



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS

UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI, IMSS.

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE *Borrelia burgdorferi* ADQUIRIDA
EN LA REPUBLICA MEXICANA Y DE LA RESPUESTA INMUNE A
ANTIGENOS DE DIFERENTES ESPECIES DE *BORRELIA* EN PACIENTES
CON BORRELIOSIS DE LYME.**

TESIS

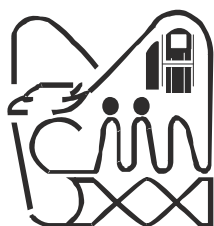
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA:

DRA. MARIA GUADALUPE GORDILLO PEREZ

COMITE TUTORAL:

DR. JAVIER TORRES LOPEZ
DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS
DR. JUAN CALVA MERCADO
DRA. CELIA ALPUCHE ARANDA
DRA. MARIA DEL CARMEN MARTINEZ



¹JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS, HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI. IMSS; ²SUBDIRECTOR DE INVESTIGACION CLINICA, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN; ³JEFE DEL LABORATORIO DE MEDICINA EXPERIMENTAL,SS; ⁴INVESTIGADOR TITULAR, COORDINACION DE INVESTIGACION MEDICA, IMSS.

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis hijos

Quienes me han inspirado para seguir estudiando y poder aportar un poco de conocimiento para el manejo de nuestros pacientes.

A mi esposo

Por compartir sus objetivos profesionales, así como por su paciencia y comprensión durante este largo período de preparación académica.

A mis padres

Quienes supieron guiarme durante mi vida personal y profesional, así como por enseñarme el valor de la constancia y la perseverancia.

A mis hermanos

Quienes han compartido mi inquietud académica. Muy especialmente a mi hermana Berenice quien además de compañía en este largo camino ha sido mi apoyo incondicional y el de mis hijos.

A mis maestros

De la Escuela de Medicina, UABC:

Dr. Abasolo quién fijó mi interés académico en la microbiología clínica.

Dr. Landa Rico excelente pediatra quien sembró la curiosidad académica y clínica en la Pediatría.

UNAM, IMSS:

Dr. Fortino Solórzano Santos y Dr. Humberto Díaz Ponce quienes me enseñaron lo interesante de la Infectología clínica y han puesto su confianza para mi desarrollo en la investigación.

Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS.

Dr. Javier Torres López

Por hacer posible el desarrollo de este proyecto y unir sus esfuerzos para lograr la apertura de esta nueva línea de investigación en nuestro país.

Dra. Celia Alpuche, Dr. Juan Calva, Dra. María del Carmen Martínez, Dr. Ruiz Palacios y Dr. José Sifuentes, por su entusiasmo y acertadas observaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Institute de Bacteriologie, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Dr. Benoît Jaulhac

Por haberme permitido aplicar nuevas técnicas de inmunodiagnóstico y biología molecular, así como definir los métodos de diagnóstico útiles para nuestra población.

Gracias maestros por guiarme y enseñarme que aún el camino más sinuoso ó la montaña más alta puede ser escalada.

A mis colegas médicos:

Dr. Velásquez, Dr. Ramón , Dra. Gloria Estrada por su entusiasmo e interés en mejorar la atención de los pacientes y por la confianza puesta en este proyecto.

A mis compañeros y amigos

Carmina, Leopoldo, Gerardo, Margarita, Ruth, Carmelita y Maricarmen

Quienes han compartido mis éxitos y mis fracasos en esta difícil pero apasionante carrera de investigación.

Este proyecto fue financiado por:

CONACYT proyecto 30694-M 1999-2002

Fondo de Investigación en Salud del IMSS FP:-2003/119

FP: 2005/562

Alumno becado por CONACYT, No. 116518

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINAS
1. RESUMEN	4
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Cuadro Clínico.	8
3 EPIDEMIOLOGIA	12
3.1 Epidemiología mundial.	13
3.2 Epidemiología en México.	13
4 MICROBIOLOGIA	15
4.1 Características morfológicas, antigénicas y genéticas de <i>B. burgdorferi</i> .	15
4.2 Métodos de Tipificación Fenotípica.	17
4.3 Métodos de Tipificación Genotípica.	18
5. METÓDOS DE DIAGNOSTICO	22
6. ENFERMEDAD DE LYME EN MEXICO	26
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
8. OBJETIVO GENERAL	28
8.1 Objetivos Específicos.	28
9. HIPOTESIS GENERAL	28
10. SUJETOS, MATERIAL Y METODOS	29
10.1 Diseño del Estudio.	29
10.2 Población de Estudio.	29
10.3 Muestra.	30
10.3.1 Criterios de Selección.	30
10.4 Definición Operacional de las Variables.	30
11 DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO	33
11.1 METODOS	34
11.1.1 Muestras Clínicas	34
11.1.2 Técnicas de ELISA	35
11.1.3 Respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de <i>Borrelia</i>	35
11.2 Técnicas de Biología Molecular	37
12. ANALISIS DE DATOS	41

13.	RESULTADOS	42
13.1	Descripción General	42
13.2	Descripción Epidemiológica	42
13.3	Descripción Clínica	43
13.4.	Respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de <i>Borrelia</i> en el suero de pacientes mexicanos.	47
13.5	Caracterización Molecular de <i>Borrelia burgdorferi</i> en biopsias y líquidos corporales de pacientes.	50
13.6	Cultivo de tejidos y líquidos corporales	54
14.	DISCUSION	55
15.	CONCLUSIONES	65
16.	BIBLIOGRAFIA	66
17.	ANEXOS	73
18.	FIGURAS	85

Palabras clave: *Borrelia burgdorferi*, Eritema migrans, Lyme borreliosis, Linfocitoma, neuroborreliosis.

1. RESUMEN

Caracterización molecular de *Borrelia burgdorferi* adquirida en la República Mexicana y de la respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de *Borrelia* en pacientes con Borreliosis de Lyme.

OBJETIVO: Determinar las especies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalentes en pacientes mexicanos con Borreliosis de Lyme adquirida en la República Mexicana mediante caracterización molecular y de la respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de *Borrelia*.

METODOS: Estudio transversal descriptivo. De Marzo de 1999 a Septiembre del 2003 se estudiaron 364 pacientes que cubrieron los criterios clínicos e histológicos del CDC de Borreliosis de Lyme; La encuesta epidemiológica incluyó la visita a zonas boscosas y/o la exposición a mordedura de garrapatas. Manifestaciones clínicas sugestivas de Borreliosis de Lyme fueron investigadas. Suero ó LCR fueron tomados para medir los anticuerpos IgM e IgG vs 3 especies de *B. burgdorferi* sensu lato usando ELISA confirmando con Western-blot (WB). En 28 pacientes de 56 seropositivos con WB se realizó la PCR para los genes *flagelar* y *OspA*: 17 DNAs de biopsias de piel, 10 LCR y 1 líquido sinovial.

La genotipificación se realizó con 3 métodos : Southern-blot (SB) con oligonucleótidos específicos del gene *flagelar* para 3 especies de *Borrelia*: *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* y *B. afzelii*. En las mismas 28 muestras se aplicó la PCR en tiempo real para amplificar un fragmento de 230 pb del gen *flagelar* de *B. burgdorferi* con sondas específicas para 11 genoespecies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato con una sensibilidad para detectar 2 espiroquetas utilizando la tecnología TaqMan o las sondas de doble hibridación y química LNA. El tercer método se realizó secuenciación con secuenciador capilar Beckman (Fullerton, CA, USA) a 13 de las muestras.

RESULTADOS: De los 364 pacientes 65 fueron ELISA positivo y 59 se confirmaron con WB para *B. burgdorferi* sensu lato. Los pacientes seropositivos fueron 42 adultos (62.5%) de 42.5 ± 17 años y 17 niños (27.5%) de 8 ± 2 años de edad, sexo M:F 1.2:1. En 53 casos se presentaron manifestaciones agudas (Neurológicas 46 y cutáneas 7) y 6 casos en etapa crónica 3 con manifestación cutánea y 3 con artritis. La respuesta humoral IgM de 51 casos agudos a las 3 especies de *Borrelia* fue positiva en 13, a 2 especies en 16, para *B. burgdorferi* ss 3/51 (5.9 %), *B. garinii*, 9/51 (17.6%) y 9/51 (17.6) *B. afzelii*. La respuesta IgG se presentó en 6 casos crónicos y 2 casos agudos a las 3 especies de *Borrelia* en 1 (10%), a 2 especies en 2 (20%), para *B. burgdorferi* ss en 5 (50%) y para *B. garinii* 2 (20 %). De las 28 muestras clínicas estudiadas con PCR fueron positivas para los genes *fla* 14 y *ospA* 4, se confirmaron con SB 16 con la sonda para *fla* y 7 con sonda *ospA* de *B. burgdorferi* ss. Todos los DNAs fueron negativos con las sondas de *B. afzelii* y *B. garinii* y *B. hermsii*. Con la PCR en tiempo real se identificó la genoespecie *B. burgdorferi* sensu stricto en 12 y 2 fueron no tipificables. En 8 muestras de pacientes con EM (2), linfocitoma (2), artritis (1) y neuroborreliosis (3) mostraron una homología con el gen *fla* de *B. burgdorferi* ss del 99% y con el gen *ospA* 96%.

CONCLUSIONES: Este es el primer reporte de pacientes con Borreliosis de Lyme en pacientes mexicanos. La genoespecie presente en esta muestra de pacientes con enfermedad de Lyme adquirida en México es *B. burgdorferi* sensu stricto semejante a la reportada en los Estados Unidos de América pero con expresión clínica semejante a la de Europa. Médicos que atienden pacientes mexicanos con EM, linfocitoma, monoartritis y meningopoliradiculopatía deben considerar dentro del diagnóstico diferencial la infección por *Borrelia burgdorferi*.

ABSTRACT

Molecular Characterization of *Borrelia burgdorferi* and of the immune response to different *Borrelia* species antigens in patients with Lyme Borreliosis acquired in Mexico.

Objective: Molecular genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples from Mexican patients with Lyme disease acquired in Mexico and characterization of the humoral response to different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Methods: Cross sectional study. Patients with clinical manifestations suggestive of Lyme disease were studied from March 1999 to February 2002. The study included a sample of 364 patients which fulfilled the CDC clinical and histological criteria for Lyme borreliosis. Questions regarding visit to woods or exposure to ticks bytes were included in a questionnaire. Serum samples and/or cerebrospinal fluid (CSF) were taken to test for IgM and IgG antibodies against *B. burgdorferi* sensu stricto and against antigens from three *B. burgdorferi* sensu lato species, using ELISA and confirmed with Western-Blot (WB) test. In seropositive cases, DNA from skin biopsies, CSF or sinovial liquid, according to the clinical manifestation of the patient, was studied for the *fla* and *ospA* genes by PCR. Positive cases were further genotyped with three methods: 1) southern-blot (SB) using specific probes of the *fla* gen for three *Borrelia* species: *B. burgdorferi* ss, *B. garinii* and *B. afzelii*; 2) Real time-PCR using *fla* gen probes specific for eleven *B. burgdorferi* complex genospecies, with a sensibility to detect 2 spirochetes, using TaqMan and LNA chemistry; 3) Sequencing PCR products of the *fla* and *ospA* genes with a capilar sequencer.

Results: Of 364 patients, antibodies vs *B. burgdorferi* were identified in 65/364 (18%) by ELISA and confirmed in 59 (16%) with WB. The seropositive patients were 42 adults (71%), of 42.5±17 years, and 17 children (29%). The M:F sex ratio was 1.2:1. Exposition to ticks was reported in 54% patients and other clinical data suggestive of Borreliosis were present in 30/59 (51%) patients. acute Lyme manifestations were present in 53/59 patients (86%); neurological manifestations in 46 and cutaneous in 7. Chronic manifestations were present in six patients (9%), three with cutaneous signs and 3 with arthritis. Among the 51 acute cases, the humoral IgM response in WB vs *B. burgdorferi* sensu lato was positive against antigens of the three species of *Borrelia* in 13 patients; and positive against two species in 16 cases. Whereas IgM response to only one species was found in 21 patients, three vs *B. burgdorferi* ss, nine vs *B. garinii* and nine vs *B. afzelii*. An IgG response was present in the five chronics cases and in five acute cases. One case was positive vs the three species of *Borrelia*, two cases were positives vs two species and seven vs one species: five vs *B. burgdorferi* ss and two vs *B. garinii*. All the DNAs were negatives in SB with the probes specific for *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. hermsii*. Of the 14 PCR positive samples, nine were studied with Real time-PCR and the genospecie *B. burgdorferi* sensu stricto in was identified seven; whereas two samples were not typificable. The *fla* and *ospA* genes were sequenced in eight patients: one with EM, two with linfocitoma, one with arthritis and four with neuroborreliosis. Sequence analysis showed an homology with *B. burgdorferi* ss of 96 and 99% respectively.

Conclusions: This is the first report that shows evidences of infection by *B. burgdorferi* in cases clinically suggestive of Lyme disease in Mexican patients, including neurologic, cutaneous and arthritis cases. The genospecies present in Lyme disease acquired in Mexico was *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, similar to reports in the United States. Physicians attending Mexican patients with E.M, lymphocytoma, monoarthritis and meningopoliradiculopathy should consider testing for *Borrelia burgdorferi* infection.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, Erythema migrans, Lyme borreliosis, Lymphocytoma, neuroborreliosis.

2. ANTECEDENTES.

La borreliosis de Lyme es una enfermedad infecciosa producida por una espiroqueta denominada *Borrelia burgdorferi*, la cual es transmitida por la mordedura de garrapatas del género *Ixodes* (1).

2.1 CUADRO CLINICO DE BORRELIOSIS DE LYME.

La enfermedad en animales domésticos se manifiesta como artritis y se desconocen las características en animales salvajes (2). En humanos el espectro de la borreliosis de Lyme es amplio, presentándose desde infección asintomática en población en riesgo hasta una gama amplia de manifestaciones clínicas que se han dividido en 2 estadios (2).

2.1.A. Estadio temprano : localizado y diseminado .

