



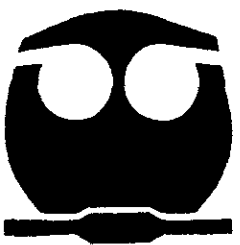
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

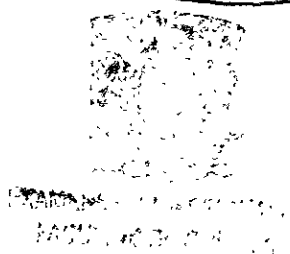
COMPARACION DE ELISA E INMUNOTRANSFERENCIA IgG DE Borrelia burgdorferi vs REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNOSTICO DE PACIENTES MEXICANOS CON MANIFESTACIONES SUGESTIVAS DE ENFERMEDAD DE LYME.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ISRAEL FLORES GARCIA

0000000



MEXICO, D. F.



2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado:**

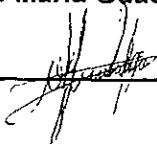
Presidente      Prof. **MAITE ASTIGARRAGA ZAVALETA**  
Vocal            Prof. **RUTH EDITH MARTIN FUENTES**  
Secretario      Dra. **MARIA GUADALUPE GORDILLO PEREZ**  
1er. Suplente   Prof. **LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO**  
2o. Suplente    Prof. **JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas  
y Parasitarias (UIMEIP), Hospital de Pediatría,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI. Mex. D.F.**

Asesor:


**M. en C. María Guadalupe Gordillo Pérez**



---

Sustentante:

**Flores García Israel**



---

## *Agradecimientos.*

*Mi más sincero agradecimiento a todos los que a lo largo de mi vida me ofrecieron su apoyo, su confianza y ejemplo:*

*...a mi Padre*

*A quien tanto quiero y quien hizo de mí un hombre responsable y perspicaz.*

*...a mi Madre*

*Por ser sin duda alguna la mejor madre que Dios pudo haberme dado, por el inmenso amor y cuidado que siempre me ha dado y porque a ella le debo lo mejor de mí.*

*...a mis Cinco Hermanos*

*Porque me han apoyado en todos mis proyectos y han compartido toda una vida a mi lado.*

*...a todos mis Maestros*

*En especial a Juana Bueno, Socorro Alpizar, Amada, Raúl Garza y Gustavo de la Mora.*

*... a mis Compañeros y Amigos*

*Con quien compartí tristezas, alegrías y triunfos.*

*...a mi querida Universidad*

*Porque a forjado en mí un espíritu profesionalista.*

*... a mi Asesora de tesis y todos los que forman parte de la UIMEIP  
Por haberme otorgado su confianza.*

*... y muy sobre todas las cosas mi más grande Agradecimiento a  
Dios*

*Por haberme dado la inteligencia, la perseverancia y la  
fuerza para seguir siempre adelante, porque a El debo todos  
mis logros.*

*"La Ciencia nos vislumbra*

*... La Grandeza de Dios"*

*ifg.*

# Índice.

	Pag
<b>Índice</b> .....	.1
<b>Planteamiento del problema</b> .....	.2
<b>Objetivo</b> .....	.3
<b>Antecedentes</b> .....	.4
<b>Diseño del estudio</b> .....	.12
<b>Descripción del estudio</b> .....	.14
<b>Material y metodología</b> .....	.16
<b>Resultados</b> .....	.27
Cuadro 1.....	.27
Cuadro 2.....	.28
<b>Figuras:</b>	
Figura 1.....	.30
Figura 2.....	.31
Figura 3.....	.32
Figura 4.....	.33
Figura 5.....	.34
Figura 6.....	.35
<b>Discusión</b> .....	.36
<b>Conclusión</b> .....	.41
<b>Bibliografía</b> .....	.42
<b>Anexos:</b>	
Anexo 1.....	.47
Anexo 2.....	.48
Anexo 3.....	.49
Anexo 4.....	.50
Anexo 5.....	.51

## Planteamiento del problema.

En los Estados Unidos de Norteamérica y Europa la Borreliosis de Lyme representa el 90% de las infecciones que son transmitidas por artrópodos. En México se ha documentado la presencia de los reservorios y de vectores competentes para la infección con *Borrelia* en la zona norte, noreste y Golfo de México.

A partir de 1991 se reportaron los primeros casos sospechosos de infección por *Borrelia burgdorferi* en los estados de Sinaloa y de Nuevo León. En 1999 se reportó la Encuesta Seroepidemiológica Nacional de borreliosis de Lyme con sueros obtenidos en 1988 con la técnica de ELISA y se observó una seroprevalencia de IgG vs *B. burgdorferi* de 1.1%, y se confirmó por inmunotransferencia en un 0.3% de la población estudiada. Los casos positivos correspondían a las zonas Noreste y Centro Occidente del país.

El diagnóstico de la enfermedad ha sido difícil principalmente en el estadio temprano, ya que diversos factores dificultan la interpretación de estudios serológicos, el cultivo de la bacteria en tejidos y líquidos corporales es difícil, lento y con una sensibilidad menor al 15%. Las técnicas de biología molecular para detectar DNA de *B. burgdorferi* han resultado ser muy sensibles, sin embargo su aplicación con especímenes clínicos ha presentado problemas y sobre todo, actualmente no existe un acuerdo en la selección de las secuencias que puedan funcionar como iniciadores para detectar todas las subespecies patógenas, esto debido a la variación genética de las mismas. Un diagnóstico temprano y posterior tratamiento oportuno de la infección con antibióticos disminuye el riesgo de complicaciones y secuelas.

Por lo anterior, consideramos necesario realizar un estudio de comparación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular de infección por *B. burgdorferi* en pacientes mexicanos con sospecha clínica de enfermedad de Lyme.

¿Resultaría la técnica de PCR una herramienta de mayor utilidad que la serología para el diagnóstico oportuno de Borreliosis de Lyme en pacientes con manifestaciones neurológicas o cutáneas?

## **Objetivo general.**

- Comparar los métodos serológicos (ELISA e inmunotransferencia) contra la técnica de PCR para búsqueda de *B. burgdorferi* en especímenes clínicos de casos sugestivos de Borreliosis de Lyme en México.

## **Objetivos específicos.**

- Determinar la frecuencia de infección por *Borrelia burgdorferi* en pacientes mexicanos con cuadro clínico sugestivo de Borreliosis de Lyme con el método de inmunotransferencia.
- Determinar la frecuencia de Borreliosis de Lyme en pacientes mexicanos con cuadro clínico sugestivo de Borreliosis de Lyme con el método de PCR para identificación de DNA de *B. burgdorferi* en muestras clínicas de piel y LCR.

## **Hipótesis nula:**

El diagnóstico por PCR de Borreliosis de Lyme en muestras clínicas de pacientes con cuadro sugestivo de la enfermedad presenta una frecuencia de detección similar a la que presentan las técnicas serológicas.

## **Hipótesis alterna:**

El diagnóstico por PCR de Borreliosis de Lyme en muestras clínicas de pacientes con cuadro sugestivo presenta una frecuencia de detección mayor a la que presentan las técnicas serológicas.



## ANTECEDENTES

### Etiología de la Enfermedad de Lyme.

La Borreliosis de Lyme es una enfermedad multisistémica de etiología infecciosa, producida por una espiroqueta denominada *Borrelia burgdorferi*, la enfermedad se desarrolla cuando la espiroqueta es transmitida al hombre, a través de la mordedura de garrapatas del género *Ixodes*, que actúan como vectores competentes para *Borrelia*. Estas son mantenidas en la naturaleza a través de un ciclo biológico, el cual inicia cuando los huevos son depositados en primavera, la larva emerge varias semanas después y se alimenta durante el verano, usualmente de roedores, perros, venados o humanos; y en el otoño muda a la forma adulta. Los adultos atacan a un huésped, comúnmente a venados, donde ellos viven y se alimentan para el desarrollo de los huevos. Después de poner los huevos mueren, y así el ciclo se repite (1).

Los vectores adquieren la infección cuando se alimentan de animales portadores principalmente en el estadio de larva y ninfa (1). La espiroqueta permanece en el intestino medio de la garrapata donde se multiplica y al mudar al nuevo estadio se transmite a través de la saliva durante su alimentación a nuevos huéspedes mamíferos; creando un ciclo infeccioso para la espiroqueta (2,13,4,5).

Después de la inoculación en piel de *Borrelia burgdorferi* por la garrapata, el microorganismo migra produciendo el eritema crónico migratorio (ECM) o puede diseminarse vía hemática a otros órganos, sistema musculoesquelético u otros sitios de la piel (4). Los microorganismos invaden y persisten en los tejidos afectados durante toda la enfermedad (1,3,7).

La enfermedad está distribuida en zonas donde se encuentra el vector. La mayor parte de los casos ocurren en verano, en el periodo de mayo a agosto, que corresponde al estadio de mayor actividad biológica de las garrapatas y de las actividades recreativas del hombre en áreas forestales y parques (5).

## **Epidemiología.**

Esta enfermedad se reporta en 3 áreas enzoóticas de Estados Unidos de América (EUA). de Massachusetts a Maryland en el Noreste, Wisconsin y Minnesota en el medio Oeste, y California, con una prevalencia de 1 a 10% En Europa principalmente en Alemania, Austria, Suiza, Francia y Suecia, con prevalencia del 4%, y con menos frecuencia en Rusia, China, Japón y Australia (1,3,8).

En Sudamérica y México existen reportes de casos clínicos sugestivos de Borreliosis de Lyme. Nuestro país comparte frontera geográfica con Estados Unidos de Norteamérica, así como intercambio de insumos, migración de personas y de aves (reservorio del vector) (6) éstas últimas acarrear a las garrapatas largas distancias relativas y las introducen a otras áreas (11). Entre los reservorios potenciales de *B. burgdorferi* en México se ha descrito la presencia de *Odocoileus virginianus* y *Peromyscus leucopus* distribuidos en los estados de Veracruz, Durango, Tamaulipas, Yucatán, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Estado de México y Morelos, que pueden hospedar a la garrapata del género *Ixodes*. Las garrapatas del género *Ixodes* especies *pacificus* y *scapularis* competentes de *Borrelia* también se encuentran distribuidos en la República Mexicana en los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Jalisco, Hidalgo, Veracruz, Campeche y Quintana Roo (12).

## **Manifestaciones clínicas.**

La enfermedad de Lyme tiene un espectro amplio de manifestaciones en etapa aguda y crónica En la fase 1, después de 3 a 32 días de incubación posterior a la mordedura de la garrapata, aparece en el 60 al 80 % de los pacientes el ECM que es la manifestación clínica inicial: comienza con una mácula o pápula roja que se expande hasta formar una gran lesión anular, y se resuelve espontáneamente en pocas semanas o meses algunos pacientes desarrollan lesiones cutáneas anulares secundarias crónicas. La espiroqueta puede permanecer localizada en la lesión cutánea y en los ganglios linfáticos regionales. Las lesiones cutáneas suelen acompañarse de cefalea intensa, ligera rigidez de nuca, fiebre, escalofríos, dolores musculares, artralgias y malestar general. La respuesta celular de mononucleares a los

antígenos de *B. burgdorferi* es mínima, y los anticuerpos específicos contra la espiroqueta son pocos (1,213).

