

24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA.

HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL
SXXI.

ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA DE BORRELIOSIS DE
LYME EN EL DISTRITO FEDERAL Y LA ZONA NORESTE DE
MÉXICO.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

LA ALUMNA

GARDUÑO BAUTISTA VERÓNICA.

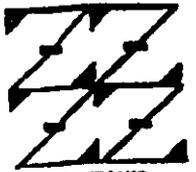
No. DE CUENTA: 9032655-2

DIRECTOR: Dra. MARÍA GUADALUPE GORDILLO PÉREZ.

ASESOR: Dr. RUBEN MARROQUÍN SEGURA.

291422

MÉXICO, D.F. 2000.



LO HUMANO
ESTÁ
EN NUESTRA REFLEXION



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.

AGRADECIMIENTOS.

ANTES DE INICIAR EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA MI TESIS, NO CONOCÍA A LA GENTE QUE AHORA CONOZCO, ESTAS PERSONAS HAN SIDO PARA MI UN EJEMPLO Y TODA UNA MOTIVACIÓN PARA QUE PUDIERA PRESENTAR UN TRABAJO TERMINADO.

A TODAS ESAS PERSONAS QUE ME AYUDARON INCONDICIONALMENTE, A QUIENES APRECIO Y ME APRECIAN, A MI FAMILIA Y MIS AMIGOS.

EN ESPECIAL A LA M. en C. Ma. GUADALUPE GORDILLO, QUE TUBO LA PACIENCIA Y ME ENSEÑO TODAS LAS TÉCNICAS QUE NECESITABA SABER; A TODOS MIS MAESTROS DE LA FACULTAD, QUE COOPERARON CON SUS ENSEÑANZAS EN MI FORMACIÓN Y AL I.B.Q. J. ANTONIO POR SER AMABLE Y PACIENTE CONMIGO.

A TODOS ELLOS

GRACIAS.

INDICE.

CONTENIDO.	PAGINAS.
Resumen.	2
Fundamentación teórica.	3
Agente etiológico.	3
Vector y animal hospedero.	4
Epidemiología.	7
Manifestaciones clínicas y patógenesis.	8
Diagnostico.	11
Tratamiento y profilaxis.	13
ELISA. Fundamento teórico.	14
Western blot. Fundamento teórico.	16
Planteamiento del problema.	18
Objetivos.	18
Hipótesis.	19
Material y métodos.	19
Población de estudio.	19
Criterios de inclusión.	19
Criterios de exclusión.	20
Criterios de eliminación.	20
Variables.	20
Material.	21
Reactivos.	21
Equipo.	22
Inmunoensayo enzimatico (ELISA).	23
Western blot (WB).	24
Diseño estadístico.	27
Resultados.	28
Discusión de resultados.	39
Conclusiones.	43
Propuestas y/o recomendaciones.	44
Referencias bibliográficas.	45
Anexo 1: soluciones para la técnica de ELISA.	49
Anexo 2: soluciones para la técnica de Western blot.	50

RESUMEN.

La Borreliosis de Lyme es una enfermedad multisistémica que afecta músculos, sistema nervioso, corazón y articulaciones; es endémica en Europa, donde la prevalencia es del 8 al 27 %; también es endémica en Estados Unidos de Norte America (E.E.U.U.) donde la prevalencia varía entre un 1 y 10%, en México la prevalencia nacional es de 0.3% por Western-blot, la mayoría de sujetos de este porcentaje se localizó en la Zona Noreste y Centro del país; con estos antecedentes, se hace necesario conocer la prevalencia de infección por Burrelia burgdorferi en la Zona Noreste y Centro del país; se estudiaron 2.346 sueros de sujetos de la Zona Noreste y Distrito Federal. Utilizando la técnica de ELISA indirecto para IgG con antígeno completo de la cepa B31 de Borreliia burgdorferi, confirmando con el Western-blot y considerando western-blot positivo, al suero que presentó 5 o más de las siguientes bandas: 18, 21 (OspC), 28, 30, 39 (BmpA), 41, 45, 48, 66 y 93 Kda, se obtuvo una seroprevalencia en el D.F. de 3.43% (25 sujetos) y en la Zona Noreste del 6% (93 sujetos). Lo que evidencia, que existen sujetos que poseen anticuerpos IgG contra Borreliia burgdorferi con más frecuencia y una prevalencia semejante a la reportada en Zonas endémicas de E.E.U.U. y Europa.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE LYME (Borrelia burgdorferi)

Las espiroquetas del genero de Borrelia, Leptospira y Treponema pertenecen al phylum eubacterial de la familia spiroquetacea.

Borrelia es la espiroqueta más larga de la familia spiroquetacea, B. burgdorferi mide de largo 20 a 30 μm y un grosor de 0.2 a 0.3 μm , tienen 7 a 11 flagelos. Son bacterias móviles, Gram negativas poseen un cilindro protoplásmico que está cubierto por una membrana celular, un flagelo y una membrana externa, la cual está unida débilmente con las estructuras internas, su membrana externa es única por que los genes que la codifican son plásmidos, lo que podría aventajar a los organismos en cambios antigénicos en las proteínas de la superficie externa. La membrana externa se mueve al final del cilindro, en un fenómeno conocido como casquete ("capping") que puede ser importante en la adherencia a células ^{1,2}.

Las especies de Borrelia son fastidiosas para crecer, ya que son bacterias microaerofílicas, tienen un crecimiento complejo, óptimo a 33°C en un medio líquido llamado medio Barbour-Stoener-Kelly. Comparada con otras bacterias, Borrelia tiene un crecimiento muy lento, cada espiroqueta se alarga de 12 a 24 horas y se divide en dos células. B. burgdorferi pierde patogenicidad en cultivo, usualmente después de 10 a 15 pases.

B. burgdorferi tiene de 31 al 59% de DNA, sus proporciones de guanina y citosina son de 28 y 30.5% y su porcentaje es homólogo con otras Borrelias. B. burgdorferi contiene cerca de 30 proteínas diferentes, pero muy pocas son conocidas. Estas incluyen dos proteínas, de superficie y una alta carga de proteínas básicas llamadas proteínas A de superficie externa (30 a 32 kDa). Los polipéptidos 66 kDa también están localizados en la membrana externa².

La espiroqueta tiene 10 polipéptidos los cuales incluyen las proteínas de superficie (Osp) las cuales son: la 30 kDa OspA, 32 kDa OspB, 22 kDa OspC y la de 41 kDa que es una proteína flagelar que es similar a los antígenos flagelares de otras espiroquetas. Las proteínas de choque térmico de 58-, 66-, y 74- kDa son homólogas con las proteínas de la familia de Escherichia coli de 60 kDa y el 70 kDa DNA. Las funciones de otros antígenos importantes, incluyen los de 18, 28, 30, 37, 39, 45 y 93 kDa ⁴.

La respuesta inmune específica en la enfermedad de Lyme se desarrolla gradualmente en un periodo de meses a años.

VECTOR Y ANIMAL HOSPEDERO.

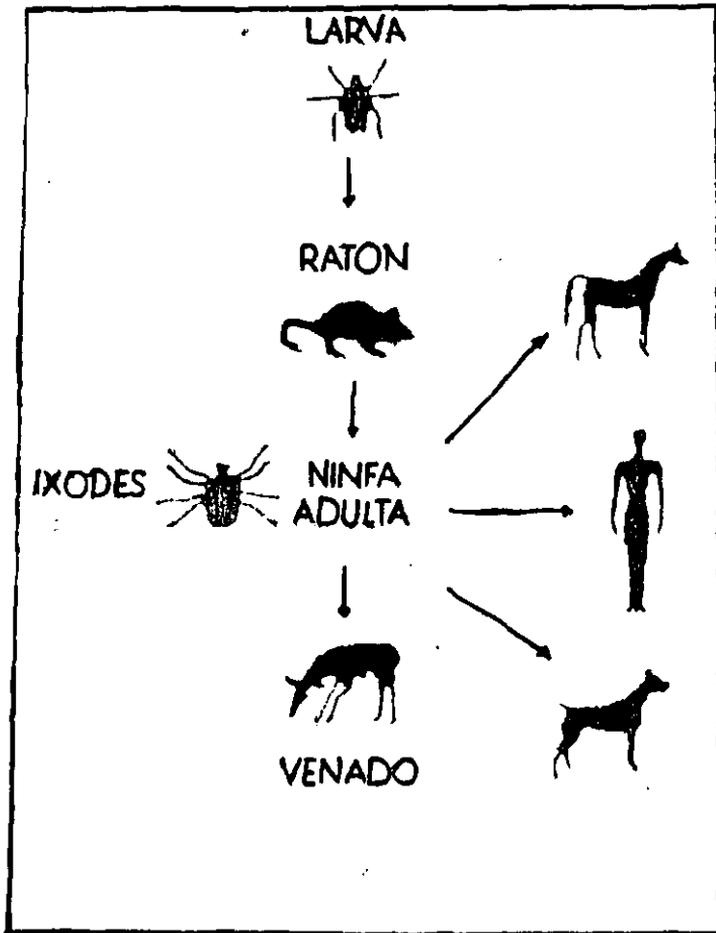
La borreliosis de Lyme es una zoonosis transmitida por garrapatas y causada por la espiroqueta Borrelia burgdorferi, se ha reportado principalmente en el Hemisferio Norte; descrita en más de 40 estados de Norteamérica, en los países europeos y algunos de Asia.

En su ciclo biológico los reservorios principales de B. burgdorferi son roedores que pertenecen al género Peromyscus y Apodemus, estos roedores se parasitan por garrapatas que a su vez transmiten al hombre la espiroqueta, las garrapatas en su forma inmadura (larva o ninfa) se alimentan principalmente de los roedores regurgitando durante su alimentación e inoculando la espiroqueta al roedor, simultáneamente infectan con la espiroqueta a su prole; cuando las garrapatas son adultas se alimentan de grandes mamíferos como el venado (Odocoileus virginianus), éstos (figura 1) mantienen la infección de Borrelia burgdorferi en la naturaleza por transmisión horizontal de hospederos infectados

Las especies de garrapatas predominantes que transmiten al hombre Borrelia burgdorferi son en Norteamérica: Ixodes dammini (I. dammini), Ixodes pacificus e

I. scapularis y las eurasiáticas Ixodes ricinus e I. persulcatus.

FIGURA 1: CICLO BIOLÓGICO DE *Borrelia burgdorferi*²².



