnarelli, K. C. Stafford; 1990; Bird-feeding ticks transsiadially transmit *Borrelia burgdorferi* that infect syrian hamsters; *Journal of the Wildlife Disease*; 26:1;10-19.
8. - Andiman W. A.; 1984; Causative agent. *Yale J. Biol. Med.* 57:555-556.
9. - Angulo A. B.; 1986; Lyme disease in cats. *Southwest Vet.* 37;108-109.
- 10.- Appel M. J. G.; 1990; Lyme disase in dogs and cats. *Compenduim Small Animal.* 12:5;617-625.
- 11.- Barbuor A. G.; 1984; Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:221-525.
- 12.- Barbuor A. G.; 1984; Immunochemical analysis of Lyme diasease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:581-586.
- 13.- Barbuor A. G.;1988; Laboratory aspects of Lyme Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:4;399-414.



- 14.- Barrera S. H. A., Ortiz L. R., Rojas M. A., Reséndez P. D.; 1993, Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*, (CONACyT México). 18:108;50-60.
- 15.- 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. Barbuor, W. Burgdorfer, R. Edelman, R. A. Kaslow; 1983; Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N. Eng. J. Med.* 308:13;740-742.
- 16.- 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. *Infect. Immun.* 60:4;1677-1683.
- 17.- Bonard E. C.; 1990; Borrelioses. *Rev. Med. Suisse. Romande.* 110:5;489-490.
- 18.- Bosch M. M.; 1990; Nederlandse teken als overbrengers van infectieziekten. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 134:32;1563.
- 19.- Bosler F. M., T. L. Schulze; 1986; The prevalence and significance of *Borrelia burgdorferi* in the urine feral reservoir hosts. *Zbl. Bakl. Hyg. A.* 263:40-44.
- 20.- Bouman T. J.; 1990; Aspects recents dans le traitement de la maladie de "Lyme". *Phlebologie* Jan-Mar. 43:1;36-37.
- 21.- Bruske E.; 1988; "Lyme disease" a new disease, carried by ticks spreads through the parks. *National Parks.* March/April 33-37.
- 22.- Bukouski J. A.; 1988; Lyme disease: A tick-borne threat to people and pets. *Vet. Med.* April pp.346-358.
- 23.- Burgdorfer W., A. G. Barbuor, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, J. P. Davis; 1982; Lyme disease-a tick-borne spirochetosis?. *Science.* 216;1317-1319.
- 24.- Burgdorfer W.; 1986; The enlarging spectrum of tick-borne spirochetosis. *Rev. Infect. Dis.* 8:6;932-940.
- 25.- Burgess E. C.; 1986; Experimental inoculation dogs with *Borrelia burgdorferi*. *Zbl. Bakl. Hyg. A.* 263:49-54.
- 26.- Burgess E. C., D. Gillette, J. P. Pickett; 1986; Arthritis and panuveitis as manifestation of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *JAVMA.* 189:10;1340-1342.
- 27.- Burgess R. C.; 1986; Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochetes. (*B. burgdorferi*). *Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 36;288-290.

