



DETECCIÓN DE *Borrelia burgdorferi* EN GARRAPATAS DE PERRO, EN EL AREA METROPOLITANA DE NUEVO LEÓN.

Zinnia Judith Molina-Garza, Karla Perez-Treviño, Francisco Iruegas-Buentello, Lucio Galaviz-Silva.

RESUMEN.

Este estudio fue conducido para la identificación de garrapatas que parasitan a perros de raza pura y criollos, en el área metropolitana. Las garrapatas fueron removidas del cuerpo de los perros con pinzas. Se muestrearon 115; 92 criollos y 23 de raza pura. De estos perros se colectaron 1063 garrapatas, identificadas como *Rhipicephalus sanguineus*. Se realizaron 100 pools de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*). Todos los PCR fueron negativos. Se recomiendan medidas sanitarias en las mascotas para el control del vector.

Palabras clave: Garrapatas, Perros, *Rhipicephalus sanguineus*

INTRODUCCIÓN.

Las garrapatas son importantes transmisores de diferentes patógenos de importancia en medicina veterinaria y en salud pública en muchos países del mundo ⁽¹⁹⁾, debido a su capacidad de parasitar a vertebrados domésticos, silvestres y al hombre ⁽¹¹⁾. Las enfermedades caninas emergentes que pueden transmitir son babesiosis, hepatozoonosis, ehrlichiosis,

rickettsiosis y borreliosis que han desviado la atención pública y científica hacia estos artrópodos (Ramírez-Barrios *et al.*, 2008). Entre los factores biológicos que contribuyen al alto potencial vectorial de las garrapatas se encuentra su modo de vida, las propiedades características de su saliva y el modo en que se realiza la digestión de la sangre ingerida ⁽¹⁵⁾. El incremento en el número de garrapatas ha sido asociado al acceso a ambientes naturales y al

aumento de la población de hospedadores silvestres (venado, pequeños mamíferos, zorros entre otros) que ahora tienen una asociación más cercana con la actividad humana ⁽²³⁾. La distribución de la garrapata vector se ve influenciada principalmente por las variaciones climáticas y geográficas, así como la migración de aves a las que infestan e incluso la dinámica poblacional normal de los demás hospedadores, lo que hace de la garrapata una especie con un potencial de distribución muy alto, además facilita su introducción en sitios donde no se encontraba naturalmente, lo que aumenta el riesgo en el humano de adquirir enfermedades asociadas a estas garrapatas ⁽²¹⁾. La mayoría de las mordidas de garrapata ocurren en los meses de verano, sin embargo se encuentra un buen número de incidentes en los meses de primavera y otoño ⁽⁶⁾.

Las garrapatas tienen un papel relevante en la transmisión de *Rickettsias*, como es la enfermedad de Lyme o borreliosis de Lyme causado por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* ⁽¹³⁾ la cual fue reconocida por primera vez en el año de 1975, tras presentarse una epidemia de artritis en los habitantes de la localidad de Lyme en el condado de Connecticut, en los Estados Unidos de América. La enfermedad de Lyme se caracteriza por presentar tres estados patológicos, la fase inicial consiste en una lesión cutánea llamada eritema crónico migratorio (77%), la segunda fase presenta anomalías neurológicas y disturbios en la conducción cardíaca (16%) y en la tercera, ocurre una artritis franca (7%) en las últimas etapas de la enfermedad que pueden manifestarse de días a años después de la infección inicial ⁽¹⁷⁾.

Es considerada actualmente como la enfermedad transmitida por vectores a humanos más común en los Estados Unidos. ⁽²⁰⁾. En México son escasos los reportes relacionados con esta enfermedad en humanos, Gordillo *et al.* (2003) determinaron una prevalencia de 3 a 6% en un banco de sueros congelados del Distrito Federal y del noreste el país (Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León). En Nuevo León la garrapata de perro *Dermacentor variabilis* fue positiva por PCR a la enfermedad de Lyme (1.6%) ⁽⁷⁾.

Debido a que existe en la literatura datos muy variados sobre posibles vectores para la transmisión de la enfermedad de Lyme u otras enfermedades transmitidas por garrapatas, nuestro estudio tuvo como objetivo identificar taxonómicamente las garrapatas de perro así como determinar por PCR la presencia de *B. burgdorferi sensu lato*.

