

11219
3
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI**

**ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA DE ESPECIALIDAD
DE LYME EN LA REPUBLICA MEXICANA**



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALIZACION EN INFECTOLOGIA Y ECOLOGIA MEDICA
P R E S E N T A :
DRA. MARIA GUADALUPE GORDILLO PEREZ

**TUTORES: DR. FORTINO SOLORIZANO SANTOS
DR. FRANCISCO JAVIER TORRES LOPEZ**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO:
DR. FORTINO SOLORIZANO SANTOS**



MEXICO, D.F.

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mis padres:

A mi madre que siempre me brindó su apoyo incondicional y a mi padre quien permanece en mi memoria con su enseñanza de dar e intentar ser un buen profesionalista.

A mi esposo e hijo

Quienes me acompañaron en los momentos más difíciles de esta etapa y compartieron mis éxitos.

A mis hermanos

Quienes estuvieron conmigo cuando los necesité.

A mis maestros:

Dr. Fortino Solórzano

Dr. Humberto Díaz

Dr. Guillermo Vázquez

Dr. Gerardo Palacios

Dr. Javier Torres

Dra. Guadalupe Miranda

Quienes me enseñaron y guiaron en
el camino del conocimiento en forma
desinteresada y me brindaron su amistad
incondicional.

**A la Dra. Rocio Espinoza Casas
con quien en dos años compartí
angustias y emociones durante el
cambio radical de residencia y
ambiente hospitalario.**

**El presente trabajo fué realizado en la Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Infecciosas y Parasitarias ubicada en el Hospital de Pediatría del
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS .
Fué apoyado por CONACyT (0524P-M9506).**

CONTENIDO

	Página
<i>RESUMEN</i>	1
<i>ANTECEDENTES</i>	2
<i>JUSTIFICACION</i>	5
<i>OBJETIVO</i>	6
<i>MATERIAL Y METODOS</i>	7
<i>RESULTADOS</i>	13
<i>DISCUSION</i>	14
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	18
<i>FIGURA 1</i>	21
<i>FIGURA 2</i>	22
<i>FIGURA 3</i>	23
<i>TABLA 1</i>	24
<i>TABLA 2</i>	25

ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA DE ENFERMEDAD DE LYME EN LA REPUBLICA MEXICANA.

Gordillo Pérez María Guadalupe*, Solórzano Santos Fortino* y Torres López J.**
Servicio de Infectología* y Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias ** Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI.

INTRODUCCION: La Borreliosis de Lyme es una zoonosis transmitida por garrapatas y causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Se ha reportado en Europa, Asia y en 3 áreas enzooticas en Norteamérica, aparentemente la infección se ha diseminado a nuevas áreas. En la República Mexicana se han reportado casos sospechosos desde 1989 en Culiacán, Sinaloa y en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León en 1994.

OBJETIVO: Determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra *B. burgdorferi* en la República Mexicana. **MATERIAL Y METODOS:** Se estudiaron 2890 sueros de sujetos de uno a 90 años de edad obtenidos durante la Encuesta Nacional Seropidemiológica realizada en 1987-1988 en áreas rurales y urbanas de los 32 estados del país. Se realizaron determinaciones de anticuerpos IgG por el método de inmunoensayo enzimático (ELISA) usando como antígeno extracto total de *B. burgdorferi* proporcionado por el Dr. Alan G. Barbour (Department of Microbiology of the University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas). Se estandarizó la técnica con 25 sueros de donadores sanos y un control positivo formado por un conjunto de sueros positivos de 5 pacientes con enfermedad de Lyme confirmada en una zona de alta endemidad (Connecticut FMA) y se hizo el ensayo 5 veces. El valor de corte (VC) se obtuvo como el promedio de la absorbancia (D.O.) de los 25 sueros controles mas 3 desviaciones estándar, usando una dilución 1:640 de las muestras séncas. Cada muestra séncas fue examinada 1:640 por duplicado, y el promedio D.O. se dividió con el VC, el valor mayor de 1.0 fue considerado positivo. Todos los sueros positivos se confirmaron por cuadruplicado, y estos se titularon probándose a diluciones 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120. Se estudió la especificidad de los sueros positivos realizando ensayos de inmunotransferencia determinando los antígenos flagelar y de membrana externada *B. burgdorferi*. **RESULTADOS:** Un total de 2890 sueros fueron estudiados de los cuales 34 fueron positivos para anticuerpos IgG contra *B. burgdorferi* correspondiendo a una seroprevalencia de 1.1%. La proporción entre sexos fue de 1, el grupo de edad con mayor prevalencia fue el de 20 a 59 años, sin embargo hubo un sujeto positivo de 1 año de edad, 9 sueros fueron confirmados con el método de inmunotransferencia de proteínas de específicas de *B. burgdorferi* correspondiendo al 0.30% de seroprevalencia nacional. Las zonas de mayor prevalencia fueron Noreste y Centro del país. **CONCLUSION:** En 1988 el 1% de la población mexicana estudiada estaba infectada con *B. burgdorferi*, es relevante el que existan zonas con mayor seroprevalencia

ANTECEDENTES:

La Borreliosis de Lyme es una zoonosis que es transmitida por garrapatas causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) (1).

