

11282
2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y PARASITARIAS
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI

CONFIRMACION EPIDEMIOLOGICA DE
ENFERMEDAD DE LYME EN PACIENTES Y
BUSQUEDA DE *B. burgdorferi* EN EL VECTOR, EN LA
REPUBLICA MEXICANA.

EVIDENCIAS CLINICAS, SEROLOGICAS Y ENZOOTICAS DE
ENFERMEDADES DE LYME EN MEXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A :
DRA. MARIA GUADALUPE GORDILLO PEREZ

0275796

COMITE TUTORAL: DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS*
DR. JAVIER TORRES LOPEZ**
DR. ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ***

- *JEFE DEL SERVICIO DE INFECTOLOGIA, HOSPITAL DE PEDIATRIA.
- **JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS, HOSPITAL DE PEDIATRIA, CMN SXXI.
- ***COORDINADOR NACIONAL DE INVESTIGACION DEL IMSS.



MEXICO, D. F.,

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



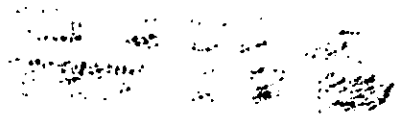
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS



A mi hijo

**Quien me ha inspirado para seguir
estudiando y poder aportar algo
de conocimiento para mis pacientes.**

A mis padres

**Mi madre quien ha sido mi apoyo
Incondicional en los momentos más difíciles
de mi carrera profesional y personal.
Mi padre que aún cuando no está
Con nosotros, siempre está en mi
memoria alentándome para que
 siga adelante.**

A mi esposo

**Con quien he compartido varios años de carrera
Profesional y personal..**

A mis hermanos.

**Quienes aún lejos físicamente
siempre me han apoyado emocionalmente
en todo momento.**

A todos mis maestros en especial:

**Dr. Fortino Solórzano Santos
Dr. Javier Torres López
Dr. Juan Garduño**

**Quienes han puesto su confianza en mí, para
el desarrollo de éste proyecto y me han guiado
para lograr escalar un peldaño más de ésta
difícil pero apasionante carrera**

**A todos mis compañeros de la Maestría
y en especial amis amigas:**

**Dra. Gabriela Borrayo
Dra. Irma Isordia
Dra. Martha Hernández**

**Con quienes compartí momentos de tensión y tristeza.
Después de éstos años ver la alegría y satisfacción de cada uno de
nosotros al lograr uno de los objetivos más importantes de
nuestra carrera profesional.**

Confirmación epidemiológica de Enfermedad de Lyme en pacientes y búsqueda de *Borrelia burgdorferi* en el vector, en la República Mexicana.

ANTECEDENTES: *Borrelia burgdorferi* es el agente etiológico de la Enfermedad de Lyme, es transmitida por la picadura de una garrapata del género *Ixodes*. En México existen los reservorios naturales y el vector en la zona Norte y Golfo de México. A principios de 1990 se reportaron 3 casos sospechosos de enfermedad de Lyme. En 1996 se reportó una seroprevalencia del 1.1% contra *B. Burgdorferi*, localizándose la mayoría de los casos en la zona Noreste y Centro del país. La OMS define un país como endémico de Enfermedad de Lyme si tiene mínimo 2 casos con cuadro clínico, confirmados por estudios serológicos (ELISA e Inmunotransferencia) y/o cultivo; ó si se encuentra la garrapata (vector) infectada con *B. burgdorferi*.

OBJETIVO GENERAL: Determinar si la enfermedad de Lyme es endémica en la República Mexicana.

MATERIAL Y METODOS: ESTUDIO TRANSVERSAL DESCRIPTIVO. Se estudiaron todos los pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de Borreliosis de Lyme consecutivos, atendidos en Centro Medico SXXI y La Raza, del IMSS. El estudio se realizó de agosto 1997 a Septiembre 1998. **Garrapatas:** Se estudiaron aquellas colectadas en 1990-1991 y las colectadas de vegetación y huéspedes en agosto 1997 y agosto de 1998, de la Zona Noreste de México y que fueran clasificadas como género *Ixodes*. Todas las garrapatas se clasificaron hasta especie y se realizó PCR, de garrapatas vivas se cultivó el tubo digestivo.

Etapa clínica. Definición de caso: Paciente con cuadro clínico sugestivo y estudios serológicos de ELISA e inmunotransferencia y/o PCR ó cultivo para *B. burgdorferi* positivo. A los casos sospechosos se les realizó estudios serológicos de ELISA e Inmunotransferencia; así como biopsia de piel (casos cutáneos) ó toma de LCR (casos neurológicos). Las muestras se procesaron para cultivo ó PCR. El tamaño muestral calculado fué de 196 garrapatas y 45 casos.

RESULTADOS: **Casos cutáneos:** 20 pacientes de 4 a 18 años de edad con manifestaciones cutáneas clasificadas como: eritema migrans, 1; ACA, 8; esclerodermia localizada en golpe de sable, 5; atrofia hemifacial, 2; morfea, 4; y esclerodermia sistémica, 1. Edad promedio de 10.3 años, relación M:F 1:2.6. El 75% (15) de los pacientes con manifestación cutánea tuvieron pruebas de ELISA e inmuno dot-blot ó Western blot positivas; Seropositividad del 100% en casos con ACA y 73% en aquellos con escleroderma. Un caso con EM fué seropositivo. Las biopsias de piel de casos cutáneos mostraron epidermis adelgazada, anexos atróficos, infiltrado linfocitario perivascular y perianexial moderado. Fué mayor en biopsias con menos tiempo de evolución. En 10 biopsias se observaron estructuras bacterianas de forma espiral por tinción de Wharthin -Starry (WS). Un caso con diagnóstico de ACA seronegativo, fué positivo por tinción de WS en la biopsia. Todas las biopsias fueron negativas por cultivo. Un caso con ACA fué positivo por PCR.

Casos neurológicos: Se estudiaron 31 pacientes con manifestaciones neurológicas (meningoradiculoneuritis, neuritis craneal y encefalomielitis), pero se eliminaron a 16 pacientes al confirmarse otros diagnósticos. De los 15 pacientes con criterios clínicos de la enfermedad, 10 (66%) fueron seropositivos, con un intervalo de edad de 12 a 58 años, mediana de 42 años; predominio del sexo masculino 2:1. Se realizó PCR en LCR de 8 casos y 2 (25%) fueron positivos. **Estudio de garrapatas:** Se obtuvieron 203 garrapatas del género *Ixodes* procedentes de vegetación y roedores (*Peromyscus leucopus* y *Liomis*). Las garrapatas vivas (42) se procesaron para cultivo y fueron negativas. Se hizo extracción de DNA de 203 garrapatas y sólo en 42 especímenes la extracción fué adecuada, con la PCR negativa.

CONCLUSIONES: El diagnóstico clínico de los pacientes estudiados, los estudios serológicos, histológicos y moleculares positivos para *B. burgdorferi* sugieren que México es un país endémico donde la Enfermedad de Lyme es endémica de acuerdo a los criterios de la OMS. Además la presencia de el roedor (*Peromyscus leucopus*) infestado con la garrapata del género *Ixodes*, sugiere que el ciclo enzoótico puede mantenerse en la zona Noreste de México.

ABSTRACT

Clinical, serological and molecular data suggest that Lyme disease is endemic in Mexico.

Background: Lyme disease is a multisystemic disorder caused by *Borrelia burgdorferi*. The infection is the commonest of the tick-borne diseases in USA. Ticks of the genus *Ixodes* are the vector and small and median size mammals are the reservoirs. *Ixodes* ticks and potential reservoirs exist in the North-east and centrum of Mexico. Besides, Mexico shares a large border region with USA, and there is a strong migration of humans and animals. Cases suggestive of Lyme disease have been reported in Sinaloa and Nuevo Leon, although diagnosis was incomplete. Recently, we performed a National serosurvey and found a seroprevalence of 1.1%, with most cases occurring in the North-East and center of Mexico. **The aim** of this work was to search for evidence of *B. burgdorferi* infection in ticks and patients in Mexico. **MATERIAL AND METHODS:** Cross sectional study. *Ticks study.* Phase I. We studied patients with clinical manifestations suggestive of Lyme disease, attended in two hospitals in Mexico city, during August 1997 to September 1998. Phase II. We studied museum *Ixodes* ticks collected during 1990-1991, and ticks collected from reservoirs and from grass during August 1997 and August 1998, in the Northeast states. *Clinical study.* Case definition: Patients with clinical manifestations suggestive of Lyme and with positive serological studies (ELISA and WB) and/or positive for *B. burgdorferi* by culture or PCR. **RESULTS:** We studied 51 patients, 20 with cutaneous manifestations (mean age of 10.3 years) and 31 with neurologic manifestations (mean age 42 years). The patients with late cutaneous manifestations suffered from: *erythema migrans*, ACA or localized scleroderma. A positive ELISA and WB test was documented on 75% of patients (15) with cutaneous manifestations and in 66% of patients (10) with neurological manifestations. In the cutaneous cases the skin biopsies presented atrophic epidermis and perivascular lymphocytic inflammatory infiltrative. Ten skin biopsies stained with Whartin-Starry had bacterial with spiral structure. All biopsies were negative by culture. The PCR test with *fla* gene was positive in the skin biopsy from one case with ACA and in the CSF from two neurological cases. Forty-two *Ixodes* ticks were studied and all were negative by culture and PCR. **CONCLUSIONS:** We confirmed the presence of *B. burgdorferi* infection in Mexican patients with clinical manifestations suggestive of cutaneous and neurologic Lyme disease by serological and PCR tests. These results fulfill the criteria by the WHO to consider an endemic country for Lyme disease. Further studies are needed to confirm *B. burgdorferi* infection in ticks and to culture the bacteria from patients.

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
i RESUMEN	I
ii ABSTRACT	II
1. ANTECEDENTES	
1.1 Datos Generales	3
1.2 Manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme	5
1.3 Métodos de diagnóstico	7
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. DISEÑO DEL ESTUDIO	14
5. UNIVERSO DE TRABAJO	15
6. DEFINICION DE LA MUESTRA	15
7. CRITERIOS DE SELECCION	15
7.1 Criterios de inclusión	
7.2 Criterios de no inclusión	
7.3 Criterios de exclusión	
8. METODOLOGIA	
8.1 Descripción General del Estudio	17
8.2 Análisis estadístico	22
9. RESULTADOS	23
10. DISCUSION	26
11. CONCLUSIONES	29
12. TABLAS	
TABLA 1 Características clínicas y demográficas de pacientes pediátricos con manifestaciones cutáneas sugestivas de Enfermedad de Lyme.	30
TABLA 2 Características clínicas y demográficas de pacientes con manifestaciones Neurológicas sugestivas de Enfermedad de Lyme.	31
TABLA 3 Frecuencia de seropositividad (inmunotransferencia) ha anticuerpos Contra <i>B. burgdorferi</i> en pacientes pediátricos con manifestaciones Cutáneas sugestivas de Enfermedad de Lyme.	32

TABLA 4	Respuesta a proteínas específicas de <i>B. burgdorferi</i> por inmunodot blot .	33
TABLA 5	Características de las garrapatas colectadas en la zona Noreste de la República Mexicana.	34
13. ANEXOS:		
ANEXO 1	Cuestionario de Notificación de Caso Lyme	35
ANEXO 2	Carta de consentimiento informado	39
ANEXO 3	Estandarización de la técnica de ELISA para IgG vs <i>B. burgdorferi</i>	40
ANEXO 4	Técnica de Extracción de DNA de biopsias de piel	41
ANEXO 5	Técnica para procesamiento de garrapatas	42
ANEXO 6	Técnica de PCR para <i>B. burgdorferi</i> en garrapatas conservadas en Etanol.	45
ANEXO 7	Técnica de electroforesis de los productos de PCR	47
ANEXO 8	Técnica de Southern blot para el Gen flagelar y Osp A de <i>B. Burgdorferi</i>	48
14. FIGURAS		
FIGURA 1	Ciclo de Vida de la garrapata del género <i>Ixodes</i>	50
FIGURA 2	Estructura de la garrapata del género <i>Ixodes</i>	51
FIGURA 3	Manifestación temprana de Enfermedad de Lyme (<i>eritema migrans</i>) en un paciente pediátrico.	52
FIGURA 4	Manifestación cutánea tardía de enfermedad de Lyme (<i>acrodermatitis crónica atroficans</i>).	53
FIGURA 5	Corte de biopsia de piel de paciente con manifestación temprana teñido con hematoxilina-eosina.	54
FIGURA 6	Corte de biopsia de piel de paciente con manifestación tardía	55
FIGURA 7	Tinción de Plata (Whartin-Starry), espiroquetas en biopsia de piel	56
FIGURA 8	PCR para el gen de <i>B-globulina</i> en biopsias de piel conservadas en etanol y parafina.	57
FIGURA 9	PCR para el gen flagelar 290-545 de <i>B. burgdorferi</i> en LCR.	58
FIGURA 10	PCR para el gen flagelar de <i>B. burgdorferi</i> en tejido de garrapatas	59
FIGURA 11	Southern-blot del gen Osp A (149-319) de <i>B. burgdorferi</i>	60

BIBLIOGRAFIA		61
--------------	--	----

AGRADECIMIENTOS.

Este proyecto fué financiado parcialmente por la Coordinación de Investigación del IMSS. No. de proyecto 0038/356.

Alumno becado por CONACyT, No. becario 116518.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Lyme fué descrita en Lyme, Connecticut en 1975, y a finales de los 70's Allen C. Steere y Stephen E. Malawista de Yale describieron que el microorganismo era transmitido por al menos una especie de garrapatas (*Ixodes scapularis*). En 1982 Willy Burgdorfer identificó el microorganismo (1,2).

El agente etiológico es una espiroqueta que se le denominó *Borrelia burgdorferi*; y se caracteriza por ser un microorganismo móvil, microaerofílico, que mide 5 a 25 μm de largo y 0.2 a 0.5 μm de ancho. Está cubierto por una membrana externa y posee un flagelo subterminal. Se diferencia de otras bacterias y espiroquetas por su estructura genómica conformada por un cromosoma lineal y numerosos plásmidos lineales y circulares (3). Se han identificado 3 genoespecies de la especie *B. burgdorferi*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* y *B. afzelii* que se han asociado a diferentes manifestaciones clínicas en Estados Unidos y Europa (Tabla 1) (4).

Las garrapatas son consideradas los vectores competentes para *Borrelia*. Se han reportado 4 especies competentes, *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus* en Europa e *Ixodes pacificus* e *Ixodes scapularis* en Norteamérica (5). La garrapata se alimenta en los primeros 2 estadios de su desarrollo de roedores de los géneros *Peromyscus* y *Apodemus* que son los principales reservorios en Norteamérica y Europa respectivamente. Cuando éstos roedores están infectados, pueden infectar hasta el 100% de las ninfas (5). En estadio adulto se alimenta de grandes mamíferos como animales salvajes y domésticos (venados, caballos, ganado bovino, mapaches, zorros, etc.) así como de 8 géneros de aves (8-10).