2.1.B. Estadio crónico.

2.1.A.1. Estadio temprano localizado. Ocurre pocas semanas después de la infección y se manifiesta como eritema migratorio (*eritema migrans*) (EM) que se presenta en el 60 a 80% de los casos como signo inicial. Es una lesión circular papular eritematosa con diseminación centrífuga que puede desarrollarse 3 días a 16 semanas (promedio 1.5 semanas) después de la mordedura por garrapata y se resuelve espontáneamente en 3 a 6 semanas.

2.1.A.2. Estadio temprano diseminado. Después del EM, en 3 a 12 semanas si no se da tratamiento se presenta afección de varios órganos o sistemas, probablemente por diseminación hematogena con manifestaciones neurológicas cardiacas, cutáneas y oculares (3).

2.1.A.2.a. Neuroborreliosis de Lyme: Inicia en la tercera semana posterior a la mordedura de la garrapata. Se presenta en 20 % de casos con borreliosis de Lyme, en Estados Unidos de América (EUA) comparado con 40% en Europa (5).

Las formas de neuroborreliosis son:

- a) **Neuropatía craneal**, principalmente parálisis periférica del nervio facial (VII par craneal); es la manifestación neurológica más común en EUA; se presenta en el 25 a 50% de casos con borreliosis de Lyme en EUA y en 65% de los casos en Europa. Puede ser bilateral y ocasionalmente se acompaña de parálisis de V, IV, III y VI

pares craneales o como mononeuritis múltiple (4,5).

En la parálisis facial idiopática la frecuencia de infección por *B.*

burgdorferi en adultos es de 3-11% vs 1% en población pediátrica (6,7).

b) Meningoradiculoneuritis. La meningitis se manifiesta por meningismo leve y cefalea intermitente; pueden asociarse neuritis craneal y radiculopatía (síndrome de Garin- Boujadoux- Bannwarth). En líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra pleocitosis linfocítica en más del 80%.

c) Radiculoneuropatía. Es de inicio agudo con dolor radicular intenso localizado y/o debilidad motora con ó sin pérdida sensitiva. La pérdida sensitiva y el déficit neurológico pueden ser multifocales asimétricos; pueden presentarse como síndrome de Garin-Boujadoux-Bannwarth. Es más común en Europa. Otras formas que se presentan raramente son la encefalitis, mielitis y vasculitis cerebral (4).

2.1.A.2.b. Manifestaciones cardiacas. Se presentan en menos del 1% en adultos en 0.5% de la población pediátrica infectada (3). Inicia en la segunda a tercera semana después de la infección con palpitaciones, disnea, dolor torácico ó síncope secundario a un bloqueo atrioventricular de 2o y 3er grado, miopericarditis con derrame que es raro, y/o falla cardiaca comúnmente transitoria que se autolimita en 10 días.

2.1.A.2.c. Linfocitoma borrelial. Inicia en promedio 30 días (6 a 180 días) después de la mordedura por garrapata. Es una presentación rara de borreliosis de Lyme; su frecuencia es de 1.1 a 3 % en Europa, y en EUA no hay reportes. La edad promedio de presentación es de 23 años (rango 2 – 72 años); 44% de los casos son niños menores de 15 años. Es una lesión cutánea nodular de color rojo - violáceo de 0.5 a 2.5 cm de diámetro, que se localiza con mayor frecuencia en el lóbulo de la oreja y la areola mamaria, y en algunos casos en cara y brazo (3,8). En 25% de los casos aparece al mismo tiempo que el EM. El linfocitoma borrelial no tratado puede persistir por muchos meses. Histológicamente se caracteriza por un infiltrado linfocítico policlonal denso en la dermis y/o tejido subcutáneo, algunas veces con centros germinativos (8).

2.1.A.2.d. Alteraciones oculares: La conjuntivitis se ha observado en menos del 5% de los pacientes con EM; así como también la afectación

directa del ojo (uveítis, queratitis, coroiditis, panoftalmítis y neuritis óptica) ha sido asociada con el aislamiento de *B. burgdorferi* en cultivo (9).

2.1.B. Estadio Crónico: Esta forma es evidente 6 meses ó varios años después de la infección y se presenta en cerca del 60% de los pacientes que cursaron con EM y no fueron tratados (10). En Estados Unidos de Norteamérica se manifiesta principalmente como artritis, sin embargo en Europa afecta progresivamente la piel produciendo acrodermatitis crónica atrófica (ACA) y encefalitis o encefalomiелitis.

2.1.B.1. Artritis Se presenta en 60% de los casos de EM no tratados con antibióticos y aparece generalmente antes del año (en promedio 6 meses, rango 4 días a 2 años del inicio del EM). En EUA es la principal manifestación de la enfermedad, siendo los adultos los más afectados y en 7 % de los menores de 15 años. La artritis es migratoria, monoarticular u oligoarticular, asimétrica, dura en promedio 3 meses (3 días a 11.5 meses). La rodilla es afectada en algún momento de la evolución en la mayoría de los pacientes, pero otras articulaciones grandes pueden afectarse. La articulación temporomandibular se afecta en 11% de los casos. En el líquido sinovial se elevan moderadamente las proteínas y los leucocitos en promedio 24,250 células / μ l con predominio de polimorfonucleares y la glucosa es normal. También puede presentarse miositis con linfadenopatía regional ó generalizada (9).

2.1.B.2. Neuropatía Periférica (neuropatía axonal crónica). Se presentan parestesias, El dolor radicular poco común y el déficit sensitivo es raro; la fuerza muscular y los reflejos tendinosos están conservados. Generalmente no hay meningitis o neuritis craneal. Los anticuerpos en suero vs *B. burgdorferi* son comunmente positivos. La electromiografía muestra neuropatía axonal leve, LCR normal, sin anticuerpos intratecales, la biopsia del nervio sural muestra pérdida axonal distal e infiltrado perivascular sin depósitos de complejos inmunes, no se observa *B. burgdorferi* en el nervio. La radiculoneuritis asimétrica asociada a dolor radicular intenso con o sin debilidad muscular o alteraciones sensoriales; es un cuadro que comparte

características con el síndrome de Guillain-Barré; la asociación de *B. burgdorferi* con esta entidad se ha estimado entre un 3-5% (22,30).

2.1.B.1.c. Encefalomiелitis. Es una enfermedad inflamatoria unifocal ó multifocal la cual es lentamente progresiva y afecta la sustancia blanca más que la gris. Se detectan anticuerpos séricos e intratecales vs *B. burgdorferi*; en LCR pueden presentarse pleocitosis, hiperproteinorraquia y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) positiva. La resonancia magnética es inespecífica y puede sugerir enfermedad de sustancia blanca. Es una manifestación rara (1%).

2.1.B.2.d. Acrodermatitis crónica atrófica (ACA). Es una lesión atrófica de la piel, se presenta 6 meses o años después en el sitio donde fue la mordedura de la garrapata. La ACA y el linfocitoma borrelial están bien documentados en pacientes europeos con borreliosis de Lyme pero son casos raros en EUA, y se asocian con infección por la genoespecie *Borrelia afzelii* (*B. afzelii*) (13).

2.B.2.e. Esclerodermia. *B. burgdorferi* ha sido implicada en el desarrollo de algunas formas de esclerodermia localizada y líquen escleroatrófico (LEA). La primera se clasifica por la forma y zona afectada en esclerodermia lineal (en golpe de sable o en extremidades), segmentaria (atrofia hemifacial) y en placas (morfea).

La etiología de la esclerodermia era considerada desconocida; sin embargo en estudios histológicos se observaron características similares a las encontradas en ACA. A partir de entonces se ha demostrado la presencia de la bacteria en estudios histológicos y ensayos de PCR, así como respuesta serológica, aunque los resultados han sido contradictorios en pacientes de EUA y Europa (11,12).

Recientemente, esta patología ha sido asociada con infección por *B. afzelii* (12).

En Europa existe una mayor diversidad clínica de la enfermedad asociada a la presencia de diferentes especies. La neuroborreliosis es más frecuente en Europa, especialmente en niños y se asocia con las especies de *Borrelia garinii* (*B. garinii*) y *Borrelia valaisiana* (*B. valaisiana*). Comparativamente en EUA la artritis es la manifestación clínica

más frecuente y se presenta en el 80% de los casos de la enfermedad asociada con *B. burgdorferi* sensu stricto (Cuadro 1) (2,3,13).

Cuadro 1

Genoespecies de *Borrelia burgdorferi* asociadas con borreliosis de Lyme, su distribución geográfica y enfermedades asociadas.

GENOESPECIES	AREA GEOGRAFICA	ENFERMEDAD EN HUMANOS	
		Temprana	Tardía
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	EUA y Europa	EM*60% Neuroborreliosis 10%	Artritis 80%
<i>B. garinii</i>	Europa y Asia	EM 70% Neuroborreliosis 40%	Artritis 5%
<i>B. afzelii</i>	Europa y Asia	EM 70% Linfocitoma cutáneo 2-3% Neuroborreliosis 40%	ACA** 40%
<i>B. japonica</i>	Japón	EM (1 caso reportado)	
<i>B. valaisiana</i>	EUA y Europa	Parálisis facial	
<i>B. bisettii</i>	EUA y Europa	EM y Linfocitoma (Casos)	
<i>B. spielmanii</i>	Europa	EM (1 caso)	
<i>B. lonestarii</i>	EUA	EM like (Casos)	

* Eritema migratorio ** Acrodermatitis crónica atrófica

3. EPIDEMIOLOGIA.

El riesgo de Borreliosis de Lyme está directamente relacionado con la prevalencia de garrapatas y de los reservorios infectados, así como con la exposición del hombre en zonas endémicas (9).

3.1. Epidemiología Mundial.

La Borreliosis de Lyme está distribuida en la mayoría de los países europeos, algunos países de Asia y 3 zonas enzoóticas de EUA (Costa Noreste, Minnesota y California). En Australia y Sudamérica (Bolivia, Chile y Brasil) se ha reportado una enfermedad similar a Borreliosis de Lyme y en una ciudad de la provincia de Bolivia la prevalencia de infección fue del 10.8% con Inmunofluorescencia (IFA), sin embargo no se ha aislado *B. burgdorferi* de garrapatas, fauna o pacientes (2,14,15).

En los países europeos la infección es endémica. La prevalencia de infección en

más frecuente y se presenta en el 80% de los casos de la enfermedad asociada con *B. burgdorferi* sensu stricto (Cuadro 1) (2,3,13).

Cuadro 1

Genoespecies de *Borrelia burgdorferi* asociadas con borreliosis de Lyme, su distribución geográfica y enfermedades asociadas.

GENOESPECIES	AREA GEOGRAFICA	ENFERMEDAD EN HUMANOS	
		Temprana	Tardía
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	EUA y Europa	EM*60% Neuroborreliosis 10%	Artritis 80%
<i>B. garinii</i>	Europa y Asia	EM 70% Neuroborreliosis 40%	Artritis 5%
<i>B. afzelii</i>	Europa y Asia	EM 70% Linfocitoma cutáneo 2-3% Neuroborreliosis 40%	ACA** 40%
<i>B. japonica</i>	Japón	EM (1 caso reportado)	
<i>B. valaisiana</i>	EUA y Europa	Parálisis facial	
<i>B. bisettii</i>	EUA y Europa	EM y Linfocitoma (Casos)	
<i>B. spielmanii</i>	Europa	EM (1 caso)	
<i>B. lonestarii</i>	EUA	EM like (Casos)	

* Eritema migratorio ** Acrodermatitis crónica atrófica

3. EPIDEMIOLOGIA.

El riesgo de Borreliosis de Lyme está directamente relacionado con la prevalencia de garrapatas y de los reservorios infectados, así como con la exposición del hombre en zonas endémicas (9).

3.1. Epidemiología Mundial.

La Borreliosis de Lyme está distribuida en la mayoría de los países europeos, algunos países de Asia y 3 zonas enzoóticas de EUA (Costa Noreste, Minnesota y California). En Australia y Sudamérica (Bolivia, Chile y Brasil) se ha reportado una enfermedad similar a Borreliosis de Lyme y en una ciudad de la provincia de Bolivia la prevalencia de infección fue del 10.8% con Inmunofluorescencia (IFA), sin embargo no se ha aislado *B. burgdorferi* de garrapatas, fauna o pacientes (2,14,15).

En los países europeos la infección es endémica. La prevalencia de infección en

Alemania y Suecia en trabajadores forestales es del 8% a 27% (16,17) y en la población general de 4% (16), mientras que en Londres y Soumpton, Inglaterra es de 1 a 7% (18). En EUA la enfermedad ha sido confinada a 3 áreas enzoóticas (Costa Noreste, medio Oeste y California) donde la prevalencia de infección varía de 1 a 10% y se ha diseminado a nuevas áreas (19,20).

En 2005, la incidencia de la enfermedad en 10 estados hiperendémicos de EUA fue de 31.2 casos por 100,000 habitantes. El mismo año en California, Arizona y Texas la incidencia fue de 0.26 a 0.44 casos por 100,000 habitantes en el año lo que representó de 69 a 95 casos nuevos por año en Texas y California respectivamente, donde la incidencia es baja (21,22).

3.2. Epidemiología en México. En 1999 se estudió una muestra de sueros representativa del país obtenidos como parte de la Encuesta Seroepidemiológica Nacional realizada en 1988 (23), en la que se determinaron anticuerpos IgG contra *B. burgdorferi*. Por el método de ELISA se detectó una prevalencia del 1.1%; la tercera parte de los sueros positivos también lo fueron con la prueba confirmatoria de inmunotransferencia, dando una prevalencia de 0.3%. Los sueros positivos fueron habitantes de la zona Noreste (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz) y Centro-Occidente (Distrito Federal y Jalisco) del país (24).

3.3 Distribución del vector y hospederos. Las garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* son vectores competentes para transmitir *B. burgdorferi* y las especies reportadas en Norteamérica son *I. scapularis* e *I. pacificus* (2) mientras que en Europa son *I. ricinus* e *I. persulcatus* (Cuadro 2) (25). En la República Mexicana desde 1964, se reportaron las especies de garrapatas *I. scapularis* distribuidas en los estados de Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Campeche, Quintana Roo, San Luis Potosí, Hidalgo, y Jalisco e *I. pacificus* en Baja California, Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit y Jalisco (26).