La garrapata se ha encontrado en otros animales salvajes y domésticos, incluyendo perros, caballos, ganado y aves, éstas últimas podrían ser responsables de la diseminación sobre extensas áreas. La enfermedad clínica de Lyme ocurre en animales domésticos, y se desconoce el desarrollo de la enfermedad en animales salvajes².

En México las garrapatas del género *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* fueron encontradas en el área Norte del país en Baja California, en la Zona Noreste (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas) y la costa del golfo de México; los animales susceptibles a la infección por *Borrelia burgdorferi* incluyen *Odocoileus virginianus* (venado de cola blanca) y *Peromyscus leucopus* (ratón de patas blancas), que también habita en el Distrito Federal; la zona Noreste y el D. F. propician la presencia de la espiroqueta, su vector y hospederos debido a su flora, fauna y clima que se describe como sigue:

Coahuila (Saltillo): 7.6% del Territorio Nacional; 38 municipios y posee 1,557,265 habitantes⁴². el clima de Coahuila en las llanuras del norte es cálido extremo, aunque menos seco en la región de los bolsones por la influencia marítima; en los llanos y los bolsones, habitan principalmente reptiles como víbora de cascabel, lagartijas etc., aves como la garza garrapatera, águilas y palomas de alas blancas; en la sierra destacan el venado cola blanca y otros mamíferos como el jabalí, oso negro, etc⁴¹.

Nuevo León (Monterrey): 3.3% del Territorio nacional, 51 municipios. Monterrey: 1,924,434 habitantes⁴², el clima en las partes bajas y al occidente de la sierra Madre Oriental es cálido y seco extremo, en las partes altas es templado, subhúmedo con frecuentes heladas invernales; la fauna en la sierra es principalmente de aves como el pato real, paloma blanca etc., existen mamíferos como el gato montes y el venado cola blanca; en la llanura aves como patos de collar y mamíferos como jabalíes, coyotes, zorillos, liebres, etc⁴¹.

Tamaulipas (Cd. Victoria): 4.0% del Territorio nacional, Tampico con 278,933 habitantes; Cd. Madero con 171,097 habitantes⁴², el clima hacia el vertiente oriental de las sierras es templado, subhúmedo; en la planicie, seco con lluvias escasas durante todo el año, en verano, el calor sobrepasa los 40°C, hacia el sur de la Huasteca, el clima es cálido subhúmedo con la influencia de los vientos alisios, Tamaulipas se encuentra en zonas de influencia de ciclones; en las sierras habitan el venado cola blanca y otros mamíferos como el gato montes, leoncillo, jaguar etc.; en la llanura y costa habitan aves como la paloma morada, grulla y corniz, también mamíferos como el puma, el gato montes zorrillo espalda blanca, comadreja etc⁴¹.

Distrito Federal 0.1% del Territorio Nacional, 16 delegaciones políticas, 8,831,079 habitantes⁴², el clima es templado subhúmedo, existen masas de aire húmedo en verano y parte del otoño, debido a la influencia de los ciclones tropicales; posee áreas naturales protegidas como el Tepeyac, cerro de la Estrella, Fuentes Brotantes de Tlalpan, El Tepeyac, Cumbres del Ajusco, Lomas de Padierna, Desierto de los Leones (se ha encontrado el ratón de patas blancas), Miguel Hidalgo y Xochimilco.

EPIDEMIOLOGÍA.

En Europa la enfermedad tiene una amplia distribución y consistente por ejemplo en Suecia se ha encontrado que sus trabajadores forestales y colocadores de palos de golf existe evidencia serología de infección asintomática en 8.1%³⁰, y en la población abierta de Inglaterra (Londres y Southampton) del 1 al 7 %³². En E.E.U.U. la Borreliosis de Lyme (LB) ha sido confinada a tres áreas enzoóticas (Costa Noreste, medio Oeste y California)², donde la prevalencia varío de 0 a 10%; en zonas enzoóticas existe un riesgo elevado en trabajadores de la construcción⁸, los casos se han incrementado y la infección se ha diseminado^{5, 33, 34} a otros estados, como lo es Texas en donde se han reportado 77 casos entre 1995 y 1997⁴⁰, en Sinaloa en 1989 se reportaron 20 pacientes con eritema crónico migratorio asociado a artritis; lográndose en un caso observar la espiroqueta en biopsia de piel, tres casos con serología positiva por el método de ELISA y en los 17 casos restantes la serología fue negativa, sin embargo hubo mejoría

clínica posterior al tratamiento único o combinado con tetraciclina y penicilina⁶, en 1994 en la ciudad de Monterrey, Nuevo León se reportaron 2 casos diagnosticados por medio de la determinación de IgG e IgM para *B. burgdorferi* por el método de ELISA²², en la Zona Noreste se reportaron 3.5 casos con una presentación clínica sugestiva de Borreliosis de Lyme fueron reportados a principios de los 90'S y tres fueron positivos para anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi* por un ELISA, en una Encuesta Serológica Nacional, se reportó una seroprevalencia del 03% por Westen-blot.⁷

La Borreliosis de Lyme afecta al hombre en cualquier edad, sin embargo en un estudio en Suecia se reportó un índice mayor en los grupos de 5 a 9 años y de 60 a 74 años de edad².

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOGÉNESIS.

La enfermedad frecuentemente comienza con una infección localizada en cualquier parte de la piel, *Eritema migrans*, seguido de días o semanas de diseminación de la espiroqueta a muchos órganos particularmente a otros sitios de la piel, sistema nervioso, o articulaciones, después de algunos meses o años de infección latente, los pacientes pueden desarrollar artritis persistente, complicaciones neurológicas crónicas ó acrodermatitis crónica atrófica⁴.

Las manifestaciones clínicas se dividen en 3 estadios:

La sintomatología en cada uno de los tres estadios es la siguiente²²:

Etapa I de la enfermedad:

Lesiones cutáneas (eritema crónico migratorio).

Cefalea

Fatiga

Fiebre

Claudicación

Edema de las extremidades

Anorexia

Letargía

Etapa II de la enfermedad:

Anormalidades cardíacas y neurológicas

Parálisis facial unilateral o bilateral

Corea

Radiculoneuropatías

Cambios en la conducta

Tanstormos renales

Etapa III de la enfermedad:

Artritis crónica

Parálisis

Síndromes dermatológicos crónicos

Lindadenosis benigna cutis,

Acrodermatitis atrófica,

Morfea.

Los primeros dos estadios representan la fase temprana de la enfermedad que ocurre en pocas semanas o meses después de la infección con *B. burgdorferi*: El *Eritema migrans* es el signo inicial que se manifiesta como una lesión circular papular eritematosa con diseminación centrifuga que puede desarrollarse en tres días a 16 semanas (promedio 1.5 semanas después de la picadura de garrapata) y se resuelve espontáneamente en pocas semanas a meses.

Existe afectación de varios órganos o sistemas, probablemente por diseminación hematogena que se presenta como:

Manifestaciones cardiacas comúnmente transitorias como alteraciones del ritmo, bloqueo atrioventricular de varios grados, miopericarditis y falla cardiaca.

Manifestaciones neurológicas como: Meningorradiculoneuritis (síndrome de Bannwarth), neuritis craneal, de plexos, mononeuritis múltiple, y raramente encefalitis, mielitis ó vasculitis cerebral.

Manifestaciones en la piel como el linfocitoma borrelial que se caracteriza por un tumor rojo en el lóbulo de la oreja con proliferación linforreticular.

Manifestaciones en músculos (miositis) y articulaciones (Artritis) pueden ocasionalmente observarse en los primeros meses de la enfermedad, así como linfadenopatía regional y generalizada.

Otras manifestaciones: oculares (conjuntivitis, iridociclitis, coroiditis, neuropatía óptica con papilemdema, panoftálmis), en raras ocasiones se presenta hepatomegalia, hepatitis y edema testicular.

En la etapa tardía crónica la involucración de órganos puede ocurrir en meses (6-12) o años después de la infección cerca el 60% de pacientes no tratados con *Erytema migrans* se vuelve crónico y progresivo.

Las manifestaciones clínicas de la etapa crónica se presentan: Artritis monoarticular y oligoarticular con ataques intermitentes que afectan grandes articulaciones, especialmente rodilla observándose que declina en 10 a 20% de los casos por año; la acrodermatitis crónica atrófica afecta principalmente las superficies extensoras de las extremidades ¹³.

DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico por cultivo de *B. burgdorferi* con líquidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, articular o pericárdico) es difícil en los medios utilizados lográndose muy bajo crecimiento², por esta razón la espiroqueta es identificada en especímenes de biopsia por tinción de plata y técnica inmunohistoquímica; éstas son difíciles de interpretar por el bajo número de espiroquetas observadas; los análisis de laboratorio clínico no son suficientes para proporcionar un diagnóstico certero, aunque los hallazgos de laboratorio más importantes son: biometría hemática con cuenta de leucocitos de 12,560 por mm³, neutrofilia de 78%, sedimentación globular elevada; transaminasas oxalacética de 65 U/L y la glutámico pirúvica de 80 U/L., el examen general de orina y el resto del perfil bioquímico fue dentro de los límites normales. Las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA, se encontraron dentro de límites normales²²; por esta razón los estudios serológicos más usados para el diagnóstico de infección por *B. burgdorferi* incluye inmunoensayo enzimático (ELISA), la inmunofluorescencia (IFA) y Western-blot, como lo establece el CDC en el seguimiento para la Borreliosis de Lyme, se basan en una prueba serológica presuntiva (ELISA ó IFA) y una confirmatoria (Western-blot), usando los criterios propuestos por Dressler et. al., actualmente reconocidos por el CDC para la interpretación del Western-blot IgG: un blot de IgG es considerado positivo si cinco de las siguientes bandas están presentes: 18, 21(OspC),28,30, 39(BmpA) y 41 (Fla), 45, 58(no GroEL), 66 Y 93 KDa²⁰, con los criterios del EUCALB un blot es considerado positivo si dos de las 12 bandas anteriores esta presente incluyedo la 60 y 31 Kda; para validar esta técnica se pueden usar anticuerpos ser desarrollados biotecnológicamente²⁰. Los resultados se reportan de la siguiente forma: un ELISA o un IFA cuyo resultado sea positivo o dudoso seguido de un Western-blot negativo, el resultado deberá ser reportado como negativo; un resultado de un ELISA o un IFA positivo seguido de un Western-blot positivo deberá ser reportado como positivo, además de acompañar todos los reportes de resultados con una explicación y /o interpretación²⁰.