- 28.- Burgess E. C.; 1988; *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 539;235-243.
- 29.- Cohen N. D., C. N. Carter, M. A. Thomas, A. B. Angulo, A. K. Eugster; 1990; Clinical and epizootiologic of dogs seropositive for *Borrelia burgdorferi* in Texas; *JAVMA*; 197:7;893-898.
- 30.- Collins C., G. Peltz; 1991; Immunoreactive epitopes on an expressed recombinant flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 59:2;514-520.
- 31.- Copeland R. A.; 1990; Lyme uveitis. *Int. Ophthalmol. Clin.* 30:7;811.
- 32.- Craft J. E., R. L. Grodzicki, M. Shrestha, D. K. Fischer, M. G. Blanco, A. C. Steere; 1984; The antibody response in Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:561-565.
- 33.- Dammin G. T.; 1986; Its a trasmission and diagnostic features. *Laboratory management.* January, pp. 33-38.
- 34.- Dekonenko E. P., K. G. Umanskii; 1989; Peculiarities of clinical picture of a new tick borne spirochetosis (Lyme disease). *Zhurnal-Neuropatologii-i-Psikhiatrii-Imeni-S-S-Korsovoka.* 89:2;15-18.
- 35.- Dekonenko E. P., A. C. Steere, K. G. Umanskii; 1989; The clinical picture and diagnosis of Lyme Borreliosis. *Terapeutichenskii-Arkiv.* 61:10;116-120.
- 36.- Dordevic D., R. Dmitrovic, V. Derkovic, D. Drndarevic, B. Lako, M. Obradovic, R. Cakanac, N. Stajkovic, D. Pokorni; 1990; *Lajmska bolest u Jugoslaviji.* *Vojnosaint Pregl.* Jul-Aug. 47:4;249-253.
- 37.- Eckert K., Kunkel T.; "DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction", *PCR: Methods and applications*, 1:1;17-24.
- 38.- Edly S. J.; 1990; Lyme disease during pregnancy. *N. J. Med.* 87:7;557-560.
- 39.- Edwards K. S., S. Kanengiser, K. I. Li, M. Glassman; 1990; Lyme disease presenting as hepatitis and jaundice in a child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:8;592-593.
- 40.- Font A., J. M. Closa, J. Masorct; 1992; Lyme disease in dogs in Spain. *Vet Rec* 130:227-228.
- 41.- Garaiova M., K. Bosmansky. M. Blicikova, M. Ondraski; 1990; *Lymska Borelioza-Velky imitador.* *Cesk. Patol.* 26:2;112-118.

- 42.- Gassmann G. S., E. Jacobs, R. Deutzmann, U. B. Göbel; 1991, Analysis of the *Borrelia* Ge Ho fla gene and antigenic characterization of its gene product. *J. Microbiol.* 173:4; 1452-1459.
- 43.- Greene R. T.; 1991; Canine Lyme Borreliosis veterinary clinical northamerica. *Small Animal Practice* 21:1;51-64
- 44.- Hall J. E., J. W. Amrine, R. D. Gais, V. P. Kolanko, B. E. Hagenbuch, V. F. Gerencser, S. M. Clarck; 1991; Parazitization of humans in west Virginia by *Ixodes cookei* (acari:Ixodidae), a potential vector of Lyme Borreliosis. *J. Med. Entomol.* 28:1;186-184.
- 45.- Hansen K., E. Åsbrink E.; 1989; Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chornica atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* flagellum enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 27:3;545-551.
- 46.- Hardin J. A.; 1984; Clinical features (part one). *Yale J. Biol. Med.* 57:479.
- 47.- Hejelle A.; 1966; *Borrelia*-like organisms in the urine of lambs suffering from eczema facialis. *Nature.* 12;856-857.
- 48.- Hosta L., Fick P.; "Enhancement of specificity and yield in PCR. How to optimize PCR reactions", *USB Editorial comments.* vol. 18, winter 1991-1992, pp. 1-5.
- 49.- Hougen K. H.; 1984; Ultraestructure of spirochete isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Yale J. Biol. Med.* 57:543-548.
- 50.- Hovmark A., E. Asbrink, O. Schwan, B. Hederstedt, D. Christensson; 1986; Antibodies to *Borrelia* spirochetes in sera from Swedish cattle and sheep. *Acta. Vet. Scand.* 27;479-485.
- 51.- Husum D., H. V. Janniche, E. Smith, P. Eliassen; 1990; Hypertension ved Borreliose. *Ugeskr. Lacger.* 153:1;33-34.
- 52.- Hsien-J. C., Ll. G. Chavez, B. M. Blumer, R. W. Sebring, T. L. Wasmoen, W. M. Acree; 1992; Immunogeneticity and efficacy study of a commercial *Borrelia burgdorferi* bacterin. *JAVMA.* 201:3;403-411
- 53.- Innis M., D. Gelfand; "Optimization of PCRs", en: Innis M., Gelfand D., Scrinisky J.; *PCR Protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, Inc., San Diego, Cap. I, 1990, pp. 3-12.