METODOLOGÍA

Se registraron datos como edad del perro, sexo, raza, presencia o ausencia del ectoparásito para análisis estadísticos y se colectaron garrapatas de los cánidos en forma manual o mediante pinzas (estadios ninfales) durante 5 minutos de las partes más irrigadas del cuerpo del perro (orejas, cuello, etc.), según la técnica descrita por Amerasinghe en 1992. Las garrapatas obtenidas se depositaron viales de 24mL con tapón de rosca, los cuales se etiquetaron previamente, sumergidas en alcohol etílico absoluto como preservador, se trasladaron al Laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas. La identificación taxonómica se realizó con las claves del manual de identificación de las especies de garrapatas de importancia en México de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural de la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria de la Dirección General de Salud Animal. Además se corroboró con el Manual Garrapatas de Animales Domésticos en el área de influencia de la UAAAN, de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” ^(10,16).

Toma de sangre para diagnóstico de la enfermedad de Lyme: fue realizada con jeringas de 3 mL y agujas de 18x14 ¼. La sangre fue extraída de la extremidad anterior, de la vena cubito radial e inmediatamente transferida a un tubo de ensaye estéril con citrato sódico y conservada en hielo para su transporte al laboratorio.

Extracción del ADN de *B. burgdorferi*: Para su análisis, las garrapatas fueron distribuidas en 100 pools (cada pool o lote, compuesto de 10 organismos), Posteriormente las garrapatas de cada pool se trituraron

manualmente en el mismo tubo que las contenía con ayuda de un pistilo, este con la finalidad de romper los tejidos tal como lo describe Cabrera, *et al.* (2002). La obtención del ADN fue mediante el protocolo del DNAzol®.

El control positivo para la PCR fue una muestra de ADN de la cepa B31 donada por la Dra. Cinco del Laboratorio Spirochete, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste, Trieste, Italy.

Reacción de PCR: Se llevó a cabo en un volumen total de 50µL, que contenía 125 ng aproximadamente de ADN, 200 pmol de cada iniciador o primer 3 mM MgCl₂, 200 mM de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatados y 2.5 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Multigene. La amplificación de muestras se realizó utilizando los iniciadores sintéticos diseñados por Chieng-Ming y Li-Lian (2002), los cuales pertenecen a la región *OspA* de la cepa de referencia *B. burgdorferi* B31 y JD1. El primer iniciador se encuentra en la secuencia nucleotídica 21 a 47, 5'-AAT AGG TCT AAT AAT AGC CTT AAT AGC-3' y el segundo iniciador presenta una secuencia en la posición 201 a 228pb, 5'-CTA GTG TTT TGC CAT CTT CTT TGA AAA-3'. Una vez terminada la reacción de polimerización, la verificación de la amplificación se confirmó al fraccionar las muestras en un gel de agarosa al 1.5% (27).

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos en el estudio fueron ingresados a una base de datos de Microsoft Excel. Se realizaron algunas medidas de tendencia central y variabilidad (18), prevalencia (desviación estándar), abundancia e intensidad.

RESULTADOS

Un total de 115 perros fueron muestreados; 92 criollos y 23 de raza pura. De estos perros se recuperaron 1063 ejemplares pertenecientes a la especie *R. sanguineus* (Figura 1), 373 garrapatas eran machos y 690 hembras. Por municipio, el total de garrapatas/Intensidad/Abundancia ± DS es el siguiente: Monterrey 320 /53.33/53.334

(11±6.00), San Nicolás de los Garza Nuevo León: 579/8.90/7.14 (7.23±8.02) y Cd. Guadalupe: 164 /7.80/4.68 (4.68±6.31). Para la detección de la *Rickettsia*, los 100 pools que fueron analizados con la técnica de PCR para la detección de *B. burgdorferi*, con la amplificación del gen de la flagelina *OspA*, fueron negativos (Figura 2).

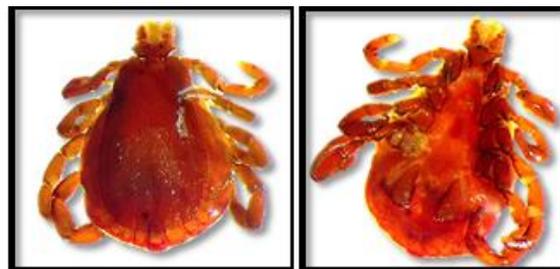


Fig. 1 Vista dorsal y ventral de un macho *R. sanguineus*, forma hexagonal de la base del capitulo, escudo liso sin ornamentaciones.

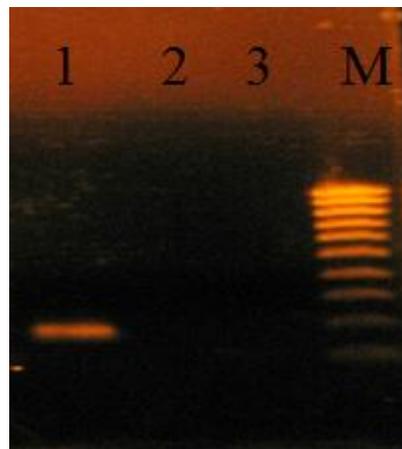


Fig. 2 Amplificación de producto de PCR de *B. burgdorferi* sensu lato *osp A* de ADN de garrapatas. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Línea 1: control positivo (300pb), línea 2 y 3 muestras negativas. M -100pb DNA ladder.