La etapa temprana diseminada se presenta con afección de varios órganos o sistemas y se presenta en el 15% de los casos varias semanas o meses después, con manifestaciones neurológicas incluidas: meningitis, encefalitis leve, neuritis craneales (como parálisis facial bilateral), radiculoneuropatía sensorial o motora. (5). El cuadro clínico más común es meningitis con parálisis facial y radiculoneuropatía periférica. Estas alteraciones se pueden resolver en unos meses, y sin tratamiento evoluciona a un proceso neurológico crónico. En un 8% se presenta afección cardíaca con diversos grados de bloqueo auriculoventricular. En la mitad de los pacientes aparecen en la piel lesiones anulares secundarias similares al ECM pero de menor tamaño y no migratorias (4). El líquido cefalorraquídeo es normal durante los primeros días de estos síntomas. El dolor musculoesquelético en la *Borreliosis de Lyme* es generalmente migratorio en las articulaciones, tendones, músculo, y en hueso con una duración de varias horas o días en un sitio. En esta etapa las células mononucleares llegan a tener respuesta alta a los antígenos y mitógenos de *B. burgdorferi*. La respuesta IgM específica contra el antígeno flagelar 41-kDa de la espiroqueta alcanza su máximo hasta la tercera y la sexta semana, y puede no persistir largo tiempo (14)

En el estadio 2, se presenta la etapa crónica del padecimiento y aparece 6 meses o años después de la infección primaria, en cerca del 60% de los pacientes no tratados cuando cursan con ECM. En esta etapa se afecta progresivamente la piel con acrodermatitis atrofica (ACA). También suele presentarse encefalitis y artritis oligoarticular. *B. burgdorferi* ha sido implicada en el desarrollo de algunas formas de esclerodermia localizada y liquen escleroatrófico (3).

## Microbiología.

*Borrelia burgdorferi*, es un microorganismo móvil, gram negativo y microaerófilo, está cubierto por una membrana externa (1,3). De las especies de *Borrelia*, *B. burgdorferi* es la de mayor tamaño (20 a 30  $\mu\text{m}$ ) y de ancho (0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$ ), descrita como helicoidal, pero en realidad se exhibe como una forma ondulada plana, y estructuralmente posee

de 7 a 11 flagelos periplásmicos, de los cuales el principal componente es la flagelina, una proteína de 41-kDa (3,5). Su relación de contenido de guanina y citosina está entre 28 y 30.5%, y presenta de 31 a 59% de homología de su DNA con otras *Borrelias* (3). Posee varias proteínas de superficie, incluyendo dos principales proteínas de superficie exterior, una proteína básica de alta abundancia llamada proteína A de superficie externa (OspA) (30 a 32 kDa) y la otra llamada proteína B de superficie externa (34 a 36 kDa); un polipéptido de 66 kDa, que se piensa que también está localizado en la membrana externa, el antígeno 41-kDa localizado en el flagelo, un antígeno de 58 o 60-kDa que es una proteína de choque térmico y que tiene reacción cruzada con un antígeno equivalente (58 a 65 kDa) en un amplio rango de la bacteria. Además se ha encontrado que contiene un lipopolisacárido con probables propiedades de endotoxina, similar a otras bacterias gram-negativas (3,5).

La membrana exterior de *Borrelia* es fluida, y fácilmente dañable tanto en respuesta al tratamiento así como durante el ciclo normal de crecimiento (3,5). Es una bacteria de crecimiento lento y requiere de medios enriquecidos para su propagación en el laboratorio, generalmente medios de cultivo líquido como el Barbour-Stonner-Kelly II (medio BSKII) (anexo 5) aunque también se logra cultivar en medio sólido con 1.3% de agarosa (6). Usualmente se cultiva en tubos con tapón con limitado espacio residual de aire, suele crecer también en condiciones anaerobias, o con una presión de oxígeno atmosférico estándar en presencia de 1 a 5% de CO<sub>2</sub>. Es relativamente fácil obtener un aislado primario a partir de las garrapatas, pero es difícil hacerlo de pacientes (1,3,5).

La proteína A al igual que la proteína B, pueden variar en su peso molecular y reactividad con anticuerpos monoclonales; además la segunda de estas proteínas puede no producirse en los cultivos. Estas observaciones *in vitro* sugieren que la membrana externa del organismo sufre variación antigénica durante el curso de la infección (15). Los plásmidos pueden también codificar para proteínas que pueden ser importantes en la patogenicidad, desde la pérdida de la capacidad para infectar de los aislados después de pases en medios de cultivo, y que quizás este relacionado con la pérdida de plásmidos particulares en el cultivo (11). Ciertas diferencias han sido notadas entre aislados americanos y europeos de *B. burgdorferi* en cuanto a morfología, proteínas de superficie externa, plásmidos, y homología de ácidos nucleicos (3)

Su genoma está compuesto de un cromosoma lineal y de plásmidos tanto lineares como circulares (1). Una característica inusual de *Borrelia* es el número de copias de su genoma, contiene de 8 a 16 copias del cromosoma y de cada plásmido por célula, y el DNA parece estar organizado en equivalentes genómicos separados a lo largo de la longitud de la espiroqueta. Los genes que codifican para la mayoría de las proteínas de superficie de *B. burgdorferi* se encuentran localizados en los plásmidos (14). La membrana externa de *Borrelia* contiene un número abundante de lipoproteínas que son de utilidad serológica (5,15). *B. burgdorferi* es altamente sensible a tetraciclina, ampicilina y ceftriaxona (1,3).

Evidencias sugieren que manifestaciones clínicas particulares están relacionadas a genoespecies diferentes, por ejemplo en Norteamérica la artritis es la sintomatología predominante, mientras que en Europa los síntomas neurológicos y cutáneos son los más comunes (3,8,16). Estudios serológicos y moleculares han descrito 10 genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato alrededor del mundo: *B. burgdorferi* sensu stricto, es encontrada en Norteamérica y Europa, *B. garinii* y *B. afzelii*, se encuentran en Europa y Asia, *B. bissettii*, *B. valaisiana* y *B. lusitaniae* se ha reportado en Europa, *B. andersonii*, principalmente en EUA, *B. japonica*, *B. turdi* y *B. tanukii* son encontradas en Japón (8,17,18).

Al inicio de la enfermedad, la respuesta inmunitaria parece estar reprimida. Las células mononucleares de los enfermos responden mínimamente a los antígenos de *B. burgdorferi*. Pasadas las primeras semanas de infección, las células mononucleares muestran elevada reactividad a los antígenos de *Borrelia*, y aumento de la cifra total de IgM sérica e inmunocomplejos circulantes. La respuesta de anticuerpos específicos contra la espiroqueta y a polipéptidos espiroquetósicos se desarrolla a lo largo de meses a años (14). Los títulos de anticuerpo IgM específico contra *B. burgdorferi* son más altos entre la tercera y sexta semana después del inicio de la enfermedad; los títulos de anticuerpo IgG específicos se elevan lentamente y, generalmente llegan a su acmé meses o años después en caso de artritis (5,19,20).

Algunos grados de daño vascular, incluyendo vasculitis moderada u oclusión vascular hipercelular, pueden verse en múltiples sitios, sugiriendo que la espiroqueta o complejos inmunes pueden estar presentes alrededor de los vasos sanguíneos (3).

## Diagnóstico de la enfermedad de Lyme.

El diagnóstico de certeza se establece con el cultivo de *B. burgdorferi* de tejidos o líquidos corporales. La bacteria ha sido cultivada de sangre, piel, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, e identificada en lesiones de piel, miocardio, retina y membrana sinovial (1); sin embargo, en la práctica clínica los porcentajes de éxito son muy bajos, resultando el cultivo difícil y lento, con una sensibilidad menor al 15%. La observación directa de *B. burgdorferi* en especímenes clínicos de pacientes es muy difícil y requiere de microscopía de campo oscuro (1,3,21,22); por lo que actualmente se recurre a la determinación de anticuerpos séricos específicos, de IgM e IgG. Las técnicas más empleadas son inmunofluorescencia indirecta (IFA), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y western blot (inmunotransferencia), esta última como prueba confirmatoria para reconocer la respuesta a ciertas proteínas que incrementan la especificidad a más del 95% (1,20,23,24). Para disminuir la reacción cruzada con otros antígenos, en los ensayos de IFA y ELISA se ha incrementado el valor de corte a 1:256 para IFA y mayor a 1:320 para ELISA, logrando en ésta última una sensibilidad de 92% y una especificidad de 80% (25). Pero diversos factores tienden a dificultar la interpretación de los resultados de estudios serológicos:

- a) El estadio clínico de la enfermedad. En la etapa temprana de la enfermedad puede haber resultados falsos negativos o una respuesta dirigida a ciertos polipéptidos (11,19,22,26).
- b) Existe reacción cruzada con otras espiroquetas como: *Treponema pallidum*, *T. denticola*, *T. phagedenis* y *Borrelia sp.*, así como enfermedades autoinmunes, fiebre exantemática de las montañas rocosas y desordenes neurológicos Dando lugar a resultados falsos positivos (14,20,22).
- c) En diferentes pacientes la respuesta inmune presenta variación (12).

- d) El tratamiento temprano con antibióticos puede dar resultados falsos negativos al abortar la producción de anticuerpos (4,14,27).
- e) Existe variabilidad antigénica entre diferentes genoespecies y cepas de *B. burgdorferi* (8,11,22).
- f) El peso molecular aparente de algunas proteínas de *B. burgdorferi* (OspC) varían dependiendo de la cepa *B. burgdorferi* y del sistema de electroforesis utilizado. Los pesos moleculares de las proteínas de importancia diagnóstica deben ser definidos con anticuerpos monoclonales y policlonales (19).

Los resultados falsos negativos ocurren principalmente durante las primeras semanas posteriores a la infección. Cuando se emplea ELISA de captura en el 80% de los pacientes pueden mostrar una respuesta sólo para IgM contra *B. burgdorferi* (22).

La mayoría de las pruebas de ELISA emplean espiroquetas completas sonicadas como antígeno (28). Se ha encontrado una disminución de la sensibilidad usando una preparación del antígeno flagelar 41-kDa, con preparaciones flagelares enriquecidas, o preparaciones de proteínas de superficie externa (14,26,28). Aunque el polipéptido reconocido comúnmente es el antígeno flagelar 41-kDa, también se ha encontrado reconocimiento de otros componentes (28).

El 50% de los pacientes tienen serología positiva durante la etapa de ECM. Un ensayo de inmunotransferencia para IgG es considerado positivos si presenta 5 de las siguientes 10 bandas: 18, 21 (OspC), 28, 30, 39 (BmpA), 41 (Fla), 45, 58, 66 y 93-kDa (14,19,22).

Anticuerpos IgG específicos contra polipéptidos de la bacteria, particularmente de las proteínas de superficie externa 31-kDa y 66-kDa, el antígeno flagelar 41-kDa y el antígeno 55/58-kDa se desarrollan gradualmente durante el curso de la infección.

El empleo de técnicas de biología molecular para detección de DNA de *B. burgdorferi* bajo condiciones experimentales resulta ser muy sensible (29); como alternativa estratégica para la detección del microorganismo, la amplificación de genes

conservados de la bacteria por PCR ofrece potencial especificidad, la cual deriva de que cada microorganismo posee un DNA único; subsecuentemente se pueden diseñar oligonucleótidos (primers) complementarios de regiones conservadas del DNA y así detectar los diversos grupos de microorganismos (29,30). Sin embargo su aplicación con especímenes clínicos resulta tener problemas por el tipo de espécimen y por el método de conservación del mismo. En ECM la sensibilidad de la PCR es de 80% en biopsias de piel, cuando éstas son conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , mientras que en muestras conservadas en parafina es de 50%. Un factor que limita la aplicación del PCR es que actualmente no existe un acuerdo en la selección de las secuencias consenso que pudiera ser empleadas como primers (iniciadores) para la identificación de las subespecies patógenas (30). Los iniciadores más aceptados son para los genes cromosómicos flagelar y 16S-RNA o plásmidico como *ospA* (plásmido de 49-kDa de la bacteria) (31).



## **Diseño de estudio.**

Estudio transversal descriptivo.

## **Población de estudio.**

Muestras clínicas de pacientes con manifestaciones sugestivas de Borreliosis de Lyme en sus 2 etapas de evolución (temprana, localizada y diseminada o tardía) que fueron atendidos en el Hospital de Pediatría, del Centro Médico Nacional del IMSS y Hospital de Especialidades del Centro Médico la Raza.

## **Criterios de inclusión.**

Se incluyeron todas las muestras de pacientes mayores de 4 años de edad con cuadro clínico sugestivo de Borreliosis de Lyme, del sexo masculino y femenino.

## **Criterios de no-inclusión.**

No se incluyeron pacientes con antecedente clínico y/o serológico de leptospirosis, sífilis o con enfermedad autoinmune (LES y artritis reumatoide), pacientes menores de 5 años y que no han viajado al extranjero.