La infección de las garrapatas por *B. burgdorferi* en sus estadios inmaduros (larva y ninfa) es diferente de acuerdo a su distribución geográfica. En Nueva York las garrapatas de la especie *I. scapularis* se han encontrado infectadas en 20 a 60% de la población muestreada. El estadio ninfal en un 30% y el estadio adulto en el 60%; la ninfa es la responsable del 90% de los casos de Enfermedad de Lyme (20). En contraste, en California del 1 al 5.7% del vector *I. pacificus* está infectado; en

el estadio ninfal sólo el 1% y en estadio adulto 3 a 5 %. Esta diferencia es atribuida a los hospederos de los que se alimenta el estadio ninfal de la garrapata el cual ocurren en lagomorfos (lagartijas) que son reservorios incompetentes para infectar garrapatas (25,27).

La bacteria persiste en la naturaleza a través de un ciclo infeccioso entre mamíferos silvestres y garrapatas. la transmisión de la bacteria en los artrópodos es transovárica y trasestadial (28) y en el hospedero vertebrado se transmite por la mordedura de artrópodos hematófagos; La garrapata del complejo *Ixodes ricinus* en los dos primeros estadios de su desarrollo se alimenta primariamente de roedores de los géneros *Peromyscus* y *Apodemus* que son los principales reservorios en Norteamérica y Europa respectivamente. Los roedores infectados son capaces de infectar el 100% de las ninfas (2,21).

El roedor del género *Peromyscus sp.* se encuentra distribuido en la zona Noreste, el Distrito Federal, Morelos y Querétaro (29).

En la mayoría de las zonas enzoóticas de Estados Unidos las garrapatas se alimentan de grandes mamíferos, animales salvajes y domésticos (venados, caballos, ganado bovino, mapaches, zorros, etc.), así como de 8 géneros de aves (2,30-32). En México el venado cola blanca *O. virginianus* se encuentra distribuido en los estados de Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Estado de México y Morelos. En 1999 se reportó una seroprevalencia de infección por *B. burgdorferi* del 7% con ELISA en venados de Coahuila y Nuevo León (33).

El venado es el responsable del mantenimiento de poblaciones de garrapatas en el estadio adulto y permite completar el ciclo, pero es incapaz de transmitir la bacteria *B. burgdorferi* a las garrapatas (30). El paso de espiroquetas de una generación a la siguiente a través de huéspedes reservorios constituye el ciclo enzoótico de la enfermedad de Lyme (Fig 1.) (25,31).

En los estados del sureste de EUA, donde *I. scapularis* es menos común, se ha descrito una entidad clínica similar a borreliosis de Lyme denominada enfermedad cutánea asociada a mordedura de garrapata. Esta garrapata pertenece al género *Amblyomma* especie *americanum* de donde se aisló la bacteria *Borrelia lonestarii* (*B. lonestari*) (34).

En Texas esta garrapata tiene una prevalencia de infección por *B. burgdorferi* de 1 a 2 %, detectada por la técnica de inmunofluorescencia

(IFA) (35). Actualmente se reconoce que la IFA identifica el género *Borrelia* pero no es específico de especie. Recientemente con nuevas técnicas de biología molecular una nueva espiroqueta no cultivable se identificó en el vector *Amblyomma americanum* mediante la amplificación y secuenciación de los genes flagelar y 16S RNA para *B. burgdorferi* sensu lato y se denominó *Borrelia lonestarii* (Cuadro 2)(36).

Cuadro 2

Distribución de garrapatas *Ixodidae* y genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato identificadas en cada vector

Garrapatas	Distribución	Genoespecies de <i>B. burgdorferi</i>
<i>I. ricinus</i> *	Europa Oeste y Central	<i>B.afzelii, burgdorferi, garinii, valaisiana, bisettii</i>
<i>I. scapularis</i> **	EUA Este y Centro, Canadá	<i>B.burgdorferi, B.bisettii</i>
<i>I. pacificus</i> **	EUA Oeste y Canadá	<i>B.burgdorferi, B.bisettii</i>
<i>I. persulcatus</i> **	Europa Este y Asia	<i>B. afzelii, B.garinii, B. miyamotoi</i>
<i>I. urlae</i>	Norte y Sur del Atlántico	<i>B.garinii</i>
<i>I. hexagonus</i>	Oeste y Centro de Europa	<i>B.afzelii, B. burgdorferi</i>
<i>I.minor</i>	Sureste de EUA	<i>B. burgdorferi</i>
<i>I. affinis</i> *	Sureste de EUA	<i>B. burgdorferi</i>
<i>I. dentatus</i> **	Noreste de EUA	<i>B.andersoni, B.burgdorferi</i>
<i>I. spinipalpis</i>	Oeste de EUA	<i>B.bisettii</i>
<i>I. ovatus</i>	Japón	<i>B. japonica</i>
<i>I.granulatus</i>	China	<i>B. afzelii</i>
<i>I. nipponensis</i> *	Korea	<i>B.afzelii, B.garinii, B.valaisiana</i>
<i>A. americanum</i> **	EUA (Texas)	<i>B. lonestarii</i>
<i>Haemaphysalis</i>	China	<i>B. garinii</i>

* miembro del complejo *Ixodes ricinus*

** Vectores competentes para transmitir *B. burgdorferi* que produce la Borreliosis de Lyme.

4. MICROBIOLOGIA

4.1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, ANTIGÉNICAS Y GENÉTICAS

DE *Borrelia* spp.

Estudios filogenéticos indican que el género *Borrelia* pertenece a la familia Espiroquetacea del orden Espiroquetales. Otros géneros en ésta familia incluyen *Treponema*, *Leptospira*, *Serpulina*, *Espiroqueta* y *Cristispira* (1). Las características bioquímicas y ecológicas que identifican al género *Borrelia* son:

(IFA) (35). Actualmente se reconoce que la IFA identifica el género *Borrelia* pero no es específico de especie. Recientemente con nuevas técnicas de biología molecular una nueva espiroqueta no cultivable se identificó en el vector *Amblyomma americanum* mediante la amplificación y secuenciación de los genes flagelar y 16S RNA para *B. burgdorferi* sensu lato y se denominó *Borrelia lonestarii* (Cuadro 2)(36).

Cuadro 2

Distribución de garrapatas *Ixodidae* y genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato identificadas en cada vector

Garrapatas	Distribución	Genoespecies de <i>B. burgdorferi</i>
<i>I. ricinus</i> *	Europa Oeste y Central	<i>B.afzelii, burgdorferi, garinii, valaisiana, bisettii</i>
<i>I. scapularis</i> **	EUA Este y Centro, Canadá	<i>B.burgdorferi, B.bisettii</i>
<i>I. pacificus</i> **	EUA Oeste y Canadá	<i>B.burgdorferi, B.bisettii</i>
<i>I. persulcatus</i> **	Europa Este y Asia	<i>B. afzelii, B.garinii, B. miyamotoi</i>
<i>I. urlae</i>	Norte y Sur del Atlántico	<i>B.garinii</i>
<i>I. hexagonus</i>	Oeste y Centro de Europa	<i>B.afzelii, B. burgdorferi</i>
<i>I.minor</i>	Sureste de EUA	<i>B. burgdorferi</i>
<i>I. affinis</i> *	Sureste de EUA	<i>B. burgdorferi</i>
<i>I. dentatus</i> **	Noreste de EUA	<i>B.andersoni, B.burgdorferi</i>
<i>I. spinipalpis</i>	Oeste de EUA	<i>B.bisettii</i>
<i>I. ovatus</i>	Japón	<i>B. japonica</i>
<i>I.granulatus</i>	China	<i>B. afzelii</i>
<i>I. nipponensis</i> *	Korea	<i>B.afzelii, B.garinii, B.valaisiana</i>
<i>A. americanum</i> **	EUA (Texas)	<i>B. lonestarii</i>
<i>Haemaphysalis</i>	China	<i>B. garinii</i>

* miembro del complejo *Ixodes ricinus*

** Vectores competentes para transmitir *B. burgdorferi* que produce la Borreliosis de Lyme.

4. MICROBIOLOGIA

4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, ANTIGÉNICAS Y GENÉTICAS

DE *Borrelia* spp.

Estudios filogenéticos indican que el género *Borrelia* pertenece a la familia Espiroquetacea del orden Espiroquetales. Otros géneros en ésta familia incluyen *Treponema*, *Leptospira*, *Serpulina*, *Espiroqueta* y *Cristispira* (1). Las características bioquímicas y ecológicas que identifican al género *Borrelia* son:

el contenido de guanina-citosina del DNA genómico, que es de 27 a 32%. Es un microorganismo móvil de forma helicoidal, que mide 5 a 25 µm de largo y 0.2 a 0.5 µm de ancho (el tamaño varía con los nutrientes, edad del cultivo y en tejidos) está cubierto por una membrana celular externa que rodea el cilindro protoplásmico (formado por citoplasma, membrana celular interna y peptidoglicano). Tiene 7-11 flagelos estructuralmente iguales que el de otras bacterias, pero que se localizan en el espacio periplásmico, al final del cilindro protoplásmico (37).

Es microaerófilico y se diferencia de otras bacterias y espiroquetas por su estructura genómica conformada por un cromosoma lineal y numerosos plásmidos lineales y circulares (1,37), así como por la presencia de bacteriófagos, como el B4 en la cepa de referencia B31 de *B. burgdorferi* (38). La membrana externa de *B. hermsii* y *B. burgdorferi* contiene 45 a 62% de proteína, 23 a 50% de lípidos y 3 a 4 % de carbohidratos. Extractos de membrana externa de cepas rugosas de *B. burgdorferi* presentan propiedades de endotoxina (38).

Desde 1870, se han hecho intentos para cultivarla. Algunas especies de *Borrelia* pueden ser crecidas en huevos embrionados y éste cultivo puede tener pases ilimitados. Estudios recientes muestran que *B. burgdorferi* requiere de un medio rico en glucosa y peptonas a base de suero de conejo, albúmina o extracto de tejido fresco para su crecimiento. Es microaerófilico a diferencia de los treponemas, los cuales son anaerobios y contiene superóxido dismutasa pero no catalasa o peroxidasa. Requiere para su crecimiento de N-acetilglucosamina (éste representa el mayor constituyente de peptidoglicano); además, la adición de gelatina provee un medio viscoso para la locomoción y aumenta el crecimiento bacteriano cuando el inóculo es pequeño (1,37,38). Es susceptible a los antibióticos B-lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina; y resistente a metronidazol, rifampicina, sulfonamidas y 5-fluoracilo. La resistencia a rifampicina podría indicar que la RNA polimerasa de la espiroqueta difiere de la de otras bacterias (37).

El género *Borrelia* representa un grupo filogenético que se diferencia de otros grupos de acuerdo al análisis del espacio intergénico 5S-23S (39,40). Más de 20 especies han sido identificadas en este género (39-42). Estas especies de *Borrelia* se han clasificado en dos categorías mayores, la *Borrelia* de la

fiebre recurrente y la *Borrelia* asociada a Borreliosis de Lyme, en base a sus características ecológicas y genéticas.

B. burgdorferi tiene 3 proteínas mayores de superficie, la OspA, OspB y OspC; y estas proteínas varían en las diferentes cepas de *B. burgdorferi* en su peso molecular y antigenicidad (43). OspA es una lipoproteína que tiene un peso molecular de 31–34 kDa, ha sido usada para diagnóstico serológico y desarrollo de vacunas. OspC es una proteína de 20-25 kDa, varía entre especies, y es útil como antígeno seroreactivo durante el estadio temprano de la enfermedad (44). El complejo *B. burgdorferi* sensu lato incluye todas las especies y los grupos genómicos de *Borrelia* aislados de Euro-Asia y EUA que son transmitidos por garrapata y asociadas a borreliosis de Lyme, éste término lo distingue de la especie *B. burgdorferi* sensu stricto (39-42,45).

4.2. MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN FENOTÍPICA.

En *B. burgdorferi* sensu lato se han usado los mismos sistemas de tipificación fenotípica que para otras especies de bacterias como son: La biotipificación, tipificación de fagos y análisis de susceptibilidad a los antibióticos, sin embargo no son factibles por el bajo crecimiento bacteriano. Por lo tanto se ha utilizado el análisis mediante electroforesis de proteínas SDS-PAGE y el perfil de ácidos grasos, pero las conclusiones basadas en estos métodos no son exactas (43).

4.2.1. Serotipificación

La serotipificación es el método fenotípico más común para la tipificación de *B. burgdorferi* sensu lato y está basada en reactividad a diferentes anticuerpos monoclonales específicos contra OspA y OspC. La serotipificación con OspA logra definir 8 serotipos diferentes al estudiar 112 cepas aisladas de humanos y garrapatas de Europa, 24 de Norteamérica y 2 de Japón (43, 44). Los serotipos 1, 2 y J11 corresponden a *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, y *B. japonica*, respectivamente, y los serotipos 3 a 8 corresponden a *B. garinii*. El serotipo 2 se ha encontrado en más de 50% de pacientes con Borreliosis de Lyme y el serotipo 4 ha sido detectado en LCR de pacientes con neuroborreliosis, pero no en garrapatas. En contraste, en más de 50% de los aislados de garrapata se detecta el serotipo 6 (43).

Por otra parte, con anticuerpos monoclonales específicos para OspC se han definido 16 serotipos diferentes para aislados Europeos y Norteamericanos. De estos, 6 corresponden a *B. burgdorferi* sensu stricto, y 4 serotipos a *B. afzelii*, el resto no se han identificado. Al comparar los serotipos OspA y OspC de *B. burgdorferi* sensu lato se observa mayor heterogeneidad con OspC (44).