Existen 4 especies de garrapatas que son vectores competentes en Europa *Ixodes ricinus* e *I. persulcatus* y en Norteamérica *Ixodes pacificus* y *scapularis* (2) Las especies encontradas en Norteamérica están distribuidas en México en los estados de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Nuevo Leon, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Jalisco, Colima, Hidalgo, Campeche y Quintana Roo (3)

La garrapata *I. scapularis* en su forma inmadura (larva y ninfa) tiene una prevalencia de infección por *B. burgdorferi* de 20 a 25% siendo responsable de cerca del 90% de los casos de enfermedad de Lyme (4). Esta garrapata se alimenta primariamente de ratones patas blancas (*Peromyscus leucopus*) del que se infectan el 100% de las ninfas. En su forma adulta se alimenta de grandes mamíferos como venado, caballos, ganado bovino, perros, mapaches y zorros (5,6) . El paso de espiroquetas de una generación de garrapatas a la siguiente a través de reservorios constituye el ciclo enzoótico de enfermedad de Lyme.

La Borreliosis de Lyme se ha reportado en todos los países Europeos, algunos de Asia y en 40 estados de los Estados Unidos de América. En Australia se ha descrito una enfermedad similar a Borreliosis de Lyme sin que se haya aislado *B. burgdorferi* de garrapatas, fauna ó pacientes (1). En los países europeos la enfermedad de Lyme está distribuida de forma endémica con una prevalencia en Alemania en trabajadores forestales del 8 % a 27% (7,8), en Suecia en trabajadores forestales y colocadores de palos de golf existe evidencia serológica de infección asintomática en 8.1% (7), y en población abierta de Inglaterra (Londres y Southampton) del 1 a 7% (9) . En Estados Unidos de Norteamérica ha sido confinada a 3 áreas enzoóticas (Costa Noreste, Medio Oeste y California), donde la prevalencia varió de 0 a 10%, los casos se han incrementado y la infección se ha diseminado a nuevas áreas (10,11).

En 1989 en la República Mexicana se reportaron 20 casos de pacientes con eritema crónico migratorio asociado a artritis en la Ciudad de Culiacán , Sinaloa; lográndose en un

caso observar la espiroqueta en biopsia de piel y 3 casos con serología positiva por el método de Inmunoensayo-enzimático (ELISA) ; en los 17 restantes la serología fue negativa , sin embargo hubo mejoría clínica posterior al tratamiento único o combinado con tetraciclina y penicilina (12). En 1994 en la Cd de Monterrey , Nuevo León se reportaron 2 casos diagnosticados por medio de la determinación de IgG e IgM para *B. burgdorferi* . En ambos reportes los estudios de ELISA se realizaron en el CDC en Atlanta, Georgia (13)

Las manifestaciones clínicas de Enfermedad de Lyme se divide en 3 estadios: los primeros 2 estadios representan la fase temprana de la enfermedad que ocurre en pocas semanas o meses después de la infección.

El eritema migrans es el signo inicial que se manifiesta como una lesión circular papular eritematosa con diseminación centrifuga que pueden desarrollarse 3 días a 16 semanas (promedio 1.5 semanas) después de una picadura por garrapata y se resuelve espontáneamente en pocas semanas y meses. Existe afectación de varios órganos y sistemas, probablemente por diseminación hematogena que se presentan como (14):

- 1) Manifestaciones cardiacas: comúnmente transitorias, como alteraciones del ritmo, bloqueo atrioventricular de varios grados, miopericarditis y falla cardiaca.
- 2)Manifestaciones neurológicas como meningoencefalitis, meningoradiculoneuritis (Síndrome de Bannwarth), neuritis craneal, neuritis de plexos, mononeuritis múltiple, y raramente encefalitis, mielitis y vasculitis cerebral.
- 3) En piel se presenta el linfocitoma borreliol que se caracteriza por un tumor rojo en lóbulo de la oreja con proliferación linforeticular.
- 4) Alteraciones oculares: conjuntivitis, iridociclitis, coroiditis, neuropatía óptica con papiledema, panoftalmítis.

En la etapa tardía hay involucro crónico y progresivo de piel con acrodermatitis crónica atrófica, encefalitis ó encefalomielitis y artritis oligoarticular de grandes articulaciones 6 meses ó años después de la infección en cerca del 60% de pacientes no tratados con eritema migrans (14).