- 54.- Isogai E., H. Isogai, N. Sato, M. Yuzawa, M. Kawakami; 1990; Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in Hokkaido. *Microbiol. Immunol.* 34:12;1005-1012.
- 55.- Johnson R. C., F. W. Hyde, C. M. Rumpel; 1984; Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:529-537.
- 56.- Johnson S. E., G. C. Klein, G. P. Schmid, J. C. Feeley; 1984; Antimicrobial agents. *Yale J. Biol. Med.* 57:549-553.
- 57.- Johnson R. C., C. Kodner, M. Russell; 1986; Active immunization of hamsters against experimental infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infec. Immun.* 54:3;897-898.
- 58.- Johnson R. C.; 1988; A disease that has come into its own. *Laboratory management.* June. pp. 34-40.
- 59.- Karlsson M.; 1990; Aspects of diagnosis of Lyme Borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 67:1-59.
- 60.- Keeneth B.; 1992; Minocycline in Lyme disease. *J. Am. Aca. Dermatol.* 26:1;263-264.
- 61.- Kehl K. S. C., S. G. Farmer, R. A. Komorowski, K. K. Knox; 1986; Antigenic variation among *Borrelia* Spp. in relapsing fever. *Infec. Immun.* 54:3;899-902.
- 62.- Kochi S. K., R. C. Johnson, A. P. Dalmasso; 1991; Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 146:11;3964-3970.
- 63.- Kornblatt A. N., P.H. Urban, A. C. Steere; 1985; Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. *JAVMA* 186:9;960-964.
- 64.- Kruger W. H., M. Pulz; 1991; Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 35:2;98-102.
- 65.- Lebech A. M., K. Hansen; 1991; Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:7;1646-1653.
- 66.- Levy S. A., P. H. Duray; 1988; Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*: similarity to human Lyme carditis. *J. Vet. Int. Med.* 2:3;138-144.
- 67.- Liebisch A., A Koop, S. Olbrich; 1990; Zeckenborreliose bei Haustieren. Teil I: Infektionen bei Hunden und Katzen. *Vet. Journal für den Veterinär.* 10;6-15.

- 68.- Liebisch A., A. Koop, S. Olbrich; 1990; Zeckenborreliose bei Haustieren. Teil II: Infektionen bei Pferden und Katzen. *Vet. Journal für den veterinär.* 11;15-20.
- 69.- Lindermeier J. M. D. Marshall, A. B. Onderdonk; 1991; dogs as sentinels for Lyme disease in Massachusetts. *Am. J. Publ. Health.* 81:11;1448-1455.
- 70.- Lissman B. A., E. M. Bosler, H. Camay, B. G. Ormiston, J. L. Benach; 1984; Spirochetes-associated arthritis (Lyme disease) in dog. *JAVMA.* 185:2;219-220.
- 71.- Ma Y., A. Sturrock, J. J. Weis; 1991; Intercellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. *Infec. Immun.* 59:2;671-678.
- 72.- Magnarelli L. A., J. F. Anderson, W. Burgdorfer, W. A. Chapell; 1984; Parasitism by *Ixodes dammini* (acari:Ixodidae) and antibodies to spirochetes in mammals at Lyme diseases foci in Connecticut USA. *J. Med. Entomol.* 21:1;52-57.
- 73.- Magnarelli L.A., J. F. Anderson, A. F. Kaufmann, L. L. Lieberman, G. D. Whitney; 1985; Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *JAVMA.* 186:9;955-959.
- 74.- Magnarelli L. A., J. F. Anderson, A. B. Schreier, C. M. Ficke; 1987; Clinical and serological studies of canine borreliosis. *JAVMA.* 191:9;1089-1094.
- 75.- Magnarelli L. A., J. F. Anderson, J. B. Mc Aninch; 1990; Serologic analyses of cottontail rabbits for antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 28:5;890-893.
- 76.- Magnarelli L. A. J. F. Anderson; 1991; Adsorption and biotin-sterptavidin amplification in serologic test for diagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 29:9;1761-1764.
- 77.- Magnarelli L. A., J. H. Oliver H. J. Hutcheson, J. F. Anderson; 1991; Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in deer and racoons. *J. Wil. Dis.* 27:4;562-568.
- 78.- Magnarelli L. A., R. K. Swihart; 1991; Spotted fever group Rickettsiae or *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes cookei* (Ixodidae) in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* 29:7;1520-1522.
- 79.- Main A. J., A. B. Carey, M. G. Carey, R. H. Goodwin; 1982, Immature *Ixodes dammini* on small animals in Connecticut, USA: *J. Med. Entomol.* 19:6;655-664
- 80.- Main A. J.; 1984; Vector and causative agent. *Yale J. Biol. Med.* 57:527-537.