4.2.2. Electroforesis enzimática multilocus (MLEE)

Este método se basa en la tipificación de proteínas y consiste en diferenciar la movilidad electroforética de enzimas metabólicas de cada cepa bacteriana para determinar la población genética de la bacteria, ya que cada cepa tiene un patrón electroforético diferente. Con el método de MLEE se ha estimado la relación y diversidad genética entre las cepas de *B. burgdorferi* sensu lato (45).

4.3 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN GENOTÍPICA.

Los métodos de tipificación molecular basados en las características genéticas del microorganismo aportan información más precisa en la diversidad patogénica de la bacteria. El estudio de esta diversidad genética en *Borrelia* tiene implicaciones epidemiológicas, clínicas y de diagnóstico (45).

Para estudiar la diversidad genética de cepas de *B. burgdorferi* sensu lato se han usado los siguientes métodos:

4.3.1. Análisis de hibridación DNA-DNA. Es un método que se ha usado para

estudiar las relaciones taxonómicas y es uno de los mejores procedimientos aplicables para la taxonomía de *Borrelia*. La definición filogenética de especie generalmente incluye cepas con aproximadamente 70% o más de homología.

Las cepas del género *Borrelia* con el análisis de reasociación de DNA tienen un nivel de homología de 30 a 100%. Esta homología entre cepas de *Borrelia* spp. que causan fiebre recurrente y las que causan Borreliosis de Lyme es de 30 a 44%. Entre diferentes subespecies de *B. burgdorferi* sensu lato el nivel de homología es de 48 a 70%. La hibridación de DNA-DNA es reconocida actualmente como el método de referencia para la delineación hasta subespecie de *B. burgdorferi* sensu lato (45-47).

Basados en este método, *B. burgdorferi* sensu lato se ha subdividido en 5 subespecies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. japonica* (inicialmente grupo F63B) y *B. andersoni* (inicialmente grupo 21123) (47).

Recientemente se han descrito nuevos grupos genómicos, como los grupos Europeo VS116 y PotiB2 actualmente denominados *B. valaisiana* y *B. lusitaniae*; el grupo americano DN 127, que incluye a *B. bisettii* (48,49) y en Asia, *B. turdae* y *B. tanuki* (50). Actualmente son reconocidas 11 subespecies de *B. burgdorferi* sensu lato, pero sólo 5 se reconocen como patógenas para el hombre (Cuadro 1).

4.3.2. Ribotipificación puede ser usada para identificar cepas a nivel de especie; se basa en el perfil obtenido del DNA cromosómico al digerirlo con enzimas de restricción e hibridizar los fragmentos con una sonda derivada de una zona altamente conservada del RNA ribosomal (46).

4.3.3 Electroforesis en gel por campos pulsados. (PEGC)- Este método consiste en separar fragmentos grandes de restricción de DNA después de digestión con enzimas como *MluI* por electroforesis. La discriminación de especies y entre cepas se basa en el polimorfismo de fragmentos grandes del DNA cromosómico.

Pueden ser reconocidos fragmentos específicos para cada especie. Este método es útil para el estudio taxonómico de cepas a nivel de especie y para diferenciar entre cepas de la misma especie en estudios epidemiológicos (46,51).

4.3.4. Fingerprinting de plásmido (52-53). Se ha utilizado para comparar cepas del complejo de *B. burgdorferi* y *Borrelia recurrente*. La utilidad de la huella digital de plásmidos puede ser afectada por la pérdida del plásmido durante el cultivo in vitro ó por recombinación inter e intraplasmídicos.

4.3.5 Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR).

Es un método para genotipificación, estudia el genoma completo de una bacteria con alto poder de discriminación y fácil de desarrollar. Es útil para distinguir entre diferentes especies de *Borrelia* y entre cepas de la misma especie (46,55).

4.3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Es un método de subtipificación molecular de DNA que tiene la ventaja de ser Fácil, rápido y se requieren pocas células del microorganismo. Se utiliza para la tipificación de cepas e identificación a especie tanto en muestras clínicas como en el vector. Los genes más comunes para amplificación y secuenciación son el gene *fla* (flagelar) y *ospA* (proteína de membrana

externa). Para el gene *fla* se han diseñado iniciadores para amplificar la región conservada, así como un fragmento interno del gene para amplificar la región central variable e identificar entre genoespecies (46,56). El gene *ospA* se localiza en un plásmido de 49 kb de *B. burgdorferi* denominado Ip54; se han diseñado iniciadores para la amplificación en muestras clínicas y el vector, mismos que han mostrado ser altamente específicos (56-57).

4.3.7 PCR en tiempo-real.

La técnica de PCR en tiempo real es usada para la cuantificación y detección de DNA de *B. burgdorferi*, por lo que se puede determinar el número de espiroquetas en la muestra de pacientes con borreliosis de Lyme en tejido, líquido cefalorraquídeo (LCR) y vector (58).

Los resultados de la T_m (temperatura a la que el 50% del DNA de la molécula está desnaturalizado) están relacionados con el contenido de GC/AT que estos a su vez están relacionados a la longitud y la secuencia.

Estudios realizados en DNA de piel y vector (*Ixodes ricinus*), los resultados de la T_m de *B. garinii* es de 2 °C debajo de *B. burgdorferi* sensu stricto y *B. afzelii*, por lo tanto el análisis de la T_m ofrece una rápida alternativa de identificación y detección de las genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato (59).

A pesar que la PCR en tiempo real ofrece una alta sensibilidad para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato en muestras de biopsias de piel para pacientes con borreliosis de Lyme, en otras muestras como líquido cefalorraquídeo y sangre tienen baja sensibilidad por lo que en éstos casos no es aceptado para el diagnóstico (60).

4.3.8 Secuenciación .- Es un método de tipificación molecular de ácidos nucleicos el cual compara directamente secuencias de DNA de cepas bacterianas y es el mejor método cuantitativo para determinar la similitud o diferencias entre 2 cepas. Permite analizar segmentos cortos de la secuencia de bases del DNA.

Los genes secuenciados de *B. burgdorferi* son el gene *fla* (flagelar) y *ospA* además de el espacio intergénico entre los genes ribosomales 5S y 23S.

Su diversidad se ha aprovechado para tipificar cepas, documentando los diferentes fragmentos originados por enzimas de restricción (RFLP-PCR) basado en la organización única de *B. burgdorferi* (Cuadro 3) (5, 55, 56).

Algunos autores sugieren que este método podría ser utilizado para estudios de epidemiología molecular (57).

Cuadro 3**Métodos Genotípicos para la Tipificación de *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

Método	Poder de discriminación	Tipo de Muestras	Ventajas	Desventajas
Análisis de reasociación DNA-DNA	Alto hasta especie	Cepas, DNA de muestras clínicas y vector	El mejor procedimiento para la taxonomía bacteriana.	Bajo poder de discriminación con homología < al 70 %.
Ribotipificación	Limitado a especie	Cepas	Tipificación a especie y subespecie	Requiere más DNA que para PCR
Electroforesis en gel por campos pulsados	Alto poder de discriminación y reproducible	Cepas	Discrimina entre especies y entre cepas	Requiere más DNA que para PCR
Fingerprinting de plásmido	Bajo poder de discriminación	Cepas	El perfil de plásmidos podría correlacionar.	Afecta por pérdida del plásmido.
Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR).	Alto poder discriminación y Reproducibilidad	Cepas	Discrimina entre especies y entre cepas.	Requiere más DNA que para PCR
Reacción en Cadena de la Polimerasa	Alto poder discriminación y Reproducibilidad	Cepas, DNA de muestras clínicas y vector.	Requiere mínima cantidad de DNA y útil en muestras clínicas, vector.	Puede ser inhibida la reacción con algunas sustancias, ó inespecífica.
PCR en tiempo real	Identifica especie y subespecies	DNA de muestras clínicas y vector.	Requiere mínima cantidad de DNA.	Baja sensibilidad en algunas muestras clínicas
Secuenciación	Identifica diferencias ente nucleótidos	Cepas, DNA de muestras clínicas y vector	Requiere mínima cantidad de DNA	Puede ser inhibida la reacción con algunas sustancias, ó inespecífica.

5. METODOS DE DIAGNOSTICO.

El estándar de oro para diagnóstico de la enfermedad es el cultivo, sin embargo la sensibilidad de éste método es baja. Otros estudios como la IFA también

tienen baja sensibilidad en enfermedad temprana y existe dificultad para su interpretación, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas serológicas y de biología molecular (58).

5.1 Microbiológico

El cultivo de *B. burgdorferi* sensu lato de especímenes clínicos es útil en biopsias de piel o especímenes de lavado cutáneo de lesiones de EM y sangre de pacientes con enfermedad temprana diseminada. En lesiones primarias de EM la sensibilidad del cultivo es de 50 % y puede aumentar a 85% en lesiones de EM secundarias además, ha sido reportado en 48 % en sangre o plasma de pacientes con enfermedad de Lyme temprana con volúmenes mayores a 9 ml (59). El aislamiento de *B. burgdorferi* de otros sitios, tales como LCR es menor de 5% y en líquido sinovial, es raro; la tasa de recuperación baja refleja el pequeño número de organismos viables presentes en estos sitios anatómicos.

5.2 Histopatología

Este método se aplica a especímenes de biopsias de lesiones de EM que muestran edema, depósitos de mucina, y un infiltrado perivascular de macrófagos, linfocitos, y en ocasiones células plasmáticas en la dermis superficial y profunda. Estos hallazgos no son específicos para borreliosis de Lyme, por lo que se han usado tinciones de plata (Warthin-Starry, Dieterle modificado, o tinción de Steiner modificado), Fas, ó inmunoperoxidasa para localizar organismos espirales en piel y otros tejidos. Es un estudio difícil de interpretar con especificidad variable, por lo que el uso de esta metodología se limitada a investigación y situaciones clínicas específicas (58).

5.3 Serología

Existe dificultad para interpretar estudios de ELISA (inmunoensayo enzimático) e IFA (inmunofluorescencia) en biopsias de piel con anticuerpos inmunofluorescentes vs *B. burgdorferi*. Esto debido a que:

- a) El resultado depende del estadio clínico de la enfermedad. En el estadio temprano de la enfermedad los resultados serológicos por ELISA son negativos o la respuesta puede limitarse sólo a los polipéptidos más inmunogénicos (60).
- b) Su interpretación es complicada por la reactividad cruzada con otras espiroquetas como *Treponema spp.* (*T. pallidum*, *T. denticola*, *T. phagedenis* y *Borrelia spp.* (*B. hermsii* y *B. recurrentis*); así también, en enfermedades

autoinmunes, mononucleosis infecciosa y fiebre de las montañas rocallosas (60).

- c) Hay variabilidad de la respuesta inmune en diferentes pacientes (60).
- d) El tratamiento antibiótico temprano puede abortar una respuesta inmune y dar resultados falsos negativos (60).
- e) Hay variabilidad de genoespecies y cepas de *B. burgdorferi* a nivel mundial lo que modifica la interpretación de los estudios de ELISA e inmunotransferencia de proteínas (61). Por estas razones se han implementado nuevas técnicas serológicas ó modificaciones de las mismas para mejorar la especificidad de la prueba.

Para disminuir la reactividad serológica cruzada se ha incrementado el valor de corte en estudios de IFA con títulos mayor de 1:256 (60) y por ELISA mayores de 1:320; este último tiene una sensibilidad de 75% y una especificidad del 80% en zonas endémicas (60). Para estudiar resultados de casos dudosos se realizan estudios de VDRL ó RPR (rapid reagin card), para los que *B. burgdorferi* no es reactiva (60). Otros estudios realizados para evitar reacción cruzada con otras espiroquetas periodontales son la adsorción del suero con *T. phagedenis* y *T. denticola* o el uso de antígenos purificados o fracciones antigénicas recombinantes de *B. burgdorferi* como: la proteína de 39-kDa y 83 kDa, flagelina, OspA, OspB, OspC, OspE, OspF, p22, BBK32 y VlsE). Ninguno de estos antígenos a probado ser superior a la serología con antígeno completo (60-66). Sin embargo, algunas proteínas como p39 kDa de *B. burgdorferi* es un antígeno específico de especie y su reactividad en sueros de humanos excluye a los sueros falsos positivos para otras enfermedades causadas por espiroquetas como: Leptospirosis, fiebre de las Montañas Rocosas, Fiebre recurrente transmitida por garrapata y Sífilis (56-59).

Recientemente una proteína de unión de *B. burgdorferi* (DbpA) fue clonada y secuenciada de 3 subespecies de Borrelia comunes en Europa: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y *B. afzelii*. La determinación de anticuerpos contra los antígenos BBK32, DbpA y el péptido VlsE IR6 son los que con mayor frecuencia se han evaluado en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedad de Lyme (66-67).

El criterio diagnóstico actualmente aceptado para confirmar un caso positivo se debe hacer ELISA con antígeno completo y confirmar con inmunotransferencia (Western-blot) lo que incrementa a 95% la especificidad (67-72). Existen diferentes equipos comerciales para estudios de ELISA y WB que contienen como antígeno extracto total de *B. burgdorferi* cepa B31. El CDC validó dos de éstos equipos uno es el Mar Dx Diagnostics, Carlsbad, CA y otro el BBI que tienen las bandas de proteínas de la bacteria en su control positivo con pesos moleculares bien definidos con una especificidad de 99 % (72).

En Europa en 1999 los criterios para serodiagnóstico de Western-blot (inmunoblot) IgM e IgG para *B. burgdorferi* sensu lato fueron validados. Se utilizaron antígenos de las cepas PKA2 de *B. burgdorferi* sensu stricto, cepa PBI de *B. garinii* y la cepa PKo de *B. afzelii*. Los criterios de positividad para PBI fue la presencia de mínimo 1 banda de p83/100, p39, p30, OspC, p21, y p17 y para la cepa PKo la presencia de mínimo 2 bandas de las proteínas 83/100, p58,p43, p39, p30, OspC, p21, p17, y p14 (70).