El diagnóstico de la enfermedad ha sido problemático:

A) Por el bajo porcentaje de aislamiento en los cultivos de líquidos corporales .
B) Dificultad para interpretar estudios de biopsia con técnica de inmunohistoquímica C)
Dificultad para interpretar los estudios serológicos para el diagnóstico de infección por
métodos de anticuerpos inmunofluorescentes IFA, ELISA e inmunotransferencia de
proteínas. Este último punto es debido a:

1) El resultado es dependiente del estadio clínico de la enfermedad. En el estadio temprano
los resultados serológicos por ELISA son negativos o la respuesta puede limitarse sólo a
los polipéptidos más inmunogénicos (15).

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 también en enfermedades autoinmunes, mononucleosis infecciosa y
fiebre de las montañas rocosas (15,16)

3) La variabilidad de la respuesta inmune en diferentes pacientes.

4) El efecto del tratamiento antibiótico temprano que puede abortar una respuesta inmune
y dar resultados negativos (16).

5) La presencia de diferentes genoespecies y cepas de *B. burgdorferi* a nivel mundial

en la interpretación de los estudios de inmunotransferencia de proteínas (17).

Para disminuir la reactividad serológica cruzada se ha incrementado el valor de corte en
estudios de ELISA e IFA a \geq de 1:256 , a pesar de la cual se encuentran respuestas falsas
positivas. Por lo anterior se realizan estudios de VDRL ó RPR (rapid reagin card) para los
que *B. burgdorferi* no es reactiva (16) y la adsorción de *T. phagedenis* y *T. denticola* con
lo que se incrementa la especificidad hasta un 97%. El uso de antígenos monoclonales ó
fracciones antigénicas recombinantes de *B. burgdorferi* ó el estudio de otras muestras (
líquido cefalorraquídeo u orina) pueden también aumentar la especificidad (18).

JUSTIFICACION:

Los siguientes aspectos justifican la realización del presente estudio:

1.- La Enfermedad de Lyme es endémica en Estados Unidos de Norteamérica y México comparte frontera geográfica, hay migración de aves (reservorios de garrapatas del género *Ixodes*), migración de habitantes e intercambio comercial de insumos.

2.- Se ha documentado la presencia de los reservorios y los vectores conocidos como transmisores de la bacteria en los estados de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Durango, Jalisco, Colima, Hidalgo, Tabasco y Campeche.

3.- En los estados de Sinaloa y Nuevo León se han reportado los primeros casos de una enfermedad semejante a la Borreliosis de Lyme.

Debido a que la información en nuestro país es limitada es importante determinar la presencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* con un estudio de escrutinio para apoyar la presencia de Borreliosis de Lyme como una enfermedad prevalente en la población Mexicana.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* en la República Mexicana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- A) Estandarización y validación de la prueba de Inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de Borreliosis de Lyme en México.
- B) Validar ELISA con el estudio de inmunotransferencia de antígenos proteicos de *B. burgdorferi*.
- C) Conocer la localización por entidad federativa de los sujetos seropositivos a IgG contra *Borrelia burgdorferi* en la República Mexicana.

MATERIAL Y METODOS:

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

Los sueros estudiados se colectaron durante la Encuesta Nacional Seroepidemiológica realizada en 1987-1988 por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud.

El marco muestral maestro estuvo integrado por 791 municipios, 1342 Unidades Primarias de muestreo, 3865 áreas geoestadísticas, 8764 áreas de listado y 429440 viviendas, éstas se agruparon de acuerdo al estrato socioeconómico, recolectándose más de 70.000 sueros (19)

El tamaño muestral se determinó tomando en cuenta los siguientes factores:

- a) La frecuencia del fenómeno a estudiar.
- b) El nivel de precisión deseado. El intervalo de confianza seleccionado fué de 95% y el coeficiente de variación de 0.30 correspondiente a una $P=0.01$. Se aceptó que el nivel de precisión de diferentes regiones, entidades federativas, grupos de edad, estratos pudiera ser menor, dependiendo de la frecuencia del fenómeno estudiado.
- c) La tasa de no respuesta, que se define como el número de individuos de los que no es posible obtener la muestra de sangre (20).

Los sueros del presente estudio son una submuestra y el tamaño muestral se calculó para una prevalencia esperada del 5% con un error relativo del 22% y el intervalo de confianza del 95%.

2

$$n = Z (1-P) \text{Deff} / r \times p$$

$$Z = 1.96$$

$$P = 0.5$$

$$\text{Deff} = 2$$

$$r = 0.22$$

$$n = 3016$$

Los 3016 sueros fueron seleccionados aleatoriamente de áreas rurales y urbanas de todos los estados de la República Mexicana los cuales fueron proporcionados por el Banco Nacional de sueros.

Todos los sueros fueron procesados por el método de inmunoensayo-enzimático para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *B. burgdorferi* (15).

El antígeno de extracto celular completo de *Borrelia* (cepa B31) fue proporcionado por el Dr. Alan G. Barbour (Department of Microbiology of the University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas).