- 81.- Malawista S. E.; 1984; Clinical features (part two). *Yale J. Biol. Med.* 57:505-506.
- 82.- Malawista S. E., A. C. Steere, J. A. Hardin; 1984; Lyme disease: A unique human model for an infectious etiology rheumatic disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:473-477.
- 83.- Malloy D. C., R. K. Nauman, H. Paxton; 1990; Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:6;1089-1093.
- 84.- Marcus L. C., M. M. Paterson, R. E. Gilfillan, P. H. Urbano. 1985; Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses: Serology survey. *Am. J. Vet. Res.* 46:12;2570-2571.
- 85.- Melchers W., J. Meis, P. Rosa, E. Claas, L. Nohlmans, R. Koopman, A. Horrevorts, J. Galama; 1991; Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with the Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 9:11;2401-2406.
- 86.- Mörner A. P., P. Olson, M. Carlsson, U. M. Olershacken; 1990; Clinical and serological studies of borreliosis in Swedish dogs. *IV Int. Conf. Lyme borreliosis, Stockholom, Abstr. A.* 40.
- 87.- Munger R. J.; 1990; Uveitis as a Manifestation of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs. *JAVMA.* 197:1;811.
- 88.- Nagasawa A., A. Kume, S. Shiramizu, A. Takahashi, T. Yasuda; 1990; [A case of multiple cerebral plasy manifesting facial paralysis and positive *Borrelia burgdorferi* antibody]. *Nippon-Naika-Gakkai-Zasshi.* 79:10;1445-1446.
- 89.- Nicholson W. L., R. T. Greene; 1989; Lyme disease: current concepts. *Veterinary-Reprts-Solvay.* 2:2;1-5.
- 90.- Niederman J. C.; 1984; Causative agent and host response (part one). *Yale J. Biol. Med.* 57:587.
- 91.- Pachner A. R., A. C. Steere; 1984; Neurological findings of Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:481-483.
- 92.- Park S.; 1986; Zur Diagnose und Verbreitung der einheimischen Zecken borreliose beim Tier. *München Tiärztl. Fakultät diss.*
- 93.- Persing D. H., S. R. Telford, P. N. Rys, D. E. Dodge, T. J. Withe, S. E. Malawista, A. Spielman; 1990; Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science.* 249:1420-1423.
- 94.- Pinger R. R., T. Glancy; 1989; *Ixodes dammini* (acari:Ixodidae) in Indiana. *J. Med. Entomol.* 26:20;130-131.