Algunos autores han reportado la asociación entre manifestaciones clínicas y la reactividad en WB vs 4 genoespecies del complejo de *B. burgdorferi* sensu lato patógenas para humanos. Donde 5 bandas de proteínas tienen un potencial mayor de discriminación: Las bandas de 12 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspA y 66 kDa. En *B. burgdorferi* sensu stricto se observa una reactividad preferencial a las bandas de 12 kDa, 16kDa, OspC, 58 kDa and 66 kDa, comparado con *B. garinii* 16 kDa, 18kDa, 20kDa, OspC, OspD, 30 kDa, OspA, 45 kDa y 60kDa, con *B. afzelii* 12kDa, 14 kDa, 16 kDa, 18 kDa, OspC y 45 kDa, así como *B. valaisiana* OspA, 45 kDa y 66kDa (70).

5.4 Biología molecular.

La introducción de técnicas de biología molecular en Borreliosis de Lyme ya tiene un papel definido en los casos con manifestaciones de neuroborreliosis temprana con serología negativa, en borreliosis ocular o en recién nacidos de madres que presentaron Enfermedad de Lyme activa durante su embarazo, así como en casos de diagnóstico difícil como infecciones coexistentes con *Babesia* y *Ehrlichia* (2,43, 48, 68,73).

Cuadro 4

Sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico de acuerdo a la manifestación clínica.

Enfermedad	ELISA		Western-blot		PCR		CULTIVO	
	S	E	S	E	S	E	S	E
EM*	50%	69%	75%	90%	75%	97%	50-85%	100%
ACA**	80%	78%	99%	95%	57%	95%	10-19%	100%
Neuroborreliosis	60%	75%	85%	93%	65%	95%	<10%	100%
Artritis	78%	75%	80%	93%	88%	100%	3%	100%

*Eritema migrans ** Acrodermatitis crónica atrófica.

6. ANTECEDENTES EN MEXICO.

Casos clínicos. En 1991, en Culiacán, Sinaloa se reportaron 20 casos de pacientes con eritema crónico migratorio asociado a artritis en un caso observaron la espiroqueta en biopsia de piel mientras que tres casos tuvieron serología (ELISA) positiva; 18 de los casos mostraron mejoría clínica después del tratamiento único o combinado con tetraciclina y penicilina (77). En 1994 en la Cd. de Monterrey, Nuevo León se reportaron dos casos sugestivos de enfermedad de Lyme, con la determinación por ELISA de IgM e IgG contra *B. burgdorferi* positivos; en ambos reportes los estudios de ELISA se realizaron en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia (78).

En 1999 en la Ciudad de México estudiamos pacientes con manifestaciones neurológicas a quienes se confirmó la infección por medio de estudios serológicos (79). El mismo año fueron reportados 2 estudios serológicos de infección por *B. burgdorferi* en México, el primero en humanos donde la seroprevalencia nacional fue de 1.1% y el segundo en venado cola blanca con una frecuencia del 6% en la zona noreste, en el 2003 reportamos la seroprevalencia de infección de *B. burgdorferi* en población general de la zona noreste y la Ciudad de México donde se encuentra una seroprevalencia de 6.3 % y 3.4% respectivamente, ambas fueron más altas que la prevalencia nacional, lo que sugiere que tenemos zonas endémicas de la enfermedad de Lyme (80).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La Borreliosis de Lyme representa más del 90% de las infecciones transmitidas por artrópodos en los EUA y Europa (9). Existen evidencias de la heterogeneidad genética de cepas de *B. burgdorferi* a nivel mundial así como de aislamientos genéticamente iguales en áreas geográficas distantes, lo que muestra el alto grado de migración en la naturaleza de los agentes de la Borreliosis de Lyme; así mismo presenta un gran polimorfismo clínico relacionado con la diversidad genética de la bacteria.

En México, desde 1991 existen reportes de casos con cuadro clínico sugestivo de la enfermedad sin que hayan sido confirmados con pruebas de laboratorio. El vector y los reservorios conocidos como competentes para transmitir la bacteria están presentes en las zonas Norte, Noreste y Golfo de México. Se han encontrado casos seropositivos en las zonas Noreste y Centro-Occidente.

Recientemente hemos encontrado evidencias de la infección por *B. burgdorferi* en pacientes residentes del centro del país con manifestaciones cutáneas tardías (ACA) y neurológicas (meningoradiculitis y parálisis facial) confirmadas con Western-blot, quienes han tenido una buena respuesta al tratamiento con antibióticos.

Sin embargo, para confirmar que la borreliosis de Lyme es una enfermedad prevalente en México es necesario demostrar la infección por *B. burgdorferi* con inmunodiagnóstico en el suero de pacientes y demostrar la presencia de la bacteria con cultivo y/o PCR en muestras clínicas. Además de confirmar la enfermedad en pacientes mexicanos, los datos serán útiles para conocer los genotipos infectantes y para diseñar pruebas de diagnóstico específicas a las especies que infectan a la población mexicana, así como para sugerir medidas de prevención en las zonas en riesgo.

7.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACION.

7.1.1 ¿Cuáles son las especies de *B. burgdorferi* prevalentes en muestras clínicas de pacientes mexicanos con Borreliosis de Lyme, definidas mediante técnicas de biología molecular?

7.1.2 ¿La reactividad a las proteínas de varias especies de *B. burgdorferi* sensu lato en suero de pacientes mexicanos es diferente a la observada en pacientes estadounidenses y europeos?

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar las especies prevalentes de *B. burgdorferi* que infectan a pacientes mexicanos con cuadro clínico compatible con Borreliosis de Lyme mediante la caracterización molecular y determinar la respuesta inmune humoral a antígenos de diferentes especies de *Borrelia* y compararla con la respuesta reportada en pacientes de EUA y de Europa.

8.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 8.1.1 Detectar por PCR e hibridización los genes *fla* y *ospA* de *B. burgdorferi* en especímenes clínicos de pacientes mexicanos con sospecha de Borreliosis de Lyme.
- 8.1.2 Determinar las secuencias del gene *fla* y *ospA* de *B. burgdorferi* amplificado de las muestras clínicas y compararlas con las secuencias del gene *fla* y *ospA* reportadas para *B. burgdorferi* sensu lato de Estados Unidos de América y Europa.
- 8.1.3 Caracterizar la respuesta inmune humoral a antígenos de diferentes especies de *Borrelia* en sueros de pacientes mexicanos con Borreliosis de Lyme mediante Western-blot.

9. HIPOTESIS GENERAL.

Las características moleculares de *B. burgdorferi* prevalentes en pacientes mexicanos y los antígenos de *B. burgdorferi* que despiertan la respuesta inmune en éstos pacientes son diferentes de las observadas en pacientes estadounidenses pero probablemente semejantes a los observados en pacientes europeos.

10. SUJETOS, MATERIAL Y METODOS

10.1 DISEÑO DE ESTUDIO.

TRANSVERSAL DESCRIPTIVO.

10.2 LUGAR DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO.

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

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

10.3. POBLACION DE ESTUDIO.

Se seleccionaron los casos consecutivos que presentaron manifestaciones clínicas sugestivas de Borreliosis de Lyme atendidos en los hospitales de Especialidades del Centro Médico La Raza y el Hospital de Pediatría, del CMNSXXI, del IMSS en la Ciudad de México.

10.3.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA:

El tamaño de muestra fue calculado con el programa EPI info 6 como sigue:

10.3.1.1 Estudio de Muestras clínicas de Pacientes: Para la detección de DNA de *B. burgdorferi* por PCR en casos con borreliosis de Lyme.

En población con diagnóstico clínico de eritema migratorio con una frecuencia esperada de detección por PCR del 50%, un error aceptable del 1 % y un intervalo de confianza del 95% N= 4

10.3.1.2 En población con diagnóstico clínico de acrodermatitis crónica atrófica, esclerodermia y meningoradiculitis con una frecuencia esperada de detección por PCR del 10%, un error aceptable del 1% y un intervalo de confianza del 95%. N= 18.

10.3.2 MUESTRA.

Se incluyeron las muestras clínicas de los pacientes que cubrieron los criterios clínicos descritos por el CDC y la EUCALB para Borreliosis de Lyme y estudios en suero con ELISA y/o Western-blot IgG vs *B. burgdorferi* sensu lato positivos. Los casos positivos fueron de la población de estudio mediante muestreo no aleatorio en el periodo comprendido entre 1 de Marzo de 1999 y Febrero del 2002.

10.3.3 Criterios de Selección.

10.3.3.1 Criterios de Inclusión.

Se incluyeron todos los sueros y DNA de muestras clínicas de pacientes mexicanos de cualquier edad y sexo, con manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme con estudios serológicos positivos para *B. burgdorferi sensu lato* y sin enfermedad autoinmune conocida, sífilis o leptospirosis.

10.3.3.2 Criterios de Exclusión.

Se excluyeron las muestras de suero y DNA de muestras clínicas positivas a *B. burgdorferi* obtenidos de pacientes con Borreliosis de Lyme adquirida en los E.U.A. o Europa.

10.3.3.3 Criterios de Eliminación.

Se eliminaron las muestras clínicas de pacientes a los que se les confirmó otros diagnóstico como: sífilis, leptospirosis ó enfermedad autoinmune e infección por herpes virus.

10.4 DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES.

10.4.1 Paciente con sospecha de Borreliosis de Lyme.

Definición operativa.- El paciente con eritema migrans ó con una manifestación tardía (64).

Criterios clínicos del CDC para el diagnóstico de Borreliosis de Lyme.

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

b) Manifestaciones Tardías.

1. Artritis objetiva en 1 ó pocas articulaciones grandes (rodilla, cadera, hombro, codo) asimétrica, recurrente ó crónica (semanas ó meses) asociada o no con EM
2. Meningitis aséptica con presencia en LCR de pleocitosis y predominio de linfocitos.
3. Parálisis facial uni ó bilateral, poliradiculoneuropatía ó encefalomielitis .
La poliradiculoneuropatía se dividió en tres variantes clínicas:
 - 3.1 Poliradiculoneuropatía con parestesia inicial y debilidad muscular Progresiva.
 - 3.2 Poliradiculoneuropatía de predominio motor (debilidad muscular sin parestesias ni déficit sensitivo).
 - 3.3 Poliradiculoneuropatía sensitivo-motora con trastorno sensitivo objetivo.
Los trastornos sensitivos se manifiestan como hipoestesis en guante y calcetín ó en parches.
4. Bloqueo cardiaco atrioventricular de 2do y 3er grado, de inicio agudo, que se resuelve en días a semanas y algunas veces está asociado a miocarditis.
5. Acrodermatitis crónica atrófica.- Lesión rojiza a violácea en su inicio y evoluciona a hipocrómica ó hiperocrómica, generalmente en las extremidades, que tiende a producir atrofia de la epidermis como piel de cigarro y músculo sin afectar hueso.

10.4.2 Paciente con Borreliosis de Lyme.

Definición operativa. Un paciente con cuadro clínico de Borreliosis de Lyme con los criterios clínicos del CDC y la EUCALB con estudios serológicos de ELISA y WB positivos y además cultivo o PCR positivo para *B. burgdorferi* (66).

10.4.2.1 Anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi* por ELISA.

Se determinó en base a el título de IgG presente en suero que se unió al antígeno (*B. burgdorferi* sensu lato) y se leyó como la absorbancia obtenida de cada muestra comparada con el valor de corte (veáse métodos).

Escala de Medición: Nominal

Categoría de la variable: Positivo- Si la absorbancia fue mayor al valor del punto de corte .

Negativo- Si la absorbancia fue menor al valor promedio menos 3DS.

10.4.2.2 Anticuerpos IgG vs *B. burgdorferi* por WB.

Definición operacional – La detección de bandas de proteínas específicas de *B. burgdorferi*.

Categoría de la variable:

Positivo a *B. burgdorferi* sensu stricto

La presencia de mínimo 5 de las siguientes bandas de proteínas: 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 93 kDa.

Positivo a *B. garinii*. La presencia 2 bandas mínimo de las bandas de proteínas (p83/100, p39, OspC, p21 y p17).

Positivo a *B. afzelii*. La presencia de mínimo 2 bandas (83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17, y p14).

Negativo- La presencia de menos de 5 bandas para *B. burgdorferi* ss y menos de 2 bandas para *B. garinii* y *B. afzelii*

No Reactivo- La ausencia de bandas de proteínas.

11. DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO:

El estudio consta de varias etapas:

A) Etapa Clínica.

Se ingresaron al estudio todos los pacientes con diagnóstico diferencial de enfermedad de Lyme enviados por algún médico especialista: médicos internistas, neurólogos, dermatólogos, reumatólogos ó pediatras de 2 hospitales del IMSS del Distrito Federal que recibieron información sobre la enfermedad y formato validado de notificación de caso sospechoso.

La forma de notificación: Es un cuestionario que incluye identificación personal, edad y sexo, la fecha de la mordedura de la garrapata, una lista de signos y síntomas, la fecha del diagnóstico, localización geográfica y anatómica de la mordedura de la garrapata. En casos con manifestaciones en piel, la localización anatómica y descripción de la lesión, la presencia de manifestaciones articulares y neurológicas con su semiología y los resultados de los exámenes séricos únicos o seriados (citoquímico y citológico de LCR, VDRL y/o FTA-Abs, inmunoglobulinas, factor reumatoide, y en los casos de artritis ó escleroderma anticuerpos antinucleares (AntiDNA de doble cadena, anti-Ro, anti-Scl 70) cultivo bacteriológico y BAAR de líquido sinovial negativo, citológico, presencia de cristales y estudios de inmunodetección de IgM por ELISA para virus del grupo herpes y varicela-zoster. Estudios radiográficos para observar erosiones, calcificaciones ó tofos en articulaciones y la descripción de tomografía o resonancia magnética de pacientes con manifestaciones neurológicas. En casos cutáneos y con artritis el reporte histológico de las lesiones con técnica de Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica en los casos indicados, además de la tinción de Warthin-Starry para búsqueda de espiroquetas y de tejido articular el reporte sobre la presencia de lesiones granulomatosas. así como el reporte de tratamientos recibidos, tiempo y posología (Anexo 1 y 2). Todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado (Anexo 3).

11. 1 MÉTODOS.