La proporción de garrapatas infectadas por *B. burgdorferi* es diferente de acuerdo a su distribución geográfica y estadio de evolución. En el estado de Nueva York las formas inmaduras (larva y ninfa) de la especie *I. scapularis* se han encontrado infectadas en 20 a 30%. La ninfa es la responsable de aproximadamente el 90% de los casos de infección (7). La proporción de infección por *B. burgdorferi* se incrementa en el estadio adulto hasta el 50 a 65%. En contraste, en el Estado de California sólo el 1 a 3% de las especies *I. pacificus* e *I. scapularis* están infectadas. Esta diferencia es atribuida a la alimentación de las garrapatas inmaduras en lagartijas, las cuales son huéspedes que no se infectan y son incompetentes para transmitir la infección a garrapatas (7,8).

El venado es el responsable del mantenimiento de poblaciones de garrapatas en el ambiente, aunque son incapaces de infectarlas con *B. burgdorferi* (10). El paso de espiroquetas de una generación a la siguiente a través de huéspedes reservorios constituye el ciclo enzoótico de enfermedad de Lyme (Fig 1) (8,9).

La enfermedad de Lyme como manifestación articular ocurre en vacas y perros, pero se desconoce en animales salvajes (8). En humanos la enfermedad de Lyme se ha reportado en todos los países Europeos, algunos de Asia y en 40 estados de la Unión Americana. En Australia y en Sudamérica (Chile y Brasil) han reportado una enfermedad similar a Borreliosis de Lyme, sin que se haya logrado aislar *B. burgdorferi* de garrapatas, fauna ó de pacientes (5,11).

En los países Europeos la enfermedad de Lyme está distribuida de forma endémica, con una prevalencia del 8% a 27% en trabajadores forestales de Alemania y Suecia (12,13), y en 4% de la población general (12); y en 1 a 7% de población abierta de Londres y Southampton Inglaterra (14). En Estados Unidos de Norteamérica ha sido confinada a 3 áreas enzoóticas (Costa Noreste, medio Oeste y California) donde la prevalencia varía de 1 a 10%. En los últimos años los casos se han incrementado y la infección se ha diseminado a nuevas áreas (15,16).

El espectro de la Borreliosis de Lyme es amplia desde infección asintomática en población en riesgo donde es del 8.1% hasta una gama amplia de manifestaciones clínicas que se han dividido en 3 estadios (12,22):

I.- La forma localizada en piel .

II- La forma diseminada sistémica.

III- La forma crónica.

El primer estadio de la enfermedad ocurre pocas semanas después de la infección y se manifiesta como eritema migrans que se presenta en el 60 a 80% de los casos como signo inicial. Es una lesión circular papular eritematosa con diseminación centrífuga que puede desarrollarse de 3 días a 16 semanas (promedio 1.5 semanas) después de una picadura por garrapata y se resuelve espontáneamente en pocas semanas ó meses.

El segundo estadio se desarrolla meses después con afección de varios órganos ó sistemas, probablemente por diseminación hematogena y se manifiesta como (22):

El **segundo estadio** se desarrolla meses después con afección de varios órganos ó sistemas, probablemente por diseminación hematogena y se manifiesta como (22):

A) Neuroborreliosis de Lyme: meningoradiculoneuritis (Síndrome de Bannwarth) ó meningitis linfocítica, neuritis craneal de plexos principalmente VII , IV y V y ocasionalmente de III y VI ó mononeuritis múltiple. En Estados Unidos de Norteamérica (EUA) la neuroborreliosis se presenta en el 1% de la población pediátrica infectada y en el 7% de adultos infectados, lo que contrasta con Europa donde la neuroborreliosis ocurre en el 25% de los pacientes infectados. Otras formas que se presentan raramente son la encefalitis, mielitis y vasculitis cerebral (25-27).

B) Manifestaciones cardiacas: En el 0.5% de la población infectada se presenta bloqueo atrioventricular de 2do y 3er grado, miopericarditis y falla cardíaca, comúnmente transitorias (28).

C) Artritis y miositis pueden observarse en los primeros meses de la enfermedad en aproximadamente el 7% de pacientes infectados menores de 15 años en EUA. También puede presentarse linfadenopatía regional y generalizada (29).

D) Alteraciones oculares: Conjuntivitis, iridociclitis, coroiditis, neuropatía óptica con papiledema, panoftalmitis (27,29).

E) El linfocitoma borrelial que es un tumor rojo en el lóbulo de la oreja con proliferación linforeticular.

F) La hepatitis y edema testicular se presenta en casos raros.

El estadio 3: Es la forma crónica donde se afectan progresivamente la piel con acrodermatitis crónica atrófica. También puede presentarse encefalitis o encefalomiélitis y artritis oligoarticular de grandes articulaciones. Esta forma es evidente desde 6 meses o hasta años después de la infección, en cerca del 60% de los pacientes no tratados cuando cursan con eritema migratorio (23).

B. burgdorferi ha sido implicada en el desarrollo de algunas formas de esclerodermia localizada y liquen escleroatrófico (LEA). La primera se le clasifica por la forma y zona afectada en: esclerodermia lineal (en golpe de sable ó en extremidades), segmentaria (atrófia hemifacial), y en placas (Tabla 2).

La etiología de la esclerodermia era considerada desconocida , sin embargo se observaron en estudios histológicos características similares a las encontradas en ACA. A partir de entonces se ha demostrado la presencia de la bacteria en estudios histológicas y PCR, así como respuesta serológica, aunque los resultados han sido contradictorios. Recientemente, esta forma se ha sido asociada a la geno especie *Borrelia afzelii* (Tabla 1 y 2) (24).

TABLA 1

Distribución geográfica de geno especies de *Borrelia burgdorferi* y manifestación clínica asociada.

ESPECIES	AREA GEOGRAFICA	PRESENTACION CLINICA
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	EUA > EUROPA	ARTRITIS> NEUROBORRELIOSIS
<i>B. garinii</i>	EUROPA > ASIA	NEUROBORRELIOSIS
<i>B. afzelii</i>	EUROPA > ASIA	ACA*
<i>B. japonica</i>	JAPON	E.M.**
<i>B. andersoni</i>	EUA	NINGUNA
Grupos genómicos		
VS16-potiB2	EUA	EM

> más frecuente que

*Acrodermatitis crónica atrófica

** Eritema migratorio

TABLA No. 2

Frecuencia de asociación entre infección por *Borrelia burgdorferi* y manifestaciones cutáneas sugestivas de Enfermedad de Lyme.

DIAGNOSTICO	País (Ref)	SEROLOGIA	CULTIVO	PCR
		ELISA		
Eritema migrans	EUA (41,)	50%	50%	75%
	Suiza (30)	22%	70%	--
ACA	Suiza (30)	100%	10%	--
	EUA (41)	--	--	70%
Linfocitoma cutis	Suiza (30)	45%	—	—
		—	—	—
Esclerodermia	Suiza (30)	30%	—	—
		—	—	—
Localizada	Japón (43)	—	—	90%
	USA (44)	—	0%	0%

El diagnóstico de la enfermedad ha sido problemático especialmente en el estadio temprano (Tabla 2).

Diversos factores dificultan la interpretación de estudios serológicos (ELISA e inmunotransferencia de proteínas) e inmunohistoquímica (IFA):

- 1) El resultado es dependiente del estadio clínico de la enfermedad. En el estadio temprano los resultados serológicos por ELISA son negativos ó la respuesta puede limitarse sólo a los polipéptidos más inmunogénicos (29-32).
- 2) Su interpretación es complicada por la reactividad cruzada con otras espiroquetas como *Treponema pallidum*, *T. denticola*, *T. phagedenis* y *Borrelia sp* (*B. hermsii* y *B. recurrentis*), así como en enfermedades autoinmunes como mononucleosis infecciosa y fiebre de las montañas rocosas (30,33,34).
- 3) Hay variabilidad de la respuesta inmune en diferentes pacientes (30,31).

4) El tratamiento temprano con antibióticos puede abortar una respuesta inmune y dar resultados falsos negativos (30).

5) Hay variabilidad antigénica entre las diferentes genoespecies y cepas de *B. burgdorferi* a nivel mundial, lo que modifica la respuesta en los diferentes estudios inmunológicos (32-34).

Para disminuir la reactividad cruzada en ensayos de IFA y ELISA se ha incrementado el valor de corte a 1:256 (28) para IFA y mayor a 1:320 para ELISA en el que se ha logrado una sensibilidad de 92% y una especificidad del 80% (31). Para estudiar resultados de casos dudosos se realizan estudios de VDRL para los que *B. burgdorferi* no es reactiva (29). Para evitar reacción cruzada con espiroquetas periodontales se sugiere adsorción de sueros con *T. phagedenis* y *T. denticola* y el uso de antígenos recombinantes de *B. burgdorferi* (35,37). Para confirmar un caso positivo después del estudio de ELISA con antígeno de extracto total, se realiza inmunotransferencia para reconocer la respuesta a ciertas proteínas. Con esto se incrementa la especificidad a más del 95% (32). Por lo que actualmente el criterio diagnóstico para estudios serológicos es con un ensayo de escrutinio como ELISA y confirmatorio con inmunotransferencia.

El cultivo de la bacteria en tejidos y líquidos corporales es difícil, lento y con una sensibilidad menor al 15%.

La introducción de técnicas de biología molecular para detectar DNA de *B. burgdorferi* bajo condiciones experimentales es muy sensible; sin embargo su aplicación con especímenes clínicos ha presentado problemas por el tipo de espécimen (tejido ó líquido corporal) y método de conservación de las muestras. En EM la sensibilidad varía de 80% en biopsias de piel a 30% en muestras de orina. En biopsias de piel de casos con EM conservadas a -70 oC la sensibilidad es de 87% mientras que en biopsias conservadas en parafina la sensibilidad es de 50%. Otro factor que influye en la aplicación del PCR es que actualmente no hay un acuerdo en la selección de genes iniciadores de *B. burgdorferi*. Esto es debido a la variación genética de subespecies de *B. burgdorferi* que dificultan la selección de secuencias consenso que puedan funcionar como iniciadores para detectar todas las subespecies patógenas (41). Los iniciadores para los genes flagelar y 16S RNA que están localizados en el cromosoma y Osp A que se encuentra en un plásmido de 49 kb de la espiroqueta son los más aceptados.

En la infección temprana, en lesiones de EM, la PCR tiene hasta un 87% de sensibilidad siendo más sensible que la serología y el cultivo (41). La PCR es el método diagnóstico con mayor sensibilidad en neuroborreliosis temprana seronegativa, borreliosis ocular, en recién nacidos de madres que presentaron Borreliosis de Lyme activa durante su embarazo y en infecciones coexistentes con *Babesia*, *Ehrlichia* y *B. burgdorferi* (40). También se ha utilizado para diagnosticar la infección en el vector, con una sensibilidad de 72%, semejante al de la inmunofluorescencia directa (35-37).

En México se han reportado algunos casos clínicos sugestivos de enfermedad de Lyme. En 1991 en la Cd. de Culiacán, Sinaloa se reportaron 20 casos de pacientes con eritema crónico migratorio asociado a artritis. En un caso se observó una "espiroqueta" en biopsia de piel y la serología por ELISA fué positiva, los 19 restantes fueron seronegativos, sin embargo en todos los pacientes hubo mejoría clínica posterior al tratamiento único o combinado con tetraciclina y penicilina (18). En 1994 en la Cd. de Monterrey, Nuevo León se reportaron 2 casos con manifestaciones de artritis sugestivos de enfermedad de Lyme. Los dos casos fueron positivos para IgM e IgG anti-*B. burgdorferi* por ELISA; en ambos reportes los estudios de ELISA se realizaron en el CDC en Atlanta, Georgia (18). En ninguno de éstos casos se realizó el estudio confirmatorio con inmunotransferencia.

En 1996 se estudió una submuestra de sueros representativa del país obtenidos como parte de la Encuesta Seroepidemiológica Nacional realizada en 1988 (19). En el estudio se determinaron anticuerpos IgG contra *B. burgdorferi* por el método de ELISA y se obtuvo una prevalencia del 1.1%. De los sueros positivos por ELISA, 30% fueron confirmados por inmunotransferencia. Lo que resultó en una seroprevalencia confirmada de 0.3%. Los sueros positivos confirmados fueron de habitantes de la zona Noreste (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz) y Centro-Occidente (Distrito Federal y Jalisco) del país (20).

Los vectores y los reservorios de *Borrelia* también se encuentran distribuidos en la República Mexicana. Se ha documentado la presencia de las garrapatas *Ixodes pacificus* e *Ixodes scapularis* en los estados de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Jalisco, Hidalgo, Veracruz, Campeche y Quintana Roo (6). En cuanto a la presencia de reservorios potenciales en México se ha descrito la presencia de *Odocoileus virginianus* y *Peromyscus leucopus* que pueden hospedar a la garrapata del

género *Ixodes*. *O. virginianus* se encuentra distribuido en los estados de Durango, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Estado de México y Morelos. *Peromyscus leucopus* se ha encontrado en Durango, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Puebla. Se ha encontrado el género *Peromyscus sp.* en el Distrito Federal, Morelos y Querétaro (17).

Según la Organización Mundial de la Salud para considerarse un país como endémico de Enfermedad de Lyme se requiere de la identificación de por lo menos 2 casos con cuadro clínico, que son confirmados por estudios serológicos (ELISA e Inmunotransferencia) y/o cultivo, o un país en el cual existe la garrapata como vector y se ha demostrado que está infectada con *B. burgdorferi* (9,21).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La enfermedad de Lyme representa más del 90% de las infecciones transmitidas por artrópodos en los Estados Unidos de Norteamérica y Europa. En Sudamérica y México existen reportes de casos sospechosos de la enfermedad sin que se haya confirmado la infección. Nuestro país comparte con Estados Unidos de Norteamérica frontera geográfica, intercambio comercial de insumos, migración de habitantes y aves (reservorios de garrapatas del género *Ixodes*).

Desde 1991 se han reportado casos sospechosos de Borreliosis de Lyme en los estados de Sinaloa y Nuevo León, que fueron diagnosticados con pruebas de escrutinio como ELISA. De la Encuesta Seroepidemiológica Nacional de 1988 encontramos por la técnica de ELISA una seroprevalencia contra *Borrelia burgdorferi* de 1.1%, y se confirmó por inmunotransferencia en un 0.3% de la población estudiada. Los casos positivos provenían de las zonas Noreste y Centro-Occidente del país. También se ha documentado la presencia de los reservorios y los vectores conocidos como transmisores de la bacteria en la zona Norte, Noreste y Golfo de México.

Es interesante hacer notar que los primeros casos clínicos sugestivos de Enfermedad de Lyme, la presencia del vector, los reservorios y los casos seropositivos en la encuesta nacional, todos ocurren en las mismas zonas del país.