- 95.- Post J. E., E. Shaw, S. D. Wright; 1988; Suspected borreliosis in cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 395;488.
- 96.- Post J. E.; 1990; Lyme disease in large animals. *N. J. Med.* 87:7;575-577.
- 97.- Postic D., C. Edlinger, C. Richaud, F. Grimont, Y. Defresne; 1990; Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.* 141:4;465-475.
- 98.- Rabb C. D., L. J. Leshner, W. F. Chandler; 1992; Polymerase chain reaction confirmation of *Borrelia burgdorferi* in benign lymphocytic infiltrate of dermis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 26:1;267-268.
- 99.- Raczka A., J. Knap; 1990; Oznaczanie poziomu przeciwciał anty-*Borrelia burgdorferi* kalasie IgG/IgM metoda ELISA. i. ocena testu i zalozenia metodyczne. *Przegl. Epidemiol.* 44:4;327-331.
- 100.- Rand P.W., R. P. Smith, E. H. Lacombe; 1991; Canine seroprevalence and the distribution and the distribution of *Ixodes dammini* in an areas of emerging Lyme disease. *Am. J. Publ. Health.* 81:10;1331-1334.
- 101.- Rawlings J. A., P. V. Fournier, G. J. Telow; 1987; Isolation of *Borrelia spirochetes* from patients in Texas. *J. Clin. Microbiol.* 25:7;1148-1150.
- 102.- Rosa P. A., A. Hogan, T. G. Schwan; 1991; Polymerase chain reaction analyses identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin Microbiol.* 29:3;524-532.
- 103.- Russell R. C.; 1991; The Lyme disease situation in Australia. *Bull. Soc. Vector. Ecol.* 16:2;227-229.
- 104.- Ryan C. P.; 1987; Selected Arthropod-borne Diseases. *Vet. Clin. N. Am.* 17:185-194.
- 105.- Ryberg B.; 1984; Bannwarth's syndrome(lymphocytic mening oradiculitis) in Sweden. *Yale J. Bio. Med.* 57:499-503
- 106.- Saiki R., Gelfand D., Oste C., Higuchi R.; "Part one: Basic Methodology", en: Erlich H. (Ed.), *PCR Technology Principles and applications for DNA amplification*, Stockton press, New York, cap. I, II, III y IV, 1989, pp. 1-38.
- 107.- Salinas M.J.A, R. Támez, C. Arroyave. Enfermedad de Lyme en Nuevo León. Memorias de las " VI Jornadas Médicas " del Hospital Metropolitano "Dr. Bernardo Sepúlveda " y I Encuentro de Investigación Estatal. Junio 1992. Monterrey, N.L.

- 108.- Schafrank S. N., A. K. Kurban, G. Martone; 1990; Lyme disease acquired in southeast Africa. *Arch. Dermatol.* 126:5;685-686.
- 109.- Schmid G. P., A. G. Steigerwalt, S. E. Johnson, A. G. Barbuor, A. C. Steere, I. M. Robinson, D. J. Brenner; 1984; DNA characterization of the spirochete that cause Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 20:157-158.
- 110.- Schmid G. P., A. G. Steigerwalt, S. E. Johnson, A. G. Barbuor, A. C. Steere, I. M. Robinson, D. J. Brenner; 1984; DNA characterization of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57:539-542.
- 111.- Schneider T., R. Lange, W. Rönspack, W. Weigelt, H. W. Kölmel; 1992; Pronostic B-cell epitopes on the flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infec. Immun.* 60:1;316-319.
- 112.- Schulze T. L., G. S. Bowen, M. F. Lakat, W. E. Parkin, J. K. Shiler; 1986; Seasonal abundance and host of *Ixodes dammini* and other ixodid ticks from endemic Lyme disease focus in New Jersey, USA. *J. Med. Entomol.* 23:1;105-109.
- 113.- Schulze T. L., C. R. Taylor, G. C. Taylor, E. M. Bosler; 1991; Lyme disease: A Proposed ecological index to assess areas of risk in the northeastern United States. *Am. J. Publ. Health.* 81:6;714-718.
- 114.- Sears J. E., E. Frikrig, T. Y. Nakagawa, K. Deponte, N. Marcantonio, F. S. Kantor, R. A. Flavell; 1991; Molecular mapping of Osp A mediated immunity against *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *J. Immunol.* 147:6;1995-2000.
- 115.- Smith R. P., E. H. Lacombe, P. W. Rand, R. Dearborn; 1992; Diversity of tick species biting humans in an emerging area for Lyme disease. *Am. J. Publ. Health.* 82:12;67-69.
- 116.- Spielman A., C. M. Clifford, J. Piesman, M. D. Corwin; 1979; Description of vector, *Ixodes dammini* on Nantucket, Island USA. *J. Med. Entomol.* 15:3;218-234.
- 117.- Spielman A., J. F. Levine, M. L. Wilson; 1984; vectorial capacity of north american *Ixodes* ticks. *Yale J. Biol. Med.* 57:507-513.
- 118.- Spielman A., M. L. Wilson, J. F. Levine, J. Piesman; 1985; Ecologic of *Ixodes dammini*-Borne Human Babesiosis and Lyme disease. *Ann. Rev. Entomol.* 30;439-460.
- 119.- Steere A. C., S. E. Malawista, J. A. Hardin, S. Ruddy, P. M. Askenase, W. A. Andiman; 1977; Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. Enlarging clinical espectrum. *Ann. Inter. Med.* 86:6;685-698.