11.1.1 Muestras Clínicas.

Se estudiaron los pacientes en los cuales como diagnóstico diferencial se incluyó Borreliosis de Lyme, de ellos se seleccionaron los pacientes que cubrieron los criterios clínicos de Borreliosis de Lyme y en casos cutáneos los criterios histológicos del CDC. A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre (5 ml) sin anticoagulante para obtener suero. En pacientes con manifestaciones cutáneas (eritema migratorio, ACA y linfocitoma cutáneo) se les tomó además biopsia de piel para estudio histológico con tinciones de hematoxilina-eosina y Whartin-Starry y otra parte se conservó en etanol al 70% para procesamiento con PCR.

En pacientes con manifestaciones del sistema nervioso se clasificaron como meningopoli-radicleoneuropatía, polineuropatía clásica ó polineuropatía atípica ó mononeuropatía craneal única ó múltiple.

Se realizó electromiografía y se clasificó en: patrón desmielinizante y patrón con degeneración axonal.

La recuperación funcional se evaluó con escala de Hughes cada semana el primer mes y después cada mes durante 3 meses. Se evaluaron el tiempo de hospitalización y la mortalidad (Anexo 4).

Se obtuvo LCR a su ingreso que se conservó a - 20oC hasta su procesamiento. De las muestras clínicas se obtuvo DNA y se usó para diagnóstico con técnicas de biología molecular.

11.1.2 Técnica de ELISA.

A cada suero se le realizó estudios de ELISA con antígeno completo cepa B31 para determinar IgG vs *B. burgdorferi* (antígeno donado por el Dr. Alan Barbour, Universidad de San Antonio, Texas). En aquellos pacientes con manifestaciones agudas y la prueba negativa, se tomó nueva muestra a las 8 semanas del inicio del cuadro clínico y se realizó el estudio con ambas muestras.

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Rusell (60) con algunas modificaciones que fueron reportadas por nosotros (24). Se aplicó el antígeno a una concentración de 5 µg/ml por pozo en microplacas de 96 pozos (Labsystem); el suero se diluyó 1:640 y se usó como conjugado el anti-IgG humano de cabra unido a fosfatasa alcalina (Biosource, CA, USA) diluido 1:1000. El valor de

corte se obtuvo con el valor promedio de 26 sueros de sujetos mexicanos no infectados con *B. burgdorferi* (15 sueros de niños y 11 de adultos sanos) \pm 3 desviaciones estándar (24). Como control positivo se usó una mezcla de 5 sueros de pacientes con cultivo positivos de una zona endémica del Noreste de EUA (sueros donados por el Dr. Magnarelli, New Haven, Connecticut). El control positivo fue incluido por cuadruplicado en cada microplaca y cada muestra de suero fue probada por duplicado.

Con estos datos se construyó una curva de regresión lineal que se probó durante 5 días diferentes obteniendo un coeficiente de correlación $r^2 = 0.97$ al repetir los ensayos. Un suero se consideró como positivo cuando la absorbancia fue mayor al valor del punto de corte (24).

11.1.3. Respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de *Borrelia* en suero de pacientes con Borreliosis de Lyme.

Los sueros de casos positivos por ELISA y/o WB para el antígeno de *B. burgdorferi* ss fueron ensayados contra antígenos de las genoespecies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato, con la técnica descrita por Dressler y cols. (59): *B. burgdorferi* ss (cepa B31), *B. garinii* (cepa PBI), *B. afzelii* (cepa PKo) y *B. valaisiana* (VS116). Las cepas PBI, PKo y VS116 procedentes de diferentes aislados de LCR, así como contra antígenos de otras especies de *Borrelia*: *B. hermsii* (cepa DAH), *B. turicatae* (cepa 91E135), *B. coriacea* (cepa CO53) y *B. crocidurae* (cepa CR2A). Se utilizó extracto total de los 8 antígenos (donados por el Dr. Benoit Jaulhac, Laboratoire de Bacteriologie, Université Louis Pasteur, Hopitaux Strasbourg, France). Se corrieron 200 μ g de Ag en minigeles de poliacrilamida con gradientes de concentración de 4 a 15% (BIO-RAD Lab., Hercules, CA).

Se sometieron a electroforesis vertical a 4 mA durante 2 horas. Después, por inmunoelectrotransferencia las proteínas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa a 400 mA por 2 horas a 4 oC. La membrana de nitrocelulosa se lavó y bloqueó con soluciones amortiguadoras (TTBS). En cada membrana se incluyeron los sueros testigo positivo y negativo, así como sueros control de pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus

eritematoso sistémico, artritis reumatoide y anticuerpos antifosfolípidos) y los sueros de pacientes con sospecha de borreliosis de Lyme. Se diluyeron 1:50 con TBS y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces y se incubó con el conjugado (anticuerpo de ratón anti - IgG humano Southern Biotech, Birmingham A L unido a fosfatasa alcalina a una concentración de 1:500 en TBS - M); se agregó el sustrato NBT- BCIP (GibcoBRL, Gaithersburg, U.S.A.) (60).

Para considerar un suero positivo se utilizaron los criterios del Centro de Control de Enfermedades Infecciosas (CDC) y de la Unión Europea contra la Borreliosis de Lyme (EUCALB), descritos por Dressler y cols. en E.U.A. (68) y Hauser y cols.en Europa (70). Se consideró un suero positivo a *B. burgdorferi* ss cuando se detectó un mínimo de 5 de las siguientes bandas de proteínas: 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 93 kDa. o las descritas para las cepas Europeas: *B. garinii* si presentaron 2 bandas mínimo de las siguientes bandas de proteínas (p83/100, p39, OspC, p21 y p17) en *B. afzelii* 2 bandas mínimo (83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17, y p14) o *B. valaisiana* 2 bandas mínimo (p66, p45 y OspA) (69-70).

Todos los sueros fueron además caracterizados por inmunotransferencia con antígenos de *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. crocidurae* y *B. coriacea* las 3 primeras especies asociadas a fiebre recurrente en humanos y la última asociada con abortos en ganado bovino.

Para validar el ensayo de inmunotransferencia, se seleccionaron al azar sueros positivos por ELISA y se probaron con WB con un equipo comercial (MarDx Diagnostics, Carlsbad, CA), el cual contiene los antígenos completos de *B. burgdorferi* cepa B31, cuyos pesos moleculares están bien definidos. Este equipo comercial fue validado por el CDC y tiene una especificidad del 98% (72).

11.2 TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

11.2.1 Extracción de DNA de la cepa B31 de *B. burgdorferi* y de las muestras de LCR.

Las muestras fueron procesadas con el equipo comercial IsoQuick (ORCA Research Inc. WA, USA) con el método de isotiocianato de guanidina para purificar DNA de bacterias y líquidos corporales. El sedimento de células

del LCR fué suspendido en 1 ml. de buffer Tris HCl 10 mM, pH 8.3 mezclando con vortex. Las células fueron lisadas y se extrajo el DNA; posteriormente el DNA fué precipitado con alcohol isopropílico y suspendido con agua bidestilada libre de DNAasa , conservándolo a -20 °C hasta su procesamiento.

11.2.2 Extracción de DNA de biopsias de piel.

Las biopsias de piel conservadas en etanol al 70% fueron procesadas por el método de adsorción en gel de sílice del equipo QIAamp Tissue (QIAGEN Inc. Valencia CA, USA) (74). La biopsia de piel se cortó en fragmentos de 25 mg y cada muestra se digirió con 180 µl de solución para lisis y 20 U de proteinasa K a 55 °C en baño maría hasta su lisis completa, aproximadamente 2 horas o toda la noche; se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para sedimentar los detritus no digeridos. Se transfirieron 200 µl del sobrenadante en tubos de microcentrifuga limpios de 1.5 ml. Posteriormente, se agregó el Buffer AL se mezcló en el vortex, se incubó a 70 °C por 10 minutos, se agregaron 210 µl de etanol al 96% para precipitar el DNA y se mezcló por agitación. Todo el líquido se colocó en una columna de gel con sílice, se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. para adsorber el DNA al gel y se tiró el líquido, se realizaron 2 lavados consecutivos con sustancias amortiguadoras y se centrifugó durante 1 y 3 minutos respectivamente en cada lavado; se colocó un tubo Eppendorf a la columna y se agregaron 100 µl de agua bidestilada estéril libre de RNAasas para eluir el DNA y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. El DNA se conservó a -20 °C hasta su procesamiento (74).

11.2.3 Técnica de PCR .- Se realizó con el método descrito por Johnson y cols. (76).

Los iniciadores usados fueron genes altamente conservados del *gen fla* externo de *B. burgdorferi*, con los iniciadores conservados 5'-AAG TAG AAA AAG TCT TAG TAA GAA TGA AGG A-3' y 5'- AAT TGC ATA CTC AGT ACT ATT CTT TAT AGA T-3' región (245-855); y los iniciadores específicos del *gen fla* 5'-CAC ATA TTC AGA TGC AGA CAG AGG TTC TA-3' y GAA GGT GCT GTA GCA GGT GCT GGC TGT-3' región (300-689) (69).

Para el *gen ospA* se usaron los iniciadores 5'-TTA TGA AAA AAT ATT TAT TGG GAA T-3' región (149-319) de *B. burgdorferi* (56) .

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen Co. (Rockville, MD, USA).

La mezcla de reacción para PCR contiene Tris 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2mM, deoxinucleótido trifosfato 200 μM (Perkin-Elmer) y 50 pmol de cada iniciador (OSPA 149-319 y Gene flagelar externos ó internos) con 3 μl del DNA de muestras clínicas. Se incluyó como DNA Control de amplificación positivo, el DNA obtenido de *B. burgdorferi* B31 (ATCC 35210) y como controles negativos: DNA de biopsias de piel ó 1 ng de DNA de *Treponema pallidum* ATCC 27087. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Perkin-Elmer- Gene Amp PCR 9700. Cada ciclo fué de 94°C por 30 s para desnaturalización, alineación a 45°C por 45 s y extensión a 72 °C por 1 min, por un total de 35 ciclos. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % IBI (Shelton Scientific, Inc. Shelton, CT, USA) (70) en solución amortiguadora TAE a 50 volts. Se agregaron 10 μl de cada producto de PCR por pozo más 2 μl de solución para marcar con azul de bromofenol y el marcador de peso molecular de 100 pb en cada gel. Se consideró como PCR positivas para el gen flagelar cuando se observaron bandas de 390 pb (fragmento corto del gene) y 620 pb (fragmento largo), y para el gene OspA cuando una banda 192 pb igual que en el control positivo (DNA de cepa B31 de *B. burgdorferi*) medido con un marcador de peso molecular 100pb. La cantidad de DNA del producto de PCR se determinó mediante la cuantificación de masa con el Fago Lambda (1ng/μl).

Cuando las muestras fueron negativas al utilizar los 3 juegos de iniciadores, se evaluó la presencia de inhibidores por medio de PCR con las mismas condiciones, pero agregando 2.5 μl de DNA de *B. burgdorferi* y 2.5 μl de DNA problema.

Se consideró positiva para la presencia de inhibidores si el control positivo no presentó amplificación de los genes flagelar ó de membrana externa de *B. burgdorferi*.

11.2.4 Southern-blot (SB) .

Después de leer, el gel se sometió a sustancias amortiguadoras para desnaturalizar los productos de DNA y neutralizar para transferir a una membrana de nylon Hybond (Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.). Las

membranas fueron expuestas a luz UV por 1 min en Crosslinker y se guardaron a 4 oC hasta su procesamiento.

Se realizó prehibridación con el buffer SSPE -5 5X, Solución Denhardt SDS-5X, con 100 µl de DNA de esperma de salmón a 55 oC por 1 h). Los filtros fueron hibridados con 2×10^6 cpm de la sonda del gene flagelar (FL8) de *B. burgdorferi* ss y la sonda FL15 de *B. garinii* marcado con P³² por 16 hs. Después de la hibridación, los filtros son lavados 2 veces por 15 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X-SDS 0.1% y uno en SSC 1X-SDS 0.1% a 42 oC por 30 min. Los filtros fueron expuestos a película Kodak XAR-5 durante 24 horas (47).

Un SB fue positivo cuando la placa de RX Kodak revelada después de exponer la membrana hibridada, muestra una mancha radio opaca en cada zona donde se encuentran el control positivo y los productos de PCR positivos que contrastan con zonas radio lúcidas donde no hay hibridación.

11.2.5 Clonación de productos de PCR para secuenciación.

En aquellos casos en donde el DNA extraído de LCR o biopsia fue positivo por PCR y SB para el gene *fla*, se seleccionó y cortó la banda específica del peso molecular esperado del gene *fla* interno 350 pb y externo 620 pb, se extrajo el DNA con el equipo para extracción de DNA en gel QUIAEX (QUIAGEN Corp. Valencia, CA).

Se realizó la clonación de el producto de PCR con el equipo comercial Topo TA cloning kit (Invitrogen Co. Carlsbad, CA). La cantidad del producto de PCR necesario para la ligación fue de 10 ng (0.5 a 1 µl) con 50 ng (20 fmoles) del vector TOPO. Los pares de bases se ligaron en una proporción 1:1 (Vector:inserto).

La clonación constó de los siguientes pasos:

La Reacción de Unión-Ligación (10 ul) con solución amortiguadora (buffer de ligación) 10X 1 µl, Vector (25ng/µl) 2 µl, T4 DNA ligasa 1 µl, el producto de PCR (10ng) 1 µl y agua. Se usó para transformar células competentes Top 10F' durante 18 horas y las células transformadas fueron seleccionadas por resistencia a la ampicilina, 50 µg/ml (Gibco BRL, La Jolla CA).

Se seleccionan las colonias transformadas (de color azul). Para plásmidos de bajo número de copias se inocularon 250 ml de medio e incubó a 37 °C por 12-16 hr.

en movimiento constante a 300 rpm. El cultivo debe tener una densidad bacteriana de $3-4 \times 10^6$ células por ml. Los plásmidos fueron aislados.

11.2.6 Extracción de DNA plasmídico.

El DNA del plásmido se extrajo con un equipo comercial para DNA plasmídico Wizard Plus (Promega).