Por lo anterior, consideramos necesario hacer diagnóstico serológico, microbiológico y molecular de infección por *B. burgdorferi* en pacientes de México con sospecha clínica de enfermedad de Lyme así como buscar la presencia de *B. burgdorferi* en garrapata, de las zonas donde encontramos mayor seroprevalencia para determinar si México puede ser considerado un país endémico, de acuerdo a los criterios de la OMS.

PROBLEMA GENERAL:

1.- ¿Tiene la República Mexicana pacientes con Enfermedad de Lyme y/o garrapatas infectadas con *Borrelia burgdorferi*?

PROBLEMAS ESPECIFICOS:

1.- ¿ Hay pacientes con enfermedad de Lyme en la República Mexicana?

2- ¿ Están infestados con garrapatas del género *Ixodes* los roedores del género *Peromyscus* de la zona Noreste del país?

3.-¿ Las garrapatas del género *Ixodes* que infestan a roedores ó están en vegetación en la zona Noreste del país, están infectadas con *B. burgdorferi*?

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si la enfermedad de Lyme es endémica en la República Mexicana en base a los criterios de la OMS.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Realizar el diagnóstico serológico , microbiológico y molecular de *Borrelia burgdorferi* en casos sugestivos de enfermedad de Lyme en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social .
2. Identificar roedores del género *Peromyscus* infestados con garrapatas del género *Ixodes* en la zona Noreste de la República Mexicana.
3. Determinar por PCR y cultivo la presencia de *B.burgdorferi* en las garrapatas del género *Ixodes* colectadas en la zona Noreste de la República Mexicana.

SUJETOS, MATERIAL Y METODOS:

1. LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO:

Este estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias , Hospital de Pediatría; CMN SXXI. Del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El proyecto fué aprobado por el comité de Investigación y Ética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI.

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.

TIPO DE ESTUDIO

Para los objetivos específicos 1 y 2.

- | | |
|--|----------------|
| a) Por el control de la maniobra experimental por el investigador. | Observacional. |
| b) Por la captación de la información. | Prolectivo. |
| c) Por la medición del fenómeno en el tiempo. | Transversal |
| d) Por la ausencia de un grupo control | Descriptivo |
| e) Por la dirección del análisis. | Sin dirección |
| f) Por la ceguedad en la aplicación y evaluación de maniobras. | Ciego |

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio transversal descriptivo.

3. DISEÑO DE LA MUESTRA.

3.1 Población de estudio: Pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de Borreliosis de Lyme en sus 3 etapas de evolución (temprana, diseminada y tardía) que fueron atendidos en los Hospitales de Especialidades del Centro Médico La Raza y El Hospital de Pediatría, del Centro Médico Nacional SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Ciudad de México.

3.2 Para la etapa en garrapatas: Todas las garrapatas del género *Ixodes* colectadas de la zona Noreste del país.

3.3 Muestra: Se tomaron a todos los paciente con manifestaciones sugestivas de enfermedad de Lyme y consecutivos de la población de estudio (muestreo no aleatorio) en el periodo comprendido de Agosto de 1997 a Septiembre de 1998.

Para la etapa realizada en garrapatas: Se estudiaron a todas las garrapatas del género *Ixodes* colectadas de la Zona Noreste en el período 1990-1991, de la colección de garrapatas de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Además aquellas colectadas en vegetación, roedores y mamíferos medianos durante el período comprendido de Octubre de 1997 a Agosto de 1998.

3.4 Criterios de selección:

Estudio de pacientes: Se incluyeron todos los pacientes mayores de 5 años de edad con cuadro clínico sugestivo de Borreliosis de Lyme, del sexo masculino ó femenino, sin enfermedad autoinmune conocida. No se incluyeron aquellos pacientes con antecedente clínico y/o serológico de leptospirosis, sífilis ó con enfermedad autoinmune (LES, esclerosis múltiple y artritis reumatoide). Tampoco se incluyeron aquellos que habían viajado a los Estados Unidos de América ó Europa.

Al final del estudio se eliminaron a los pacientes que se les realizó el diagnóstico de sífilis, leptospirosis, enfermedad autoinmune u otra etiología confirmada por cuadro clínico ó aquellos con información incompleta del expediente.

Estudio en garrapatas: Se seleccionaron a todas las garrapatas que se identificaron como del género *Ixodes*. Se excluyeron aquellas conservadas en soluciones diferentes al etanol y se eliminaron aquellas garrapatas de géneros diferentes.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

El tamaño de muestra fué calculado como sigue:

Estudio de pacientes. Prevalencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en Norteamérica y Europa varía de 1 a 10% en zonas endémicas, y una encuesta seroepidemiológica en México mostró una seroprevalencia del 1.1% en población general;

3.2 Para la etapa en garrapatas: Todas las garrapatas del género *Ixodes* colectadas de la zona Noreste del país.

3.3 Muestra: Se tomaron a todos los paciente con manifestaciones sugestivas de enfermedad de Lyme y consecutivos de la población de estudio (muestreo no aleatorio) en el periodo comprendido de Agosto de 1997 a Septiembre de 1998.

Para la etapa realizada en garrapatas: Se estudiaron a todas las garrapatas del género *Ixodes* colectadas de la Zona Noreste en el período 1990-1991, de la colección de garrapatas de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Además aquellas colectadas en vegetación, roedores y mamíferos medianos durante el período comprendido de Octubre de 1997 a Agosto de 1998.

3.4 Criterios de selección:

Estudio de pacientes: Se incluyeron todos los pacientes mayores de 5 años de edad con cuadro clínico sugestivo de Borreliosis de Lyme, del sexo masculino ó femenino, sin enfermedad autoinmune conocida. No se incluyeron aquellos pacientes con antecedente clínico y/o serológico de leptospirosis, sífilis ó con enfermedad autoinmune (LES, esclerosis múltiple y artritis reumatoide). Tampoco se incluyeron aquellos que habían viajado a los Estados Unidos de América ó Europa.

Al final del estudio se eliminaron a los pacientes que se les realizó el diagnóstico de sífilis, leptospirosis, enfermedad autoinmune u otra etiología confirmada por cuadro clínico ó aquellos con información incompleta del expediente.

Estudio en garrapatas: Se seleccionaron a todas las garrapatas que se identificaron como del género *Ixodes*. Se excluyeron aquellas conservadas en soluciones diferentes al etanol y se eliminaron aquellas garrapatas de géneros diferentes.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

El tamaño de muestra fué calculado como sigue:

Estudio de pacientes. Prevalencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en Norteamérica y Europa varía de 1 a 10% en zonas endémicas, y una encuesta seroepidemiológica en México mostró una seroprevalencia del 1.1% en población general;

sin embargo cuando se estudia población de alto riesgo la prevalencia se incrementa hasta un 30%.

Para el estudio consideramos una prevalencia de 12.0% tomada en población con riesgo de una zona endémica con un error aceptable 2.5% intervalo de confianza del 95%.

n= 45

Estudio de garrapatas:

En Norteamérica existen antecedentes en zonas endémicas sobre el porcentaje de garrapatas infectadas el cual varía de acuerdo al grado de endemidad de 1 a 3% en California (zonas baja endemidad), en Europa de 3 a 23% ó hasta 50 a 60% en Nueva York (zonas hiperendémicas) .

Para éste estudio consideramos al país como una zona de baja endemidad, con una prevalencia de 2% y con un error aceptable del 0.75%, con un intervalo de confianza del 95%. n= 335

BUSQUEDA DE CASOS

Se consideró como caso sospechoso de enfermedad de Lyme al paciente con eritema migratorio; ó una manifestación tardía (9,21).

a) Eritema migrans- Lesión en piel que inicia como mácula o pápula y se extiende en días o semanas para formar una lesión redondeada grande, con aclaramiento central parcial. Una lesión solitaria debe ser mínimo de 5 cm de tamaño. Se acompaña de fatiga, fiebre, cefalea artralgiás ó mialgiás que son intermitentes.

b) Manifestaciones Tardías:

1. Artritis oligo ó poliarticular asimétrica recurrente ó crónica (semanas ó meses).

2. Manifestaciones neurológicas:

Meningitis aséptica con presencia en LCR de pleocitosis y predominio de linfocitos. Se puede acompañar de neuropatías craneales de III, IV, VI y VII únicas o combinadas.

Parálisis facial uni ó bilateral como signo inicial ó único, radiculoneuropatía dolorosa. raramente encefalomielitís.

sin embargo cuando se estudia población de alto riesgo la prevalencia se incrementa hasta un 30%.

Para el estudio consideramos una prevalencia de 12.0% tomada en población con riesgo de una zona endémica con un error aceptable 2.5% intervalo de confianza del 95%.

n= 45

Estudio de garrapatas:

En Norteamérica existen antecedentes en zonas endémicas sobre el porcentaje de garrapatas infectadas el cual varía de acuerdo al grado de endemidad de 1 a 3% en California (zonas baja endemidad), en Europa de 3 a 23% ó hasta 50 a 60% en Nueva York (zonas hiperendémicas).

Para éste estudio consideramos al país como una zona de baja endemidad, con una prevalencia de 2% y con un error aceptable del 0.75%, con un intervalo de confianza del 95%. n= 335

BUSQUEDA DE CASOS

Se consideró como caso sospechoso de enfermedad de Lyme al paciente con eritema migratorio; ó una manifestación tardía (9,21).

a) Eritema migrans- Lesión en piel que inicia como mácula o pápula y se extiende en días o semanas para formar una lesión redondeada grande, con aclaramiento central parcial. Una lesión solitaria debe ser mínimo de 5 cm de tamaño. Se acompaña de fatiga, fiebre, cefalea artralgiás ó mialgiás que son intermitentes.

b) Manifestaciones Tardías:

1. Artritis oligo ó poliarticular asimétrica recurrente ó crónica (semanas ó meses).

2. Manifestaciones neurológicas:

Meningitis aséptica con presencia en LCR de pleocitosis y predominio de linfocitos. Se puede acompañar de neuropatías craneales de III, IV, VI y VII únicas o combinadas.

Parálisis facial uni ó bilateral como signo inicial ó único, radiculoneuropatía dolorosa. raramente encefalomiélitis.

Acrodermatitis crónica atrófica. Lesión rojizo a violácea en su inicio y evoluciona a hipocrómica ó hipercrómica, en superficies extensoras de las extremidades, que tiende a producir atrofia de la epidermis como piel de cigarro y músculo sin afectar hueso.

Linfocitoma borrelial. Nodulo o placa rojo-violácea se localiza en el lóbulo de la oreja, pezón o escroto, el tejido con infiltrado linfocitario intenso, es mas frecuente en niños.

DEFINICION DE CASO CONFIRMADO: Un paciente con cuadro clínico sugestivo de enfermedad de Lyme y estudios serológicos positivos para ELISA más inmunotransferencia y/o cultivo ó PCR positivo para *B. burgdorferi*..

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO.

El estudio consta de varias etapas:

La primera etapa se realizó del 1ro de Junio de 1997 al 30 de Septiembre de 1998 .

Validación del cuestionario: Se informó del estudio a los especialistas en dermatología, reumatología, medicina interna, neurología, pediatría e infectología de dos Centros Médicos: Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza y Hospital de Pediatría del CMN SXXI de la Ciudad de México quienes recibieron información sobre la enfermedad así como formatos de notificación (Anexo 1). Se realizó la validación del cuestionario de notificación de caso por médicos especialistas en medicina familiar, dermatología, neurología, reumatología, medicina interna, pediatría e infectología .

El cuestionario de notificación (anexo 1) fué aplicado por el médico tratante a cada paciente después de informar de la naturaleza del estudio, se pidió al paciente ó a sus padres firmar la hoja de consentimiento informado para entrar al estudio (anexo 2).

Toma de muestras: A todo paciente que aceptó ingresar al estudio se le tomó muestra de sangre en ayunas por punción venosa periférica y se colocó en tubo sin anticoagulante. En pacientes con manifestaciones agudas se obtuvo una 2da. muestra a las 8 semanas del inicio del cuadro clínico. En casos que presentaron evolución crónica se obtuvo una muestra única. Se realizó determinación de anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi* con antígeno celular completo por el método de ELISA.

En casos con manifestaciones neurológicas además de la muestra sanguínea se tomó una muestra de LCR. Las muestras séricas y el LCR fueron conservados a -20 oC hasta su procesamiento por los métodos de ELISA e inmunodot de IgG vs *B. Burgdorferi* y PCR en LCR

Estudios realizados.

ELISA. Todas las muestras séricas de los pacientes se procesaron por el método de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi* a una dilución de 1:640

considerando como valor de corte para positividad al promedio de la densidad óptica de 25 sueros negativos estudiados más 3 desviaciones estándar (anexo 3).

Los sueros positivos se probaron nuevamente a diluciones 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120.

Immuno-dot. Los sueros positivos por ELISA fueron estudiados por “inmunodot” (GenBio, San Diego, CA, USA) para anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi*, el cual está constituido por antígenos de extracto total de *Borrelia burgdorferi* cepa de California y 4 diferentes antígenos recombinantes de *B. burgdorferi* cepa de California y *B. burgdorferi* sensu stricto. La prueba consiste en una tira reactiva de nitrocelulosa con antígenos que corresponden a las proteínas de *B. burgdorferi* extracto completo, las proteínas de 93, 41, 39 kDa y OspC, así como una zona control positivo. Los criterios de positividad fueron: reactividad a extracto total de *B. burgdorferi* y a 1 ó más proteínas de 93, 39 ó 23 kDa. ó la presencia de reactividad a la proteína total y 2 proteínas incluyendo la p41. Fueron considerados negativos los sueros que solo reconocieron una ó ninguna de las proteínas; así como las que reconocieron las bandas correspondientes a la proteína de extracto total y la p41 (Fig 3). Cada suero se probó a una dilución de 1:100 y en cada corrimiento se probaron sueros controles negativos seleccionados de una población voluntaria sana. Los resultados fueron interpretados por 2 investigadores diferentes cegados para la muestra.

Procesamiento de biopsias. Los casos que presentaron manifestaciones en piel (eritema migratorio, ACA y escleroderma) se les propuso la toma de biopsia de piel, la que se realizó de la zona central de la lesión cuando tenía más de 3 meses de evolución y de la zona periférica en lesiones sugestivas de EM. La asepsia de la piel se realizó con isodine al 1% y por medio de punción con un trocar de 4 a 6 mm de diametro se obtuvo un fragmento. El espécimen fué transferido en un tubo que contenía medio BSK-H (Sigma, chemical, St Louis MO) con rifampicina y anfotericina B, se fraccionó en 3 partes, y una parte se conservó en etanol al 70% para PCR, otra en formol para estudio histológico y la tercera parte se procesó para cultivo: Por medio de un mortero se trituró la biopsia y homogenizó en PBS, el homogenizado se colocó en medio BSK-H con antibiótico y se incubó a 34 °C en condiciones de microaerofilia con CO₂ al 5% durante 12 semanas. A partir de la segunda semana se inicia la observación por medio de microscopía de campos oscuro para la presencia de las espiroquetas en el cultivo (36).