## **Criterios de eliminación.**

Fueron excluidas las muestras de pacientes que durante el estudio se les diagnosticó leptospirosis, sífilis, LES o artritis reumatoide. Y pacientes sin muestras completas. Además todas las muestras de piel de las cuales no se logró extraer el DNA.

## **Definición de caso positivo.**

Definición caso sospechoso de enfermedad de Lyme: El paciente con eritema migratorio o con una manifestación tardía de la enfermedad.

- 1) Eritema crónico migratorio: lesión en piel que inicia como mácula o pápula y se extiende en días o semanas formando una lesión redondeada grande, con aclaramiento central parcial. Una lesión solitaria debe ser mínima de 5 cm de diámetro. Se acompaña de fatiga, fiebre, cefalea, artralgias o mialgias intermitentes.
- 2) Manifestaciones tardías: artritis oligo o poliarticular asimétrica recurrente o crónica (semanas o meses); manifestaciones neurológicas (meningitis aséptica con presencia en LCR de pleocitosis y predominio de linfocitos, SGB, parálisis facial uni o bilateral como signo inicial o único y radiculoneuropatía dolorosa).

## DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO.

Se estudiaron muestras clínicas de pacientes con manifestaciones sugestivas de Borreliosis de Lyme. Los especímenes fueron suero y LCR en los casos con manifestaciones neurológicas, y biopsia de piel para los casos que presentaron manifestaciones cutáneas (eritema migrans, ACA y escleroderma).

**Toma de muestra:** la muestra de sangre se tomó en ayunas por punción periférica y se colocó en un tubo sin anticoagulante, por centrifugación se obtuvo el suero. El LCR se obtuvo por punción lumbar, se colocó en un tubo estéril y se concentró por centrifugación a 12000rpm 15 min (32). Ambos tipos de muestras fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento. La biopsia de piel se tomó de la zona central de la lesión en la etapa crónica y de la zona periférica en lesiones sugestivas de EMC; la asepsia de la superficie se realizó con yodo al 1% y por medio de un trocar de 4 a 6 mm de diámetro se obtuvo un fragmento. El espécimen fue transferido a un tubo estéril y se fraccionó: la fracción de piel para PCR se conservó en etanol al 70%.

### Estudios realizados.

Las muestras séricas obtenidas se procesaron por el método de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi* a una dilución de 1:640 (33), considerando como valor de corte para positividad al promedio de la densidad óptica de 25 sueros negativos controles (sueros de donadores sanos mexicanos) más 3 desviaciones estándar (Mat. y Met.).

WESTERN-BLOT. Las muestras séricas positivas por escrutinio (ELISA) se procesaron con el método de inmunotransferencia para la determinación de anticuerpos IgG vs bandas específicas de proteínas de *B. burgdorferi*. Se utilizó un kit comercial de western-blot (MarDX, Diagnostics, Inc.) al cual se reconoce con 100% de especificidad según criterios del CDC (34) como prueba confirmatoria. En cada prueba se usó un control positivo, un control positivo débil y un control negativo (Mat. y Met.). Los criterios de positividad para inmunotransferencia fueron los aprobados por el CDC y la ASTPHLD: una muestra se consideró positiva si presenta 5 o más de las siguientes bandas: 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 o 93-kDa (34). Y los criterios de positividad

europeo (EUCALB) al menos 2 de las siguientes bandas reactivas: p83/100, p58, p43, p39, p30, p23, p21, p17 y p21 (24,35).

PCR Se extrajo DNA de todas las biopsias y de los concentrados de LCR (Mat. y Met ). Se confirmó la efectividad en la extracción de DNA de biopsia de piel determinando la presencia del gene  $\beta$ -globulina en el tejido con la técnica de PCR (Mat. y Met ). Las muestras de DNA extraído de LCR y el DNA de biopsias de piel positivas para la amplificación del gene  $\beta$ -globulina fueron procesadas por PCR utilizando los iniciadores del gene cromosómico Flagelar y el extracromosómico *ospA* específicos para *B. burgdorferi* sensu lato (Mat. y Met.). Para reducir el riesgo de contaminación todas las muestras para PCR fueron procesadas en áreas separadas con campana de flujo laminar. Los reactivos para cada muestra fueron preparados en un cuarto separado y se utilizaron materiales desechables estériles y micropipetas con presión positiva

Las muestras positivas por PCR para *ospA* se procesaron por medio de Southern-blot empleando una sonda interna específica para el gene *ospA* de *B. burgdorferi*. Un porcentaje de las muestras de DNA positivas para la amplificación del gene flagelar por PCR se confirmó por medio de un PCR anidado empleando un par de iniciadores (para *amplificación de un fragmento largo* (externo) y un fragmento corto (interno) del gene flagelar (Mat. y Met.).

## MATERIAL Y METODOLOGÍAS.

### Técnica de Inmunoensayo enzimático ELISA.

Los pozos de las microplacas se sensibilizaron durante 18 horas con 50  $\mu$ L del antígeno diluido a 5  $\mu$ g/mL del sonicado de células completas de *B. burgdorferi* (cepa B31) en amortiguador de fosfatos pH 7.4 a 37°C (anexo 1). Se adicionaron 200  $\mu$ L del bloqueador a los pozos sensibilizados (leche descremada al 5% en PBS pH 7.4), se cubrió la placa y se incubó a 37°C por 75 min. Se lavó 3 veces con 0.05% Tween-20 en PBS (PBS-T) al 1X. Posteriormente se agregaron 60  $\mu$ L de suero diluido (1:640 en PBS pH 7.4 con leche descremada al 5%) a cada pozo (33). Se cubrió la placa y se incubó por una hora a 37°C. Se lavó 5 veces con PBS-T (1X), se adicionaron 60  $\mu$ L de suero anti-IgG unido a fosfatasa alcalina preparado en cabra (BioSource International, Ca, USA) diluido 1:1000 en leche descremada al 5%, se incubó durante una hora a 37°C. Se lavó 5 veces con PBS-T (1X) y se adicionaron 60  $\mu$ L de p-nitrofenilfosfato (Gull Labs, SLC UT, USA) diluido en dietanolamina pH 9.8 incubando por 1 hora a temperatura ambiente, cubriendo la placa para protegerla de la luz. Se leyeron las absorbancias en el lector de ELISA (Labsystem) a 405 nm.

El valor de corte se obtuvo de la densidad óptica más 3 desviaciones estándar (DS) de una mezcla de 25 sueros de donadores mexicanos no infectados con *B. burgdorferi*. Cada muestra de suero se probó por duplicado. En cada placa se incluyó la mezcla de sueros positivos (pacientes infectados con *B. burgdorferi*) por cuadruplicado. El resultado se obtuvo con el promedio de cada muestra de suero entre el valor de corte, expresada en unidades ELISA (UE).

## **Técnica para Western blot empleando el kit comercial MarDx (Diagnostics, Inc.)**

La técnica se basa en el empleo de antígeno de *B. burgdorferi* cepa B31 transferido en una membrana de nitrocelulosa que está en tiras. Cada tira se colocó con guantes en una bandeja, se incubó cada tira con 2.0 mL de la solución de lavado y diluyente de muestra para bloquear, mantenido en agitación por 5 min en una plataforma oscilatoria (Boekel Scientific) con una inclinación de 30°. A una tira se adiciona 80 µL del suero control positivo, otra con 20 µL del suero control positivo débil y la tercera con 20 µL del *suero control negativo* (36). A las demás tiras se les agregó 20 µL del suero problema y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 min. Posteriormente se decantó los sueros y se lavaron 3 veces con 2.0 mL de solución de lavado en agitación durante 5 min. Se agregó 2.0 mL de suero anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1.10), y se incubó durante 15 min. en agitación. Se decantó la solución y se lavó nuevamente 3 veces con la solución de lavado, se decantó y enjuagó con 2.0 mL de agua destilada.

Se agregó 2.0 mL de sustrato e incubó en agitación constante hasta que el *control positivo débil muestre la banda de 41-kDa ligeramente visible (4-12 min.)*. Se enjuagaron las tiras en agua destilada 3 a 4 veces. Se colocaron las tiras sobre papel absorbente para permitir secar. Y se procede a la lectura de las bandas presentes. La lectura se realiza con el control positivo localizando las bandas específicas y con el control positivo débil se localiza la banda de 41kDa. Se considerarán positivas aquellas bandas que presenten una intensidad igual o mayor que el control positivo débil. Una muestra se considera positiva si presenta 5 ó más de las siguientes 10 bandas: 18,23,28,30,39,41,45,58,66 o 93-kDa.

## Técnica para extracción de DNA de muestras de LCR.

Para la extracción de DNA se empleo un kit comercial IsoQuick (ORCA Research Inc. WA,USA).

Este método se basa en la utilización de las propiedades caotrópicas del tiocianato de guanidina (GuSCN), las cuales alteran la integridad celular e inhiben las nucleasas (DNAsa y RNAsa) actúa por lo tanto provocando la lisis celular y la estabilización del DNA. El DNA es separado del resto del lisado con un disolvente orgánico no corrosivo, todo el DNA es precipitado con alcohol y disuelto en agua destilada.

Se obtuvo una suspensión de células (anexo1) por centrifugación y resuspensión del sedimento (pellet) con el reactivo A (buffer para suspensión de muestras) y se incubó de 5 a 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó un volumen de la solución de lisis a la suspensión de células.

Se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra de lisado a un tubo de microcentrifuga y se adicionaron 700  $\mu\text{L}$  del reactivo 2 (matriz de extracción) y 400  $\mu\text{L}$  del reactivo 3 (buffer de extracción) a la muestra lisada agitando en vortex por 10 seg. para mezclar bien. Se centrifugó a 12000xg por 5min. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo centrifuga evitando transferir la fase orgánica (coloreada) o la interfase. Se adicionó 0.1 volúmenes del reactivo 4 (acetato de sodio) a la muestra de la fase acuosa y un volumen equivalente de isopropanol y 1  $\mu\text{L}$  de colorante para pellet (pellet paint, Novagen). Mezclar gentilmente para precipitar los ácidos nucleicos. Y se sometió a centrifugación a 12000xg por 10 min. Se descartó el sobrenadante sin disturbar el botón formado. Se adicionó 1 mL de etanol al 70% al pellet y se mezcla gentilmente por inversión del tubo varias veces. Se centrifugó a 12000xg por 5 min. Se descartó el sobrenadante, y se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet de ácidos nucleicos se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

## Técnica de extracción de DNA de biopsias de piel.

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

Se cortaron las biopsias de piel a 25 mg (aproximadamente), y se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, y se adicionaron 180  $\mu$ L de Buffer ATL (Buffer para lisis de tejidos). Se adicionó 20  $\mu$ L de solución stock de Proteinasa-K y se mezcló en vortex. Se incubó a 55°C (en baño maría) hasta que el tejido este completamente lisado agitando ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de Buffer-AL, se agitó en vortex, y se incubó a 70°C por 10 min. Se adicionaron 210  $\mu$ L de etanol (96-100%) a la muestra y mezcló por agitación.

Se colocó una columna QIAamp-spin (con sílice en gel) en un tubo colector de 2 mL y adicionó la mezcla (incluyendo el precipitado) a la columna. Se centrifugó a 6000xg por 1 min.

Se colocó la columna en un tubo colector de 2 mL, y se descartó el tubo que contiene el filtrado, enseguida se agregaron 500  $\mu$ L de Buffer AW (buffer de lavado) y se sometió a centrifugación a 6000xg durante 1 min. Se colocó la columna en un tubo colector limpio de 2 mL (descartar el tubo colector que contiene el filtrado). Se adicionaron a la columna nuevamente 500  $\mu$ L de Buffer AW. Se centrifugó a velocidad máxima por 3 min. Se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga de 2 mL limpio, y se descartó el tubo colector que contiene el filtrado. Finalmente se eluyó el DNA con 100  $\mu$ L de agua bidestilada (precalentada a 70°C), por centrifugación a 6000xg por 1 min. El DNA se conservó a -20°C hasta su procesamiento.