El antígeno se obtuvo de un subcultivo de la espiroqueta en *Ixodes scapularis* (antes *I. dammini*) crecido en medio BSK 11 por 5 a 7 días. Las espiroquetas fueron cosechadas por centrifugación a 21,000 g por 30 minutos a 15°C lavadas 3 veces en PBS 0.01 M (pH 7.2) y depositada nuevamente en 10 ml de PBS para almacenarse a 4°C. El sedimento obtenido de un cultivo líquido de 350 ml fue suspendido en 15 ml de PBS y mezclado con un volumen igual de NaCl 2 M. La suspensión fue sonicada en un baño con hielo por 10 minutos con un sonicador Biosonik IV (VWR Scientific, San Francisco) al 60% de la máxima intensidad.

El sonicado fué centrifugado a 21,000 g/min a 4 oC. El sedimento fué posteriormente resuspendido en un tubo con 5 ml de NaCl 1 M y la suspensión fué centrifugada nuevamente. La fracción soluble fué dializada con varios cambios de agua bidestilada, y finalmente dializada en contra de PBS (15).

El extracto del antígeno se ajustó a 5 mg/ml de proteína y se almacenó a -20 oC hasta su uso.

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA:

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, y fueron donados por el Dr. L. Magnarelli. El control positivo estuvo formado por 5 sueros de pacientes con enfermedad de Lyme, con diagnóstico clínico, microbiológico y serológico, y como control negativo 5 sueros de sujetos no infectados.

Usando los sueros anteriores como referencia, se estudiaron 88 sueros de donadores mexicanos sanos, para seleccionar 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 positivos en EUA y Europa, el 17% de los sueros de donadores fué positivo, esta es una seroprevalencia muy alta para sujetos sanos aún en un país endémico. Se decidió tomar la dilución de suero 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 (Tabla 1).

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 (pool) de los 5 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.

Se definió como valor de corte para cada uno de estos tiempos el promedio de la absorbancia de los 25 sueros negativos más 3 desviaciones estándar. Este ensayo se repitió

durante 5 días consecutivos (Fig 1) y con los valores de corte y los valores de absorbancia del pool positivo se construyó una curva de regresión lineal (Fig 2).

En cada placa donde se probaron los sueros del estudio, se incluyó el pool positivo por cuadruplicado, y el promedio de absorbancia se interpoló en la curva de regresión lineal para calcular el valor de corte para las placas de forma individual.

TECNICA DE ELISA

La técnica se realizó de acuerdo a el procedimiento descrito por Engvall y Perlman (15).

1.- Las placas de microtitulación con fondo plano (Labsystem) se sensibilizaron durante 18 hrs con 50 ul del antígeno a una concentración de 5 ug de proteína/ml en un amortiguador de carbonatos 0.1 M (pH 9.6).

2.- Se agregaron 200 ul de bloqueador (leche descremada en polvo al 5 % diluida en PBS 1 X) en cada pozo.

3.- Incubar mínimo 1 hora 15 minutos a 37 °C y cubrir.

4.- La placa fue lavada 3 veces con solución que contiene PBS 1X, tween 20 al 0.05% y timerosal (PBSTT).

5.- Se realizaron diluciones 1:640 de cada suero y se agregaron 60 ul en diferentes pozos, y las placas se incubaron a 37°C por 1 hora.

6.- Después de la incubación primaria de suero, las placas fueron lavadas 5 veces con PBSTT.

7.- Se agregaron 60 ul de inmunoglobulina anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina. (Southern Biotech, Birmingham, USA) se diluyó 1:1000 en PBS-leche descremada).

8.- Las placas serán incubadas a 37°C durante 1 hora

9.- Lavar 5 veces con PBSTT.

10.- Agregar 60uL de sustrato (para-nitrofenil fosfato) en un amortiguador de dietanolamina al 0.05 Nl (pH 9.8) a cada pozo.

11. Las placas serán incubadas a 37oC por 1 hora.

12.- Leer valores de absorbancia que serán medidos a 405 nm en un Lector Labsystem.

Cada muestra sérica fué examinada por duplicado a una dilución 1:640 y el promedio de absorbancia de las 2 lecturas se dividió entre el valor de corte y se expresó en unidades ELISA; valores ≥ 1.0 fueron considerados positivos. Los sueros que resultaron positivos se confirmaron repitiendo el ensayo por cuadruplicado y titulando los sueros a diluciones 1:640, 1:1280, 1:2560 y 1:5120.

A todos los sueros de sujetos con determinación de IgG para *B. burgdorferi* por ELISA positivo se les realizó Inmunotransferencia para antígenos proteinicos de membrana externa, de choque térmico y flagelar.

INMUNOTRANSFERENCIA:

1.- Se determinó la cantidad necesaria de antígeno (el mismo usado en ELISA) a correr en un gel de 10 cm para que pudieran ser detectados claramente los diferentes antígenos, después de transferir a nitrocelulosa, con la mezcla de sueros positivos (pool positivo). Se encontró que se requerían 200 μ g de antígeno por gel.