Todas las biopsias fueron procesadas para PCR utilizando los iniciadores de los genes OspA, Flagelar y 16S ribosomal específico para *B. burgdorferi* sensu stricto, para reducir el riesgo de contaminación de las muestras, se analizaron los productos de amplificación en una área separada de la otra donde se abrieron los tubos. Los reactivos usados para cada muestra fueron preparados en una cuarto separado, y se usaron pipetas con presión positiva y el material fué exclusivo para la preparación de las muestras (anexo 4,7).

Las muestras positivas por PCR se procesaron por medio de Southern-blot con sondas internas específicas de los genes flagelar y OspA de *B. burgdorferi* (Anexo 8).

Segunda etapa - estudio en garrapatas (Julio de 1997 a Agosto de 1998).

Se definió como garrapata del género *Ixodes*:

La garrapata que presentó escudo dorsal que cubría toda la superficie en el macho y la parte anterior en la hembra, la parte anterior del gnathostoma es visible desde arriba. Con la estigmata situada detrás de la coxa IV. Dimorfismo sexual pronunciado. La larva tiene 6 patas y el adulto 8; con surco anal curvado alrededor del ano, unido en un punto o arco. Ocelos y festones ausentes, dentición 3/3 en el tercio anterior del hipostoma.(Figura 2).

El estudio se realizó en una colección obtenida durante el período de 1990 a 1991 por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional (ENCB del IPN).

Se seleccionaron las garrapatas del género *Ixodes* colectadas de roedores pequeños del género *Peromyscus* sp. de la región de San Josesito en Nuevo León (2400 m2) y de Coahuila,

Recolección de garrapatas vivas

Las garrapatas se colectaron de zonas rurales y boscosas en Santa Catalina, Nuevo León , Cd. Madero y Tampico, Tamaulipas. Se obtuvieron por medio de 2 métodos, el primero es el método de golpeo para colectar las garrapatas de la vegetación. Por medio de una manta blanca se roza el pasto y los árboles, varios metros en diferentes zonas durante el día en cada zona.

Se revisa la manta y las garrapatas se colocan con una pinza en frascos pequeños, cubiertos con tela y con papel filtro húmedo para proporcionar 90% de humedad y entrada de aire (35). El segundo método fué la colecta de garrapatas de roedores por medio de trampas que se colocan durante la noche en los días de luna nueva para tener mayor oscuridad y se recogen

durante la madrugada. Se revisan los roedores colectados y se obtienen las garrapatas de los mismos, colocándolos vivos en poca agua para que bajen las garrapatas y éstas son colocadas con pinzas en frascos con el dispositivo de ventilación ya descrito. Las garrapatas se mantuvieron vivas con las siguientes condiciones: 15 °C de temperatura con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad después de colectarse, durante su transportación a la Ciudad de México y antes de procesarlas.

Se identificó el huésped (roedor ó mamífero mediano) que tenía las garrapatas y posteriormente cada garrapata se clasificó hasta estadio y especie por medio de características morfológicas por un entomólogo quien seleccionó las del género *Ixodes*. Las garrapatas muertas durante el viaje se conservaron en alcohol al 70% .

Técnicas aplicadas:

PCR: Se realizó en aquellos especímenes de garrapatas colectados con anterioridad y conservados en etanol al 70%. Primero se removió la garrapata del alcohol y se secó al aire, sobre un disco de papel filtro por 5 minutos. Se lavaron perlas de vidrio de 0.1 mm con metanol al 50% por 3 veces , se mezclaron con una solución de albúmina bovina acetilada al 1% en agua y se incuban por 30 minutos a 37°C se calentaron a 95 °C por 10 minutos y se lavaron 2 veces con 0.5 ml de agua. En seguida se colocaron en tubos de microcentrifuga y se almacenaron a -20 °C.

Cada garrapata fué colocada en un tubo de 0.6 ml con 20 *ul* de perlas de vidrio tratadas. La garrapata se maceró con las esferas, con puntas de pipeta, para liberar los intestinos y se adicionaron 25 *ul* de buffer para PCR (10 mM tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.75 mM MgCl₂, 0.01% gelatina, 0.5% NP40, y 0.5% Tween 20). Las muestras se hirvieron a 95 °C por 10 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 5 min.

Se corrió un blanco con el buffer para PCR y las perlas de vidrio para asegurar una técnica adecuada de extracción de la bacteria sin contaminación (anexo 6).

En garrapatas vivas se realizó la disección y el procesamiento de el tubo digestivo para el cultivo de *B. burgdoferi* y PCR (anexo 5 y 6) (35,36).

Se mezcló un volumen de 5 *ul* de sobrenadante del extracto de garrapata con amortiguador para PCR, que contienen Tris Hidrocloruro (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.75 mM, gelatina

0.01%, deoxinucleósido trifosfato 200 uM y 50 pmol de cada iniciador (Osp A, Flagelar y 16 S RNA). Los componentes de reacción fueron sujetos a 45 ciclos de amplificación.

Las secuencias de genes específicos de *Borrelia burgdorferi* que se usaron en la amplificación fueron: El gene ospA, de la región 149 a 319; el gene flagelar de la región 132 a 310 y sonda interna; y del gen 16S r los iniciadores DDO2 y DDO6 (35,37).

Cultivo para *B. burgdorferi* de tubo digestivo de garrapatas del género *Ixodes* .

En garrapatas vivas se realizó disección de tubo digestivo el cual se fraccionó en 2 partes un fragmento para cultivo y otro para PCR. El cultivo fué revisado buscando espiroquetas con microscopía de campo oscuro después de 2 semanas de incubación a 34 °C en medio selectivo Barbour-Stoener- Kelly's II durante 12 semanas consecutivas (36).

ANALISIS DE LOS DATOS:

Estadística descriptiva: Análisis de la distribución de las frecuencias de las diferentes variables consideradas en el estudio. Las de medidas de tendencia central y dispersión apropiadas a cada variable de acuerdo al nivel de medición y tipo de distribución. La consistencia en la medición de los anticuerpos IgG vs *B. Burgdorferi* se realizó mediante el coeficiente de variación intra-observador y para evaluar la consistencia en las lecturas del inmuno-dot se aplicó la prueba de Kappa.

Cálculo del intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS:

ETAPA DE CASOS DE ENFERMEDAD DE LYME:

Se estudiaron 51 pacientes de los cuales 20 presentaron manifestaciones cutáneas y 31 manifestaciones neurológicas.

Manifestaciones cutáneas:

Se estudiaron 20 pacientes de 4 a 18 años de edad con manifestaciones cutáneas tardías con diagnóstico de esclerodermia que se clasificaron como: esclerodermia lineal, 12; esclerodermia segmentaria (atrofia hemifacial), 2; escleroderma en placa (morfea), 4; esclerodermia sistémica, 1; y un caso con manifestación temprana (eritema migratorio). Así como 3 pacientes con diagnóstico de LES como controles (Tabla 1).

La edad promedio de éstos 20 pacientes fué de 10.35 ± 3.43 años, con predominio del sexo femenino 2.6:1. El 75% de los casos (15/20) fueron positivos para las pruebas serológicas de ELISA e inmuno dot-blot.

En los casos con diagnóstico de esclerodermia lineal el 93% fueron seropositivos. Mientras que en los casos con morfea, 1 de 4 fué seropositivo. Los casos de esclerodermia sistémica (un paciente) y de eritema migrans (un paciente) fueron seropositivos (Tabla 2). Los 20 pacientes aceptaron la toma de biopsia. En el estudio histológico se encontró con tinción de H-E epidermis adelgazada, anexos atróficos, infiltrado linfocitario perivascular y perianexial moderado que fué mayor en los casos con menos tiempo de evolución (Fig. 1 y 2). En 10 de éstas biopsias se observaron estructuras bacterianas de forma espirilar por tinción de plata de Wharthin -Starry (Fig 3). De los 5 casos seronegativos, un caso con diagnóstico de escleroderma en banda fué positivo en la biopsia por tinción de WS. De los fragmentos de piel cultivados, todos fueron negativos a cultivo hasta 12 semanas después de incubación.

Se realizó extracción del DNA de 23 biopsias de piel conservadas en etanol al 70% que correspondían a 19 casos: con los siguientes diagnósticos EM, 1; esclerodermia lineal, 12; esclerodermia segmentaria, 2; Morfea, 4; esclerodermia sistémica, 1 y 3 controles con diagnóstico de LES. La efectividad en la extracción de DNA fué confirmada, determinando la presencia del gen de β -globulina en el tejido con técnica de PCR. De acuerdo a éste criterio se

logró extracción de DNA en 20 biopsias (87%) que correspondieron a 17 casos (2 biopsias de un paciente) y 2 controles (Figura 4).

Se realizó extracción del DNA en 20 biopsias de piel conservadas en parafina, obteniéndose extracción del DNA en sólo 2 especímenes, posiblemente por desnaturalización del ácido nucléico durante la fijación en formol.

Al final se obtuvo DNA de 20 biopsias de 19 casos y 2 controles, las cuales fueron procesadas para PCR con 2 tipos de iniciadores para Gen flagelar (Fla 5 y Fla 6) y Gen OspA (149-319). De éstas muestras un caso con diagnóstico de esclerodermia localizada fué positivo por PCR y fué confirmado con Southern-blot (Fig 5).

Manifestaciones neurológicas:

Se estudiaron 31 pacientes con manifestaciones neurológicas sugestivas de enfermedad de Lyme con los siguientes diagnósticos sindromáticos: meningoradiculitis, neuropatía periférica, mielitis y encefalopatía. Todos los pacientes fueron examinados por el mismo neurólogo. Tuvieron estudios de VDRL y AAN negativos, así como glucemia normal con lo que se excluyeron otras enfermedades neurológicas.

Se eliminaron a 16 pacientes al confirmarse otros diagnósticos como: Esclerosis múltiple, LES, mielitis por HTLVIII, sarcoidosis, pseudotumor cerebral y retinitis pigmentosa.

Los 15 pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas tuvieron un rango de edad de 12 a 58 años y una mediana de 35 años, relación M:F de 1:1. El 66% de los casos (10 pacientes) presentaron seropositividad por medio de estudios de inmunodot-blot. En 8 pacientes se obtuvo LCR el cual fué procesado para PCR. En 2 de estos casos se observó amplificación para el gen flagelar y Osp A, y en ambos casos se confirmó la especificidad con Southern-blot usando las sondas internas para los mismos genes (Fig 6). Usando las medidas preventivas para contaminación los controles negativos incluidos durante la extracción de DNA y preparación del mismo para PCR ninguno mostró producto de amplificación detectable en los experimentos.

ETAPA REALIZADA EN GARRAPATAS:

Se obtuvieron 198 garrapatas del género *Ixodes* de la colección de artrópodos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN de los Estados de Coahuila y Nuevo León, las cuales fueron obtenidas de 20 huéspedes clasificados como roedores de los géneros *Peromyscus*

leucopus y *Liomis*, así como de mamíferos medianos (*Bassariscus*, *Sylvilagus* y *Sciurus*). Las garrapatas fueron clasificadas por estudios morfológicos hasta especie en *Ixodes sinaloe* e *Ixodes octogenarius*.

Se realizaron 2 muestreos para coleccionar garrapatas vivas en zonas boscosas en los estados de Tamaulipas y Nuevo León.

Durante la colecta realizadas en zonas rurales de Tampico y Cd. Madero Tamaulipas se capturaron 6 roedores del género *Peromyscus leucopus* y *Liomis irroratus* en los que se encontró baja infestación con 1 ó 2 garrapatas. Las garrapatas fueron clasificadas hasta especie como *Ixodes sinaloe*. Se coleccionaron 90 garrapatas de vegetación, vacas o perros y fueron clasificadas como *Dermacentor albipictus* y *Amblyoma americana*.

En Santa Catarina, zona de la Laguna que son zonas rurales y boscosas de Nuevo León la captura de roedores fué muy escasa, sólo de un roedor clasificado como *Peromyscus leucopus* y estuvo infestado con una garrapata clasificada como *Ixodes sinaloe*. De vegetación se obtuvieron 76 especímenes de *Amblyoma cajennense*.

De las 171 garrapatas vivas coleccionadas se realizó disección de 42 especímenes de los estadios adulto y ninfa, que pertenecían a los géneros *Ixodes*, y algunas *Dermacentor* y *Amblyoma americana* y se les extrajo el tubo digestivo. El cultivo fué negativo para espiroquetas en los 42 especímenes probados.

Se procesaron 27 de las garrapatas de los diferentes huéspedes y en estadios de larva y ninfa de la colección de la ENCB, IPN y el tubo digestivo de 42 garrapatas coleccionadas vivas para PCR, utilizando 3 tipos de iniciadores (Gen flagelar, 16 s ribosomal y OspA). En todos los casos los resultados de PCR fueron negativos .

ANALISIS ESTADISTICO: Para evaluar la consistencia de los resultados de ELISA de IgG vs *B. burgdorferi* , se repitieron los ensayos en 5 ocasiones, en días diferentes, por el mismo observador y se realizó coeficiente de variación intraobservador obteniendo $r=0.88$. Para evaluar la concordancia interobservador en las lecturas de los resultados del método de inmunodot-blot entre 2 observadores se evaluó con el índice de kappa el cuál fué de 0.80 ($K=0.80$) .

DISCUSION:

La Enfermedad de Lyme fué descrita hace más de dos décadas. A partir de entonces se ha demostrado la presencia del vector infectado y casos clínicos en Norteamérica, Europa y Asia (1,2). Estudios recientes de seroprevalencia en México sugieren que hay exposición de la población a *Borrelia burgdorferi* en las zonas Noreste y Centro del país (20).

Para el diagnóstico de enfermedad de Lyme, se recomiendan 2 pruebas de IFA ó ELISA, más una prueba adicional por inmunotransferencia (22). En estadios tempranos el 50 a 80% de los pacientes tienen una prueba positiva(12), en la forma tardía de la enfermedad éstas pruebas tienen una mayor sensibilidad. Algunas enfermedades reumáticas y otras enfermedades producidas por espiroquetas como la sífilis, pueden dar falsos positivos en ELISA. En los pacientes con borreliosis de Lyme el VDRL es negativo. Todos los pacientes incluidos en éste trabajo fueron negativos para la prueba de VDRL, así como resultados negativos para las principales enfermedades reumáticas.

En los casos identificados en EUA todos los aislamientos corresponden a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, que difiere de lo encontrado en Europa donde además se han descrito otras especies (24). Desde hace 15 años se ha demostrado la asociación de acrodermatitis crónica atrófica (ACA) con la presencia de *Borrelia burgdorferi* (17). Además actualmente se reconocen diferentes especies implicadas en las manifestaciones neurológicas y cutáneas tardías de enfermedad de Lyme (15).