## **Técnica de PCR para amplificación del gene $\beta$ -globulina en muestra de biopsia de piel.**

Se emplearon iniciadores para amplificación del gene que codifica para  $\beta$ -globulina con las secuencias: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3' y 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'. La reacción se llevó a cabo como a continuación se describe:

Los siguientes reactivos se mezclaron en tubos de 0.5 mL especiales para termociclador: 5  $\mu$ L de DNA obtenido por el método de extracción de DNA de biopsias de piel (descrito anteriormente), 0.2 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 50 pM de cada primer, 5  $\mu$ L de amortiguador para Taq (10X), 10  $\mu$ L de glicerol al 50% (agua), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3.0 U de Taq DNA polimerasa (GibcoBRL) y agua bidestilada c.b.p. 50  $\mu$ L. La reacción se desarrolló en un termociclador (GeneAmpPCR System 9700) bajo las siguientes condiciones. un calentamiento inicial a 95°C por 4 min, 35 ciclos de amplificación a 95°C-1 min, 55°C-1 min, y 72°C-2 min; y un paso de extensión de terminación de 72°C por 5 min.

La presencia de los productos de la amplificación fue evaluada a través de electroforesis horizontal en gel de agarosa (Rochester, NY) al 2% en amortiguador TAE, 8  $\mu$ L de cada muestra y 2  $\mu$ L de buffer de corrimiento (anexo 3) se mezclaron previa colocación en el gel. Se empleó un marcador de peso molecular 1kb (GibcoBRL). El corrimiento se llevó a cabo a 100 volts, durante 50 a 60 min; el fragmento de interés tiene un tamaño de 268 pb. El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio y se visualizó y fotografió en un procesador de imágenes (Syngene). En todas las amplificaciones de DNA se metieron un control positivo y negativo.

## Técnica de PCR para la amplificación del gene flagelar.

Fueron sometidas a amplificación del gene flagelar las muestras que resultaron positivas para la amplificación del gene  $\beta$ -globulina por PCR (anexo 3) y las muestras de DNA extraído de LCR por la técnica de extracción de DNA de fluidos biológicos.

Se emplearon 2 juegos de iniciadores, uno para la amplificación de un fragmento corto del gene flagelar de especies de *Borrelia* (Fla LS y Fla RS): Fla-LS 5'-AAC AGC TGA AGA GCT TGG AAT TG-3' (438-459) y Fla-RS 3'-CGA TAA TCT TAC TAT TCA CTA GTT TC-5' (766-791). Y otro para la amplificación de una región larga del mismo gene (Fla-LL y Fla-RL). Fla LL 5'-ACA TAT TCA GAT GCA GAC AGA GGT-3' (301-324) y Fla RL 3'-TGT TAG ACG TTA CCG ATA CTA ACG-5' (942-965). El tamaño de los fragmentos de amplificación esperados es de aproximadamente 350 y 641pb respectivamente. La reacción se llevó a cabo como a continuación se describe:

Los siguientes reactivos se mezclaron en tubos especiales para termociclador: 5  $\mu$ L de DNA, 5  $\mu$ L de amortiguador para Taq (10X), 0.1 mM de cada desoxinucleótido trifosfatado (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 pM de cada primer, 2.5 U de Taq DNA polimerasa y agua bidestilada c.b.p. 50  $\mu$ L. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (GeneAmpPCR System 9700) bajo las siguientes condiciones:

un inicio con calentamiento a 95°C por 3 min, 40 ciclos de amplificación de 1 min a 95°C, 55°C-1 min., 75°C-1 min, y un paso de extensión de terminación a 72°C-7 min (31).

La presencia de los productos de la amplificación se evaluó por electroforesis (anexo 3), empleando un marcador de pesos moleculares de 1kb (Gibco-BRL).

## Técnica de PCR para amplificación del gene flagelar anidado.

Fueron sometidas a amplificación del gene flagelar anidado muestras de DNA que fueron positivas por lo menos para una de las amplificaciones por PCR de los fragmentos corto y largo del mismo gene flagelar. Primero se realizó una amplificación con los iniciadores Outer1 y Outer2, y posteriormente los productos de la primera amplificación fueron diluidos 100 veces y amplificados nuevamente usando los iniciadores Inner1 y Inner2.

Outer1: 5'-AAG TAG AAA AAG TCT TAG TAA GAA TGA AGG A-3' (245-275)

Outer2: 5'-AAT TGC ATA CTC AGT ACT ATT CTT TAT AGA T-3' (825-855).

Inner 1: 5'-CAC ATA TTC AGA TGC AGA CAG AGG TTC TA-3' (300-328)

Inner 2: 5'-GAA GGT GCT GTA GCA GGT GCT GGC TGT-3' (663-689).

El tamaño del fragmento de amplificación esperado es de 390 pb.

La reacción se llevó a cabo como se describe a continuación:

Los siguientes reactivos se mezclaron en tubos especiales para termociclador: 5  $\mu$ L de DNA, 5  $\mu$ L de amortiguador para Taq (10X), 0.1 mM de cada desoxinucleótido trifosfatado (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 pM de cada primer, 2.5 U de Taq DNA polimerasa y agua bidestilada c.b.p. 50  $\mu$ L. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (GeneAmpPCR System 9700) bajo las siguientes condiciones:

Un inicio con calentamiento a 94°C por 1 min seguido de 35 ciclos de amplificación de 30 seg a 94°C (desnaturalización), 55°C por 1 min. (alineamiento) y 72°C por 2 min (extensión) (37).

La presencia de los productos de la amplificación se evaluó por electroforesis (anexo 3), empleando un marcador de pesos moleculares de 50 pb (Gibco-BRL).

## **Técnica de PCR para amplificación del gene OspA.**

Fueron sometidas a amplificación del gene flagelar todas las muestras que resultaron positivas para la amplificación del gene  $\beta$ -globulina por PCR (descrito anteriormente) y las muestras de DNA extraído de LCR por la técnica de extracción de DNA de fluidos biológicos. Se emplearon los iniciadores: OspA 149 5'-TTA TGA AAA AAT ATT TAT TGG GAA T-3' Y OspA 319 5'-CTT TAA GCT CAA GCT TGT CTA CTG T-3'. La secuencia de amplificación tiene un tamaño aproximado de 195 pb. La reacción se llevó a cabo como se describe a continuación:

Los siguientes reactivos se mezclaron en tubos especiales para termociclador: 5  $\mu$ L de DNA, 5  $\mu$ L de amortiguador para Taq (10X), 0.1 mM de cada desoxinucléotido trifosfatado, 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 50 pM de cada primer, 2.5 U de Taq DNA polimerasa y agua bidestilada c.b.p 50  $\mu$ L. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (GeneAmpPCR System 9700) bajo las siguientes condiciones:

Un inicio con calentamiento a 94°C por 4 min, 45 ciclos de amplificación de 1 min. a 94°C (desnaturalización), 50°C-45 seg. (alineamiento), 72°C-45 seg. (extensión), y un paso de extensión de terminación a 72°C-7 min. (38).

La presencia de los productos de la amplificación se evaluó como se describe anteriormente, empleando un marcador de pesos moleculares de 1kb (Gibco-BRL).

## **Técnica de Southern blot en muestras positivas para OspA 149-319.**

Se empleo un kit comercial (ECL). El cual se basa en el empleo fluoresceína-11-dUTP que se une al DNA prueba. La detección es llevada a cabo vía un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina, la cual cataliza la reacción de quimioluminiscencia con dioxetano como sustrato. La luz resultante es capturada sobre una película (Hyperfilm MP).

Las muestras que resultaron positivas para la amplificación de estos genes, se sometieron a electroforesis (como se describe anteriormente). Posteriormente el gel se colocó en solución desnaturizante por 15 min. Se enjuagó dos veces por 5 min en agua bidestilada. Se colocó en solución neutralizante durante 15 min. Los productos positivos por la PCR se transfirieron a una membrana cargada positivamente de nylon-Hybond (Amersham Corp., Arlington Heights, Ill) por gradiente con solución SSC (10X), durante toda la noche. La membrana se retira y se deja secar (a medio ambiente) sobre papel. Y se expone a luz UV por 1 min para lograr la fijación del DNA (32).

### Pre-hibridización.

Se mezcló el buffer-ECL con cloruro de sodio y con el agente bloqueador (anexo 4). Se prehibridizó por 1 h. en un horno a 42°C (empleando 0.25 mL/cm<sup>2</sup>)

### Hibridización.

Se adicionaron 10 µL de la sonda de DNA (10 ng/µL) en solución de hibridación (anexo 4) precalentada a 42°C y la mezcla se agregó a la membrana incubando a 42°C de 8-12h. Se lavó la membrana con 50 mL de solución de lavado primario (anexo 4) 2 veces. Se agregaron 100 mL de la solución de lavado a 42°C manteniendo en incubación 20 min en el horno dos veces. Se lavó por duplicado con solución SSC (2X) en agitación suave por 5 min.

### Detección.

Se mezclaron volúmenes iguales del reactivo detección 1 y 2. Se coloca la membrana en un nuevo envase. Y se adicionó la mezcla de detección (0.125 mL/cm<sup>2</sup>). Se incubó por 1 min con agitación suave a temperatura ambiente. Se drenó el exceso del reactivo de detección y se cubrió la membrana en película de plástico adherente. Se fijó la membrana (con la cara del DNA hacia la placa de fotografía). En cuarto oscuro y luz roja se coloca el papel de película y se cierra la placa. Se expuso por 1h. Y se reveló la placa.

La sonda interna empleada: OspA 6 5'-ATT GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC CT-3' (39).

## **Prueba de posible inhibición para la PCR en muestras de DNA.**

Las muestras que fueron negativas para las 3 técnicas de PCR (flagelar corto y largo y *OspA*) y con sospecha de ser positivas, se probaron para la amplificación de los mismos genes por PCR (Mat. y Met.) Adicionando a la mezcla de reacción 5 $\mu$ L de DNA de control positivo (estándar interno) y 5 $\mu$ L de DNA prueba, manteniendo el volumen final de la mezcla de reacción c.b.p. 50 $\mu$ L.

Una muestra se consideró positiva para la presencia de inhibidores si no presentó amplificación para el gene correspondiente.

## Resultados.

Se estudiaron 94 pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de Borreliosis de Lyme residentes de la República Mexicana que no han viajado al extranjero. Los pacientes estudiados incluidos fueron 42 niños de 4 a 17 años con una edad promedio de  $10.3 \pm 3.7$  años y 52 adultos de 18 a 71 años con una edad promedio de  $38.5 \pm 12.8$  años. La relación hombre-mujer fué de 1:1.8. Se clasificaron de acuerdo a la manifestación clínica: en casos con manifestaciones neurológicas y manifestaciones cutáneas. Se eliminaron del estudio 5 casos al confirmarse otros diagnósticos. En 46 pacientes con manifestaciones neurológicas, el 67.4% (31) de los casos fué enviado con diagnóstico de polirradiculoneuritis, 8 (17.4%) con neuropatía craneal y el 15.2% restantes con meningorradiculoneuritis, mielitis y encefalopatía (Cuadro 1)

**Cuadro 1.** Casos positivos con manifestaciones neurológicas confirmados con estudios serológicos y PCR.

<b>Diagnóstico</b>	<b>No. Casos</b>	<b>WB (CDC)</b>	<b>WB EUCALB</b>	<b>PCR <i>ospA</i></b>	<b>PCR Fla-S</b>	<b>PCR Fla-L</b>
Meningorradiculoneuritis	2	1	1	0	1	0
Polirradiculoneuritis	31	8	10	2	0	0
Neuropatía craneal	8	2	3	1	0	1
Mielitis/Neuritis	2	1	1	0	0	0
Encefalopatía	3	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

En los otros 43 casos que presentaron manifestaciones cutáneas, el 25.6% (11) de los pacientes se enviaron con diagnóstico de esclerodermia, 37.2% (16) se envió con diagnóstico de atrofia hemifacial, 8 (18.6%) con ACA, y 8 casos con diagnóstico de ECM (3), linfocitoma (3) y LEA (2) (Cuadro 2).