El serodiagnóstico con cada uno de estos métodos se complica por cuatro factores principales:

- Su interpretación es complicada por la reactividad cruzada con otras espiroquetas con las técnicas de IFA y ELISA como Treponema pallidum, T. denticola, T. Phagedenis y Borrelia sp. (B. hermsii y B. recurrentis), así también en enfermedades autoinmunes, mononucleosis infecciosa y fiebre de las montañas rocosas.
- La variabilidad de la respuesta inmune en diferentes pacientes.
- El efecto del tratamiento antibiótico temprano puede abortar una respuesta inmune y dar resultados falsos negativos.
- La presencia de diferentes genoespecies y cepas de B. burgdorferi, a nivel mundial en la interpretación de los estudios de inmunotransferencia de proteínas.

Para nuestra finalidad se utiliza el ELISA como técnica de escrutinio, en el ELISA realizado con antígeno celular completo reporta una sensibilidad del 92 a 93 %, con una especificidad menor de 71 a 82 %, la precisión del estudio disminuye cuando el paciente es sospechoso o no es caso clínico hasta 79 a 69 % respectivamente, sin embargo se incrementa a 92 % en pacientes con enfermedad⁴. En estadio 1, localizado menos de la mitad de los pacientes tienen anticuerpos específicos detectables, predominantemente IgM en 70-90% con cambio de IgM a IgG⁹. Por lo tanto si la borreliosis de Lyme temprana se sospecha clínicamente aún con títulos de anticuerpos negativos, las pruebas serológicas pueden ser repetidas aproximadamente dos a cuatro semanas más tarde¹¹.

En la enfermedad crónica los títulos de anticuerpos IgG son usualmente elevados y podrían durar así por varios años, aun cuando el tratamiento es útil. Raramente los pacientes con enfermedad crónica son persistentemente seronegativos, mostrando solo una respuesta mediada por células T^{4, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 21}

El Western-blot es usado como técnica confirmatoria, por lo general se realiza cuando principia la infección en las primeras 4 semanas. Este análisis debería ser efectuado por ambos procedimientos con IgM e IgG, más por situaciones cronológicas y de economía no se realizan; cuando la mayoría de los pacientes seroconvierten dentro de un periodo de cuatro semanas, en el caso de que un paciente con enfermedad de Lyme

sospechosa tenga serología negativa, la evidencia serológica de la infección se puede obtener probando agudamente en pareja, testigos y muestras en fase convaleciente; en la enfermedad de Lyme tardía, el anticuerpo de respuesta predominante es usualmente la IgG, cuando se elevan los anticuerpos en un paciente con enfermedad de Lyme activa que solo tenga una respuesta de IgM para *B. burgdorferi*, después de un mes de infección es extraña. Un resultado positivo de IgM no es recomendado para la determinación en personas con enfermedad de Lyme activa con más de un mes de duración, puesto que los falsos positivos son frecuentes para estos individuos²⁰.

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS.

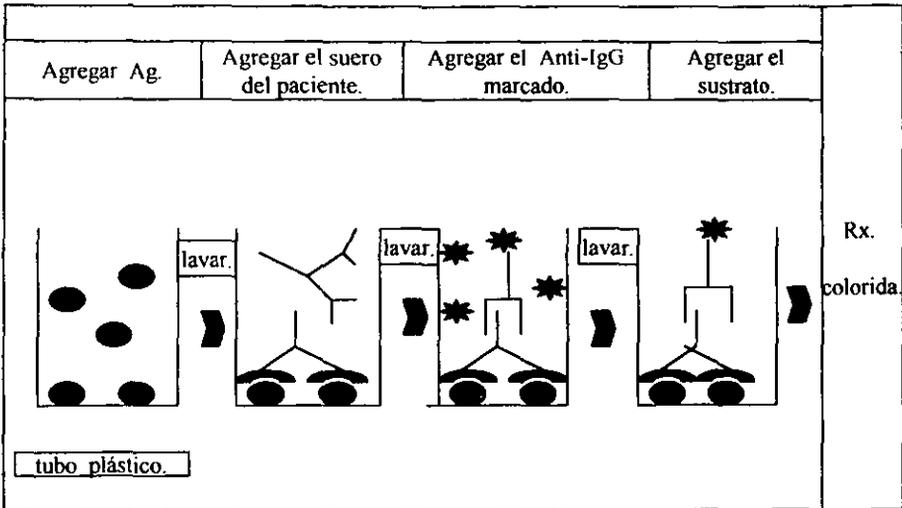
El antibiótico de elección y dosis del tratamiento causa controversia, especialmente para la Borreliosis de Lyme, las tetraciclinas son la droga de elección en el tratamiento relacionado con fiebre, aunque la destrucción brusca del microorganismo puede provocar reacciones desfavorables al organismo humano, obteniendo buenos resultados con 0.5 g de tetraciclina oral cada 6 horas por 4 ó 5 días con una dosis de 100 mg de dicloxacilina².

La prevención incluye evitar las áreas infestadas con garrapatas, en caso de habitar una zona endémica se recomienda usar ropa de colores vivos, llevar botas gastadas, cerradas y pegadas al pantalón, usar repelentes para insectos, inspeccionar a los niños, especialmente el cuero cabelludo⁴⁰.

ELISA INDIRECTO FUNDAMENTO TEÓRICO.

Los análisis inmunoenzimáticos son de dos tipos principales: homogéneos y heterogéneos; los análisis inmunoenzimáticos heterogéneos son generalmente conocidos como inmunoensayo enzimático (ELISA), existen ELISA's de diferentes tipos de acuerdo al tipo de análisis que se requiera, como el ELISA directo, indirecto, competitivo, tipo "sándwich", de inhibición etc., para IgG e IgM; en este trabajo se utiliza el método indirecto, que es ampliamente utilizado para la determinación de anticuerpo, ya que se necesitan solo unos pocos conjugados (ej. antiglobulinas humanas marcadas con enzimas) para analizar anticuerpo de una variedad de enfermedades¹⁶, La técnica se explica en la figura 2¹⁷, este ensayo se basa en que el antígeno o anticuerpo se adsorba físicamente a un soporte de fase sólida (como el poliestireno y los policarbonatos), para que posteriormente se les haga reaccionar inmunológicamente con su anticuerpo o antígeno respectivo y dependen de que los anticuerpos o el antígeno se puedan fijar a una enzima, sin que este complejo pierda la actividad inmunológica con la enzimática (las enzimas más frecuentemente usadas son la fosfatasa y la peroxidasa de rábano picante) para después revelar esta reacción con un sustrato y un cromógeno que deben ser inicialmente y fuertemente coloreados tras la oxidación. Los cromógenos más eficaces para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenilfosfato, y para la peroxidasa, la o-fenilendiamina¹⁶.

Figura 2. esquematización de la técnica del ELISA Indirecto¹⁷.

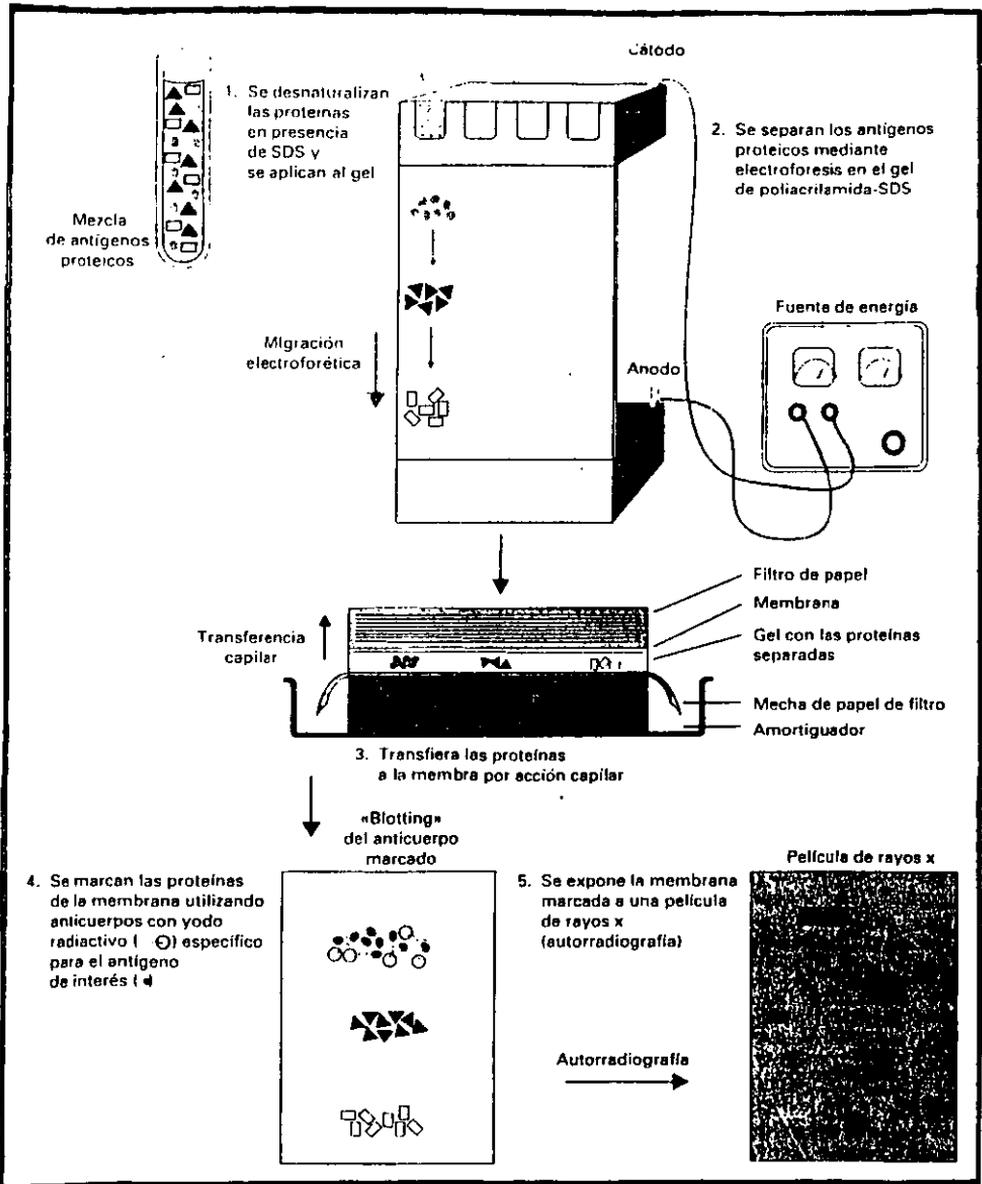


Este esquema ilustra la técnica de ELISA indirecto (fig. 2) el antígeno soluble se fija por adsorción física a la superficie sólida, para reducir el enlace no específico de IgG a la fase sólida se puede agregar una proteína irrelevante (gelatina, albúmina, etc.) con el fin de bloquear cualquier sitio libre con el plástico, posteriormente se fija un anticuerpo por reacción inmunológica, haciendo que esta reacción sea fácilmente medible agregando un anti - Ig marcado con una enzima, un sustrato y un cromógeno específico para esta enzima observando una reacción colorida, que se determina visualmente o en un espectrofotómetro.