Mediante la técnica de lisis alcalina se obtuvo el sedimento, del cultivo crecido, se resuspendió en solución amortiguadora, se mezcló con vortex hasta que se disolvió, se lisaron las bacterias con solución de lisis y proteasa 5 min, se agregó solución de neutralización mezclando por inversión y se centrifugó durante 10 min.

Se transfirió el sobrenadante a columnas con gel de sílice (el sobrenadante tiene el DNA plasmídico) y se centrifugó 1 min. El DNA plasmídico se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El inserto fue analizado con la enzima de restricción ECO R1 10 U (Gibco BRL, La Jolla CA.). El control positivo de DNA plasmídico es una muestra que contiene *M. phlei*.

11.2.7 SECUENCIACION.

Los productos de PCR del gen *fla* y *ospA* de las muestras clínicas, fueron secuenciados con el equipo comercial (Genome Lab DTCS-Quick Star kit) con el secuenciador Beckman coulter Inc. (Fullerton, CA, USA). Usando el protocolo descrito por el fabricante. De manera automatizada en la base de datos se registra el electroferograma al término del programa y se hace la lectura de las secuencias.

Las secuencias fueron comparadas contra la secuencia de referencia tipo de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31 por medio del programa DNAMAN.

Al final se compararon las secuencias de las muestras positivas por PCR de los DNA de pacientes mexicanos contra las secuencias descritas para Borreliosis en EUA y Europa. Se reportó como proporción la homología en base a la similitud en secuencia de bases por medio del programa BLAST. El análisis con dendogramas se realizó con un método computarizado donde se evalúa la distancia genética entre las genoespecies encontradas en pacientes mexicanos y las reportadas en EUA y Europa (45) (Figura No.17).

12. ANALISIS DE LOS DATOS.

12.1 Estadística descriptiva.

Análisis de la distribución de las frecuencias, medidas de tendencia central y dispersión apropiadas para cada variable de acuerdo al nivel de medición y tipo de distribución. La consistencia en la medición de anticuerpos IgM e IgG vs *B. burgdorferi* se midieron con el coeficiente de variación intraobservador y para evaluar la concordancia interobservador en las lecturas del WB se aplicó la prueba de Kappa. Se calculó el intervalo de confianza del 95%.

11.1 Estadística Analítica.

Las variables cualitativas para 2 grupos en muestras independientes se analizaron con prueba de X^2 y en muestras cuantitativas continuas se analizaron con prueba t de Student.

13. RESULTADOS.

13.1 Descripción general.

Se estudiaron 364 pacientes con manifestaciones clínicas en las cuales como diagnóstico diferencial se debe descartar Borreliosis de Lyme. El 80% fueron adultos con una edad promedio de 43.5 años y 20% fueron niños con edad promedio de 8 años. El 74% de los pacientes (272) presentaron manifestaciones neurológicas, 20% (72) tuvieron manifestaciones cutáneas, y 6% (20) presentaron artritis (Cuadro 1).

Cuadro 1
Características generales de los pacientes estudiados

Manifestación Clínica	Número (%)	Niños (8±2 años)	Adultos (43.5±19 años)
Cutánea	72(20)	40	32
Neurológica	272 (74)	19	253
Articular	20 (6)	13	7
Total	364 (100)	72	292 (80%)

De éstos 364 pacientes, 299 fueron eliminados al presentar una serología negativa y/o al confirmar otro diagnóstico. Los diagnósticos diferenciales en 299 pacientes fueron los siguientes:

- a) Manifestaciones cutáneas (62): Eritema polimorfo asociado a medicamentos, granuloma anular, esclerodermia sistémica, esclerodermia con anticuerpos antinucleares positivos.
- b) Manifestaciones neurológicas (220): Neuropatía craneal por virus del grupo Herpes, neuropatía craneal idiopática, Síndrome de Guillain-Barré, leucemia, linfoma, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, sarcoidosis y paraparesia espástica.
- c) Manifestaciones articulares (17): Artritis reumatoide juvenil seronegativa, artritis por *Chlamydia tracomatis*, lupus y artritis reactiva.

Después de la selección 65/364 (18%) pacientes fueron seropositivos con ELISA y en 59/364 (16%) se cubrieron los criterios clínicos y serológicos (ELISA y WB) de caso positivo para Borreliosis de Lyme (Anexo 1) (22). En

2 de los 6 pacientes ELISA positivo y WB negativo se confirmó infección por *Borrelia turicatae*, agente de la fiebre recurrente.

13.2 Caracterización epidemiológica de pacientes infectados con *B. burgdorferi*

De 59 pacientes con la infección 42 (71%) fueron adultos de 42.5 ± 17 años y 17 (29%) niños de 8 ± 2 años de edad. El antecedente de picadura de un insecto no volador se presentó en 20/59 (34%) y en 5 de éstos se identificó una garrapata. La exposición a los animales domésticos y silvestres potenciales hospederos de garrapatas fue en 32 (54%).

Cuadro 2

Características demográficas y epidemiológicas de pacientes con diagnóstico confirmado de infección por *Borrelia burgdorferi*

	Etapa Temprana N=53		Etapa Crónica N=6	
	Niños N %	Adultos N %	Niños N %	Adultos N %
Edad M \pm DS	8 \pm 2	48 \pm 18	9 \pm 3	--
Sexo M:F	1:1.6	1:1.4	1.2:1	1:1.7
Mordedura por insecto	5 (41%)	16 (39%)	2	0
Hospederos	8 (66%)	21(51%)	2	0
Tiempo de Evolución del padecimiento al ingreso (promedio)	16 días	34 días	21 \pm 7meses	12 meses

13.3 Caracterización Clínica de pacientes infectados con *B. burgdorferi*

Los 59 casos positivos se distribuyeron de acuerdo al estadio de la enfermedad de la siguiente manera: En 53 (90%) se presentaron manifestaciones tempranas y en 6 (10%) fueron manifestaciones tardías. (Cuadro 2).

A) Manifestaciones tempranas.

1) Casos cutáneos en 7/53 (13 %), dos Eritema migrans (Figura 1) y cinco linfocitomas (Figura 2).

- 2) Casos Neurológicos en 46/53 (87 %): dos meningopoliradiculoneuritis, 21 poliradiculopatía y 23 neuropatía craneal única ó múltiple.

B) Manifestaciones tardías:

- 1) Manifestaciones cutáneas en 3/6, 1 ACA y 2 escleroderma (1 morfea y 1 atrofia de Passini y Pierini).
- 2) Manifestacion articular en 3/6: Artritis oligoarticular.
- (Cuadro 3).

Cuadro 3
Manifestaciones clínicas de pacientes seropositivos a
Borrelia burgdorferi sensu lato.

	Seropositivos	
	N=59	
Edad	Niños N=17 (29%)	Adultos N=42 (71%)
Manifestación Clínica		
Temprana	12	41
Meningopoliradiculoneuritis	1	1
Poliradiculoneuropatía	6	15
Neuropatía craneal	4	19
Eritema migrans	0	2
Linfocitoma	1	4
Tardia	5	1
ACA	1	0
Escleroderma:		
a) Morfea	1	0
b Atrofoderma de Passini	1	1
Artritis	3	0

13.3.1 Manifestaciones cutáneas.

a) Descripción Epidemiológica.

En 10 pacientes se presentaron manifestaciones dérmicas. Fueron 7 adultos con un promedio de edad de 42 años y 3 niños de 9 años.

a) Descripción Clínica.

La etapa aguda de la enfermedad se presentó en 7 pacientes que cursaban con 18 días de evolución y la etapa crónica en 3 (Cuadro No. 3).

La manifestación más frecuente fue el linfocitoma cutáneo en 5 pacientes.

c) Hallazgos Histopatológicos.

1.- Eritema migrans con la tinción de hematoxilina-eosina mostró un infiltrado linfocitario perivascular en dermis superficial (Figura 1 B).

2.- Linfocitoma cutáneo la tinción de H-E muestra un infiltrado mononuclear con centros germinales.

La tinción de Warthin-Starry mostró bacterias de forma espirilar. La Inmunohistoquímica para anticuerpos monoclonales vs anti CD45 y CD20 fueron positivos lo que muestra la presencia de linfocitos B y linfocitos T esto se definió el infiltrado policlonal (Figura 2B yC).

13.3.2 Manifestaciones neurológicas.

a) Descripción Epidemiológica.

De 46 pacientes 35(76%) fueron adultos de 27 ± 16 años y 11(24%) niños de 8 ± 2 años en adultos el sexo femenino fue el más afectado 1:1.7 y en niños el sexo masculino 1.2:1. (Cuadro 3).

b) Descripción Clínica.

Los 46 pacientes con afección a sistema nervioso presentaron la etapa aguda de la enfermedad con un promedio de 34 días de evolución. Las manifestaciones clínicas fueron las siguientes:

1. Meningopoliradiculopatía y polirradiculoneuropatía: En 23 pacientes se presentó poliradiculoneuropatía mixta con debilidad global en 50% y distal en 33%. En 18/23 (78%) se presentó además afección a pares craneales (VII, X, XI y XII). El nervio facial se encontró más frecuentemente afectado, en 15/18 (83%) de los casos, de forma unilateral ó bilateral. Cuando se compararon los pacientes con neuroborreliosis y los no infectados se observó una asociación con la presencia de paresia de pares craneales en neuroborreliosis, la cual fue

mayor a 5 veces, con un O.R.= 5.7; donde el par craneal más frecuentemente afectado fué el facial (VII) 5 veces con una $p < 0.05$ y un O.R.=4.9 en los pacientes con enfermedad de Lyme. Las características del citoquímico y citológico de LCR no fueron diferentes a las de los no infectados (Cuadro 4). Las complicaciones en pacientes con neuroborreliosis se presentaron en el 70% de los casos con presencia de bradicardia y requirieron asistencia ventilatoria con evolución grave, en éstos pacientes se observó la recuperación completa en 75 días promedio

Cuadro No. 4

Descripción Clínica y de laboratorio en pacientes con Neuroborreliosis vs poliradiculopatía no Lyme.

Característica	Neuroborreliosis N=23	Poliradiculopatía no Lyme N=26	Valor de p
Sexo:			
Masculino	12	13	NS
Femenino	11	13	
Edad (M±DS)	27±16.2	30.5 ± 18.8	NS
Antecedentes			
GI	5	5	NS
IVRA	5	4	NS
Parestesias	10	20	< 0.004
Déficit NC: ingreso	5	7	NS
Debilidad: Distal	8	10	NS
Global	11	12	NS
Mixta	4	4	NS
Par Craneal	12	5	< 0.01* Chi=5.7
Paresia Facial	9	3	<0.02* Chi=4.92
LCR			
Células	33	17	0.19
Glucosa	60	63	0.30
Proteínas	133	100	0.25

2. La neuropatía craneal : se presentó en 23 pacientes fueron 19 adultos con un promedio de edad de 48±20 años y la proporción entre sexos M:F de 1:1.4, y 4 niños de 10±1 año y la relación entre sexos 1:1. En 10/23 (45%) de los pacientes se presentaron otros datos clínicos asociados a Borreliosis de Lyme, como: EM (2), artritis

y/6 artralgias (4), síndrome del túnel del carpo (1), bloqueo auriculoventricular (A-V) de 2do grado (1) y parálisis facial recurrente (5).

13.4 Respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de *Borrelia* en suero de pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de *Borreliosis* de Lyme.

De los 65 sueros de pacientes con ELISA positivo, 59 fueron Western-blot Positivo para una o varias de las 4 especies del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. afzelii* y a *B. valaisiana*). (Cuadro 5).

Cuadro 5

Respuesta IgM a cuatro especies de *Borrelia burgdorferi* en suero de pacientes con manifestaciones cutáneas, neurológicas y articulares

Manifestación Clínica	No. probado	Sueros positivos contra especies de <i>Borrelia</i> de acuerdo a los criterios EUCALB:			
		<i>B.b.ss</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. valaisiana</i> *
Cutáneos	6	2	2	2	0
Eritema Migrans	1	1			
Linfocitoma	5	1	2	2	
Neurológicos	45	9	18	16	2
Polirradiculoneuropatía	23	8	8	7	0
Neuropatía craneal	22	1	10	9	2
Artritis	0	0	0	0	0
	51	11	20	18	2

*para esta especie solo se probaron 21 sueros

Los pacientes confirmados con WB para *B. burgdorferi* sensu lato fueron 51 con WB IgM vs *B. burgdorferi* y 10 con IgG vs *B. burgdorferi*. De los pacientes positivos con IgM vs *B. burgdorferi* sensu lato en 13/51 (25%) fueron reactivos a las 3 especies, 14/51 (27%) a 2 especies y para cada una de las especies como sigue: a *B.burgdorferi* ss 3 (6%), a *B. garinii* 9 (18%), a *B. afzelii* 9 (18%) y a *B. valaisiana* 2 (4%) (Figura 3,4 y 5A).

Los casos seropositivos a IgM presentaron manifestaciones neurológicas en 45 y manifestaciones cutáneas 6. En 8 casos fueron seropositivos para IgG en los 5 casos crónicos y 3 casos agudos con manifestaciones neurológicas dos pacientes de neuropatía craneal y un caso de EM que seroconvirtió a los 2 meses.

Los dos casos positivos a *B. valaisiana* presentaron parálisis facial.

En 21 sueros de los 65 seropositivos por ELISA en los que se probaron otros 4 Ags de *Borrelia* spp. (*B. hermsii*, *B. coriacea*, *B. crocidurae* y *B. turicatae*). Se confirmaron 2 casos para *Borrelia turicatae* agente etiológico de fiebre recurrente (Figura 5B). Los 21 pacientes fueron negativos a los otros 3 antígenos.

y los 2 casos positivos a *B. turicatae* presentaron neuropatía craneal.