**Cuadro 2.** Casos positivos con manifestaciones cutáneas confirmados con estudios serológicos y PCR

<b>Diagnóstico</b>	<b>No. Casos</b>	<b>WB (CDC)</b>	<b>WB EUCALB</b>	<b>PCR <i>ospA</i></b>	<b>PCR Fla-S</b>	<b>PCR Fla-L</b>
ECM	3	2	2	0	1	3
Linfocitoma	3	2	2	0	1	2
ACA	8	1	1	0	4	5
Esclerodermia	11	0	1	0	4	6
Atrofia hemifacial	16	7	9	0	6	11
LEA	2	1	1	0	0	1
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>28</b>

Las 89 muestras séricas se estudiaron con ELISA y los casos positivos fueron confirmados con Inmunotransferencia (WB). Considerando los criterios del CDC, 25 sueros (28.1%) fueron positivos. Que corresponden a 12 casos neurológicos y 13 casos cutáneos. Con los criterios de la EUCALB, el número se incrementó a 31 casos positivos. El WB mostró la banda de la proteína flagelar de 41kDa en todos los casos, la banda de 66kDa y 93kDa en 35% de los casos. La banda de 45kDa en 69% de los casos con manifestaciones cutáneas contra 42% en casos neurológicos. Las bandas de bajo peso molecular (18 y 23kDa) son proteínas presentes durante la etapa de enfermedad temprana, la primera se encontró en 7 casos con polirradiculoneuritis y esclerodermia; y la banda de 23kDa se encontró en 10 casos con cuadro clínico cutáneo de ECM, atrofia hemifacial y linfocitoma, así como en los casos neurológicos con parálisis facial y polirradiculoneuritis (Figura 1).

Después de evaluar la efectividad de extracción de DNA de biopsias de piel y la inhibición en muestras de DNA obtenido en LCR. El primer método confirmó una efectividad de extracción de DNA del 100% con la amplificación del gene  $\beta$ -globulina por PCR en todas las muestras conservadas en etanol al 70% (Figura 2).

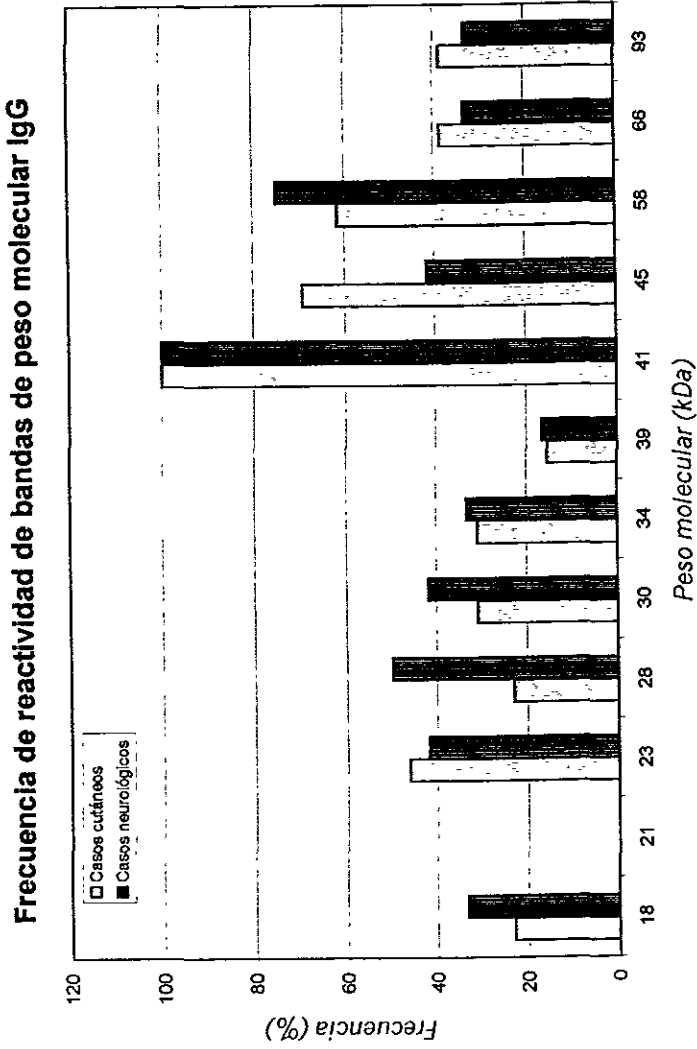
Al DNA de muestras de piel y LCR se les realizó la técnica de PCR para la amplificación de 2 genes de *B. burgdorferi*, el primero codifica para una proteína en un gene cromosómico (gene flagelar) y el segundo codifica para una proteína de membrana externa en un gene extracromosómico (*ospA*).

La amplificación por PCR del fragmento corto del gene flagelar (Fla-S) fué positiva en una muestra de LCR y en 16 muestras de piel (Figura 3). El fragmento *flagelar largo (Fla-L) amplificó por PCR sólo en un caso neurológico y para 28 muestras de piel (66.7%) (Figura 4). El 93.8% de los casos cutáneos positivos por PCR amplificaron para los fragmentos largo y corto del gen flagelar de B burgdorferi (Cuadro 2).*

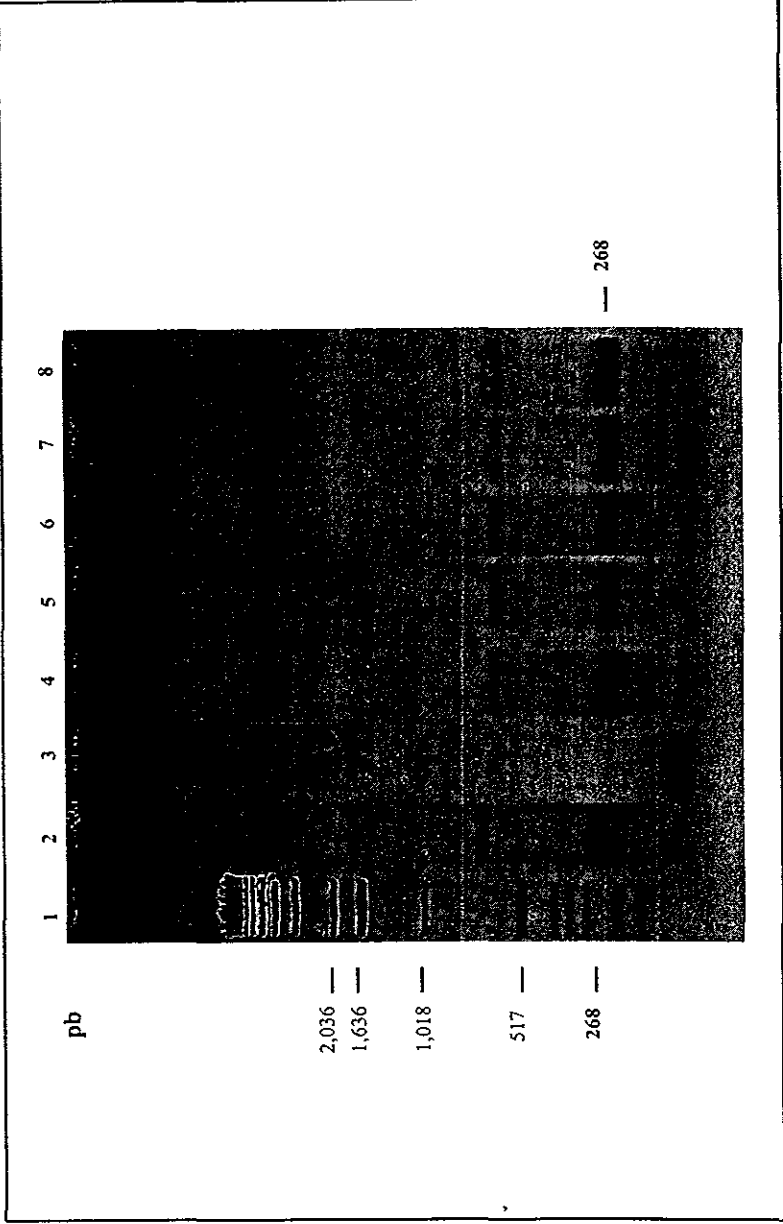
Se realizó la amplificación por PCR de otro fragmento del mismo gene empleando un PCR anidado en 23 (76.6%) de 30 muestras de DNA, que fueron positivas para al menos uno de los iniciadores del gene flagelar. El 91.3% (21) de las muestras fueron positivas (Figura 5).

El gene *ospA* se amplificó por PCR en 3 casos con manifestación neurológica y no amplificó en casos con manifestación cutánea. Los 3 casos positivos para la amplificación por PCR del gene *ospA* fueron confirmados por southern-blot empleando una sonda interna del gene amplificado (Figura 6)

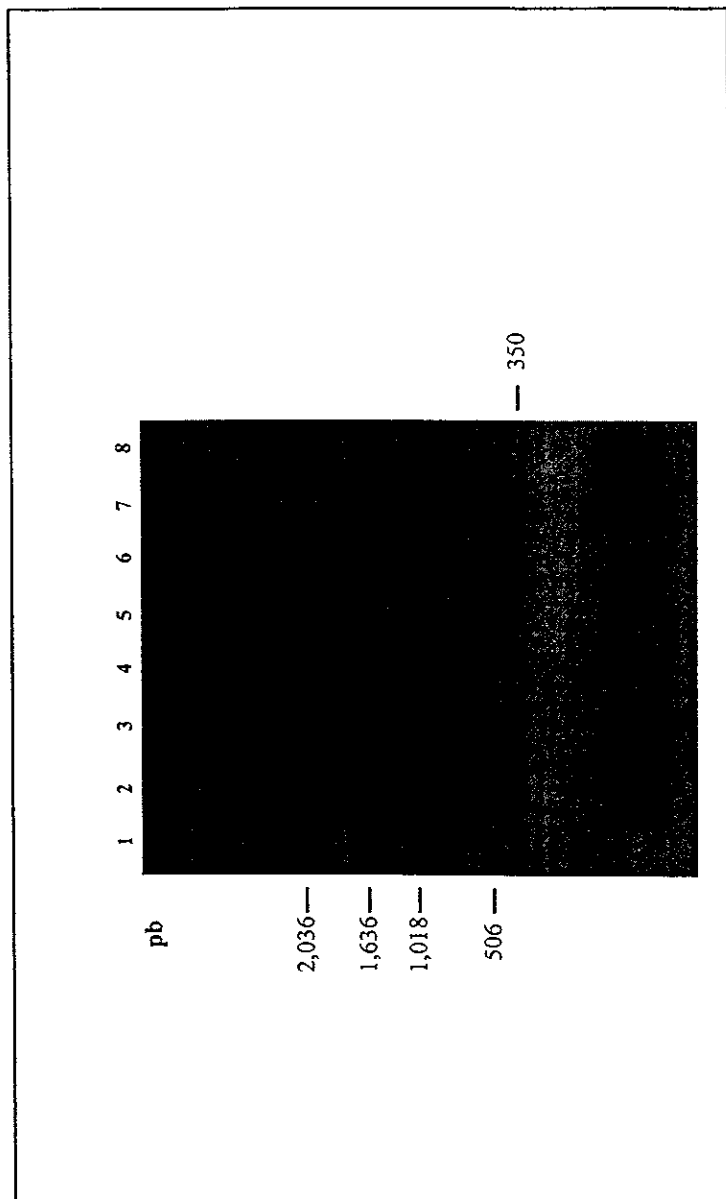
En el 20% de las muestras de LCR que se seleccionaron al azar para evaluar inhibición no se observó inhibición con la amplificación por PCR de los genes flagelar y *ospA*