WESTERN BLOT FUNDAMENTO TEÓRICO.

El Western blot se fundamenta en tres técnicas: la electroforesis, transferencia ó electroforesis transversa y ELISA. En la electroforesis el antígeno desnaturalizado migra hacia una posición hipotética, de acuerdo a su carga iónica de naturaleza proteica; con ayuda de un detergente catiónico, luego de separar a los antígenos de una mezcla compleja por medio de una electroforesis en fase sólida con el gel de poliacrilamida, puede pasarse por electroforesis transversa (transferencia) a láminas de nitrocelulosa donde se ligan sin especificidad y pueden ser identificadas por coloración con anticuerpos adecuados marcados (ELISA). Es obvio que tales procedimientos no podrán realizarse con antígenos desnaturalizados en forma irreversible y es preferible utilizar antisueros policlonales para la acumulación (blotting).¹⁷ (Ver figura 3).

FIGURA 3: CARACTERIZACIÓN DE ANTIGENOS POR WERTEN BLOT.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

California es una zona endémica de Borreliosis de Lyme en Estados Unidos², este estado comparte zonas climáticas, de altitud, flora y fauna con México, en Texas se han reportado casos de Borreliosis de Lyme entre 1995 y 1997⁴⁰, Texas colinda con la Zona Noreste de México en donde se ha encontrado la presencia de la garrapata *Ixodes* y sus hospederos como venados cola blanca, ratones de patas blancas y aves migratorias^{2,6}, con esta información y la presencia de casos sugestivos de Borreliosis de Lyme se realizó una encuesta seroepidemiológica nacional de borreliosis de Lyme con sueros obtenidos en 1988 y se encontró una prevalencia nacional del 0.3%, en donde la mayoría de estos sujetos se localizaron en la Zona Noreste y la Zona Centro de México. Así, con la localización de zonas endémicas en México se podría conocer más a cerca de la Borreliosis de Lyme en México, ofreciendo a futuro un diagnóstico diferencial oportuno para evitar las fases crónicas de la enfermedad que son irreversibles. Por lo anteriormente expuesto nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Cuál será la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra *B. burgdorferi* en una muestra de sujetos del D.F. y la Zona Noreste de México?.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) contra *Borrelia burgdorferi* en la Zona Noreste de México y el Distrito Federal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Conocer la seroprevalencia de IgG contra *Borrelia burgdorferi* en las entidades de la Zona Noreste de México.
- Conocer la seroprevalencia de IgG contra *Borrelia burgdorferi* en el Distrito Federal
- Comparar la seroprevalencia de IgG versus *B. burgdorferi* entre la Zona Noreste y el Distrito Federal.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Debido a la existencia de hospederos y vector de *Borrelia burgdorferi* ya documentada en la Zona Noreste, la seroprevalencia de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) contra *Borrelia burgdorferi* en la Zona Noreste será mayor que en el Distrito Federal.

MATERIAL Y MÉTODOS.

POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Para la encuesta se utilizó una muestra del D.F. y la Zona Noreste de México, distribuidos de la siguiente forma:

Nuevo León (Monterrey): 1199 sueros.

Tamaulipas (Tampico y Cd. Madero): 303 sueros.

Coahuila (San Juan de Sabinas): 116 sueros.

Distrito Federal (Delegación Gustavo a. Madero): 728 sueros

El Banco Nacional de Sueros del INDRE proporcionó 2346 sueros de sujetos para este proyecto. Esta muestra incluyó individuos de los dos sexos de 1 a 90 años de todos los niveles socioeconómicos y se seleccionaron al azar, sin puntualizar en otro tipo de datos (ocupación, mascotas, tipo de habitación, etc.).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Se incluyeron los 2346 sueros de sujetos de los dos sexos, de 1 – 90 años y de todos los niveles socioeconómicos, que se proporcionaron por el Banco Nacional de Sueros de la Zona Noreste y el Distrito Federal

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyen del estudio a todos los sueros de sujetos que no pertenezcan a las poblaciones siguientes: Nuevo León (Monterrey), Tamaulipas (Ciudad Madero y Tampico), Coahuila (San Juan de las Sabinas) y Distrito Federal (Del. Gustavo A. Madero).

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Se eliminaron de este estudio a los sueros de sujetos que presentaron contaminación o que se concentraron por causa del almacenaje.

VARIABLES.

Variables dependientes.

La medición de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) contra *Borrelia burgdorferi* por la técnica de ELISA y Western blot.

Variables independientes.

La probable infección por *Borrelia burgdorferi*, en sujetos del Distrito Federal y la Zona Noreste de México.

Material.

- Pipetas graduadas (PYREZ y KIMAX) de 5 y 10 mL.
- Tubos de plástico (LABCOM) de 15 y 50 mL.
- Tubos Ependorf (LABCOM) de 1 y 2 mL.
- Gradilla para tubos Ependorf.
- Reservorios (LABSYSTEMS).
- Placas microtituladoras para ELISA (LABSYSTEMS).
- Placas de dilución para ELISA (LABSYSTEMS).
- Micropipetas semiautomáticas de 1-10, 50-200 y 100-1000 μ L (GILSON).
- Micropipeta multicanal de 20-200 μ L (LABSYSTEMS).
- Vasos de precipitado (PYREX) de 50 mL.
- Propipeta eléctrica.
- Baño María.
- Membranas de nitrocelulosa (BIOMETRA).
- Charolas para incubación (BIOMETRA).
- Pinzas de disección sin diente.

Reactivos.

Las siguientes soluciones se prepararon como se describe en el Anexo 1.

- PBS 10X, 1X pH 7.4.
- PBS 1X con timerosal.
- Leche descremada (SVELTY).
- Antígeno de células completas de la cepa B31 de *Borrelia burgdorferi*.
- Sueros de sujetos ya especificados.
- Conjugado anti-IgG de cabra- fosfatasa alcalina (Southern Biotech, Birmingham, USA).
- Solución de dietanolamina (SIGMA) pH 9.8.

- Sustrato: p-nitrofenilfosfato disódico tabletas 5mg/tableta (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, USA).

Las siguientes soluciones se prepararon como se describe en el Anexo 2.

- Antígeno de células completas de la cepa B31 de *B. burgdorferi*.
- Amortiguador de tratamiento.
- Solución para gel de separación.
- Solución para gel concentrador.
- Amortiguador de cámara.
- Amortiguador de transferencia.
- Amortiguador TBST.
- Amortiguador de carbonatos pH 9.4
- Leche descremada al 5%.
- Sueros ELISA positivo.
- Conjugado utilizado en el ELISA.
- Solución de NBT-BCIP (BCIP/NBT Life technologies Gaithersburg USA).

EQUIPO.

- Propipeta eléctrica.
- Baño María.
- Cuarto caliente de 36 a 38 °C.
- Lector de ELISA (iEMS analyzer, Labsystems, Helsinki, Finland).
- Porta geles*.
- Cristales*.
- Separadores y peine ciego de 0.7 mm*.
- Cámara de electroforesis*.
- Cámara de transferencia*.
- Aparato multipruebas*.

- * Bio-Rad, Hercules, Ca, Usa.
- Kit MarDx Diagnostics, Inc. Carlsbad, CA.

MÉTODOS.

INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA).

- 1) En la noche previa a la prueba los pozos de las placas microtituladoras se sensibilizaron con 5 μg de antígeno por pozo del extracto sonificado de células completas de *B. burgdorferi* (cepa B31) en amortiguador de fosfatos pH 7.4. a 37°C.
- 2) Añadir 200 μL de bloqueador sin tirar el antígeno a toda la placa (leche descremada al 5% en PBS pH 7.4).
- 3) Incubar a 37°C cubierta por espacio de 1 hora 15 minutos.
- 4) Lavar tres veces con 0.05% Tween 20 en PBS 1X.
- 5) Añadir 60 μL de suero diluido a los pozos (la dilución será 1:640 en PBS pH 7.4).
- 6) Incubar a 37°C cubierto por una hora.
- 7) Lavar cinco veces con PBS-T 1X.
- 8) Añadir 60 μL de antisuero IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:1000 en leche descremada al 5%).
- 9) Incubar a 37°C cubierto por una hora.
- 10) Lavar cinco veces con PBS-T 1X.
- 11) Añadir 60 μL de p-nitro-fenil-fosfato diluido en dietanolamina pH 9.8.
- 12) Incubar 1 hora, cubierto a temperatura ambiente.
- 13) Leer las absorbancias en el lector de ELISA Labsystem. a 405 nm. ⁽⁷⁾.

WESTERN BLOT. (WB).

Técnica para el Western blot SDS-PAGE.