En nuestra muestra la mayoría de los pacientes presentaban manifestaciones de esclerodermia localizada en las que se obtuvo una seropositividad del 73% por inmunodot-blot, observándose espiroquetas en el 50% de las biopsias. En uno de los casos fué posible la amplificación por PCR utilizando 2 iniciadores de origen cromosómico (flagelar y 16S ribosomal) y un extracromosómico de membrana externa (OspA), altamente específicos para *B. burgdorferi* sensu stricto (20). En Europa Wilske et al. encontraron la geno especie *Borrelia afzelii* en aislamientos de piel con ACA (18). Con un iniciador cromosómico específico de *B. burgdorferi* sensu lato (*B. garinii* y *B. afzelii*) Fujiwara et al. obtuvo por PCR resultados positivos en biopsias de piel de pacientes europeos y japoneses con esclerodermia localizada; sin embargo en biopsias de pacientes Norteamericanos ninguna amplificó(19).

Los cultivos en los pacientes incluidos fueron negativos, lo cual se relaciona probablemente con la baja sensibilidad del estudio que en casos de ACA puede ser del 10% (18).

La PCR es una técnica poderosa para detectar DNA de *B. burgdorferi*. Goodman et al. demuestran que ésta prueba puede ser tres veces más sensible que el cultivo en la etapa temprana y podría ser útil como indicador de diagnóstico en enfermedad diseminada (42).

En éste estudio se utilizó el método de isotiocianato de guanidina (IsoQuick) para la extracción de DNA de muestras de LCR, con ésta técnica Mouritsen et al tiene una sensibilidad muy alta y puede detectar en LCR y plasma 10 espiroquetas por ml. comparado con muestras sanguíneas donde fué de 100 espiroquetas por ml (43).

Los grupos de iniciadores aplicados en éste estudio para las muestras de piel, LCR y garrapatas fueron 2 de origen cromosómico (flagelar y 16S ribosomal) y uno extracromosómico de membrana externa (OspA). Estos iniciadores son altamente específicos para detectar *B. burgdorferi* sensu stricto (14,15).

Breitsneider demostró que el nivel de detección de DNA disminuye en muestras de ECM comparado con la etapa temprana, con una sensibilidad de 94% vs 81% respectivamente, lo que indica que el tiempo de evolución de la enfermedad disminuye la sensibilidad de la prueba. Considerando éste punto en nuestro estudio todos los pacientes presentaban manifestaciones cutáneas tardías de 6 meses a 7 años de evolución y el paciente con la muestra de piel positiva tenía 6 meses de evolución de la lesión comparado con más de 3 años en casos con resultado negativo.

Es posible que la detección de DNA falló en algunas muestras porque la concentración de *B. burgdorferi* fué más baja que el límite de detección ó el fragmento de biopsia no fué suficiente para contener la bacteria. Algunas biopsias tenían más de un año de conservación, lo que de acuerdo a estudios previos por Brettschneider, disminuye hasta un 50% la posibilidad de amplificación. (18,21).

La PCR en estadios tempranos en piel es una prueba rápida, sensible y específica que puede ser superior a la serología y el cultivo. Durante el curso de la infección la sensibilidad del PCR disminuye comparado con la serología. Las pruebas serológicas comerciales para detección de anticuerpos vs *B. burgdorferi* presentan diferencias en la sensibilidad durante el estadio temprana de la infección, pero la mayoría identifican con alta sensibilidad a los

pacientes con la forma tardía de la enfermedad (42). Por lo anterior los estudios serológicos tienen un alto peso en el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad.

La PCR también se ha aplicado en el estudio de garrapatas muertas conservadas en etanol, con ésta técnica se obtiene una sensibilidad igual al de la IFA con anticuerpos monoclonales específicos de *B. burgdorferi*. Con la ventaja que se puede aplicar a éste tipo de muestras y la IFA no. *Persing et al.* detectaron DNA de *B. burgdorferi* en menos del 1% de una colección de garrapatas del género *Ixodes* procedentes de una zona hiperendémica de la enfermedad. Los especímenes estuvieron conservadas en alcohol durante 50 años. Los iniciadores utilizados fueron de los genes Osp A y Flagelar específicos para la cepa B31 de *B. burgdorferi sensu stricto* (38). En nuestra muestra se procesaron 198 garrapatas del género *Ixodes*. Los especímenes fueron conservados en etanol durante 8 años. Todos los especímenes de nuestra muestra fueron negativos para PCR lo cual demuestra que el tiempo y modo de conservación de los especímenes influye en la sensibilidad del estudio, así como es posible que en una zona de baja endemicidad como puede ser nuestro país, sea necesario un tamaño de muestra mayor de garrapatas vivas para incrementar la sensibilidad de la prueba. La combinación de hallazgos clínicos y resultados de laboratorio en este estudio confirman que México es un país donde puede considerarse la Borreliosis de Lyme como una enfermedad endémica.

CONCLUSIONES:

- 1- Se diagnosticaron pacientes mexicanos con Borreliosis cutánea (EM, ACA y esclerodermia localizada) con características clínicas e histológicas similares a las descritas en otros países.
- 2- Se confirmó con estudios serológicos que el 73% de los casos estudiados con manifestaciones cutáneas y el 66% con manifestaciones neurológicas estuvo asociado a infección por *Borrelia burgdorferi*, además se demostró la presencia de la bacteria por microscopía y biología molecular en ambos casos, cutáneos y neurológicos.
- 3- El diagnóstico clínico, los estudios serológicos, histológicos y moleculares positivos para *B. burgdorferi* reportados en éste trabajo sugieren que México es un país donde la Enfermedad de Lyme es endémica, de acuerdo a los criterios de la OMS.
- 4- La presencia de el reservorio principal (*Peromyscus leucopus*) infestado con la garrapata del género *Ixodes* sugiere que el ciclo puede mantenerse por lo menos en la zona Noreste de México.
- 5- No se encontraron garrapatas del género *Ixodes* infectadas con *B burgdorferi* probablemente por:
 - a) La baja prevalencia de garrapatas infectadas.
 - b) La baja sensibilidad de la PCR en garrapatas conservadas en etanol.
 - c) La especie de *Borrelia* sea diferente a *B. burgdorferi* sensu stricto.

TABLA 1**Características clínicas y demográficas de pacientes pediátricos con manifestaciones cutáneas sugestivas de Borreliosis de Lyme.**

Característica	Seropositivos	Seronegativo
No. Pacientes	15	5
Edad (años) media y DS	10.3	11
Sexo M/F	10/5	3/2
Duración (años) intervalo	0.5-7años	3a-5a
Esclerodermia localizada	13	5
E. sistémica	1	0
Eritema migrans	1	0
Artritis	2	2
Neuroborreliosis	1	0

TABLA 2**Características demográficas y clínicas de pacientes con manifestaciones neurológicas sugestivas de Enfermedad de Lyme.**

CARACTERISTICA	SEROPOSITIVOS	SERONEGATIVOS
Número	10	5
Edad (años) Mediana	42.5	42
Percentiles 25 a 75	21.5-48.50	
Sexo M/F	5/6	2/5
Duración (Meses)	3 m	6 m
Media - DS		
Meningoradiculitis 2	2	0
Neuropatía craneal 9	5	4
Neuropatía periférica 4	3	1
Mielitis 1	1	0
Pleocitosis	4	0
Artritis	2	1

TABLA 3

Seropositividad de Inmunotransferencia de IgG vs *Borrelia burgdorferi* en pacientes pediátricos con manifestaciones cutáneas sugestivas de Enfermedad de Lyme .

Diagnóstico	Número	Seropositivos	Frecuencia (%)
<i>Eritema migrans</i>	1	1	100
Esclerodermia	19	14	73
Localizada			
E. Lineal	12	11	91
E. segmentaria	2	1	50
E. placa	4	1	25
E. sistémica	1	1	100

TABLA 4

Respuesta a proteínas específicas de *B. burgdorferi* en casos confirmados de Enfermedad de Lyme por Método de Inmunodot-blot

Diagnóstico	No.	Extracto Total	Proteína	Proteína	P39 kDa	OspC
			83-93 kDa	Flagelar P41		
EM.*	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1
E. lineal**	10/12	10/10	10/10	6/10	3/10	4/10
A. hemifacial	1/2	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1
Morfea	1/4	1/4	1/1	-	1/1	-
Meningoradiculitis	2/3	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2
Parálisis facial recurrente	1/2	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1
Contacto de casos	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2

*Eritema migratorio

** Esclerodermia lineal

TABLA 5**Características de las garrapatas colectadas de la zona Noreste de la República Mexicana**

Característica	Colección de ENCB* del IPN** 1990-1991	Colecta 1997-1998
<i>Ixodes</i>	198	6
<i>Ixodidae</i> (<i>Amblyoma</i> y <i>Dermacentor</i>)	0	164
PCR realizado	198	6
Cultivo	0	42
Resultado de Cultivo	-	0/42
Resultado de PCR	0/198	0/6

* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

** Instituto Politécnico Nacional.

ANEXO 1

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO EN POBLACION ENDEMICA DE ENFERMEDAD DE LYME EN LA REPUBLICA MEXICANA

Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y parasitarias , Hospital de pediatría CMN SXXI. Proyecto 97/718/75

La enfermedad de Lyme se caracteriza por un amplio espectro de signos principalmente en piel, articulaciones, sistema nervioso y corazón.

Se considerará como un CASO SUGESTIVO DE ENFERMEDAD DE LYME:

Todo paciente con eritema migratorio ó una manifestación tardía.

Eritema migrans (EM) : Lesión en piel que inicia como mácula ó pápula y se extiende en días ó semanas para formar una lesión redondeada grande con aclaramiento central parcial y mide 5 cm ó más, en ocasiones son lesiones múltiples. Se acompaña de fatiga, fiebre, cefalea, artralgias ó mialgias intermitentes.

MANIFESTACIONES TARDIAS

ARTRITIS – Afecta una o 2 articulaciones grandes, es asimétrica, recurrente ó crónica (meses ó años).

SISTEMA NERVIOSO- Síndrome meníngeo, infeccioso y líquido cefalorraquídeo con pleocitosis linfocitaria, pueden tener parálisis facial uni o bilateral, y/o parálisis flácida de miembros inferiores.

PIEL- Lesión única coloración violácea , piel adelgazada de cigarro, venas prominentes que se transforman en hipo ó hiperpigmentadas y aparece meses ó años después de la picadura de la garrapata.

CORAZON – Bloqueo auriculo-ventricular de 2do y 3er grado (intervalo-P-R prolongado) de inicio agudo y se resuelve en 7 a 10 días y algunas veces se asocia a miocarditis.

CASO CONFIRMADO DE ENFERMEDAD DE LYME: Todo paciente con cuadro clínico de la enfermedad y estudios serológicos (ELISA e inmunotransferencia) , cultivo y/o PCR para *Borrelia burgdorferi*

NOMBRE: _____ EDAD _____ SEXO M(1) F(2) FOLIO
DOMICILIO: _____
Teléfono _____
CIUDAD: _____ ESTADO: _____ INSTITUCION I IMSS(1) SSA(2)
ISSSTE(3)
OTRAS (4) ESPECIFIQUE: _____
OCUPACION _____ AFILIACION _____

I - ANTECEDENTES:

MARCAR CON UNA X LA RESPUESTA CORRECTA Y CONTESTE LAS PREGUNTAS ABIERTAS.

- 1) Ha estado en un área rural en los últimos 6 meses. SI NO
¿Cuáles? _____
- 2) Ha estado en un bosque ó parque zoológico en los últimos 6 me SI NO
¿Cuáles? _____
- 3) Las lesiones actuales iniciaron después de estar en un área rural, bosque ó zoológico SI NO
4) Convive con perros, gatos ó pájaros en casa SI NO
5) Convive con vacas en casa ó trabajo SI NO

6) Ha viajado ha Estados Unidos de América SI NO
 Especifique los Estados _____ Tiempo _____ Mes y año _____

DERMATOLOGICO

MARCAR CON UNA X LA RESPUESTA CORRECTA Y ESCRIBA EL NUMERO EN LOS CUADROS CORRESPONDIENTES

1) Tiene lesiones en piel SI NO
 2) Tuvo lesiones en piel SI NO
 3) Tipo de lesión: macular (m) papular (p) otras (0) SI NO
 especifique. _____

4) Forma anular: SI NO
 1) Número de lesiones:
 2) Lesiones: a) aisladas confluentes
bilateral
b) unilateral

7) Miden: cm.
 8) Localización: cara (1) tronco (2) Extremidades Superiores (3) Extremidades inferiores (4) axilas (5)

9) La lesión reaparece SI NO
 Cuántas ocasiones?

10) Borde de la lesión regular irregular desconoce
 a) coloración del borde rojizo pálido se desconoce
 b) coloración del centro violáceo rojo rosa se desconoce

11) La lesión se transformó: SI NO
 A) De pápula placa piel adelgazada

II - ARTICULACIONES

12- Tiene signos articulares: SI NO
 13- Tuvo signos articulares SI NO
 14- artralgias SI NO
 15- Con aumento de volumen SI NO

16- ¿Cuántas articulaciones afectadas?
 17- Artritis: a) Unilateral bilateral

Derecho (D) Izquierdo (I)
 18- Localización: hombro codo muñeca rodilla cadera
 tobillo interfalángicas proximales interfalángicas distales
 b) Simétrica simétrica

Tiempo de inicio de la artritis días meses años
 La artritis es: continua (1) recurrente (2)

SISTEMA NERVIOSO:

TIENE ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO

- 22- Tuvo manifestaciones del sistema nervioso SI NO
- 23-Síndrome meníngeo(rigidez de nuca, signo de Kernig o Brudsky) SI NO
- 24-Disminución de la fuerza muscular SI NO
- 25-MEDIR FUERZA MUSCULAR DE ACUERDO A LA ESCALA I A V

I= Nula fuerza II Disminución de la fuerza y tono muscular III- Disminución en contra gravedad IV= fuerza disminuída a fuerza opuesta no contra la gravedad

V= Normal

- 26- La alteración : simétrica asimétrica
- 27- Sensibilidad: normal(1) disminuida (2) aumentada (3)

- 28- Localización: Derecho (D) Izquierdo (I) Extremidades Superiores Extremidades inferiores
- hombro brazo antebrazo cadera muslo
- pierna

29- Tiene afección a par craneal: SI NO

30- ¿Cuáles?

31- Presenta parálisis facial SI NO

Zona afectada comisura labial hemicara

32- Se realizó estudio de Líquido cefalorraquídeo: SI NO

a) El citológico tiene número de células

b) Los leucocitos son polimorfonucleares % mononucleares %

c) Glucosa mg/dl no se realizó se desconoce

d) Proteínas mg/dl no se realizó se desconoce

e) Cloruros mg/dl no se realizó se desconoce

Tinción de Gram : Positiva

Bacterias hongos parásitos

33- Tiene alteraciones cardiológicas: SI NO

34- Frecuencia cardíaca: Normal(1) bradicardia(2) taquicardia

(3)

35- Se le realizó electrocardiograma: SI NO

36- El electrocardiograma presenta : Intervalo PR prolonga SI NO

37- Requerió hospitalización en este episodio SI NO

38- Requerió hospitalización en episodios previos SI NO

39- Cuánto tiempo?