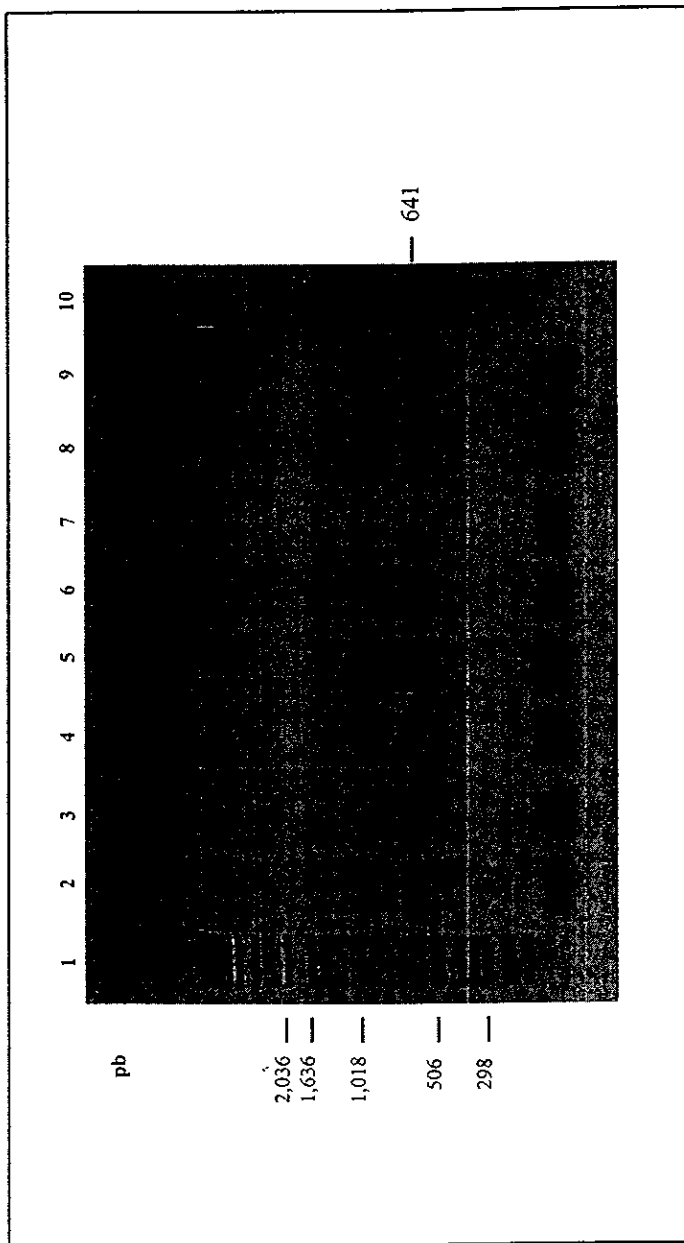
**Figura 1.** Distribución de frecuencias de la reactividad de las bandas de pesos moleculares IgG para el suero de pacientes de casos cutáneos (n=13) y neurológicos (n=12).



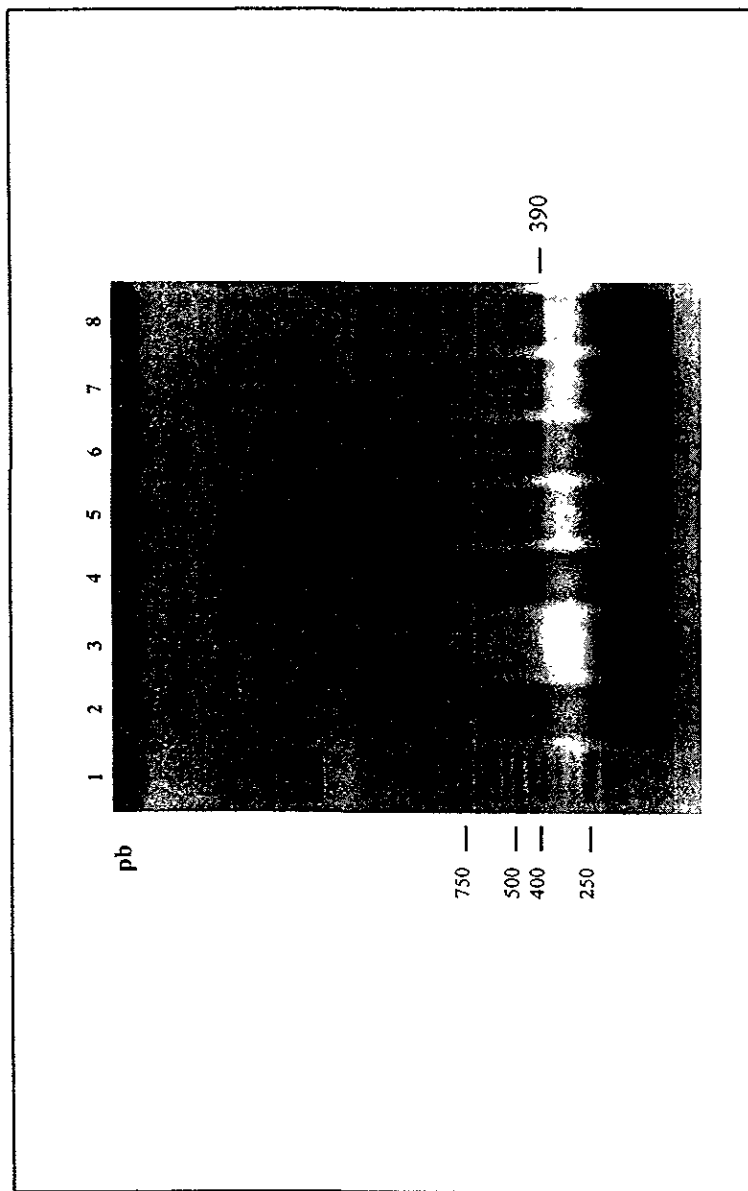
**Figura 2.** Análisis de los productos de PCR para gene  $\beta$ -globulina en DNA de biopsias de piel visualizado por electroforesis en gel de agarosa. La banda de 268pb corresponde al fragmento de amplificación esperado. Carril 1: marcador de pesos moleculares (1Kb), carril 2: control negativo, carril 3: control negativo, carriles 4-8: muestras clínicas positivas.



**Figura 3.** Análisis de los productos de PCR Flagelar corto (Fla LS y RS) en muestras de DNA de biopsia de piel y LCR por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de 350 pb corresponde al fragmento de amplificación esperado. Carril 1: marcador de pesos moleculares (1Kb), carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carriles 4 - 7: muestras clínicas positivas, carril 8: muestra clínica negativa.



**Figura 4.** Productos de PCR Flagelar largo (Fla LL y RL) en muestras de DNA de biopsia de piel y LCR analizados por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de 641 pb corresponde al fragmento del gene amplificado. Carril 1: marcador de pesos moleculares (1Kb), carril 2: control positivo, carriles 3 - 9: muestras clínicas, siendo las muestras: 1,2,3,4,6 y 7 positivas, carril 7: muestra clínica negativa.



**Figura 5.** Análisis de los productos de PCR amidoado visualizado por electroforesis en gel de agarosa. La banda de 390 pb corresponde al fragmento del gene amplificado. Carril 1: marcador de pesos moleculares (50 pb), carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carriles 4 - 8: muestras clínicas positivas.

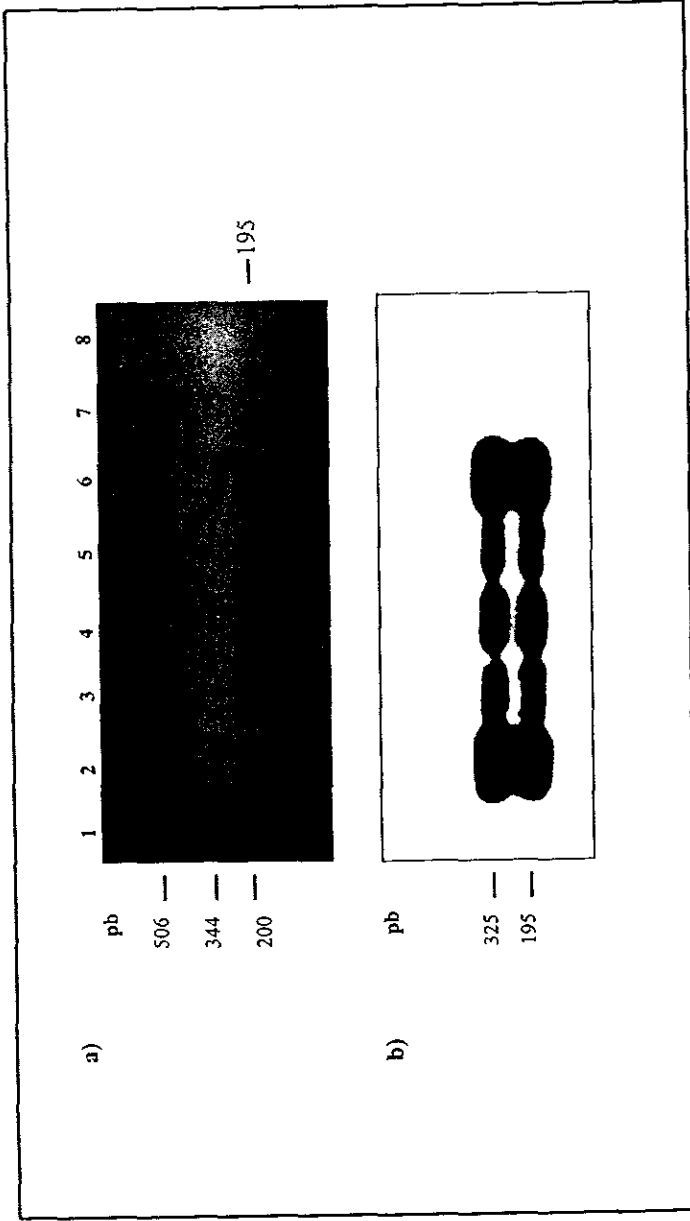


Figura 6. (a) Electroforesis de los productos de PCR amplificados para el gen *ospA* en gel de agarosa. La banda de 195pb corresponde al producto esperado de PCR, también amplificado para un fragmento no esperado de aprox. 325pb. Carril 1: marcador de peso molecular (1Kb), carriles 2 y 6: control positivo, carril 7: control negativo, carriles 3, 4 y 5: muestras clínicas correspondientes a casos neurológicos positivos, carril 8: muestra clínica negativa. (b) Southern blot empleando una sonda interna para el gen *ospA* correspondiente a la imagen superior, confirmación de los casos positivos para la amplificación del gen; la banda inespecífica (325pb) también muestra hibridación positiva.



## Discusión.

Estudios reportados en 1999 por Gordillo y cols. encuentran una seroprevalencia nacional en México que sugiere que el 0.3% de la población estuvo expuesta a *Borrelia burgdorferi*. Las zonas Noreste y Centro del país son las áreas probablemente endémicas (35). Todos los pacientes incluidos en éste estudio son residentes de la Zona Centro y Sureste de la República Mexicana que no han viajado al extranjero

Para el diagnóstico serológico de Borreliosis de Lyme el CDC recomienda 2 pruebas, una de escrutinio como el ELISA o IFA más una prueba confirmatoria con inmunotransferencia (WB) (12). Este criterio fué adoptado debido a la reacción cruzada con antígenos de *Treponema spp*, enfermedades reumáticas y otras espiroquetas que dan resultados falsos positivos en el ELISA reportado por Hauser y cols. (10). El 73.5% de las muestras de suero que fueron positivas por ELISA fueron confirmadas por inmunotransferencia. En este estudio se consideraron los criterios del CDC y fueron positivos sólo los casos con WB positivo.

Todos los casos confirmados por WB cumplieron criterios del CDC y de la EUCALB. Otros 6 casos fueron positivos sólo por los criterios europeos. Se ha comprobado la existencia de heterogeneidad genética de *Borrelia burgdorferi* en Norteamérica y el continente europeo (29). Recientes estudios serológicos y moleculares han descrito 10 genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato alrededor del mundo, y la mayoría de éstas tiene una distribución geográfica limitada (50). Debido a la variabilidad de genoespecies en diferentes áreas geográficas del continente europeo, no existe un criterio único aceptado. Robertson y cols. sugieren que el criterio de positividad en inmunotransferencia debe ser diferente en Europa y en Norteamérica (45). En EUA, Tilton y cols. evaluaron el kit de inmunotransferencia para detección de anticuerpos IgG para *B. burgdorferi* (MarDx) (Ca,US) y encontraron una especificidad del 100% con los criterios del CDC (38). Al aplicar éste método los 25 sueros positivos cubrieron los criterios del CDC y la EUCALB. Por lo que los pacientes mexicanos positivos por WB están infectados con *B. burgdorferi*

El ECM es la manifestación cutánea característica de la etapa temprana localizada de la enfermedad (24). Se estudiaron 3 pacientes con ECM y 2 fueron seropositivos por inmunotransferencia. En 3 casos se presentó la etapa temprana

diseminada como linfocitoma cutáneo y 2 fueron seropositivos. Tilton y cols. reportan que las pruebas serológicas comerciales para detección de anticuerpos vs *B. burgdorferi* en el estadio temprano de la infección presentan diferencias en la sensibilidad según el antígeno y el laboratorio (38).