1. Se sometió a electroforesis 200 μ L de antígeno celular completo de la cepa B31 de *B.burgdorferi* en un gel de poliacrilamida SDS-12.5% a 20°C y 175 V.
2. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100V y 25°C por 45 min.
3. La membrana se bloqueo con 5% de leche descremada en TBST por una hora a 25°C.
4. Se lavaron cinco veces por cinco minutos con TBST y se montó en un aparato multiprueba.
5. Se adicionó la muestra a probar diluida 1:50 e incubar a 25°C por dos horas.
6. Se lavó cinco veces la membrana por cinco minutos con TBST.
7. Incubar con el conjugado (el mismo que se utilizó en el ELISA) diluido 1:500 a 25°C por 1 hora.
8. La reacción se desarrolló con NBT-BCIP (nitro azul de tetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indofosfato toluidina), diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.4.
9. Aparte de los sueros problema se incubó la mezcla de sueros de pacientes infectados con *B. burgdorferi* y una mezcla de sueros no infectada (igual a la de ELISA) como controles. También, se incubaron para control de reacción cruzada sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico, sífilis, artritis reumatoide, o anticuerpos antifosfolipidos.
10. Una muestra será considerada como positivo para IgG versus *B. burgdorferi* si posee dos de las siguientes bandas de proteínas: 18, 23(OspC), 28, 29, 30, 31, 34, 39(BmpA), 41(fla), 45, 58, 60, 66, 93 KDa.

Se probaron con WB comercial (Kit MaxDx, Diagnostics, Carisbad CA.) 30 sueros positivos por ELISA (Ver Anexo 4).

MÉTODO PARA WESTERN BLOT CON EL KIT MarDx Diagnostics, Inc. Carlsbad, CA.

PROCEDIMIENTO.

1. Se remueven cuidadosamente el número requerido de tiras Marblot *B. burgdorferi* del vial de tiras con unas pinzas sin punta, **NO TOCAR LAS TIRAS CON LAS MANOS**. Se ponen las tiras en los canales de una bandeja de incubación una tira por cada canal, con los números hacia arriba. Usando las tiras en orden numérico consecutivo.
2. Para cada control y muestras a probar, se llenaron los canales respectivos con 2.0 mL de Solución de Lavado/Diluyente de Muestra. Se añadió la muestra diluyente, lenta y directamente al espacio entre la tira numerada y el canal. Observando si la tira está completamente sumergida y no flotando arriba del amortiguador.
3. Se incubó la tira para que se remoje por un mínimo de 5 minutos en una plataforma de agitación apropiada.
4. Se quitó la charola de incubación de la plataforma de agitación.
5. Se añadieron 80 μ L de Suero Localizador de Bandas IgG al canal 1.
6. Se añadieron 20 μ L de Control Reactivo Débil al Canal 2 y 20 μ L del control negativo al canal 3 en el espacio que hay arriba de la tira.
7. Se agregaron 20 μ L de cada muestra al canal apropiadamente marcado, como en el paso 6.
8. Se colocó la charola de incubación de las tiras de WB en la plataforma de agitación por 30 minutos.
9. Después de la agitación, se decantaron los especímenes diluidos cuidadosamente de la charola de incubación. Tratando el fluido decantado como residuos infecciosos.

10. Se añadieron 2.0 mL de la Solución de Lavado/Diluyente de Muestras a cada canal de la charola de incubación que contenía las tiras y se incubaron por cinco minutos con agitación.
11. Se decantó completamente la Solución de Lavado/Diluyente de Muestra. Se repitió este proceso (pasos del 10 al 11) dos veces más.
12. Se pipetearon 2.0 mL del Conjugado de Fosfatasa Alcalina IgG dentro de cada canal de la charola de incubación que contenía las tiras.
13. Se incubó en la plataforma de incubación por 15 minutos.
14. Se quitaron la charola de incubación y se decantó el conjugado.
15. Se agregaron 2.0 mL de Solución de Lavado/Diluyente de Muestra a cada canal que contenía las tiras, y se incubaron por 5 minutos.
16. Se decantó completamente la Solución de Lavado/Diluyente de Muestra y se repitió este proceso (pasos 14 y 15) dos veces más.
17. Se añadieron 2.0 mL de agua desionizada o destilada a cada canal de la charola de incubación agitando por un minuto.
18. Se decantó completamente el agua destilada de la charola de incubación.
19. Se añadió 2.0 mL de la solución desarrolladora de color a cada canal de la charola de incubación.
20. Se quitó la charola de incubación de la plataforma de agitación después de la incubación y se decantó el sustrato.
21. Se añadieron 2.0 mL de agua destilada a cada canal de la charola de agitación. Agitando la charola con las tiras 3 ó 4 veces. Repita este paso 2 veces más.
22. Se removieron las tiras de los canales usando pinzas sin punta. Después se pasaron las tiras a un papel secante y permitiendo secar al aire para interpretar los resultados.

DISEÑO ESTADÍSTICO.

TIPO DE ESTUDIO.

1. De acuerdo a la época en que se capta la información: **Retrospectivo.**
2. Según el número de poblaciones estudiadas: **Descriptivo.**
3. Por la evolución del fenómeno o número de veces que se mide la variable de respuesta en unidad experimental: **Transversal.**
4. Control del investigador sobre la variable de respuesta: **Observacional.**

Estadísticas.

La prevalencia se expresó como porcentaje de muestras positivas con respecto al número de muestras estudiadas; con un intervalo de confianza del 95% y mediana.

Se utilizaron medidas de tendencia central, promedio y desviación estándar (para estandariza el ELISA).

RESULTADOS.

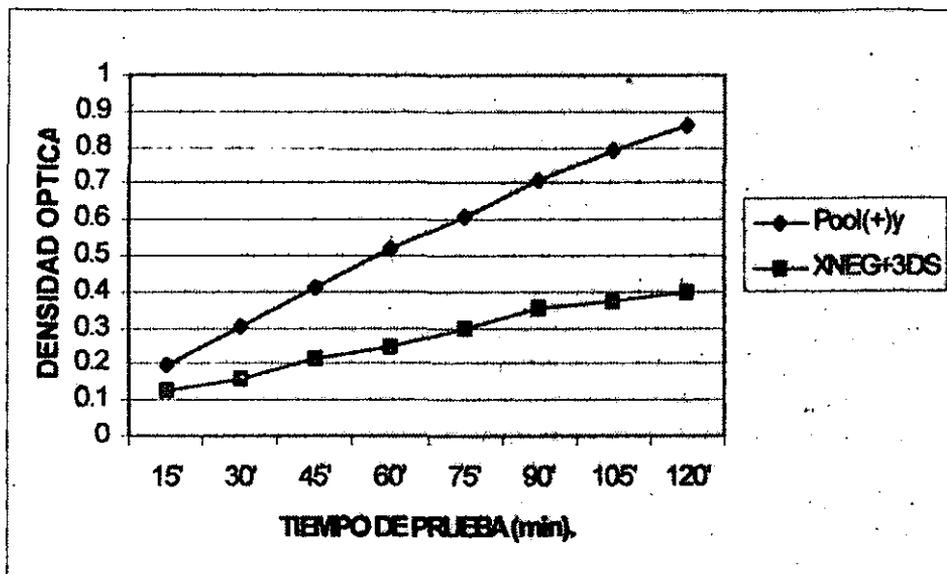
Se estudiaron 2,346 sueros de sujetos, 1,618 de la zona Noreste y 728 del D. F., 297 sueros de ambas zonas fueron positivos por ELISA la mediana de edad de los sujetos positivos fue de 34 años y el intervalo intercuartílico 25 a 75 de (18.5 – 42.5 años). En el estado de Coahuila la mediana de edad fue de 13.5 años con un intervalo intercuartílico (7 – 25 años).

La relación hombre-mujer (H:M) fue 1.6:1. En los estados de Tamaulipas y Coahuila la relación H:M fue 1:2.

Para estandarizar el ELISA, se consideraron la media de los valores de absorbancia más tres desviaciones estándar (SD) de valores de absorbancia (AV) de 42 mexicanos no infectados con B. burgdorferi, para definir el valor de corte, se construyó una regresión lineal indicando el punto de corte contra el AV de una mezcla de sueros positivos, incluyendo cinco sueros de pacientes infectados de una zona endémica.

Durante todas las pruebas la mezcla de positivos se incluyó por cuadruplicado en todas las microplacas y los cuatro valores de absorbancia se incluyeron en la regresión lineal para calcular el umbral de cada placa (gráfica 1 A). El resultado de cada muestra de suero se expresó en Unidades ELISA (U.E.). Cada muestra de suero fue probada por duplicado y las muestras positivas por cuadruplicado, posteriormente se obtuvieron sus títulos y se les realizó un Western-blot SDS-PAGE.

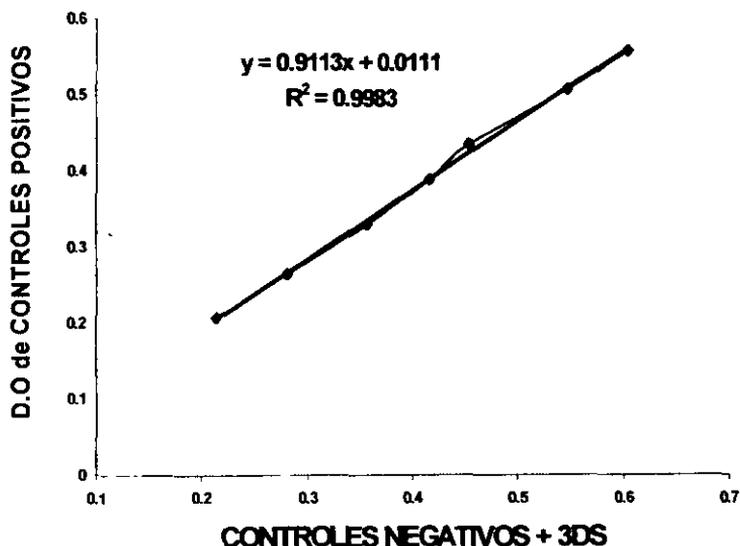
**GRAFICA 1: CURVA PARA LA ESTANDARIZACION DEL ELISA
INDIRECTO CON IgG CONTRA *Borrelia burgdorferi*.**



La gráfica 1 muestra comparativamente la absorbancia de controles positivos contra la absorbancia de los controles negativos más tres desviaciones estándar el umbral de la prueba es a 0.400 nm en 120 minutos.

GRAFICA 1A: CURVA DE ESTANDARIZACION PARA ELISA.

Curva para el ELISA vs *Borrelia burgdorferi*



GRAFICA 1A: En estas curvas se presentan las regresiones lineales de las densidades ópticas de los controles positivos contra las densidades ópticas de los controles negativos +3DS de cinco días distintos. Obteniendo una correlación intraobservador de 0.9983.