Descripción:

El género posee pedipalpos cortos y la base del gnatosoma usualmente hexagonal dorsalmente. Ocelos y festones presentes. Coxa I con una profunda hendidura o escotadura. Machos con placas adenales y usualmente placas accesorias. Placas estigmas en forma de coma. Proceso caudal presente o ausente en machos. El género aparentemente es originario de África, donde se encuentran en la actualidad 60

especies. Estas garrapatas son esencialmente importantes como reservorios y vectores de una variedad de enfermedades animales. *R. sanguineus* es una de las especies de garrapatas más ampliamente distribuidas en el mundo, En México se localiza en la mayoría de los estados de la República Mexicana. Bajo condiciones favorables, el ciclo de vida puede completarse en 63 días; en áreas templadas puede prolongarse un año.

DISCUSIÓN

Las garrapatas colectadas en este estudio fueron *R. sanguineus*, de la familia Ixodidae, parásitos de mamíferos. Aunque se muestrearon más perros machos que hembras (76 machos y 39 hembras), las perras (74%) tenían casi la misma infestación de garrapatas que los perros machos (75.60%), en cuanto a la edad del perro también es importante, y se ha observado que entre más joven es el perro mayor es la infestación de garrapatas, debido a que los animales jóvenes todavía no tienen el sistema inmunológico desarrollado que podría sugerir que sean más susceptibles a la infestación de garrapatas^(2,19). En un estudio en Nuevo León, la garrapata *R. sanguineus* fue la más distribuida en nueve municipios muestreados, donde se colectaron 2,408 especímenes de este género con una prevalencia de 94.6%⁽⁷⁾. En otros países como África su abundancia es de 40.58 y en países Asiáticos hasta 97.3%⁽¹²⁾. Aunque la garrapata es el vector reconocido de la enfermedad de Lyme, no todas las especies son capaces de transmitirla. La especie con más reportes como causante de la transmisión de la espiroqueta es la garrapata de los ciervos o de las patas negras (*Ixodes scapularis*), en la que la espiroqueta es capaz incluso de persistir de un estadio a otro⁽¹⁷⁾. Existen reportes de la enfermedad de Lyme en perros que tienen sintomatología clínica y serología positiva a Lyme, pero al momento de realizar el diagnóstico por PCR, los resultados son menores a los esperados, debido a los inhibidores de la sangre⁽¹⁴⁾. En Mexicali, México se ha identificado anticuerpos en perros de *B. burgdorferi* con una seroprevalencia del 12% en la región y la especie de garrapata identificada taxonómicamente en perros es *R*

sanguineus⁽²⁴⁾. Cabe mencionar que *Rhipicephalus spp*, se asocia principalmente a *Borrelia theileri*, agente causal de la borreliosis bovina y equina, especie que no se localizan dentro del complejo *B. burgdorferi sensu lato*⁽³⁾, por lo cual también alojaron resultados negativos.

En conclusión, este estudio determinó que la especie de garrapata más abundante en el área metropolitana es *R. sanguineus*, la cual fue negativa a la enfermedad de Lyme. Es importante determinar los diferentes factores epidemiológicos de la infestación por garrapatas (Acari: Ixodidae). En México se le ha tomado importancia desde el primer reporte de Salinas-Meléndez en 1992, hasta los posteriores estudios^(9,7) debido a que se considera un problema tanto de la entomología médica como de medicina general, por lo cual en el próximamente se planea realizar programas de vigilancia epidemiológica a vectores, reservorios y pacientes que podrían verse afectados por picaduras de garrapatas o por la transmisión de rickettsiosis, tomando en cuenta que los perros son las mascotas preferidas de los humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Amerasinghe FP, Breish WL, Azad AF, Gimpel WF, Grep M, Weidhart K., Pagac B, Piesman J, Sandt J, Scott TW, Sweeney K 1992 Distribution, density and Lyme disease spirochete infection in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) on white tailed deer in Maryland. *J. Med. Entomol.* 29:54-61
2. Arong GA, Shitta K B, James-Rugu NN, Effanga EO 2011 Seasonal variation in the abundance and distribution of ixodid ticks on mongrel, Alsatian, and mixed breeds of dogs (*Canis familiaris*) In Jos, In Plateau state, North-central Nigeria. *World J Sci Technol.* 1(4): 24-29.
3. Barbour, Alan G.; Gary O. Maupin & Glenna J. Teltow. 1996. Identification of an Uncultivable *Borrelia* species in the Hard Tick *Amblyomma americanum*: Possible Agent of a Lyme Disease- like Illness. *J Infect Dis.* 173:403-9