40 - Recibió antibióticos:

a) ¿Cuántos?

41- NOMBRE GENERICO DOSIS TIEMPO DE ADMINISTRACION

42- ESTUDIOS DE LABORATORIO SE REALIZARON RESULTADOS

VDRL	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO
FACTOR REUMATOIDE	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO
ACS. ANTINUCLEARES	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO
IgG	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO
IgM	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO
IgE	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO

NOMBRE DEL MEDICO: _____ Teléfono _____
 DOMICILIO: _____ CD _____
 ESTADO _____ FAX DEL TRABAJO O CONSULTORIO _____

SI TIENE UN CASOS SOSPECHOSO DE ENFERMEDAD DE LYME :

FAVOR ENVIAR MUESTRA DE SUERO (1 A 3 ML) EN UN TUBO DE ENSAYO O DE PLASTICO BIEN CERRADO . Empacarlo en hielo seco – congelado previamente.

En pacientes con manifestaciones del Sistema nervioso enviar líquido cefalorraquídeo congelado, empacado en hielo seco.

En pacientes con manifestaciones en piel realizar biopsia y enviar la muestra conservada en etanol al 70%.

LAS MUESTRAS DEBERAN ENVIARSE AL SIGUIENTE DOMICILIO:

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS ,
 HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI (IMSS).

DOMICILIO: Ave. Cuauhtémoc # 330 Col. Doctores CP. 06725, México, DF.

DIRIGIDO: DRA. MARIA GUADALUPE GORDILLO PEREZ.

DR. JAVIER TORRES LOPEZ

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio de investigación: Estudio epidemiológico de población endémica de Enfermedad de Lyme y búsqueda de *Borrelia burgdorferi* en garrapatas del género *Ixodes* en la zona Noreste de la República Mexicana.

Investigadores: Dr. Fortino Solórzano Santos.
Dra. María Guadalupe Gordillo Pérez.

Objetivo y Antecedentes:

La Enfermedad de Lyme es una enfermedad sistémica que produce manifestaciones en piel, articulares, neurológicas y cardíacas.

El objetivo: Determinar si la zona Noreste de la República Mexicana tiene población endémica de la Enfermedad de Lyme con los criterios de la OMS.

PROCEDIMIENTO:

Si consiento participar sucederá lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre mi historia médica, que dura 40 minutos.
2. Me someteré a una exploración física rutinaria y revisarán mi expediente.
3. Me extraerán sangre (5-10 ml) aproximadamente del brazo con aguja, para estudios de VDRL, ELISA e inmunotransferencia. La punción duele unos segundos y en ocasiones se produce un hematoma (moretón) pero es poco frecuente.
- 4 En casos con manifestación en piel se realizará biopsia de la lesión para estudio histológico, cultivo y PCR.
- 5 En casos con manifestaciones en sistema nervioso se realizará punción lumbar y el LCR se estudiará citológico, cultivo y PCR.

BENEFICIOS: Conocer los resultados de los estudios y posible diagnóstico de su enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados de todas las pruebas se discutirán conmigo y se enviarán a su médico tratante. Toda la información será confidencial y será usada solo para efectos de la investigación. Mi identidad será mantenida confidencial en la medida que la ley lo permita.

DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR EL ESTUDIO.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonarlo en cualquier momento, sin afectar mi atención médica futura.

La Dra. Maria Guadalupe Gordillo Pérez y/o colaboradores , ha discutido esta información y se ha ofrecido a responder mis preguntas. Si tengo más preguntas, puedo ponerme en contacto con ella directamente en el servicio de Infectología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI.

CONSENTIMIENTO.

Consiento en participar en este estudio, he tenido la oportunidad de leerlo.

NOMBRE Y FIRMA:

FECHA: _____

Médico _____

TESTIGO (Nombre y Firma)

Firma del

ANEXO 3

TECNICA DE ESTANDARIZACION DEL INMUNOENSAYO-ENZIMATICO IgG vs *Borrelia burgdorferi*:

Para buscar anticuerpos contra extracto total se usó un sonicado obtenido de la cepa B31 de *Borrelia burgdorferi* proporcionada por el Dr. Alan G. Barbour (Department of Microbiology of the University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas. El antígeno se ajustó a una concentración de 5 mg/ml y se almacenó a -70 oC hasta su uso (27).

La estandarización de la técnica se realizó de la siguiente manera:

Los controles para iniciar la estandarización de la prueba fueron sujetos de zonas endémicas de EUA, donados por el Dr. L. Magnarelli. El control positivo estuvo formado por 5 sueros de pacientes con Enfermedad de Lyme el diagnóstico confirmado por estudio clínico, microbiológico y serológico; y como control negativo 5 sueros de sujetos no infectados ambos procedentes de una zona endémica (Conecticut , FMA).

Usando los sueros anteriores como referencia, se estudiaron 88 sueros de donadores mexicanos sanos, se seleccionaron sueros negativos. Se buscó la dilución óptima de suero con ELISA; se probaron cuatro diluciones dobles seriadas 1:160, 1:320, 1:640 y 1:1280. Con la dilución 1:320, que es la dilución usada para reportar resultados positivos en EUA y Europa , el 17% de los sueros de donadores fué positivo; ésta es una seroprevalencia muy alta para sujetos sanos aún en un país endémico. Se decidió tomar la dilución de suero más cercana que fué de 1:640 como valor de corte de seropositividad para incrementar la especificidad sin modificar mucho la sensibilidad del ensayo; con esta dilución el 9% de los sueros fué positivo.

De los 88 sueros, se seleccionaron 25 que a la dilución 1:640 daban absorbancias similares a las obtenidas con los 5 sueros de sujetos no infectados de EUA. Estos sueros y la mezcla de los sueros de pacientes infectados de EUA se ensayaron en una placa y se hicieron lecturas a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos.

El valor de corte se definió como el promedio mas tres desviaciones estándar de los 25 sueros de sujetos donadores sanos. Este ensayo se repitió durante 5 días consecutivos y con los

valores de corte y los valores de absorbancia de la mezcla de sueros positivos (pool) se construyó una curva de regresión lineal. En cada placa donde se probaron los sueros del estudio, se incluyó el pool positivo por cuadruplicado, y el promedio de la absorbancia se interpoló en la curva de regresión lineal para calcular el valor de corte para las placas de forma individual. El resultado se calculó como resultado de dividir la absorbancia de la muestra entre el valor de corte y se expresó como unidades ELISA; de tal manera que resultados mayores 1.0 fueron considerados como positivos. Para medir anticuerpos contra este antígeno se usó el procedimiento descrito por Engvall y Perlmann (27); el antígeno se diluyó en solución reguladora de carbonatos (pH 9.6) y se adicionó a placas de 96 pozos (Combiplate 8; Labsystems, Finland) agregando 0.5 ug/pozo y se incubó toda la noche. Después se bloqueó la superficie con leche descremada al 5% con solución reguladora de fosfatos (PBS 1 M) y la placa se incubó por 75 minutos a 37°C; enseguida se lavó tres veces con solución reguladora de fosfatos con Tween 20 al 0.05% (PBSTG) y se agregaron los sueros problema. En cada placa se incluyeron por cuadruplicado un pool de sueros positivos y un pool de sueros negativos para corregir la variación del ensayo por día y por placa.

Las placas se incubaron por 1 hora a 37°C. Enseguida se agregó un monoclonal anti-IgG ó anti-IgA humana acoplado con fosfatasa alcalina (Southern Biotech, E.U.) a una dilución de 1:1000 y se incubó 1 hora a 37 °C. Enseguida se agregó sustrato pNPP (Southern Biotech, E.U.) a una concentración de 1 mg/ ml diluido en regulador de dietanolamina pH 9.8 las placas fueron incubadas a 37°C por una hora aproximadamente. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector iEMS analyzer (Labsystems, Finland) en el momento en que el control positivo dió valores de absorbancia entre 1600 a 1800 la reacción se paró. Se consideró un suero positivo cuando el promedio de la absorbancia de los sueros (duplicado) fué mayor a 0.380- 0.400 densidad óptica. En sueros positivos se realizaron titulaciones desde 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120.

ANEXO 4

TECNICA DE EXTRACCION DE DNA DE BIOPSIAS DE PIEL:

Para la extracción de DNA de biopsias de piel se utilizó el método comercial QUIAGEN. Este método se basa en la adsorción en gel con sílice y se somete el tejido a sustancias amortiguadoras con altas concentraciones de sales.

Se digirió el tejido colocando 3 a 5 mg de biopsia de piel en solución con proteinasa K y solución de lisis celular se incubó a 55 °C con movimiento continuo a 150-200 rpm durante la noche hasta la digestión total (La cantidad y el tipo de tejido determinan el tiempo de incubación requerido), el tiempo varía de 1 a 24 horas; es útil mezclar los tubos por períodos cortos con el vortex cada hora durante las primeras 2 horas para aumentar la velocidad de digestión del tejido (35).

Se centrifugó a una velocidad de 12500 rpm durante 5 minutos para sedimentar los detritus no digeridos. Y se transfirió 200 μ l del sobrenadante en tubos de microcentrífuga limpios de 1.5 ml. Con cuidado para evitar la transferencia de algo del material sedimentado porque puede contener sustancias inhibitorias.(35).

Se agregaron 200 μ l de solución amortiguadora para lisis celular (Para 25 mg de tejido) y 210 μ l de etanol al 96% para precipitación, se mezcló vigorosamente en el vortex y se colocó en la columna que contiene gel -sílice y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.

Se colocaron columnas limpias para centrifugar y agregaron 500 μ l de solución para lavado. Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm y se repitió por 3 veces.

Se colocó la columna con el DNA en un tubo limpio y se centrifugó a velocidad máxima durante 2 minutos para remover solución de lavado residual.

Se colocó la columna dentro de un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml. Entonces se diluyó el DNA agregando 200 μ l de agua libre de Rnasa (precalentada a 70 °C) e incubaron los tubos en el block calentado a 70°C por 5 minutos.

Se centrifugaron los tubos por 1 minuto a 8000 rpm y colectó el DNA purificado.

El DNA se conservó a -70 °C hasta que la amplificación por PCR se desarrolló.

CONTROL DE CALIDAD:

Control de sensibilidad y amplificación positiva.

Usé DNA preparado de *B.burgdorferi* B 31 (ATCC 35210) de cultivo bacteriano en baño María. Uso de reacciones altamente positiva que provee información del control de calidad . Las concentraciones del DNA se determina preparando una serie de 10 diluciones de DNA de *B. burgdorferi* se amplifican alicuotas de 5 *ul* de cada dilución . Se escogen 2 de las diluciones DNA con reacciones positivas para los controles de rutina.

Control de amplificación negativo.

5 *ul* de agua se agregó directamente a la mezcla de PCR (Control negativo).

ANEXO 5

TECNICA PARA PROCESAMIENTO DE GARRAPATAS

Identificación de *B. burgdorferi* en tejidos de garrapatas del género *Ixodes sp.*

El estudio consta de 2 etapas:

La garrapata se colocó en alcohol isopropílico al 70% y enjuagó con agua estéril, fué transferida asépticamente en un portaobjeto estéril que contenía una gota de medio de cultivo BSK II ó TE frío (Tris 10mM (pH 7.4) y EDTA 0.5 mM). Se procedió a disecar el tubo digestivo y otros tejidos de la garrapata através de un microscopio dentro de una campana de flujo laminar. Enseguida, la mitad de los tejidos (principalmente el divertículo del tubo digestivo) fueron transferidos por medio de una pipeta Pasteur a tubos de medio BSK II con y sin antibiótico por duplicado y otra parte se colocó en tubos de microcentrifuga de 0.5 ml que contienen 25 *ul* de TE, y los tubos fueron congelados a -70oC para su procesamiento por la técnica de PCR. El resto del material fué triturado en el portaobjeto, secado a temperatura ambiente y fijado en acetona por 10 minutos. Las pinzas fueron sumergidas en alcohol-acetona y flameada después de cada disección para prevenir contaminación por material antes de las disecciones (35). Los cultivos fueron incubados a 34oC durante 8 semanas y examinados para espiroquetas desde la 2da semana por medio de microscopio de campo oscuro. Las cepas aisladas se conservan en nitrógeno líquido en medio BSK II y glicerol al 15% (36).

El cuerpo de la garrapata fué removido de la gota de medio de cultivo BSK II y colocado en un medio con alcohol isopropílico al 70% y guardado como espécimen de prueba permanente para referencia futura (35).

ANEXO 6

TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN GARRAPATAS CONSERVADAS EN ALCOHOL PARA IDENTIFICACION DE *B. burgdorferi*

Esta etapa se realizó en aquellos especímenes de garrapatas colectados con anterioridad y conservados en etanol al 70%.

Primero se removió la garrapata del alcohol y se secó al aire sobre un disco de papel filtro por 5 minutos.

Por otro lado, perlas de vidrio de 0.1 mm se lavaron con metanol al 50% 3 veces, se mezclaron con una solución de albúmina bovina acetilada al 1% en agua y se incubaron por 30 minutos a 37°C, se calentaron a 95 °C por 10 minutos y se lavaron 2 veces con 0.5 ml de agua. Se colocaron en tubos de microcentrífuga y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Cada garrapata fué colocada en un tubo de 0.6 ml con 20 μ l de perlas de vidrio tratadas. La garrapata se maceró contra las esferas con puntas de pipeta para liberar los intestinos y se adicionaron 25 μ l de buffer para PCR (10 mM tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.75 mM MgCl₂, 0.01% gelatina, 0.5% NP40, y 0.5% Tween 20). Las muestras se hirvieron a 95 °C por 10 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 5 min.

Para confirmar que durante la técnica de extracción no hubo contaminación, se corrió un blanco con el buffer para PCR y las perlas de vidrio simultáneamente.

Un volumen de 5 μ l de sobrenadante con extracto de garrapata se mezcló con amortiguador para PCR que contiene Hidrocloruro de Tris (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.75 mM, gelatina 0.01%, deoxinucleósido trifosfato 200 μ M y 50 μ mol de cada iniciador OSP-149 y OSP-A 319. Los componentes de reacción se sometieron a las siguientes condiciones en un termociclador Perkin-Elmer 480: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, y 45 ciclos a 94 °C durante 45 segundos para desnaturalización, 55°C durante 45 segundos para alineación y 72 °C durante 1 minuto para extensión, al final un ciclo de extensión durante 5 minutos a 72 °C. Posteriormente el producto de PCR se mantiene a 4 °C cuando se hace el corrimiento el mismo día ó se conserva a -20 °C para estudiarse después.

Las secuencias que se usaron en la amplificación fueron:

Del gene ospA 149 a 319 (37):

OspA 149 5'-TTA TGA AAA AAT ATT TAT TGG GAA T 3'

OspA 319 5'-CTT TAA GCT CAA GCT TGT CTA CTG T -3'

Sonda interna Osp A 6 5'- ATT GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC CT-3'

Del gene fla:

fla 5 5' -TTA ATC GAG CTT CTG ATG A-3'

fla 6 5' -ATT TCG TCT GTA AGT TGC T -3'

Sonda interna fla 132 5'-TTG CAT GGG AGT TTC TGG TAA GAT T 3'.