La prevalencia por ELISA de sujetos seropositivos por IgG vs *Borrelia burgdorferi* en el Distrito Federal fue de 7.28% (53/728) y en la Zona Noreste de 15.0% (244/1618) (Tabla 1). La seroprevalencia por estado en la Zona Noreste fue la siguiente: En Nuevo León se presentó un 11.7% (141 sujetos), Tamaulipas 29 % (88 sujetos) y en Coahuila 12% (15 sujetos). Se realizaron titulaciones 1:640 a 1:10240, el 76% de los sueros positivos de la Zona Noreste tuvieron títulos mayores de 1:10240, en contraste con los del D.F. en donde el 832% tuvieron títulos 1:640 (Tabla 1).

TABLA 1 SUEROS ELISA POSITIVOS Y SUS TITULOS.

ENTIDAD.	ELISA (+)	TITULO MÁXIMO.				
		1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Distrito Federal. n=728	53	11	14	13	6	8
Nuevo León. n=1199	141	19	29	30	18	45
Tamaulipas. n=303	88	7	3	10	14	54
Coahuila. n=116	15	0	0	1	0	14

Los sueros positivos por ELISA se probaron con Western-blot (WB) y un equipo comercial MarDx (Fig. 4 y 5), siendo positivos por ambos métodos para anticuerpos IgG contra *B. Burgdorferi* en el Distrito Federal (3.43%) y en la Zona Noreste 97 sujetos (6.0%). Con una prevalencia por estado: Nuevo León con 3.91% (47 sujetos), Tamaulipas 14% (43 sujetos) y en Coahuila 6% (7 sujetos). (Tabla 2).

TABLA 2: PREVALENCIA CONFIRMADA POR INMUNOTRANSFERENCIA EN LA ZONA NORESTE Y EL D.F.

ENTIDAD	DISTRITO FEDERAL	NUEVO LEÓN	TAMAULIPAS	COAHUILA.
n.	728	1199	303	116
ELISA (+)	53 (7.28%)	141 (11.75%)	88 (29.04%)	15 (12.9%)
WB (+)	25 (3.43%)	47 (3.91%)	43 (14.19%)	7 (6.03%)

Se seleccionaron al azar 30 sueros ELISA positivos lo que representó el 10% del total de los sueros positivos y se probaron por el método de Western-blot con un equipo comercial (MarDX Diagnostics) validado por el CDC se distribuyeron de la siguiente forma 10 en el Distrito Federal y 20 en la Zona Noreste (Tabla 3).

FIGURA 4: SUEROS POSITIVOS POR EL MÉTODO DE SDS-PAGE.

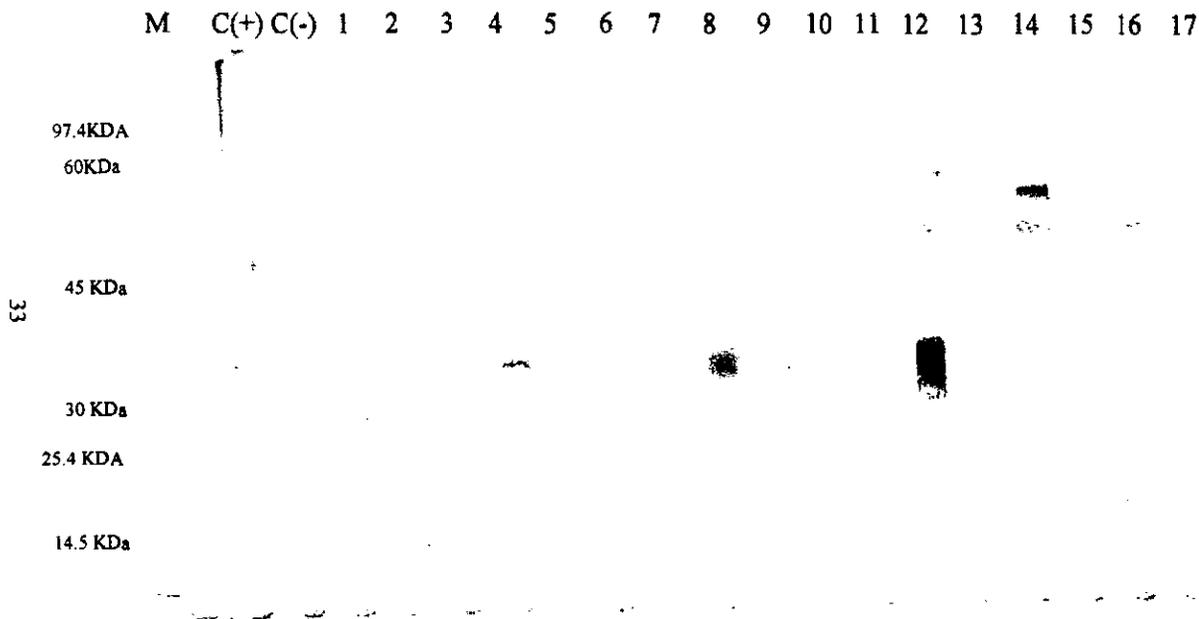


FIGURA 4. Membrana de nitrocelulosa revelada por el método SDS-PAGE. Esta membrana muestra el marcador de pesos molecularas en Kda (M); un control positivo [C(+)] para *b. burgdorferi* cepa B31; un control negativo [C(-)]; en el pozo 1 suero control de sífilis; pozo 2: suero control leptospirosis; pozo 3: suero control de Ab anti-fosfolipidos; pozo 4: suero control Les. Del pozo 5 - 14 sueros problema del estado de Monterrey, observese el suero 8 y el suero 13 son multibandeados y se correlacionan con control positivo.

FIGURA 5: WESTERN BLOT COMERCIAL.

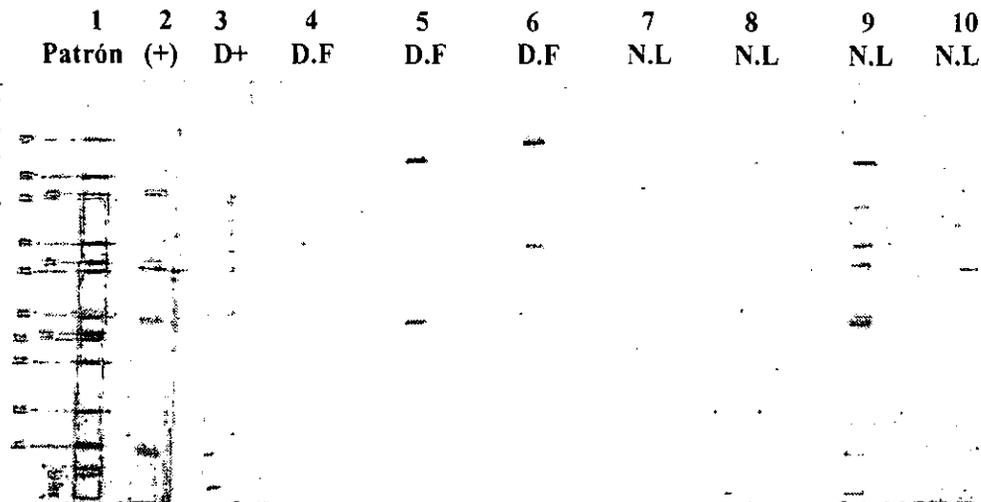


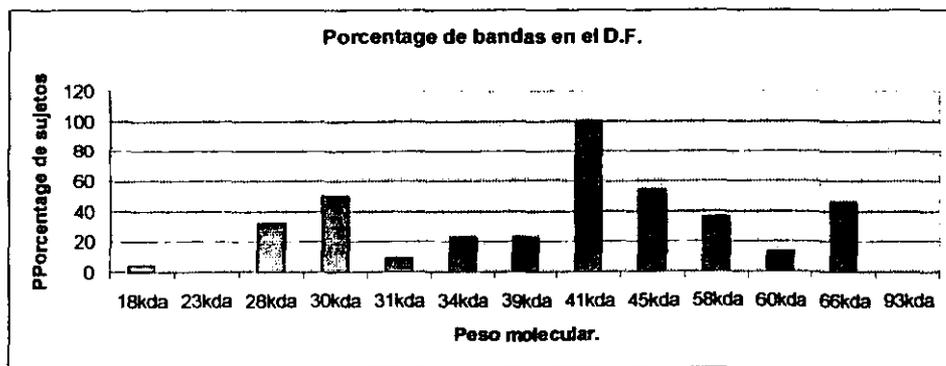
FIGURA 5: Membranas de nitrocelulosa reveladas por el método comercial Kit MarDx: Esta figura muestra: Tiras de nitrocelulosa: (1) es una plantilla de peso molecular (con los sig. pesos moleculares en forma descendente:93,66,60,58,45,41,39,37,34,31,30,28,23,21 y 18 KDa), en Kda; 2: un suero control positivo; 3: un suero débil positivo; 4 - 10 : Sueros problema de diferentes entidades. Obsérvese en estas membranas que los sueros 5, 6 y 9 son positivos para Borreliosis de Lyme con los criterios del CDC; Empleando los criterios de la EUCALB los sueros 4 a 7 son positivos y el suero 8 y 10 es negativo.

TABLA 3. SUJETOS POSITIVOS POR WESTERN BLOT MAR DX.

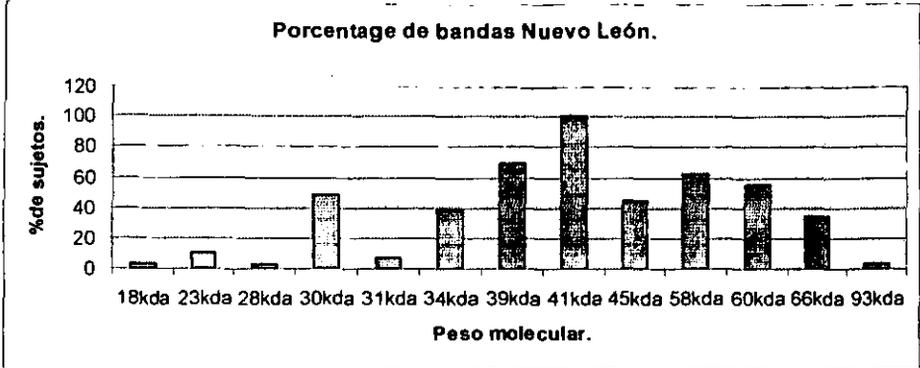
ENTIDAD	TÍTULOS ELISA				WESTERN BLOT CDC/EUCALB
	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
DISTRITO FEDERAL N=10	3	0	1	2	5 6/10
NUEVO LEÓN N=11	0	2	2	1	6 5/11
TAMAULUIPAS N=7	3	0	0	1	3 3/7
COAHUILA N=2	0	1	0	0	1 2/2

Las bandas más frecuentes fueron las de las proteínas de 30, 39 (BmpA), 41 (fla), 45 y 58 Kda en más del 78% de los sujetos. En el 22 % de los sujetos positivos se observaron las bandas 18, 23 (OspC) que son proteínas de respuesta temprana. En el Distrito Federal y el estado de Coahuila no se presentaron sujetos con las bandas de 23 (OspC) y 93 Kda (Gráficas 1 a 4).