4. Cabrera OL, Munstermann LE, Cárdenas R, Gutiérrez R, Ferro C. 2002. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. *Biomédica*. 22:3: 296-302.
5. Chien-Ming S, and Chao LL. 2002. An *OspA*-based genospecies identification of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) isolated in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*. 66:5:611-615.
6. Falco RC, Durland F and Piesman J. 1996. Duration of Tick Bites in a Lyme Disease-endemic Area. *Am. J. Epidemiol*. 143:187- 192.
7. Galaviz-Silva L, Perez-Treviño K, Molina Garza ZJ. 2013. Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo León, Mexico, and their association with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Exp Appl Acarol*. DOI 10.1007/s10493-013-9707-5.
8. Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F, Garduno-Bautista V. 2003. Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the Northeast of the Mexican Republic. *Salud Pública Mex*. 45:351-5.
9. Gordillo-Pérez G; Vargas M, Solórzano-Santos F, A Rivera A, Polanco OJ, Alvarado L, Muñoz O, J Torres J. 2009. Demonstration of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* infection in ticks from the northeast of Mexico. *Clin Microbiol Infect*.5:496-498.
10. Guerrero-Rodríguez E, Lozoya-Saldaña A, Landeros-Flores J. 1986. Garrapatas, garrapatas de animales domesticos en el área de influencia de la UAAAN. Universidad Autonoma Agraria "Antonio Narro". Saltillo, Coahuila. Vol 1. No 4.
11. Guglielmone A and Nava S. 2005. Las garrapatas de la familia Argasidae y de los géneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Ixodidae) de la Argentina: Distribución y Hospederos. *RIA* 34:123-141.
12. Hanifeh M, Malmasi A, Virtala A.-MK, Nikbakht-Brujeni GR, Zahraei Salehi T, Rahbari S. 2012. Seroprevalence, geographic distribution and risk factor analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in naturally exposed dogs of Iran. *Afr J Microbiol Res*. 6: 5353-5361.
13. Johnson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwalt and D. J. Brenner. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *Int. J. System. Bacteriol*. 34:496-497.
14. Malloy DC, Nauman RK and Paxton H. 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J Clinical Microbiol*. 28:1089-1093
15. Márquez-Jiménez F, Hidalgo-Pontiveros A, Contreras-Chova F, Rodríguez-Liébano JL, Muniain-Ezcurra MA. 2005. Las garrapatas (Acarina:Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enf Infecc Microbiol Clin* 23:94-102
16. Murrell A and Barker SC. 2003 Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*. 56:169-172.
17. Ornistein K, Berglund J, Bergström S, Ragnar Norrby R, G. Barbour A. 2002. Three Major Lyme *Borrelia* Genospecies (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified by PCR un Cerebrospinal Fluid from Patients with Neuroborreliosis in Sweden. *Scand J Infect*. 3:341 – 346.
18. Pagano RR. 1999. Estadística para las ciencias del comportamiento. International Thomson Editores, S.A. de C.V. Quinta edición. México. pp 61-80.
19. Ramírez-Barrios RA, Chacín E, Barboza G, Fernández G, Valera Z, Villalobos A, Angulo-Cubillán F. 2008. Garrapatas (Acari: Ixodidae) recolectadas de caninos bajo asistencia veterinaria en Maracaibo Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVIII, 267 – 270*.
20. Salinas-Meléndez, JA, Galván de la Garza S, Rojas-Valdés VM, Wong González A, Avalos-Ramírez R. 2001. Antibodies detection against *Borrelia burgdorferi* in horses located in the suburban ares of Monterrey, Nuevo León. *Rev Latinoam Microbiol*. 3:161-164.

21. Shaw MT, Keesing F, McGrail R and Ostfeld R. 2003. Factors influencing the distribution of larval blacklegged ticks on rodent hosts. *Am J Trop. Med Hyg.* 68:447–452.

22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1988. Molecular cloning A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

23. Talleklint L and Jaenson TGT. 1998. 1998. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* in central and northern Sweden. *J Med Entomol.* 35:521-526.

24. Tinoco-García L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martínez MT, Rentería-Evangelista TB, Barreras-Serrano A, Hori-Oshima S, López-Valencia G, Tamayo-Sosa AR, Medina-Basulto G, Haro-Alvarez P, Moro M, Vinasco J. 2009. Prevalence and risk factors for *Borrelia burgdorferi* infection in dogs of animal control centers from Mexicali, Baja California: A Mexico-US Border City. *J Anim Vet Adv* .8(2): 251-254.