310 5'-TTT GTA TAG AAC CTC TGT CTG CAT C 3'

Del gene 16S rDNA : DDO2 5' -CCC TCA CTA AAC ATA CCT 3'

DDO6 5' -ATC TGT TAC CAG CAT GTA AT 3'

ANEXO 7

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR

Se prepararon 100 ml de gel de agarosa al 2% (SeaKem GTG) con solución amortiguadora TAE, se agregó 0.5 *ul* de bromuro de etidio. A la cámara de electroforesis se agregó 700 ml de solución amortiguadora con 2 *ul* de bromuro de etidio.

Se coloca el marcador de peso molecular de 100 pb , 15 *ul* y 2 *ul* de “loading buffer” en el pozo localizado al extremo izquierdo del gel.

Se mezcla 1 *ul* de “loading buffer” y 10 *ul* del producto de PCR de cada muestra y se coloca en cada pozo.

Se corre a 105 volts durante 30 a 40 minutos.

Se coloca sobre una lámpara de luz UV y se toma la fotografía.

ANEXO 8

TECNICA DE SOUTHERN BLOT EN MUESTRAS POSITIVAS PARA GEN FLAGELAR (Fla 5 y Fla 6) y Osp A 149-319.

ELECTROFORESIS:

- 1.- Se prepararon geles de agarosa al 2% con TAE. Se agregó 10 μ l de cada producto de reacción por pozo más 1 μ l de buffer que contiene bromofenol, y se corrió la electroforesis hasta que el indicador migró 2/3 partes de la longitud del gel. Se agregaron marcadores de peso molecular de 100 a 800 pb.
- 2.- Se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los productos de amplificación.
- 3.- Se colocó en soluciones para desnaturalizar el DNA por 20 minutos
- 4.- Se colocó en soluciones neutralizantes durante 20 minutos.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % SeaKem y entonces los productos positivos por la PCR se transfirieron a una membrana de nylon- Hybond (Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.). Para fijar el DNA la membrana fué expuestas a luz UV por 5 min ó en un horno a 80 oC por 2 horas. Para la unión.; enseguida se prehibridiza en buffer SSPE -5 5X, Solución Denhardt SDS- 5X, con 100 μ l de DNA/ml de esperma de salmón a 55 oC por 1 h. Los filtros serán hibridados con 2×10^6 cpm del iniciador OSP-A 6 marcado con P³² por 4 h. Después de la hibridación, los filtros son lavados 2 veces por 5 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X-SDS 0.1% y uno en SSC 1X-SDS 0.1% a 55 oC por 30 min. Los filtros serán expuestos a película Kodak XAR-5 (35).

HIBRIDIZACION :

DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA.

- 1.- Se unió el oligonucleótido (contiene un hexylthiol unido al final de 5' con peroxidasa de rabano usando el sistema ECL.

2.- Se purificó el oligonucleótido conjugado a peroxidasa por separación electroforética . La membrana se prehibridiza en una solución amortiguadora de ECL para hibridización durante 1 hora a 42 oC.

3.- Se agrega el oligonucleótido purificado a 30 ng/ ml e hibridiza por 2 horas a 42 oC.

4.- Se lavaron las membranas en SSC 1X por 15 minutos a 42 oC se tiró la solución amortiguadora y se lavó por 5 minutos durante 3 veces . Posteriormente se lavó con SSC 1X (SDS y urea 3.4M) a 42 oC durante 3 veces.

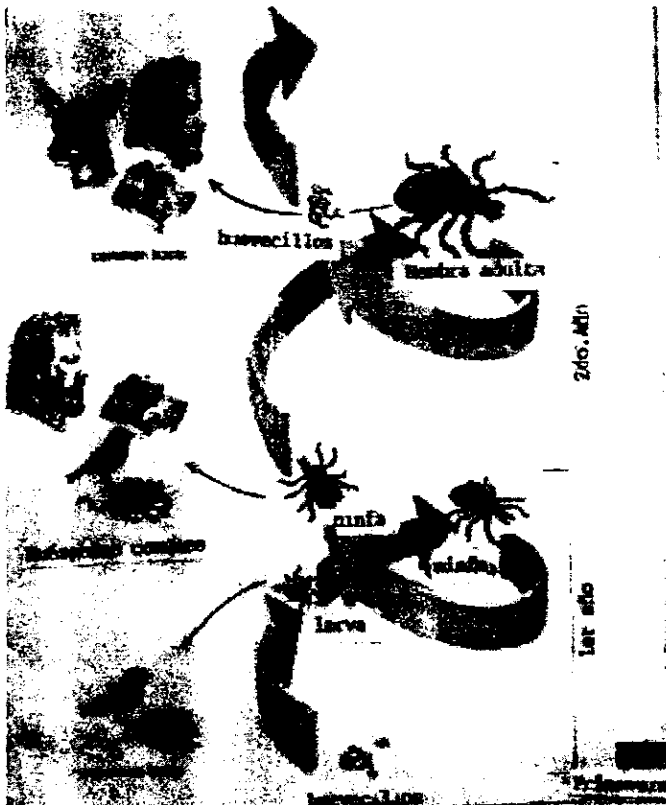
5.- Al final se lavó la membrana en SSC 1X 2 veces a temperatura ambiente durante 5 minutos.

6.- Se sumergió la membrana en solución reveladora, se cubrió con plástico delgado y colocó sobre una placa Kodak X-omat por 5 minutos a 3 horas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

FIGURA 1

CICLO DE VIDA DE LA GARRAPATA *IXODES SCAPULARIS*



Los huevos son depositados en la primavera y la larva emerge varias semanas más tarde. Se alimenta durante el verano, usualmente de mamíferos pequeños como ratones ó grandes mamíferos como perros, venados o humanos antes de mudar a la forma adulta en el otoño. Los adultos atacan a un huésped, usualmente venado cola blanca, donde ellos viven. Los machos mueren corto tiempo después y las hembras continúan alimentándose para el desarrollo de los huevos. Las hembras ponen sus huevos y mueren, y así el ciclo se repite.

FIGURA 2

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS GARRAPATAS
DEL GENERO *IXODES*.

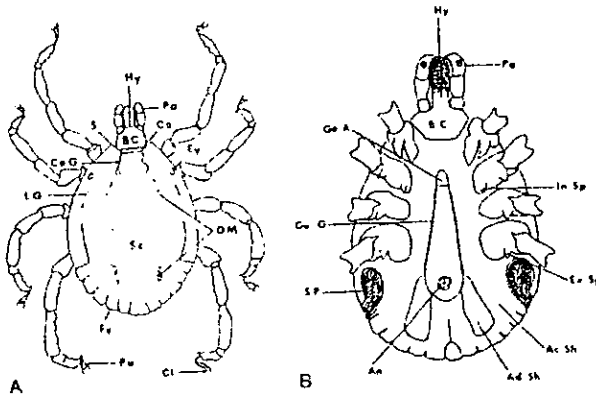


Fig. 2 A. Vista dorsal de la garrapata adulta - macho con las palabras claves como sigue: Sc escudo, Hy= hipostoma, Pa= palpus, Fe= festones . Vista ventral Ge G gnathostoma genital y An= ano.

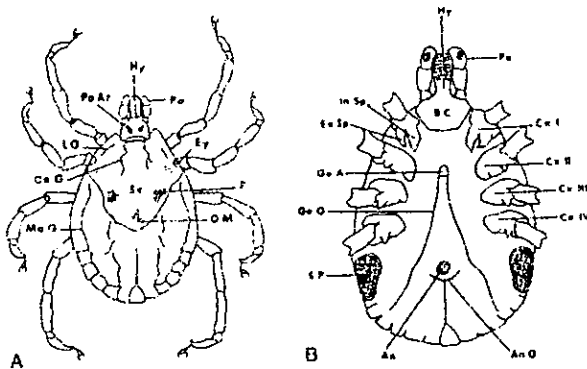
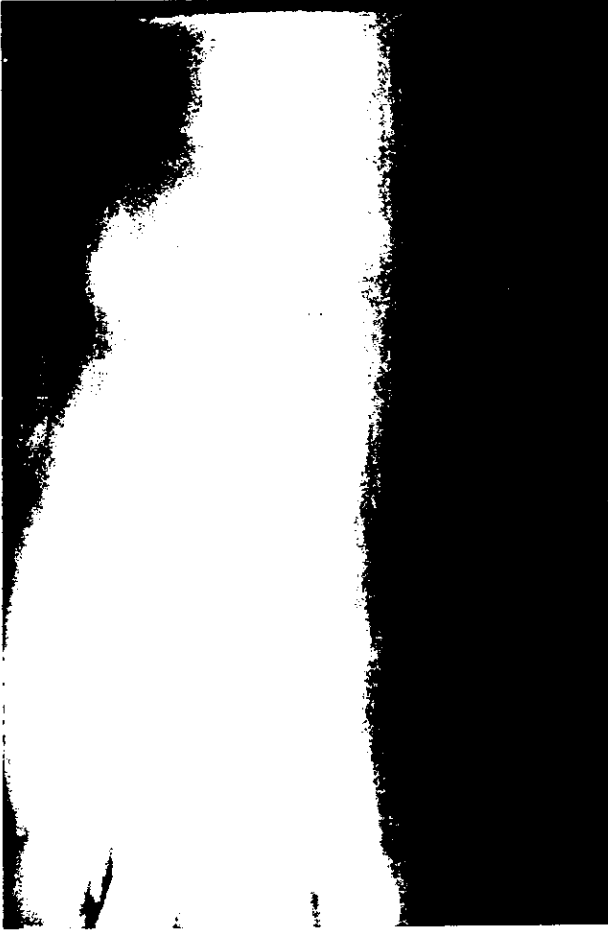


Fig 2-B. Vista Dorsal de una garrapata adulta - hembra. Palabras clave. Sc= escudo, PoAr= rea porosa, Hy= hipostoma, Pa= palpus. Vista ventral. An G apertura genital.

FIGURA 3



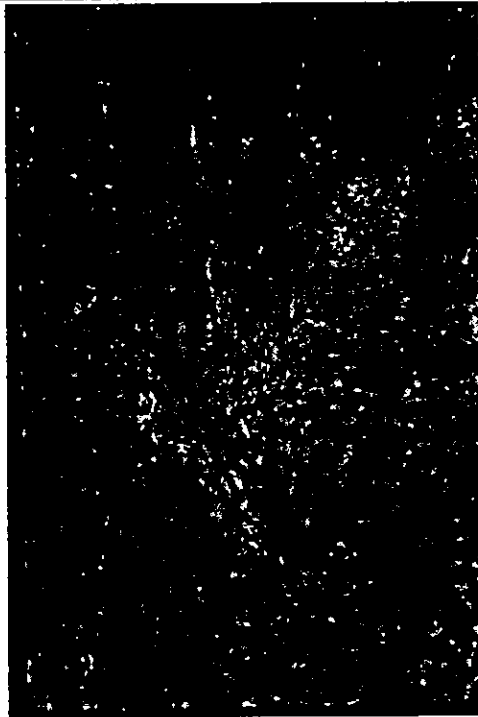
Manifestación temprana de Enfermedad de Lyme
(eritema migrans) en un paciente pediátrico.

FIGURA 4



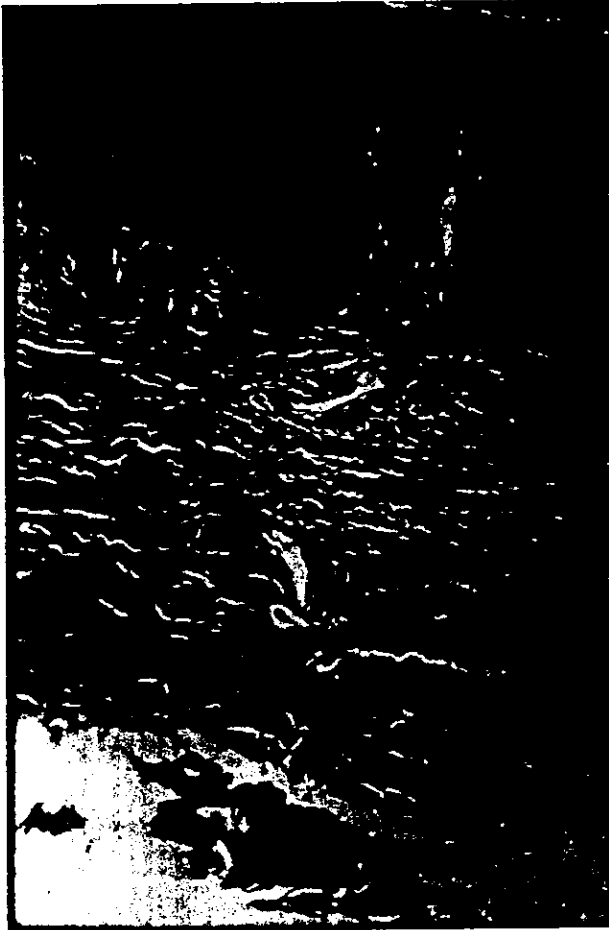
Acrodermatitis crónica atrófica de 7 años de evolución.

FIGURA 5



Corte de biopsia de piel de EM
(eritema migratorio) teñido con
Hematoxilina-eosina que muestra
infiltrado linfocitocitario.

FIGURA 6



Corte de biopsia de piel de paciente con manifestación de Acrodermatitis crónica atrófica teñido con H-E.

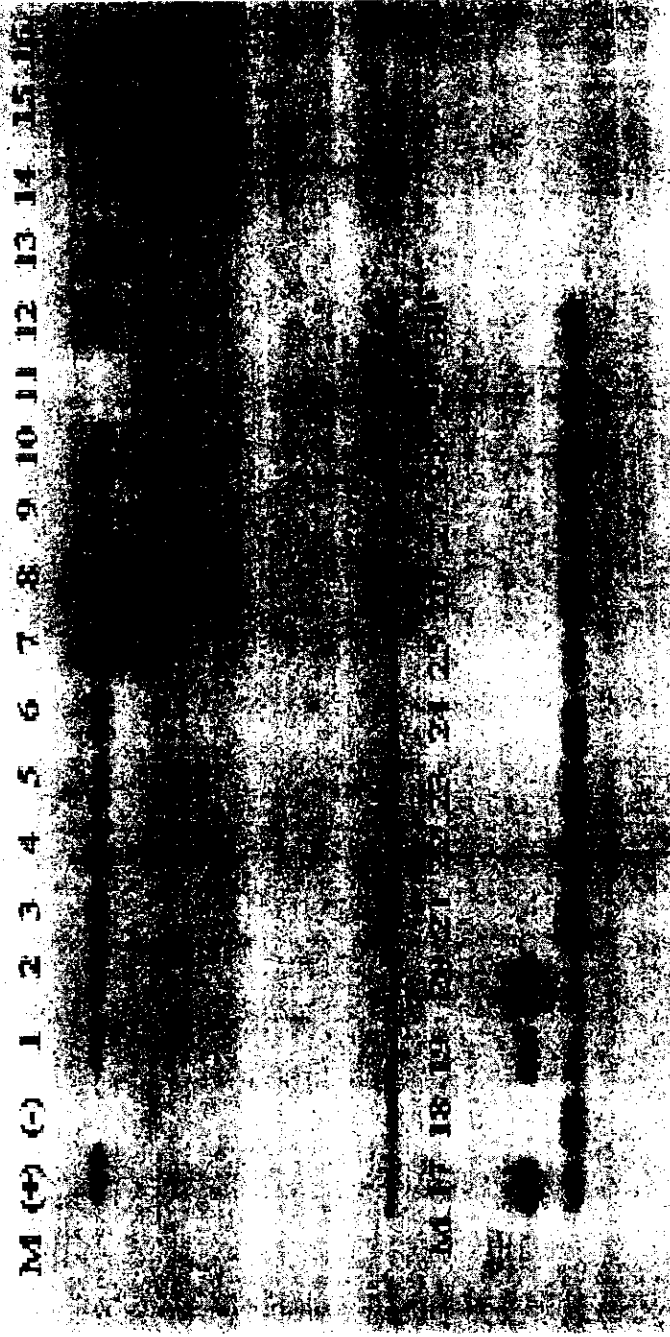
FIGURA 7



Corte de biopsia de piel teñido con tinción de plata (Whartin-Starry) se observan estructuras espirilares sugestivas de espiroquetas.