2.- El antígeno completo fué sometido a electroforesis en gel de poliacrilamina al 12.5% (En minigel de 10 cm, 0.75 mm de grosor; con una proporción acrilamida- bis acrilamida 30:2.7) a 20oC y 200 V. las proteínas del gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa a 4oC y 400 mA por 2 horas. El papel de nitrocelulosa fué colocado en amortiguador salino-TRIS (TBS: 20mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7.6) y Tween 20 por 10 minutos.

Las tiras fueron bloqueadas en leche descremada al 5% en TBS-M después lavadas 3 veces entre cada paso con TBS en tween 20 (TBS-T) al 0.1%. se incubó con suero de paciente (1:100 en TBS-M) 1 hora a temperatura ambiente, se lavó y se incubó con anticuerpos de ratón antiIgG humana (Southern Biotech, Birmingham AL) conjugado con

fosfatasa alcalina, 1:500 en TBSS-M durante 1 hora a 20oC. El sustrato consistió de 1 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) con 30 mg de cloruro de nitroazul de tetrazolio y 1 ml de DMF con 15 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato mezclado en 100 ml de amortiguador de carbonatos (NaHCO3 100mM, 1mM MgCl2, pH 9.8) la membrana se incubó por 10 minutos a 20oC. Las mismas muestras usadas como controles positivo y negativo en ELISA se incluyeron en el ensayo de inmunotransferencia, así como sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes (Lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y enfermedad por anticuerpos antifosfolípidos), sífilis, leptospirosis y sospechosos de dar reacción cruzada (16).

Los criterios para inmunotransferencia positiva fueron la presencia de 3 ó más bandas de las 10 recomendadas por el CDC/ASTPHLD (18,24 (Osp C), 28,30,39,41,45,58,66, y 93 kDa) (21) y se agregaron Osp A y OspB (31 y 34 kDa) (22).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

El diseño del estudio es observacional, descriptivo, transversal (encuesta).

Se realizó análisis de frecuencias simples estratificado por grupos de edad, sexo y entidad federativa y se calculó la tasa de prevalencia.

Se obtuvo el intervalo de confianza del 100% de los resultados con la siguiente fórmula:

$$P \pm Z (1-\alpha)/2 \sqrt{P(1-p)/n}$$

RESULTADOS:

De la submuestra calculada de 3016 muestras séricas se estudiaron 2890 ya que al final hubo una pérdida de 126 sueros (no se pudieron recuperar del Banco Nacional de Sueros) lo que representó el 96% del tamaño muestral calculado; por lo que se conserva el error relativo inicial de 22% y el 95% de confianza; De los 2890 sueros estudiados, 34 fueron positivos para el ensayo de ELISA confirmados por cuadruplicado y titulación del suero, lo que representó el 1.1% de la población, con un intervalo de confianza (0.74% - 1.45%). Los títulos de los sueros fueron 32 a una dilución 1:640 y dos a una dilución 1:1280. A los sueros positivos por este método se les realizó inmunotransferencia y fueron confirmados como verdaderos positivos solo 9 sueros, lo que representa el 0.31% con un intervalo de confianza (0.13-0.51) del total de la población.

Los criterios de positividad fue con 3 bandas o más de las sugeridas como criterios de positividad para inmunotransferencia por el CDC/ ASTPHLD en Estados Unidos de Norteamérica (Centro para el control y prevención de enfermedades/ Asociación de la Dirección de Laboratorios de Salud pública y del Estado) (21) y agregamos los antígenos de las proteínas Osp A y Osp B de 31 y 34 kDa respectivamente (22). En la Tabla 2 se muestran los resultados de inmunotransferencia con los sueros positivos por ELISA y de los sueros de pacientes con otras enfermedades crónicas. Las bandas que fueron reconocidas por sueros de estos últimos pacientes fueron consideradas inespecíficas y no se incluyeron en las 3 o más bandas reconocidas por los verdaderos positivos.

La caracterización de los 9 casos positivos se describe en la tabla 2 y la localización de los casos se representa en la figura 3.

DISCUSION:

A pesar de existir evidencias aisladas de casos clínicos sospechosos de Enfermedad de Lyme en nuestro país desde hace 8 años (12,13) ; no se han hecho estudios para confirmar la presencia de la enfermedad en México. Este estudio es el primer intento de buscar evidencias serológicas de la existencia de la infección .

Para realizar este estudio exploratorio, se estandarizó el inmunoensayo más aceptado en E.U. y Canadá, donde la enfermedad es endémica (15). Existen algunos puntos que dificultan la validación de esta prueba en nuestro medio :

- 1) La prueba tiene baja sensibilidad y especificidad en zonas con una prevalencia alta de infección (15) y es de esperarse, que sea también menos eficiente en zonas de baja prevalencia como quizá lo sea México.
- 2) La sífilis y otras infecciones por treponemas que en México cruzan antigénicamente con la prueba (16).
- 3) Desconocemos si en nuestro medio *B. burgdorferi* sensu stricto es la especie prevalente y las pruebas usadas en EU y Canadá usan antígenos de esta especie (15) .