La esclerodermia localizada, la atrofia hemifacial y el LEA han sido reportados en Europa como manifestación cutánea de la enfermedad, estos hallazgos no han sido observados en pacientes de Estados Unidos (48) En éste estudio se evaluaron a 11 pacientes con esclerodermia localizada y ningún caso fué positivo con serología. En cambio de 18 pacientes, 16 con atrofia hemifacial y 2 casos de LEA, 8 fueron seropositivos.

La acrodermatitis crónica atrófica (ACA) es la manifestación cutánea tardía de Borreliosis de Lyme. La seropositividad encontrada en 8 casos estudiados con ACA fué de 13%. Craven y cols. reportan que en los casos con manifestación tardía la mayoría son seropositivos con una sensibilidad cercana al 100% (46). Por lo anterior los estudios serológicos tienen una gran importancia en el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad

La mayoría de los pacientes estudiados con manifestación neurológica presentaban diagnóstico de polirradiculoneuritis, y/o neuropatía craneal que corresponden a manifestaciones de la forma aguda *diseminada de la enfermedad*, tuvieron una seropositividad del 26%. Hauser y cols. reportan que el diagnóstico de neuroborreliosis por serología en la etapa temprana es más difícil que en los casos cutáneos (29). En la forma tardía se estudiaron 3 casos con diagnóstico de encefalopatía y ningún caso fué positivo por serología. Pachner y cols. reportan que la manifestación neurológica tardía de la enfermedad es rara (5). Por lo que se reafirma la baja frecuencia de casos positivos para Borreliosis con encefalopatía.

La producción de anticuerpos estuvo dirigida principalmente contra las proteínas de 41kDa (100% de los casos), 45, 58, 66 y 93kDa. Estos hallazgos son semejantes a los encontrados por Ledue y cols. quienes reportan las bandas correspondientes a las proteínas de 41,58,66 y 93kDa como las de mayor frecuencia encontradas (44). Dressler y cols. reportaron que el suero de pacientes con enfermedad tardía reconoce las proteínas de membrana externa (30,39,58 o 93kDa) y la de 66kDa, mientras que en

enfermedad temprana reconoce a las proteínas de 41, 23 (OpsC) y 18kDa (17p en el sistema europeo) (37). En este trabajo las bandas de 23kDa y 18kDa estuvieron presentes en pacientes que cursaban con diagnósticos de: ECM, linfocitoma, atrofia hemifacial. También en los casos neurológicos con diagnósticos de parálisis facial y polirradiculoneuritis. Todas son manifestaciones tempranas localizadas o diseminadas de la enfermedad.

Los grupos de iniciadores aplicados en éste estudio con la técnica de PCR para muestras de piel y de LCR fueron 2; uno de origen cromosómico (flagelar) y uno extracromosómico de membrana externa (*OspA*) que son altamente específicos para detectar *B. burgdorferi* sensu lato (31,39,42).

La amplificación del fragmento largo del gene flagelar (Fla-L) fué positiva en los 3 casos de ECM y en 2 casos con linfocitoma, que corresponden a manifestaciones tempranas de la enfermedad. Mientras que el fragmento corto (Fla-S) sólo amplificó en un caso con ECM y en un caso con linfocitoma. Semejante a lo reportado por Schwartz y cols. quienes encontraron una sensibilidad superior al 59% en la amplificación por PCR en muestras de piel de pacientes en el estadio temprano de la enfermedad (24). Lo que confirma que la PCR en muestras de piel con manifestación temprana es una prueba rápida, específica y con mayor sensibilidad que la serología. En los casos correspondientes a esclerodermia, atrofia hemifacial y LEA, que son cuadros clínicos que sugieren Borreliosis de Lyme se encontró una positividad de 62% por PCR.

En pacientes con manifestación neurológica, sólo 5 de 46 casos fueron positivos por PCR en LCR. Estos resultados presentan una sensibilidad más baja que la reportada por Nocton y cols quienes reportan una positividad con PCR del 25 al 38% (39). En pacientes con neuroborreliosis sólo uno de cada 4 presenta DNA de *B. burgdorferi* en LCR (27). Lo cual concuerda con los resultados encontrados en los casos neurológicos con una positividad total de 11.6%.

La mayoría de las muestras se estudiaron por PCR con dos juegos de iniciadores diferentes para la amplificación del gene flagelar. Se logró confirmar en el 91.3% la amplificación con PCR anidado del gene flagelar. Johnson y cols. reportan que los iniciadores empleados en la PCR anidado no reaccionan con ningún otro DNA de *Borrelia sp* ya que amplifican para un fragmento altamente conservado y específico

para *B. burgdorferi* (42). Lo que sugiere que los 23 casos positivos confirmados por ambas técnicas son casos confirmados de Borreliosis de Lyme.

La amplificación del gene *ospA* confirmada por southern-blot fué positiva para 3 casos neurológicos de polirradiculoneuritis con neuropatía craneal. En ninguna muestra de piel se amplificó el gene *ospA*. La PCR del gene *ospA* fue más sensible en muestras de LCR como lo reportan Nocton y cols. Johnson y cols. reportan una disminución del 30% para la amplificación de este gene en aislados de California, Nueva York y Alemania y el mismo gene puede amplificar para otras especies de *Borrelia* (42).

De los 43 casos cutáneos estudiados la PCR detectó como positivos el 67.4% y por serología el 30.2%. De los 31 casos cutáneos positivos, 29 (93.5%) fué positivo con PCR y 13 (42%) por serología. Por lo que la PCR en los casos cutáneos fue más sensible y puede ser una herramienta para el diagnóstico de Borreliosis de Lyme, cuando el cultivo es difícil y poco accesible

De los 15 casos neurológicos positivos por serología y/o PCR, 12 (80%) fueron positivos por serología y 5 (33.3%) por PCR. Por lo que en casos neurológicos la detección de anticuerpos contra proteínas de *B. burgdorferi* resultó ser una mejor prueba que la PCR para diagnosticar la enfermedad.

El método empleado para la extracción de DNA de biopsias de piel (Quiagen) es altamente confiable con una sensibilidad encontrada del 100%. Para el método de isotiocianato de guanidina (IsoQuick) empleado para la extracción de DNA de muestras de LCR, Mouritsen y cols. reportan una sensibilidad capaz de detectar hasta 10 espiroquetas por mL (24). Por lo anterior los casos obtenidos con la amplificación por PCR son verdaderos positivos y con muy baja proporción de casos falsos negativos.

Como no se observó inhibición en las muestras de LCR con la amplificación por PCR, las muestras que fueron negativas por esta técnica no contenían presencia de inhibidores. La disminución sensibilidad de la PCR puede atribuirse a la etapa clínica en que se tomó la muestra, la concentración de DNA de *B. burgdorferi* por debajo del límite de detección o que el sitio de la toma de la muestra no fué adecuado para contener la espiroqueta. Algunas muestras fueron mantenidas en conservación por

más de un año. Brettschneider y cols. reportan que la detección por PCR disminuye hasta en un 50% en muestras conservadas más de un año (26). Nocton y cols. reportan que se requieren al menos 10 equivalentes genómicos para lograr la amplificación del gene *ospA*, siendo la baja concentración de DNA la causa principal de la sensibilidad baja. Otro factor que puede dar falsos negativos por PCR, es el empleo de antibióticos en el tratamiento antes de la toma de la muestra (39).

Los estudios serológicos nos proporcionan evidencia de infección por *B. burgdorferi* o enfermedad activa, pero continúan con anticuerpos durante años (1) En contraste a la serología, la técnica de PCR provee evidencia directa de la presencia de la bacteria.

## Conclusión.

La técnica de PCR es una herramienta rápida y altamente específica en el diagnóstico de Borreliosis de Lyme en pacientes con manifestaciones cutáneas, mientras que en pacientes con manifestaciones neurológicas se logran determinar mayor número de casos por serología.

En pacientes con manifestación temprana el diagnóstico de la enfermedad por identificación de anticuerpos contra *B. burgdorferi* tiene baja sensibilidad, y es la PCR superior a la serología.

El estudio serológico es de gran importancia en el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad, sin embargo sólo indica presencia de anticuerpos y no necesariamente la enfermedad.

**Bibliografía.**

1. Patrick R.Murray, Ellen Jo Baron, et al. Manual of Clinical Microbiology. 7th edition, ASM Press, USA; 1999: 746-758.
2. Persing H. David, Smith F. Thoma, et al. Diagnostic molecular microbiology, Principles and Applications. 6th. Edition, American society for microbiology, USA;1993:203-210.
3. Allen C. Steere, M.D. Medical Progress of Lyme Disease. The New England Journal of Medicine 1989;31:586-596.
4. Maradiaga CMA, Llausás VA, Kumate RJ. Eritema Crónico Migratorio Asociado a Artritis. Enfermedad de Lyme (?) o una variante. Cong Mex Inf XIV 1989;1(res):1.
5. Rosa Patricia A., Ph.D. Microbiology of *Borrelia burgdorferi* Thieme Medical Publishers 1997:17:5-9.
6. Anderson John F., Magnareli A. Louis. Epizootiology of Lyme Disease and Methods of Cultivating *Borrelia burgdorferi*. Tropical Veterinary Medicine 1992;653:52-63.
7. Arroyave CM, Taméz GR. Enfermedad de Lyme. Informe de casos. Bol Med Hosp Infant Mex 1994;51:117-120.
8. Gary I. Norman, Jeffrey M. Antig, et al. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* Senu Strcto, *B. garinii*, and *B. afzelii* Western Blots (Immunoblots). Journal of Clinical Microbiology 1996;4:1732-38.
9. Arroyave CM, Támez GR. Enfermedad de Lyme. Informe de casos. Bol Med Hosp Infant Mex 1994;51:117-120.
10. Magos LC, Sánchez Villareal F., Gutiérrez G., Tapia CR. Banco Nacional de sueros. Salud pública 1992;30.64-68.
11. Heinz Fahrler, Sjeff M., et al. The Prevalence and Incidence of Clinical and Asymptomatic Lyme Borreliosis in a Population at Risk. The Journal of Infectious Diseases 1991;163:305-310.

12. Rusell H, Sampson JS, et al. Enzyme-Linked Immunofluorescence Assay and Indirect Immunofluorescence Assay for Lyme Disease 1984;149:465-470.
13. Pachner A. R, Steere A.C. The triad of neurologic manifestacions of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuntis. Neurology 1985;35:47-53.
14. Dressler Frank, Whalen Jennifer A., et al. Western Blotting in Serodiagnosis of Lyme Disease..The Journal of Infeccious Diseases 1993;167:392-400.
15. Stoenner Herbert G., Dodd Thomas, Larsen Carole. Antigenic Variation of *Borrelia Hermsii*. Journal of experimental Medicine 1982;156:1297-1311.
16. Van Dam, A.P., H. Kuper, et al. Different Genospecies of *Borrelia burgdorferi* are Associated with Distinct Clinical Manifestations of Lyme Borreliosis. Clinical Infections Diseases 1993;17:708-717.
17. Burgdorfer, W. Lyme Borreliosis: Ten Years After Discovery of Etiologic Agent. *B. burgdorferi*. Infection 1991;19:257-262.
- 18 Lee Seung-Hyun, Kim Bum-Joon, et al. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato on Basis of RNA Polymerase Chain Gene (*rpoB*) Sequences. American Society for Microbiology 2000;38:2557-62.
19. Maradiaga CMA, Llausás VA, Kumate RJ. Eritema Crónico Migratorio Asociado a Artritis. Enfermedad de Lyme (?) o una variante. Cong Mex Inf XIV 1989;1(res):1.
20. Rusell Harold, Samson Jacquelyn S., et al. Enzyme-Linked Immunofluorescence Assay for Lyme Disease. The Journal of Infectious Diseases 1984;149:465-9.
21. Fredricks David N., Relman David A.. Application of Polymerase Chain Reaction to the Diagnosis of Infectious Diseases. Infectious Diseases Society of America 1999;29:475-488.
22. Craft Joseph E., Grodzicki Robert L., Steere Allen C. Antibody Response in Lyme Disease: Evaluation of Diagnosis Tests. The Journal of Infectious Diseases 1984;149:789-795.