Figura 8

PCR para el gen de B-globulina de biopsias de piel conservadas en etanol y parafina.



En la columna 4 a la 18 son muestras conservadas en etanol (11 y 18 negativo). A partir de la 19 a 30 son muestras en parafina y sólo se en rajo en 2.

Figura 9

PCR para el gen flagelar de *B. burgdorferi* en LCR

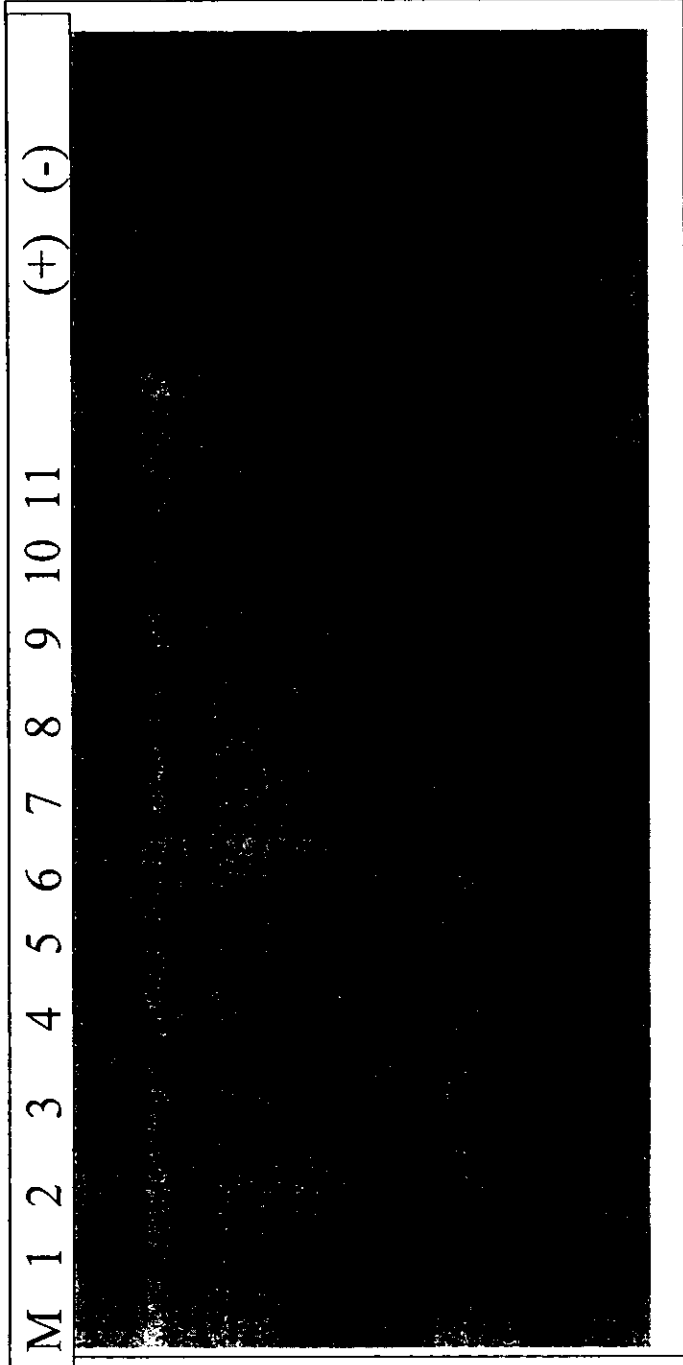
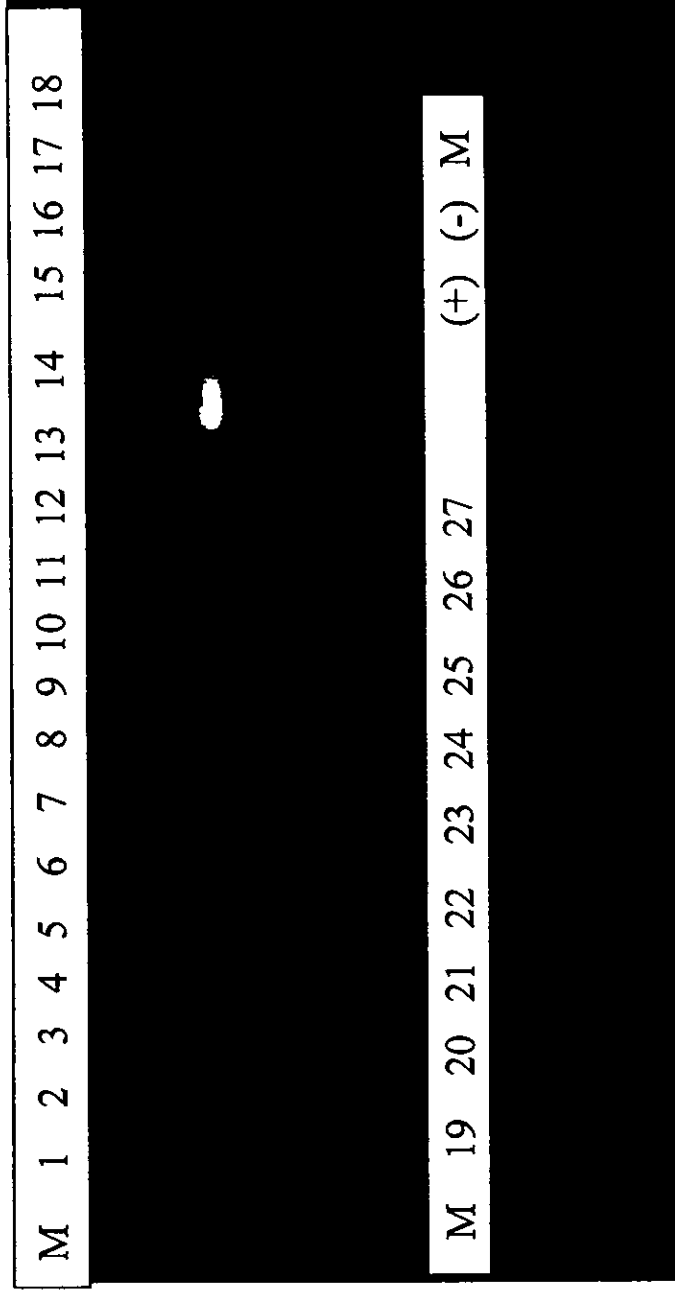


Figura 10

PCR para gen flagelar de *B. burgdorferi* en garrapatas.



27 productos de PCR de tejido de garrapatas negativos para gen flagelar de *B. burgdorferi*.

Figura 11

Southern- blot del Gen Osp A (149-319) de *B. burgdorferi*



1-PCR de
biopsia de piel

2-PCR de LCR.

3-Control
positivo oreja
de ratón
infectado con
Bburgdorferi

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Steere AC, Malawista SE, Snyderman, RE, Shope RE, Andima WA, Ross MR and Steele FM. Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis and Reum* 1977; 20:7-17.
- 2.- Steere A C. Lyme disease: a growing threat to urban populations. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:2378-2383.
- 3.- Steere AC, Grodzicky RL, Kornblat AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorferi W and Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 1983;308:733-40.
- 4.- Baranton G, Postic D, Saint GI. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:378-83.
- 5.- Walther PH, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspect. *Lancet* 1994;343: 1013-16.
- 6.- Vaca GD, Fragoso SH, Franco BR, Martínez IF, Santamaria VM y Soberanes CN. Manual de identificación de las especies de garrapatas de importancia en México. *IICA* 1996;1:30-77.
- 7.- Steere AC, Malawista SE. Cases of Lyme disease in the United States: Locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann Int Med* 1979;91:730-33.
- 8.- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, et al. Capacity of European animals as reservoir host for the Lyme disease spirochet. *J Infect Dis* 1992;165:479.
- 9.- Fujikura T. Report of a WHO workshop on Lyme Borreliosis. *WHO/CDC/VPH* 1993;132: 3-19.
- 10.- Durlan F. Symposium on Lyme disease (Enviromental risk and Prevention of Lyme disease). *Am J Med* 1995;suppl 4 A:2s-5s.
- 11.- Guzman L y Neira O. Lyme disease in Chile. *J Rheumatol* 1993;20:774-5.
- 12.- Fahrer H, Van der LSM, Sauvain M J, Gern L, Zhioua E and Aeschliman A. The prevalence and incidence of clinical and asyntomatic Lyme Borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* 1991;163:305-10.

- at risk. *J Infect Dis* 1991;163:305-10.
- 13.- Rath PM, Ibershoff B, Albig J, Fehrenbach FJ and cols. Seroprevalence of Lyme Borreliosis in forestry workers from Brandenburg, Germany. *Eur Clin Microb Infect Dis* 1996;15:372-7.
 - 14.- Cooper C, Muhlemann MF, Wright DJM, Hutchinson CA, Armstrong R and Maini RN. Arthritis as manifestation of Lyme disease in England. *Lancet* 1987;1:1313-4.
 - 15.- Hanrahan JP, Benach JL, Coleman JL, et al. Incidence and cumulative frequency of endemic Lyme disease in a community. *J Infect Dis* 1984;150:489-96.
 - 16.- Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, Spielman A. Longitudinal assesment of clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J Infect Dis* 1986;154:295-300.
 - 17- Ramírez-Pulido J y Castro- Campillo A. Bibliografía reciente de los mamíferos de México 1989-1993. Ira. ed, Ed.UAM 1994: 88-91 y 163-5.
 - 18 - Maradiaga CMA, Llausás VA y Kumate RJ. Eritema crónico migratorio asociado a artritis. Enfermedad de Lyme (?) o una variante. *Cong Mex Inf XIV* 1989;1 (res):1.
 - 19 - Arroyave CM, Támez GR. Enfermedad de Lyme. Informe de casos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994;51:117-120.
 - 20 - Magos LC, Sánchez Villareal F, Gutiérrez G, Tapia CR. Banco Nacional de sueros. *Salud pública* 1992;34:136-147.
 - 21.- Gordillo PMG, Solórzano SF, Torres LFJ, Cedillo RR, Tapia CR y Muñoz HO. Evidence serologic suggesting the presence of Lyme Disease in Mexico. *Arch Med Res* 1999;30:64-68.
 - 22.-CDC. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR* 1997;46(RR-10):20
 - 23.- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Arkenase PW and Andiman WA. Erythema chronic migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Annals Int Med* 1997;86:685-698.
 - 24- Fan W, Leonardi CL, Penneys NS. Absence of *Borrelia burgdorferi* in patients with scleroderma (morphea). *J Am Acad Dermatol* 1995;33:682-4.

- 25.- Pachner AR, and Steere AC. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 1985;35:47-53.
- 26.- Roggendorf M . Borreliosis de Lyme and tick-borne encephalitis. *Infection* 1996;24:465- 468.
- 27 - Balcer LJ, Winterkorn JMS and Galetta SL. Neuro-ophthalmic manifestations of Lyme Disease *J Neuro-Ophthalmol* 1997;17:108-21.
- 28.-Steere AC, Batsford WP and col.. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Int Med* 1980;93:8-16.
- 29.-Shapiro DE , Steere AC and Lesser RL. Lyme disease in children, musculoskeletal and ocular manifestations of Lyme disease. *Am J Med* 1995;98 (suppl 4A): 44A-73.
- 30.- Rusell H, Sampson JS, Schmid GP, Hazel WW, and Plikayti B. Enzyme-Linked Immunofluorescence Assay and Indirect Immunofluorescence Assay for Lyme Disease 1984;149:465-470.
31. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, and Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993;167:392-400.
32. Craven RB, Quan TJ, Bailey RE, Dattwyler R, Ryan RW, and Gubler DJ. Improved serodiagnostic testing for Lyme disease: Results of a multicenter serologic evaluation. *Emerg Infect Dis* 1996;2:136-140.
33. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G and Hogrefe W. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi Sensu Stricto*, *B. garinni*, and *B. afzelii* Western Blots (immunoblots). *J Clin Microb* 1996;34:1732-1738.
- 34.- Magnarelli LA. Serologic diagnosis of Lyme disease. *Ann New York Acad Science* 1989;1:154-161.
- 35.- Mathiesen DA, Oliver JH, Kolbert CP, Tullson DE, Johnson BJ, Campbell G L, Mitchell PD and Persing D H. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the United States. *J Infect Dis* 1997;175:98-107.
- 36.- Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF and Riviere GR. Cross-Reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microb* 1990;28:1276-79.

- 37.- Johnson B J B, Robbins KE, Dennis DT, and Cols. Serodiagnosis of Lyme disease:Accuracy of a Two-step approach using a flagella based ELISA and immunoblotting. J Infect Dis 1996;174:346-53.
38. Persing DH, Teldorf SR, Spielman AS, and Barthold SW. Detection of *B. burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polimerase chain reaction. J Clin Microb 1990;28:566-72.
- 37.- Anderson JF and Magnarelli LA. Epizootiology of Lyme Disease and Methods cultivating *Borrelia burgdorferi* Trop Vet Med 1992;653: 52-63.
- 38.- Persing DH, Telford SR, Rys PN, Dodge DE, Malawista SE and Spielman A. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. Science 1990;249:1420-1423.
- 39.- Hilton E, Devoti J and Sood S. Recommendation to include OSP A and OspB in the new immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. J Clin Microb 1995;34:1353 -1354.
- 40.- Hauser U, Lehnert G, Lobentanzner R and Wilske B. Interpretation criteria for standarized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J Clin Microb 1997;35:1433-1444.
- 41- Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N and Hofman H. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin Borreliosis J Clin Microbiol 1998; 36:2658-65.