- 120.- Steere A. C., S. E. Malawista, D. R. Sydman; 1977; Lyme arthritis an epidemic of oligoarticular Arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arth. Rheum.* 20;7-17.
- 121.- Steere A. C., T. F. Broderick, S. E. Malawista; 1978; Erythema chronic migrans and Lyme arthritis, epidemiologic evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* 108;312-321.
- 122.- Steere A. C., A. Gibofsky, M. E. Patarroyo, R. J. Winchester, J. A. Hardin, S. E. Malawista; 1979; Chronic Lyme arthritis Clinical an Immunogenetic diferentation from rheumatoid arthritis. *Ann. Inter. Med.* 90; 896-901.
- 123.- Steere A. C., S. E. Malawista; 1979; Cases of Lyme disease in US, location correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann. Inter. Med.* 91;5;730-733.
- 124.- Steere A. C., R. L. Grodzicki, A. N. Kornblatt, J. E. Craft, A. G. Barbuor, W. Burgdorfer, G. P. Schmit, E. Johnoson, S. E. Malawista; 1983; The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Eng. J. Med.* 308;733-740.
- 125.- Steere A. C., G. J. Hutchitson, D. W. Ranh, L. H. Sigal, J. E. Craft, E. T. DeSanna, S. E. Malawista; 1983; Treatment of the early manifestation of Lyme disease. *Ann. Med.* 99;1;22-26.
- 126.- Steere A. C., R. L. Grodzicki, J. E. Craft, M. Shrestha, A. N. Kornblatt, S. E. Malawista; 1984; Recovry of Lyme disease spirochetes from patients. *Yale J. Biol. Med.* 57:557-560.
- 127.- Steere A. C., S. E. Malawista, N. H. Bertenhagen, P. N. Spieler, J. H. Newman, D. W. Rahn, G. J. Hutchitson, J. Green, P. R. Snyderman, E. Taylor; 1984; The clinical spectrum and treatment of Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:453-461.
- 128.- Stiernstedt G. T., B. R. Sköldenberg, B. Vandvik, B. Herderstedt, A. Gårde, G. Kolmodin, H. Jörbäck, B. Svenungsson; 1984; Chronic meningitis and Lyme disease in Sweden. *Yale J. Biol. Med.* 57:491-497.
- 129.- Suteu E.; 1990; Boala Lyma (Borelioza): Importanta epidemiologica a vectorilor si rezervorilor animalii. *Rev. Ig. Bacteriol.* Apr-Jun. 35:2;113-117.
- 130.- Telford S. R., A. Spielman; 1984; Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (acari: Ixodidae) as a vector of Lyme disease spirochete. *J. Med. Entomol.* 26:2;118-121.
- 131.- Tsekov I., L. Angelov, 1990; Laimskata bolest i nainite formi na proiavlennie u nas. *Vutr. Boles.* 29:2;58-63.

- 132.- Weber K., G. Schierz, B. Wilske, V. Preac-Mursic; 1984; European erithema migrans disease and related disorders. *Yale J. Biol. Med.* 56:463-471.
- 133.- Weber A., U. Heim; 1989; Borreliose beim hund. *Vet. Journal für den Veterinär*, 9, Jahrg IV, 14-16.
- 134.- Wallis R. C., S. E. Brown, K. O. Kloter; 1978; Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis field study of ticks. *Am. J. Epidemiol.* 108;322-327.
- 135.- Wilson M. L., A. Spielman; 1985; Seasonal activity of Immature Ixodes dammini (acari:ixodiadae). *J. Med. Entomol.* 22:4;408-414.
- 136.- Wilkinson H. W.; 1984; Immunodiagnostic tests for Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:567-572.
- 137.- Winterkorn J. M.; 1990; Lyme disease: neurologic and ophthalmic manifestations. *Surv. Ophthalmol.* 35:3;1991-204.
- 138.- Winward K. E., J. L. Smith; 1989; Ocular disease in caribbean patients with serologic evidence of Lyme Borreliosis. *J. Clin. Neuro. Ophthalmol.* 9:2;65-70.
- 139.- Wise D. J., T. L. Weaver; 1991; Detection of the Lyme disease bacterium, *Borrelia burgdorferi* by using the polymerase chain reaction and a nonradioisotopic gene probe. *J. Clin. Microbiol.* 29:7;1523-1526.
- 140.- Yuval B., A. Spielman; 1990; Duration and regulation of the developmental cycle of *Ixodes dammini* (acari:Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 27:2;196-201.