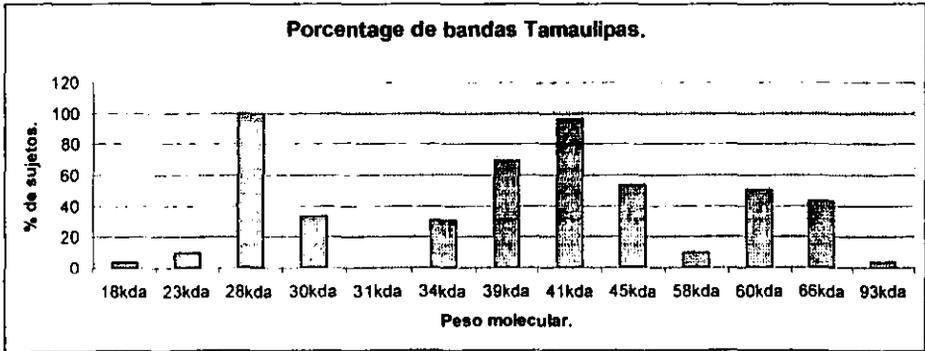
GRÁFICA 4. PORCENTAJE DE BANDAS ENCONTRADO EN EL DISTRITO FEDERAL.



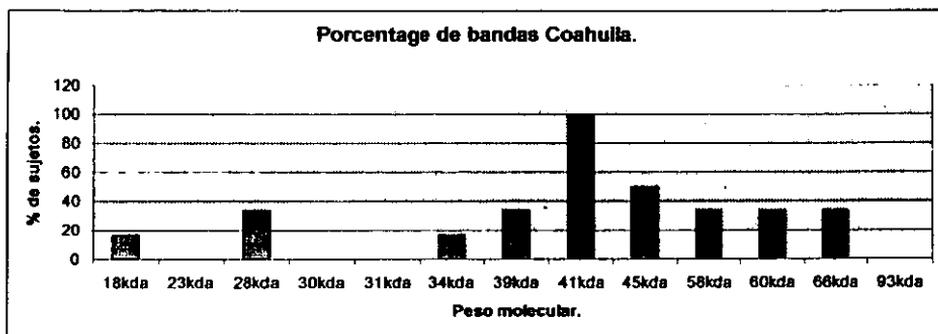
GRÁFICA 5: PORCENTAJE DE BANDAS ENCONTRADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN.



GRÁFICA 6: PORCENTAJE DE BANDAS ENCONTRADAS EN EL ESTADO DE TAMAULIPAS.

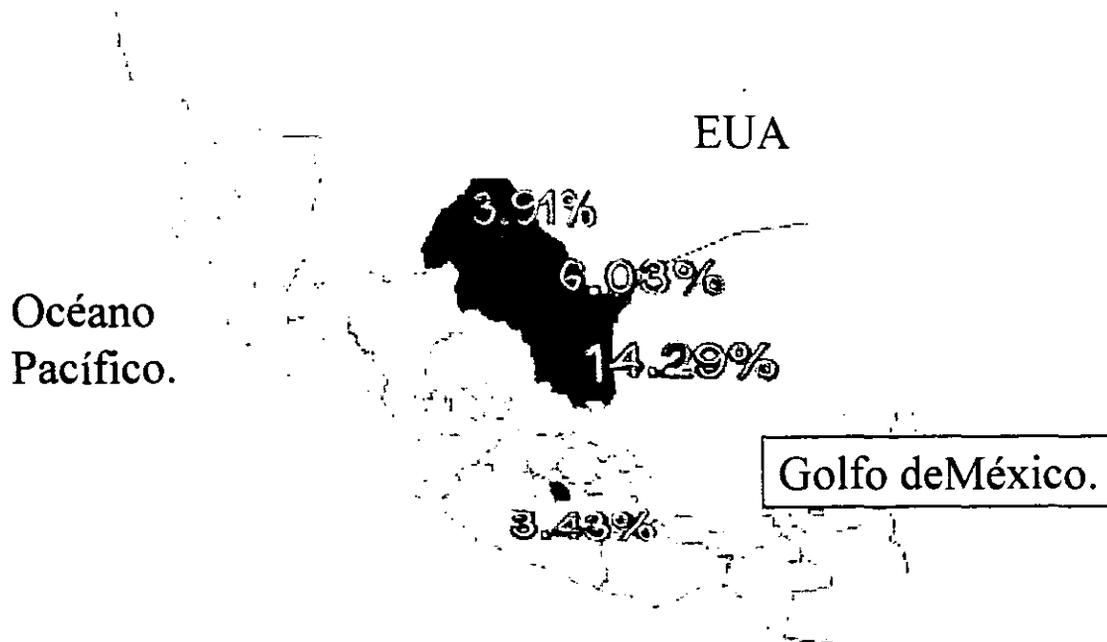


GRÁFICA 7: PORCENTAJE DE BANDAS ENCONTRADO EN EL ESTADO DE COAHUILA.



Al estudiar el tamaño muestral de los sueros de acuerdo a la seroprevalencia nacional. Se observó en la Zona Noreste una prevalencia elevada confirmada por Western-blot y con títulos elevados con el método de ELISA, comparados con el D.F. (Mapa 1).

MAPA I. Seroprevalencia por inmunotransferencia de IgG vs. *B. burgdorferi* en la Zona Noreste y el D.F.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La Borreliosis de Lyme es considerada una de las enfermedades infecciosas emergentes causada por Borrelia burgdorferi, se presenta en más del 90% de las infecciones transmitidas por garrapata en los Estados Unidos de Norteamérica y Europa². En Sudamérica existen reportes de casos sugestivos de la enfermedad sin confirmación con estudios de laboratorio^{6, 22, 43}. La Dra. Hofman en 1965 reporta la presencia del vector (garrapata Ixodes) en la Zona Noreste y Baja California⁴³. Llausas y cols informaron de algunos casos sugestivos de borreliosis de Lyme en México a principios de 1990. Con estas evidencias se realizó la búsqueda de posibles zonas endémicas de Borreliosis de Lyme; para esto se utilizaron sueros colectados en 1988 de población general procedente de áreas rurales y urbanas del D.F. y la Zona Noreste del país. El tamaño de muestra se calculó de acuerdo a la prevalencia obtenida en la encuesta nacional. En los estados de Nuevo León y Tamaulipas se completó el tamaño de muestra y en los estados de Coahuila y el D.F., para saber si el tamaño de muestra era representativo, se calculó el poder de la muestra que fue del 80%. En los estados de Nuevo León, Tamaulipas y el D.F., el grupo donde predominó la infección por B. burgdorferi, tenía 34 años, y era, el sexo masculino, el que estaba más expuesto a la infección, dato que sugiere la adquisición de la infección en hombres de edad económicamente activa, como lo reportan la asociación The Center Protec Workers'Rights⁸ y Steere AC², donde existe riesgo de infección en trabajadores de la construcción y forestales respectivamente. En el estado de Coahuila, la población estudiada fue más joven y residente de área rural. Los sujetos infectados fueron niños de 13.5 años en promedio. En México Arroyave y cols²² reporta dos casos sugestivos de la enfermedad con artritis en casos de niños de 5 y 12 años. En Steere y cols² reporta la mayor incidencia en niños de 5 a 9 años en Zonas endémicas de Europa. Fahrner y cols³⁰ reporta que existen dos picos de edad de riesgo (una curva bimodal) donde la población de riesgo es de 10 a 14 años y de 20 a 40 años en Europa. Estos resultados sugieren que el riesgo de contraer infección por Borrelia burgdorferi fue a edades tempranas en zonas rurales y económicamente activa en áreas urbanas.

La prevalencia con el estudio de ELISA indirecto para IgG, (Tabla 2) de la Zona Noreste (15.8%) fue mayor a la encontrada en el D.F.(7.28%). La prevalencia de individuos seropositivos por ELISA en la población estudiada es semejante a la reportada en zonas endémicas de Eua y Europa; Fahrer H. y cols³⁰, reportó en Suecia una prevalencia de 26.1% con la técnica de ELISA y en EUA Hanrahan³³ reportó una prevalencia de 7.5% por IFA. Los sujetos positivos en la Zona Noreste mostraron títulos mayores de 1: 2560 comparando con títulos 1:640 en el D.F.

Todos los estudios de seroprevalencia para infección de *B. burgdorferi* reportados en el mundo en población general se ha realizado con un método de escrutinio como el ELISA. En la última década se han reconocido las limitaciones que tiene éste método principalmente por la reacción cruzada con otras enfermedades autoinmunes y enfermedad periodontal^{4, 10, 25}. Por lo que el CDC incluye la Western-blot como el método para confirmar el diagnóstico serológico de infección por *B. burgdorferi*.

Dresler y cols, Cutler y cols y Tilton y cols reportan que la mitad de los sueros positivos por ELISA son confirmados por inmunotransferencia SDS-PAGE^{4, 29, 37}. En la muestra estudiada con éste método el 50% de los sueros se confirmaron. Esto muestra la reacción cruzada con otros antígenos prevalentes en la población mexicana similar a la de otros países. La seroprevalencia confirmada por Western-blot fue de 3.4% en el D.F. y el 6% en la Zona Noreste (tabla 2), sin embargo, en Tamaulipas la seroprevalencia fue la más alta de esta región con el 14%. Esto sugiere que la Zona Noreste en particular los estados de Nuevo León y Tamaulipas que son estados ganaderos, son zonas de alta endemicidad de Borreliosis de Lyme en nuestro país. Estos resultados fueron semejantes cuando se probaron los sueros ELISA positivos con un equipo comercial de Western-blot preparado con un antígeno completo de *B. burgdorferi* (Tabla 3) ya validado por el CDC y con una especificidad mayor al 98%

Al estudiar un tamaño muestral de sueros de acuerdo a la seroprevalencia nacional. Se observó en la Zona Noreste una prevalencia elevada confirmada por Western-blot y con títulos elevados con el método de ELISA, comparados con el D.F. (Mapa 1).