Para realizar una estimación válida de la prevalencia de una enfermedad se requiere de pruebas diagnósticas confiables que permitan definir especificidad de las pruebas serológicas. En la Borreliosis de Lyme el aislamiento de *B. burgdorferi* en muestras clínicas es muy difícil, por lo que el diagnóstico microbiológico no es posible en muchos casos (18) y no hay referencias estandar válidas cuando no existe el antecedente de exposición, como las manifestaciones clínicas de Enfermedad de Lyme no son únicas, frecuentemente se confunde con otros diagnósticos y en casos individuales es difícil diferenciar entre infección asintomática y un resultado falso positivo con la técnica de ELISA (13) . La prueba de ELISA que actualmente se usa da reacción cruzada con *Treponema pallidum* en un 32% (15) además de cruzar con otras espiroquetas como *Treponema denticola* (16) .

Para reducir los problemas en la exactitud y precisión de los estudios serológicos utilizamos un grupo de donadores sanos que tenían residiendo más de 5 años en una zona con altitud mayor de 1500 metros sobre el nivel del mar lo que disminuye

considerablemente la posibilidad de exposición a *B. burgdorferi* (7). Se realizó el ensayo de ELISA por cuadruplicado como estudio de escrutinio teniendo en mente que en sujetos sospechosos la prueba tiene una especificidad de 69 a 79% con el antígeno celular completo de *B. burgdorferi* cepa B31 (21). Cuando se usó la dilución de suero 1:320 recomendada para otros países (15) encontramos que un 17% de los donadores sanos fueron reactivos a la prueba, por lo que probamos diluciones mayores y encontramos que una dilución 1:640 redujo la reactividad inespecífica. Los sueros positivos 1:320 fueron negativos en el ensayo confirmatorio de inmunotransferencia, lo que confirma que esta dilución daba resultados falsos positivos. Por lo que se utilizó la dilución 1:640, se definió el valor de corte como el promedio de absorbancia de los 25 sueros controles más 3 desviaciones estándar con el fin de incrementar la especificidad, aunque con el riesgo de disminuir sensibilidad.

Dada la pobre utilidad del ELISA, ahora se acepta que esta es una prueba de escrutinio y que los sueros positivos deben confirmarse con otra prueba (21,23). El método confirmatorio que se usa es el reconocimiento de algunas proteínas en el ensayo de inmunotransferencia que incrementa la especificidad de la prueba de ELISA en 20 a 30% más con lo que se logra un 90 a 98% de especificidad con el antígeno celular completo de la cepa B31 (21).

En un estudio de pacientes con enfermedad temprana en E.U. se sugirió que el reconocimiento de 4 ó más proteínas por anticuerpos IgG sin importar su tamaño era un criterio de positividad; sin embargo esto originaba resultados falsos positivos (16). Dresler et al. reportó que la enfermedad temprana se asocia con el reconocimiento de la banda de 41 kDa que corresponde al antígeno flagelar y la presencia de una banda de 22 kDa que corresponde a la proteína Osp C. La enfermedad tardía se asoció al reconocimiento de una banda de 93 kDa que corresponde a una proteína de membrana externa y Karlson et al. en Suecia en pacientes con meningitis de Lyme definió como positivo en inmunotransferencia para IgG el reconocimiento de la banda 41 kDa más una banda de 18, 21.5 ó 23 kDa resultando en una sensibilidad del 78 a 82% (16).

Zöler et al. en Alemania reportó que el reconocimiento de las bandas 21, 30, 73 y 93 kDa para enfermedad tardía tiene una especificidad del 97% ; pero una sensibilidad muy baja de 23% (16). Ma et al. encontró en sujetos americanos sanos reactividad de la banda de 41 kDa y la banda de 39 kDa en el 11% de sujetos con sífilis (16,23). Dressler et al. observó la banda de 39 kDa en la mitad de casos con sífilis y en pacientes con Enfermedad de Lyme tardía (artritis, encefalopatía ó polineuropatía) (16)

Este estudio realizado con sueros colectados en 1988 de población abierta de áreas rurales y urbanas , el 1% de la población mexicana presento anticuerpos IgG reactivos contra *B. burgdorferi* por método de ELISA . Los sueros positivos fueron probados por inmunotransferencia usando los criterios CDC/ASTPHLD más las proteínas de 31 y 34 kDa (22) ; esto motivado por estudios donde se observa la presencia de variaciones en las bandas por técnica de inmunotransferencia de acuerdo a las geno-especies y cepas de borrelia (19). Criterios rígidos de interpretación por el CDC falla en estas pequeñas diferencias. Con estos criterios se confirmó la seropositividad en 0.31% de la población estudiada (24). Los casos positivos se localizaron en el Noreste (estados de Coahuila, Monterrey y Nuevo León), Zona Centro- Occidente (Puebla, D.F., Jalisco) y Veracruz; es interesante señalar que en estas zonas de México se ha reportado la existencia del vector *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* (3).