23. Berardi Victor P., Weeks Karen E, Steere Allen C. Serodiagnosis of Early Lyme Disease: Analysis of IgM and IgG Antibody Responses by Using an Antibody-Capture Enzyme Immunoassay. *The Journal of Infectious Diseases* 1988;158:754-760.
24. Hauser Ulrike, Lehnert Gisela, Wilske Bettina. Validity of Interpretation Criteria for Standardized Western Blots (Immunoblots) for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis Based on Sera Collected throughout Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:2241-47.
25. Dressler F., Whalen JA, Reinhardt BN, and Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases* 1993,167:392-400
26. Hauser Ulrike, Wilske Bettina. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays with Recombinant Internal Flagelin Fragments Derived from Different Species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato for the Serodiagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Med Microbiol Immunol* 1997;186:145-151
27. Pettenkofer Max Von, Maximilians Luudwing. Validity of Interpretation Criteria for Standardized Western Blots (Immunoblots) for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis Based on sera Collected throughout Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:2241-47.
28. Grodzicki Robert L., Steere Allen C. Comparison of Immunoblotting and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Different Antigen Preparations for Diagnosis Early Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 1988;157:790-7.
29. Pachner Andrew R., Delaney MD, Elizabeth, BS, The Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *Ann Neurol* 1993;34:544-550.
30. Wienecke R., Neubert U., Volkenandt M. Molecular Detection of *Borrelia burgdorferi* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Lesions of Lyme Disease. *Journal of Cutaneous Pathology* 1993;20:385-8.
31. Barbour G. Alan, Maupin Gary, Teltow, et al. Identification of an Uncultivable *Borrelia* Species in the Hard Tick *Amblyomma americanum*: Possible Agent of a Lyme Disease-Like Illness *The Journal of Infectious Diseases* 1996;173:403-9.

32. Reinhard Zbinden, Daniel Goldenberger, et al. Comparison of Two Methods for Detecting Intrathecal Synthesis of *Borrelia burgdorferi*-Specific Antibodies and PCR for Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32:1795-98.
33. Gordillo P. María G. Confirmación Epidemiológica de Enfermedad de Lyme en Pacientes y Búsqueda de *Borrelia burgdorferi* en el Vector, en la República Mexicana (Tesis de maestría) 1999:40-41.
34. Tilton Richard, Sand Mary, and Manak Mark. The Western Immunoblot for Lyme Disease. Determination of Sensibility, Specificity, and Interpretive Criteria with Use of Commercially Available Performance Panels. *Clinical Infectious Diseases* 1997;25(suppl 1):S31-4.
35. Robertson Guy, Andrews Wilske, et al. A European multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2097-2102.
36. Ledue Thomas, Collins Marilyn and Craig Wendy. New Laboratory Guidelines for Serologic Diagnosis of Lyme Disease: Evaluation of Two-Test Protocol. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:2343-50.
37. Johnson J. Barbara, Happ Christine, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* in Ticks by Species-Specific Amplification of the Flagellin Gene 1992;47:730-741.
38. Nocton James, Bloom Bradley, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid in Lyme Neuroborreliosis. *Journal of Infectious Diseases* 1996;174:623-627.
39. Mathiesen DA, Oliver JH, Kolbert CP, et al. Genetic Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the United States. *Journal of Infectious Diseases* 1997;175:98-107.
40. Schwartz Ira, Wormser Gary P., et al. Diagnosis of Early Lyme Disease by Polymerase Chain Reaction Amplification and Culture of Skin Biopsies from Erythema Migrans Lesions. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30:3082-88.

41. Fujiwara Hiroshi, Fujiwara Keiko, Hashimoto Ken, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garinii* or *B. afzelii*) in Morphea and Lichen Sclerosus et Atrophicus Tissues of German and Japanese but Not of US Patients. Arch Dermatol 1997;133:41-44.
42. Craven RB, Quan TJ, Baailley RE, Daitwyler 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.
43. Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, and Hofman H. Diagnostic Value of PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi* in Skin Biopsy and Urine Samples from Patients with Skin Borreliosis. Journal of Clinical Microbiology 1998;36:2658-65.
44. Edith Berner M., Ximena Moncada H, Hernan Aris R, Ivo Sazunic Y. Eritema Crónico Migrans y Enfermedad de Lyme. Rev. Méd. Chile 1989;117:1271-4.
45. Gordillo Guadalupe, Torres Javier, et al. Serologic Evidences Suggesting the Presence of *Borrelia burgdorferi* Infection in Mexico. Archives of Medical Research 1999;30:64-68.
46. Lebech Anne-Mette and Hansen Klaus. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Urine Samples and Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Early and Late Lyme Neuroborreliosis by Polymerase Chain Reaction. American Society for Microbiology 1992;30:1646-53.

## **ANEXOS.**

### **Anexo 1. Preparación del antígeno.**

Un subcultivo de *B. burgdorferi* (cepa B31) cultivado en el medio BSK II (anexo 5), se incubó por 5 a 7 días. Las espiroquetas se cosecharon por centrifugación a 21000g por 30 min a 15°C y lavadas por triplicado en PBS 0.01 M (pH 7.2). Se conservaron en 10 mL de PBS a 4°C.

Para el ELISA, el botón resultante de 350 mL (aproximadamente) de medio de cultivo se resuspendió en 15 mL de PBS. La suspensión se sometió a sonicación en un baño de hielo por 10 min con un sonicador Cole Parmer (Co. Chicago) a 60% de la intensidad máxima. El sonicado se centrifugó a 21000g por 30 min a 4°C. El sedimento se resuspendió una vez en 5 mL de cloruro de sodio (NaCl) 1M y la suspensión se centrifugó nuevamente. La fracción soluble corresponde a la mezcla de antígeno, la cual fue dializada con varios cambios de agua destilada y finalmente se conservó en PBS

## Anexo 2. Reactivos para ELISA.

### Preparación de amortiguador salino de fosfatos. 1X. (PBS).

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O)	2.9 g
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Timerosal	0.1 g
Tween-20	0.5 mL
Agua destilada c.b.p.	1.0 L

### Solución reguladora de dietanolamina.

Azida de sodio (NaN <sub>3</sub> )	0.02 g
Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.01 g
Dietanolamina	9.7 mL
Agua destilada c.b.p.	80.0 mL

### Anexo 3. Reactivos y materiales para electroforesis.

#### Amortiguador para electroforesis (TAE).

(Tris –acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M, pH 8.0)

Solución stock concentrado. 50X	
Tris base	242.0 g
Ac. Acético glacial	57.1 mL
EDTA	100 mL (Sol. 0.5M)
Agua c.b.p.	1000 mL

#### Buffer de corrimiento (Loading buffer).

(Azul de bromofenol 0.05%, glicerol 5%, EDTA 1mM).

1. Se pesa 0.1 g de azul de bromofenol.
2. Se disuelve en 10 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada.
3. Se toman 2.5 mL de ésta solución y se mezcla con 3 mL de glicerol.
4. Se completa un volumen total de 10 mL.
5. Se adicionan 10  $\mu$ L de EDTA 1M.

#### **Anexo 4. Soluciones para Southern blot.**

##### Solución desnaturalizante.

(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl).

NaOH	20.0 g
NaCl	87.66 g
Agua bidestilada c.b.p.	1000 mL

Esterilizar en autoclave.

##### Solución neutralizante.

(0.5 M tris, 3 M NaCl, pH 7.5).

Tris base	60.57 g
NaCl	175.32 g
Ajustar pH a 7.5 con HCl concentrado	
Agua bidestilada c.b.p.	1000 mL

Esterilizar en autoclave.

##### Buffer de hibridación.

Al buffer ECL se le agrega NaCl a una concentración 0.5M y se adiciona el agente bloqueador a la mezcla anterior a una concentración 5% (w/v), mezclar durante una hora en agitador magnético. Calentar a 42°C por 30 min con agitación ocasional. Conservar en congelación.

## Anexo 5. Descripción y preparación del medio de cultivo

Ingredientes para preparar 676 mL de medio semisólido Barbour Syoenner-Kelly II conteniendo el antibiótico Rifampicina.

Número	Ingrediente y proveedor	Cantidad
1	Neopeptona (Difco) disolver en 200 mL de agua	2.5 g
2	Yeastolate (Difco)	1.27 g
3	HEPES (Sigma)	3.0 g
4	-D(+)-Glucosa (Sigma)	2.5 g
5	Citrato de sodio (Sigma)	0.35 g
6	Piruvato de sodio (Sigma)	0.4 g
7	N-Acetil-D-glucosamina (Sigma)	0.2 g
8	Bicarbonato de sodio (Sigma)	1.1 g
9	Rifampicina (Sigma) disolver en 1.35 mL DMSO (Sigma)	0.0338 g
10	Suero de conejo (Pel Freeze)	32mL
11	Medio CMRL 1066 (10X) sin L-glutamina y bicarbonato de sodio (Gibco)	50 mL
12	Albúmina de suero bovino (Armour) disuelta en 250 mL de agua	25.0 g
13	Gelatina (Difco) disuelta en 30 mL de agua	7.0 g
14	Agarosa ( SeaKem LE; FMC Corp., Marine Colloids Div.) disuelta en 50 mL de agua	0.95 g
15	L-Cisteina HCL (Sigma)	0.125 g
16	DL-Ditiotreitol (Sigma) disuelto en 20 mL de agua	0.097 g
17	Superóxido dismutasa	0.012 g

Tabla 1.

### Preparación del medio BSK II.

Se empleo agua bidestilada para enjuagar dos veces los recipientes de vidrio antes de ser esterilizados y como disolvente para los ingredientes del medio enlistado en la Tabla 1. La Neopeptona es adicionada a 200 mL de agua que se lleva a ebullición y se enfría a 95°C. Manteniendo en agitación continua, la mezcla es gradualmente enfriada a menos de 40°C. Los ingredientes 2-9 (Tabla 1) son adicionados secuencialmente mientras la mezcla es agitada. El suero de conejo, el cual ha sido inactivado a 56°C por 1 h es filtrado a través de filtros Nalgene (Nalge Co., Rochester) de 0.22 µm y adicionado a la mezcla junto con el medio CMRL y la albúmina de suero bovino. La albúmina es mantenida en agitación durante 2 h en 250 mL de agua en un recipiente



separado y filtrada a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de ser adicionada. El pH del medio es ajustado a 7.6 con hidróxido de sodio 1N.

Los pasos finales incluyen la preparación de las soluciones de gelatina y de agarosa. La gelatina es adicionada a 30 mL de agua; la agarosa es adicionada a 50 mL de agua en recipientes separados. Ambas son solubilizadas y esterilizadas en autoclave. La suspensión descrita en el párrafo anterior es filtrada a través de un filtro Sterivex-GS bell (Millipore) de 0.22  $\mu\text{m}$  dentro de la solución enfriada de gelatina la cual es posteriormente incubada por 13 min. en un baño de agua a 52°C. La solución de agarosa, la cual es enfriada a 52°C, y los agentes reductores (ingredientes 15-17 en Tabla 1), los cuales han sido adicionados a 20 mL de agua y pasados a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , son adicionados y mezclados vigorosamente con el medio estéril. El medio completo es inmediatamente dispensado en alicuotas de 7.0 mL en tubos para cultivo de plástico de 8 mL.