Los criterios para considerar un Western-blot positivo han cambiado en EUA y Europa. Esto condicionado por la heterogenidad genética de la bacteria de acuerdo al area geográfica, por lo que en este trabajo se incluyeron los criterios tomados por los dos grupos de estudio de Borreliosis de Lyme. La EUCALB que se utilizan para el diagnóstico de *B. burgdorferi sensu lato*, que se aplican en Europa³⁷, los criterios del CDC que se utilizan para el diagnóstico de Borreliosis de Lyme causada por *B. burgdorferi sensu stricto* (Gráfica 2) que se aplican principalmente en EUA.

Las bandas más frecuentemente encontradas (Gráficas 4 a 7) fueron la 28, 30, 39(BmpA), 41 (fla, 45, 58, 66 Kda (proteínas de choque térmico), en todas las entidades.

En los estados de Nuevo León y Tamaulipas el 10% presenta con la banda de 23 Kda (Ver tablas 4 y 5). Esto sugiere enfermedad de Lyme en etapa temprana; Dressler *et al*, reportan que la enfermedad temprana se asocia con el reconocimiento de la banda 41(fla)KDa y de 23 kda (proteína OspC)⁴. En el estado de Nuevo León y Tamaulipas, se presentó la banda de 93 Kda en el 3.3% de los casos. Dressler *et al* reportan que la presencia de esta banda que es una proteína de membrana externa y se asocia a enfermedad tardía, en Suecia Berlung³⁴ reporta que en pacientes con meningitis de Lyme se definió como positivo en inmunotransferencia para IgG el reconocimiento de la banda 41(fla) Kda más una banda de 18, 21.5 ò 23(OpsC) KDa⁴. Esta respuesta se observó en cerca del 10% de los sueros estudiados.

Mientras que en el estado de Coahuila, las bandas más frecuentemente observadas (Gráfica 7), fueron la de 41(fla) y 45 Kda. No se observaron las bandas de 23 (OpsC), 30, 31 y 93 Kda.

Estos resultados muestran la presencia de infección por *Borrelia burgdorferi*. Además pueden sugerir diferentes estadios de la enfermedad. Por los distintos tipos de bandas encontradas con Western blot en esta muestra. El diagnóstico de certeza requiere los datos clínicos que prueben una infección temprana y el antecedente de picadura de garrapata presuntamente infectada²⁰. En este estudio por su diseño transversal, con una muestra obtenida, hace varios años, no fue posible obtener esta información.

CONCLUSIONES.

Se encuentran evidencias de infección por *B. burgdorferi*, con mayor frecuencia y títulos más altos en la Zona Noreste de la República Mexicana, comparados con el D.F.

Esta prevalencia observada es mayor a la reportada en la encuesta nacional y es semejante a lo que se reporta en zonas endémicas de E.E.U.U. y Europa.

En la Zona Noreste la prevalencia de infección es alta. En esta área existe el vector y los hospederos que completan el ciclo infeccioso. Esto sugiere que ésta es una zona endémica de Borreliosis de Lyme.

PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES.

El diagnóstico serológico deberá realizarse con ELISA y confirmarse con Western blot.

Se ha iniciado la búsqueda intencionada de casos clínicos de pacientes mexicanos para tratar de establecer las características clínicas de la enfermedad en México. Así como la búsqueda y presencia del agente etiológico en el vector.

La comunidad médica deberá integrar como diagnóstico diferencial la infección por *Borrelia burgdorferi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ⊗ 1. Murray RG, Cairman E, Brenner DJ, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol I. Baltimore:Williams &Wilkins; 1984.p.59-62.
- ⊗ 2. Steere AC, Lyme disease. N Engl J Med 1989;**321**:586-95.
- ⊗ 3. Barbour AG, Tessier SL, Stoenner HG. Variable major protein of *Borrelia hermsii*. J Exp Med 1992;**11**:1312-24.
- ⊗ 4. Dressler F, Whalen JA, Remhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J Infec Dis 1993;**167**:392-400.
- ⊗ 5. Guzman L, Neira O. Lyme disease in Chile. J Rheumatol 1993;**20**:774-5.
- ⊗ 6. Maradiaga CMA, Llausas VA, Barguera HJ, *et al*: Eritema crónico migratorio asociado a artritis. Enfermedad de Lyme o una variante. Rev Mex Reumatol 1991;**6**:61.
- ⊗ 7. Gordillo G, Torres J, Solorzano F, Cedillo RR, Tapia CR, Muñoz O. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in México. Arch Med Res 1999;**30**:64-8.
- ⊗ 8. © The center Protec Workers' Rights. Advertencia de peligro de enfermedad de Lyme en la construcción.UO2/CCU31-1982 y UO2/CCU 312014 del National Institute for ocupacional Safety and Health.(UIOSH).
- ⊗ 9. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* y *B. afzelii* western blots.(immunoblots). J Clin Microbiology 1996;**34**:1732-38.
- ⊗ 10. Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirec immunofluorecence Assay for Lyme disease. J Infec Dis 1984;**149**:465-70.

- ⊕ 11. Hauser U, Wilske B. Enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant internal flagellin fragments derived from different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* for the serodiagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Med Microbiol Immunol* 1997;**186**:145-51.
- ⊕ 12. Grodzicki RL, Steere AC. Comparison of immunoblotting and direct enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J Infect Dis* 1988;**157**:790-7.
- ⊕ 13. Andrew R, Pachner AR, Steere AC. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: Meningitis cranial neuritis y radiculoneuritis. *Neurology* 1985;**35**:47-53.
- ⊕ 14. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC. Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses, by using an antibody-capture enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 1988;**157**:790-7.
- ⊕ 15. Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic test. *J Infect Dis* 1984;**149**:789-95.
- ⊕ 16. Voller A, Bidwell D, Bartlett. Análisis por enzimas fijadas a inmunoabsorbentes. En: Rose NR, *El laboratorio en inmunología clínica*, Buenos Aires: Médica Panamericana; 1984.p. 414-416.
- ⊕ 17. Roitt I. *Inmunología fundamentos*, 7a de.1994, Madrid: Medica Panamericana, 92,99,
- ⊕ 18. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*, México:Interamericana-Mc Graw.Hill.;1986;63-65
- ⊕ 19. Anderson JF, Magnarelli LA. Epizootiology of Lyme disease and methods of cultivating *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci* 1992;**653**:52-63.
- ⊕ 20. ASTPHLD_CDC and NIHCSTE. *Derborn Michigan, Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme disease* 1994. Oct.p.1-5.
- ⊕ 21. Herrell D. Lyme disease. *J Infect Dis*. 1995-1998 (serial on line). Aviable from: <http://www.x-1.net/Lyme/D.Herrell>.

- ⊗ 22. Arroyave MC, Tamez GR, Enfermedad de Lyme, informe de dos casos. Bol. Med. Hosp Infant Mex 1994;**51**:117-21.
- ⊗ 23. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;**227**:680-5.
- ⊗ 24. O'Farrel P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;**250**:4007-21.
- ⊗ 25. MARBLOT STRIP TEST SYSTEM. Western Blot for detection of IgG antibody to *Borrelia burgdorferi*. Product no. 40-20656 Carlsbad, CA.p.1-7.
- ⊗ 26. 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**:136-40.
- ⊗ 27. Luger SW, Krauss E. Serological test for Lyme disease: interlaboratory variability. Arch Intern Med 1990;**150**:761-3.
- ⊗ 28. Tapia CR, Gutierrez G, Sepúveda J. Metodología de la encuesta nacional seroepidemiológica, México. Salud pública 1992;**34**:124-35.
- ⊗ 29. Cutler SJ. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis is under review. Lancet 1996;**348**:117.
- ⊗ 30. Fahrer H, Van der LSM, Sauvain MJ, Gem 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.
- ⊗ 31. Rath PM, Ibershoff B, Mohnhaupt A, Albig J, Eljaschewitsch, Fehrenbach FJ et al. Seroprevalence of Lyme Borreliosis in forestry workers from Brandenburg, Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;**15**:372-377.
- ⊗ 32. Cooper C, Muhlemann MF, Wright DJM, Hutchinson CA, Armstrong R, Maini RN. Arthritis as manifestation of Lyme disease in England (letter). Lancet1987;**1**:1313-4.
- ⊗ 33. 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.
- ⊗ 34. 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.

- ⊗ 35. Vaca GD, Fragosos SH, Franco BR, Martínez IF, Santamaria VM y Soberanes CN. Manual de identificación de las especies de garrapatas de importancia en México IICA 1996;1-3:30-77.
- ⊗ 36. Fujikura T. Report of a who workshop on Lyme Borreliosis. WHOVPH 1993;132:3-19.
- ⊗ 37. Tilton CR, Sand NM, Manak M. The western immunoblot for Lyme disease: Determination of sensitivity, specificity, and interpretive criteria with use of commercially available performance panels Clin Inf Dis 1997;25(Suppl):S31-4.
- ⊗ 38. Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringnér A, Elmrud H, *et al.* An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. New Engl J Med 1995;16:1319-24.
- ⊗ 39. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme Borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 1999;37:2241-7.
- ⊗ 40. Chenault ae. Lyme disease still a concern in Texas. Texas A & M agriculture. (979) 845-2886, (serial un line). Aviable from:<http://www.ticktexas.org/tick/diseases/index-diseases.htm>
- ⊗ 41. Instituto de Geografía/UNAM. Atlas Nacional de México, Edit UNAM, México, 1989.
- ⊗ 42. Estadísticas históricas de México. Tomo I, INEGI. 1994, 3º. Ed. Aguascalientes, p. 19, 16, 24.
- ⊗ 43. Berner ME, Moncada HX, Aris RH, Sazunic YI. Eritema crónico migrans y enfermedad de Lyme Rev Med Chile 1989;177:1271-1274
- ⊗ 44. Hoffmann a. Monografía de los Ixodea de México, Parte I. Rev Mex H Nat dic:1962.