A semejanza de lo reportado en otros estudios (16,24) más de la mitad de los sueros positivos con ELISA no son confirmados por inmunotransferencia. Estos resultados señalan que en nuestro país como en otros los resultados de la prueba de ELISA no pueden considerarse definitivos y se deben confirmar por inmunotransferencia (21).

La prevalencia de individuos seropositivos por ELISA en la población estudiada (1.1%) es baja comparada con la observada en Europa (7,8,9) sin embargo en Estados Unidos existen resultados similares en población abierta (10,11). En otros países los estudios de seroprevalencia realizados con ELISA reportan. Fahrner et al. refiere que en población rural de Alemania 15.7% de sujetos tenían anticuerpos IgG inmunofluorescentes con títulos mayores 1:128 ; mientras que el 27% de trabajadores forestales y el 46% de niños con antecedente de picadura por garrapata fueron positivos a títulos mayores de 1:64 (7).

En Alemania y Suecia estudios en población en riesgo como trabajadores forestales la seroconversión después de 6 meses de seguimiento fue del 8% vs el 4% de un grupo control (7,8). En Inglaterra se encontró el 1% de pacientes con serología positiva en Londres y el 7% en Southampton (9). En los Estados Unidos de Norteamérica la proporción de sujetos sanos con serología positiva en varios estudios varió de 0 a 10% (10) y en una Comunidad de la Costa Este de este país 4 de 129 sujetos (3.1%) fueron seguidos durante el Verano y mostraron un incremento de 4 veces el título de anticuerpos IgG. 2 de los cuales mostraron manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme (11)

Los resultados obtenidos en este estudio con sueros de todas las entidades del país sugieren que la infección por *B. burgdorferi* existe en México cuando menos desde 1988 y puede ocurrir en zonas donde se ha demostrado la presencia del vector (3). La OMS indica que países con más de 2 casos confirmados de infección con cuadro clínico y estudios de laboratorio cultivo y/o inmunotransferencia positivo o el aislamiento de la bacteria *B. burgdorferi* en el vector deben considerarse como países endémicos (6).

De acuerdo a estos criterios la Enfermedad de Lyme puede ser endémica en México. Hemos iniciado la búsqueda intencionada de casos clínicos para tratar de establecer en definitiva la existencia de la enfermedad y para conocer las características clínicas que se asocian a la infección en nuestros pacientes. Por lo tanto la comunidad médica mexicana debe considerar la probabilidad de Enfermedad de Lyme en casos sospechosos

BIBLIOGRAFIA

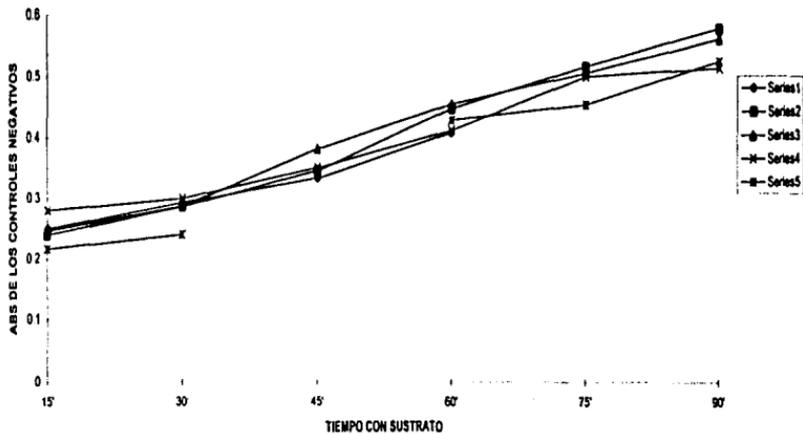
1. Walter PH, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspect
Lancet 1994; 343:1013-16.
2. Steere AC, Grodzicky RL, Kornblat AN, Craft JE, Barbour AG, Burdorferi W
and Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease. N Engl J Med 1983,
308:733-40.
3. Vaca GD, Fragoso SH, Franco BR, Martinez IF, Santamaria VM y Soberanes CN.
Manual de Identificación de las especies de garrapatas de importancia en México.
IICA 1996. 1-3, 30-77.
4. 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.
5. 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.
6. Fujikura T. Report of a who workshop on Lyme Borreliosis. WHO/VPH 1993;
132:3-19.
7. Fahrer H, Van der LSM, Sauvain MJ, Gern L, Zhioua E and Aeschliman A. The
prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme Borreliosis in a
population at risk. J. Infect Dis 1991;163: 305-10.
8. Rath PM, Ibershoff B, Mohnhaupt A, Albig J, Eljaschewitsch, Fehrenbach FJ
and cols. Seroprevalence of Lyme Borreliosis in Forestry workers from
Brandenburg, Germany.
9. Cooper C, Muhlemann MF, Wright DJM, Hutchinson CA, Armstrong R, Maini
RN. Arthritis as manifestation of Lyme disease in England (letter). Lancet 1987;
1:1313-4.
10. 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

11. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, Spielman A. Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J Infect Dis* 1986;154:295-300.
12. Maradiaga CMA, Llaús VA y Kumate RJ. Eritema crónico migratorio asociado a artritis. Enfermedad de Lyme (?) o una variante. *Cong Mex Inf XIV ; 1 (res): 1*.
13. Arroyave CM, Tamez GR. Enfermedad de Lyme. Informe de casos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994; 51 :117-120.
14. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Arkenase PW and Andiman WA. Erythema chronic migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. 1977;86:685-689.
15. Rusell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, and Plikaytis B. Enzyme linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect Dis* 1984; 149: 465-470.
16. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, and Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993;167:392-400.
17. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G and Hogrete W. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* Sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* Western blots (Immunoblot). *J Clin Microb* 1996;34:1732-1738.
18. Magnarelli LA. Serologic diagnosis of Lyme disease. *Ann New York Acad Science* 198; :154-161.
19. Tapia CR, Gutiérrez G, Sepúlveda J. Metodología de la encuesta nacional seroepidemiológica, México. *Salud pública* 1992;34:124-135.
20. Magos LC, Sánchez Villarreal F, Gutiérrez G, Tapia CR. Banco nacional de Salud pública 1992;34:136-147.
21. 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.

23. Luger SW, Krauss E. Serological test for Lyme disease : interlaboratory variability. Arch Intern Med 1990;150:761-3.
24. Cutler SJ. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis is under review. Lancet 1996; 348:117.

FIGRA No. 1

VARIACION INTERENSAYO. CONTROLES NEGATIVOS LYME



FIGRA No. 2

$R^2 = 0.8802$

CURVA DE CORRELACION PARA ESTABLECER VALOR DE CORTE \lg G LYME

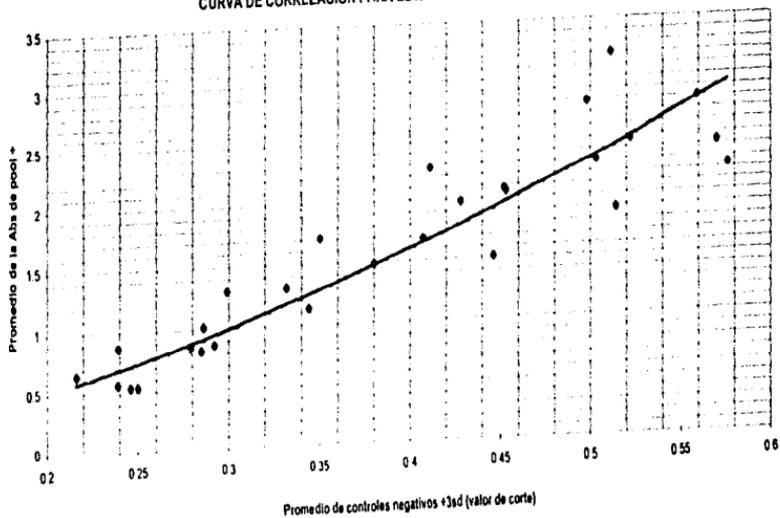


FIGURA No. 3

SEROPREVALENCIA DE IgG PARA *B. burgdorferi* POR INMUNOTRANSFERENCIA EN LA REPUBLICA MEXICANA



TABLA 1

**SUEROS DE DONADORES MEXICANOS SANOS CON DENSIDAD OPTICA (D.O.)
SIMILAR A LA D.O. DE 5 SUEROS NEGATIVOS DE UNA ZONA ENDEMICA.**

DILUCION DEL SUERO	No. DE POSITIVOS	PORCENTAJE
1:160	24	27%
1:320	15	17%
1:640	8	9%
1:1280	3	2.7%

TABLA 2
 SUEROS POSITIVOS EN INMUNOTRANSFERENCIA DE IgG PARA B. burgdorferi.

CASO	BANDAS										
	66*	62	58*	49	45*	41*	39*	34*	33	29	28*
COAHUILA 53 a *	X		X				X				
D.F. 40 a.	X		X				X				
D.F. 58 a.	X					X	X	X			
JALISCO 28 a.	X		X			X					
TAMAULIPAS 80 a						X	X	X			X
TAMAULIPAS 35 a	X		X		X	X					X
NUEVO LEON 38 a	X		X			X	X				
VERACRUZ 23 a					X			X			
VERACRUZ 11 a.	X				X						X
Sifilis		X		X					X	X	
Artritis Reumatoide											
Acs Antifosfolipido											
Leptospirosis											
Control Negativo											

* Edad del paciente