Adicionar 70 ml. de suero de conejo parcialmente hexalizado (Baxleten) para producir una concentración del 4-4 de suero. Agregar Kanamicina de poder estandar a razón de 3 mg./ml. y 230 mg./ml. de Fluorouracil de poder estandar. El medio debe tener un pH final de 7.7.

## APENDICE

### Medio de cultivo.

Contenido del Medio de cultivo selectivo para Borrelia burgdorferi.

INGREDIENTE	CANTIDAD
CMRL-1066 medio con glutamina 10x.....	100ml.
Agua bidestilada.....	900 ml.
Neopeptona.....	5 gr.
Albúmina de suero bovino fracción V.....	50 gr.
Buffer HEPES.....	6 gr.
Citratodesodio.....	0.7 gr.
Glucosa.....	5 gr.
Piruvato de sodio.....	0.8 gr.
N-Acetilglucosamida.....	0.4 gr.
Bicarbonato de sodio.....	2.2 gr.
Gelatina.....	14 gr.
Agua destilada.....	200 ml.

Adicionar 70 ml. de suero de conejo parcialmente hemolizado (Hazleton) para producir una concentración del 6 % de suero. Agregar Kanamicina de poder estandar a razón de 8  $\mu\text{g.}/\text{ml.}$  y 230  $\mu\text{g.}/\text{ml.}$  de Fluorouracil de poder estandar. El medio debe tener un pH final de 7.7.

FACULTAD DE MEDICINA U. A. N. L.  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA

FECHA 19 - MAYO - 1993

NEGATIVO No. 1.6345

BLOQUE No. 5139

MUESTRA No. Borvelic

AUMENTO NEG. 12.000X

AMPLIFICACION \_\_\_\_\_

AREA FOTOGRAFIADA \_\_\_\_\_

DESCRIPCION \_\_\_\_\_

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DIAGNOSTICO MOLECULAR DE BORRELIA  
BURGDORFERI, AGENTE CASUAL DE LA  
ENFERMEDAD DE LYME, POR LA REACCION EN  
CADENA DE LA POLIMERASA.

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA  
ROBERTO TAMEZ GONZALEZ

MONTERREY N. L.

ENERO DE 1994

INDICE

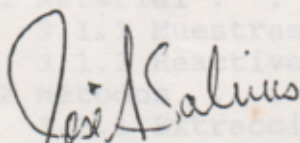
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE *Borrelia burgdorferi*, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE LYME, POR LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

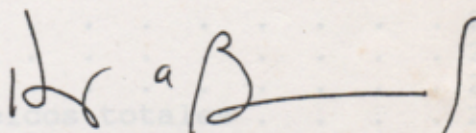
TESIS PRESENTADA POR:

PMVZ ROBERTO TAMEZ GONZALEZ

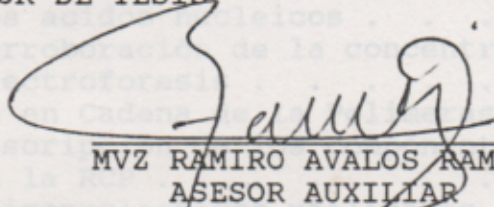
REVISADA POR:



DR. JOSE ANTONIO SALINAS MELENDEZ  
DIRECTOR DE TESIS



DR HUGO A. BARRERA SALDANA  
CO-DIRECTOR DE TESIS



MVZ RAMIRO AVALOS RAMIREZ  
ASESOR AUXILIAR