Las bandas de proteínas presentes en el 95% de los sueros positivos con el antígeno de *B. burgdorferi* sensu stricto fueron la banda de la proteína de 41 kDa y el 50% de los casos fueron reactivos contra las proteínas de 58, 45 y 66 kDa. El 33% de los casos reconocieron las bandas de 93 y 23 kDa y el 20% los sueros reconocieron las bandas de proteínas de bajo peso molecular (18, 28, 30 y 39 kDa) (Cuadro 7). Cuando se compararon los casos con manifestaciones cutáneas con los de manifestaciones neurológicas se encontraron diferencias importantes; las proteínas que predominantemente reconocieron los sueros en los casos cutáneos fueron la proteína flagelar de 41 kDa, p45 y p28; comparativamente en los casos neurológicos se reconoce la p41 y las diferencias son con las proteínas p58, p66 y p30. Las proteínas que se reconocieron en igual proporción en ambos casos fueron las de bajo peso molecular como la de 18, 23 kDa y las de 39 y 93 kDa (cuadro 6).

Cuadro 6

Comparación de las proteínas reconocidas por IgM vs *B. burgdorferi* sensu stricto en sueros de pacientes mexicanos, norteamericanos y europeos con Borreliosis de Lyme.

DX	No.	93 kDa	66	58	45	41	39	30	28	23	18
Cutáneos	10	38%	29 %	29%	67%	100%	19%	19%	52%	33%	19%
Neurológicos	46	39%	55%	70%	42 %	92%	25%	30%	8.3%	39%	22%
Articulares	3	33%	0%	0%	100%	100%	33%	33%	0%	33%	100%
Norteamericanos	5	20%	40%	60%	80%	80%	20%	20%	20%	40%	20%
Europeos	5	20%	80%	60%	60%	40%	40%	20%	80%	60%	100%

Comparativamente, Los sueros de pacientes que tuvieron reactividad vs *B. garinii* reconocieron la proteína p66, p45, p39 y p28, los sueros reactivos a *B. afzelii* reconocieron las proteínas p58, p30 y p23 y los 2 pacientes con parálisis facial que reconocieron *B. valaisiana* presentaron reactividad contra las proteínas de 93 kDa 41 y 18 (Cuadro 7).

Cuadro 7

Perfil de proteínas de 3 especies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato a las que son reactivos los pacientes con manifestaciones cutáneas y neurológicas.

Paciente	Especie	Proteínas reconocidas (kD)										
		93	66	58	45	41	39	34	30	28	23	18
Manifestación Cutánea:												
<i>EM</i>	Bb ss	X	X		X	X	X			X		
<i>Linfocitoma</i>	Bb ss 1	X			X	X	X			X		
<i>Linfocitoma</i>	<i>Bb ss 2</i> <i>B. afzelii</i>	X		*	X	X	X		*		*	
<i>ACA</i>	<i>Bb ss</i> <i>B. garinii</i>	X			X	X						
		+	+		+		+		+			
<i>Escleroderma</i>	<i>Bb ss</i> <i>B. garinii</i>	X	X	X	X	X	X					
		+			+		+	+				
<i>Escleroderma</i>	<i>Bb ss</i>	X	X	X	X	X						
<i>LEA</i>	<i>Bb ss</i>	X	X		X	X	X					
<i>Atrofoderma</i>	<i>Bb ss</i> <i>B. afzelii</i>	X	X		X	X	X		*		*	
				*			*		*			
Manifestación Neurológica												
<i>Meningopolirad</i>	<i>Bb ss 3</i>	X	X		X	X	X					
<i>Poliradiculopat</i>	<i>Bb ss 2</i>	X		X	X	X	X					
<i>Poliradiculopat</i>	<i>Bb ss 2</i>		X		X		X					
<i>Poliradiculopa</i>	<i>Bb ss</i> <i>B. garinii</i>	X		X		X			+	+	+	
							+		+	+		
<i>Poliradiculopat</i>	<i>Bb ss</i> <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i>	X		X	X	X	X				+	
			+	+			*		*			
<i>Poliradiculopat</i>	<i>Bb ss</i> <i>B. valaisiana</i>	X		X	X	X	X			X		
				/	/							
<i>Poliradiculopat</i>	<i>B. afzelii</i>						*		*			
<i>Neuropatía craneal</i>	<i>Bb ss</i>	X				X	X					
<i>Parálisis facial</i>	<i>B. garinii 2</i>		+	+	+	+	+		+	+		
<i>Parálisis facial</i>	<i>B. valaisiana</i>	/		/	/	/		/		/		/
<i>Parálisis facial</i>	<i>B. valaisiana</i>				/	/					/	

Criterios de la EUCALB para WB IgG vs *B. garinii* (cepa Pbi): Positivo 1 banda de p39, p21 y p17 (100%) especificidad. WB IgG vs *B. afzelii* (cepa PKO) positivo con 2 bandas p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17 y p14.

13.5 Caracterización molecular de *B. burgdorferi* sensu lato en muestras clínicas.

En 28 de los 59 casos seropositivos por WB se analizaron los DNAs de biopsias de piel, LCR y líquido sinovial. Se realizó la PCR para los genes *fla* y *ospA*. La PCR para el gene *fla* fue positiva en seis muestras de LCR, en 7 biopsias de piel y en un líquido sinovial (Figura 7A). Para el gen *ospA* DNAs de biopsias de piel 2 y 2 de LCR fueron positivos (Figura 8A).

13.5.1 Estudio con Southern-blot

Se probaron 28 DNAs procedentes de 13 LCR, 14 de biopsias de piel y 1 de líquido sinovial por SB con la sonda del gen *fla* específico para las 3 especies de *B. burgdorferi* sensu lato en 22 se detectó la presencia del gene. Para la especie de *B. burgdorferi* ss fueron 16 muestras positivas catorce fueron positivas por PCR y dos negativas (Figura 6A,7B). Con la sonda específica para *B. garinii* se identificaron cuatro muestras positivas (Figura 9). y otras 2 con la sonda para *B. afzelii* (Figura 10), éstas 6 muestras fueron negativas con la PCR. Todos los productos de PCR se probaron para *B. hermsii* y todos resultaron negativos.

Los pacientes positivos para *B. burgdorferi* ss presentaron EM, linfocitoma, polirradiculoneuropatía, neuropatía craneal y artritis y los SB positivos para *B. garinii* presentaron polirradiculoneuropatía 3 y atrofoderma de passini 1. Para *B. afzelii* las manifestaciones fueron cutáneas crónicas, uno con escleroderma y uno con ACA (Cuadro No. 8).

Cuadro 8

Manifestaciones Clínicas de pacientes mexicanos con Borreliosis de Lyme confirmados con PCR y Southern-blot para *Borrelia burgdorferi* sensu lato

DIAGNOSTICO	No.	PCR +*	Southern-blot +			
			<i>B. b ss</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. hermsii</i>
EM	3	2	2	0	0	0
Linfocitoma	5	3	3	0	0	0
ACA	4	2	1	0	1	0
Escleroderma:	3	3	2	0	1	0
Atrofoderma dePassini	2	3	2	1	0	0
Meningoradiculopatía	7	1	1	0	0	0
Poliradiculopatía	23	7	4	3	0	0
Neuropatía craneal	2	1	1	0	0	0
Artritis	10	1	1			
	59	22	16	4	2	0

* positivos para el gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato.

Al comparar los hallazgos de biología molecular con la respuesta antigénica de los sueros de los pacientes se confirmaron que con la sonda para *B. burgdorferi* ss 14 casos fueron positivos por PCR y SB de los que reaccionaron contra el antígeno de *B. burgdorferi* ss cepa B31 (Cuadro 10).

Con la sonda de *B. garinii* un paciente con esclerodermia fue positivo por PCR, SB y WB. En 12 casos que fueron negativos por PCR y SB para *fla* reaccionaron en suero a las siguientes especies de *B. burgdorferi* sensu lato (cinco a *B. garinii*, 5 a *B. afzelii* y dos a *B. valaisiana*) (Cuadro 8). Estos pacientes presentaron manifestaciones neurológicas en 7 y 5 casos con manifestaciones cutáneas. En 2 casos el DNA obtenido de LCR presentó inhibición de la reacción de PCR (Figura No.7).

Los casos positivos a *B. burgdorferi* ss presentaron EM 2, linfocitoma cutáneo poliradiculoneuropatía, neuropatía craneal y artritis (Cuadro No. 9).

Cuadro 9
Comparación de la respuesta a proteínas específicas de *B. burgdorferi* sensu lato y la hibridación con sondas específicas de 3 especies del complejo *B. burgdorferi* en pacientes con Borreliosis de Lyme

	No. %	WB	Proteínas reconocidas en WB con Ag de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato										Southern-Blot		
			93	66	58	45	41	39	30	28	23	18	Bbss	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>
Diagnóstico	30														
Manifestación Cutánea															
EM	2	Pos	X	X		X	X	X		X			2		
Linfocitoma	3	Pos	X			X	X	X		X			2		
Linfocitoma		Neg						X	X						
<i>S. Parry-Romberg</i>	1												1		
Escleroderma	3	Pos	X	X	X	X	X	X					0		2
Manifestación Neurológica															
Meningopolirad	1	Pos	X	X		X	X	X					0		
Neuropatía craneal	1	Neg	X				X	X					1		
Paraparesia Espástica	1	Pos	X		X	X	X	X					0	1	
Poliradiculoneuropatía	3	Pos	X		X	X	X	X		X			1	1	
Neuropatía craneal	1	Pos	X	X			X				X	X	1		
Artritis	3	Pos											1		

13.5.2 Genotipificación con PCR en Tiempo Real.

Fueron amplificadas 14 muestras por PCR y se probaron para 11 geno-especies conocidas (Figura 11). Se determinó la Tm de todas sondas para éstas geno-especies y se muestran curvas de las geno-especies patógenas para humanos con la Tm correspondiente (Figura 12 y 13). En 12 DNAs que amplificaron por PCR se pudo determinar la geno-especie, la cual amplificó y la temperatura de alineamiento correspondió a *B. burgdorferi* sensu stricto (Figura 14). En otras 2 que amplificaron para 2 diferentes geno-especies al comparar la temperatura de alineamiento no correspondió a ninguna de las 11 geno-especies probadas. Es por esta razón que se clasificaron como no tipificables.

13.5.3 Genotipificación con Secuenciación.

Fueron secuenciados 9 productos de PCR del gen *fla* y 4 productos de PCR del gen *ospA* procedentes de biopsias de piel, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo.

Algunas de las muestras fueron clonadas en un vector y obtenidas para secuenciación (Figura 15). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con una secuencia de referencia de *B. burgdorferi* sensu stricto cepa B31 obtenida del

Genebank, usando el programa DNAMAN (Figura No. 16); En tres pacientes las secuencias mostraron sustitución de 3 bases, en 4 pacientes tuvieron sustitución de dos bases y un paciente una base sustituida. En las 7 secuencias de los pacientes con EM 2, linfocitoma cutáneo 2, artritis 1 y neuroborreliosis 2, una de estas sustituciones de bases no fue conservada y cambia un aminoácido (G por R en el aminoácido 75); estas 7 secuencias tuvieron una homología del 98 y 99 % con el gen *fla*. Respecto al gen *ospA* del plásmido Ip54 de la misma cepa, 4 muestras fueron secuenciadas y se observó una sustitución de una base principal la cual no fue conservada cambiando en el aminoácido 5 (L por I). Estas secuencias tuvieron una homología del 98% con el plásmido Ip54 de la cepa B31 de *B. burgdorferi* ss (Figura 17). La distribución de esta secuencia fue localizada en un árbol filogenético para ubicarlo dentro de las genoespecies reportadas en el Genebank y se agrupa con una cepa de *B. burgdorferi* sensu stricto aislada en Europa de LCR (Figura 18).

Cuadro 10.

Confirmación de la presencia de la genoespecie *B. burgdorferi* ss por PCR- TR y secuenciación en Borreliosis de Lyme adquirida en México

Manifestación Clínica	WB *	PCR**	Genotipificación	
			PCR-TR <i>B. burgdorferi</i> sl	Secuenciación
No. %	N=59	N=30	N=14	N=9
Cutáneos	10	8/10 (80%)	N=7	N=5
-E.M.***	2	2/2	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B.burgdorferi</i> ss
-Linfocitoma cutáneo	5	3/5	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B.burgdorferi</i> ss
-Escleroderma	3	2/7	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B.burgdorferi</i> ss
Neurológicos	46	8/19(42%)	N=6	N=3
- N. craneal	23	1/1	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B.burgdorferi</i> ss
- Poliradiculopatía	23	5/18	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B.burgdorferi</i> ss
		2/18	<i>B.b.No tipificable</i>	
Artritis	3	1/1	<i>B. burgdorferi</i> ss	<i>B. burgdorferi</i> ss

* Western-blot

** Reacción en cadena de la polimerasa

*** Eritema migrans

13.6 Cultivo de tejidos y líquidos corporales.

Se realizó el cultivo a 28 muestras clínicas en: 14 biopsias de piel y 14 LCR de pacientes seropositivos. En 1 cultivo de paciente con eritema migrans se observaron bacterias espirilares, las cuales no pudieron crecer en la resiembra, en 5 cultivos de piel con diagnóstico de linfocitoma y ACA se observaron bacterias Gram positivas de forma cocácea que fueron identificadas como estafilococos y estreptococos. En los otros 8 cultivos de piel no se observaron bacterias. En los cultivos de LCR no se observaron bacterias después de 12 semanas del cultivo.

14. DISCUSION.

De acuerdo a los antecedentes a nivel nacional con respecto a la presencia del vector (26,29), huéspedes intermediarios infectados por *Borrelia* spp (33), casos clínicos sospechosos (77-79) y los estudios de seroprevalencia en humanos y animales (24,33,80), nuestro grupo inicio una línea de investigación sobre Borreliosis de Lyme en nuestro país. A través de estudios de seroprevalencia de la infección se lograron identificar al menos dos zonas de alta prevalencia, la Zona Noreste con 6.3% y la Ciudad de México con 3.4% (80); estas seroprevalencias por *B. burgdorferi* son semejante a la de zonas endémicas del sur de Estados Unidos de Norteamérica (2,3). En la región del valle de México se han referido casos sugestivos de neuroborreliosis (79,80), por lo que se inició la búsqueda intencionada de casos en hospitales del Distrito Federal. De esta manera a partir de la población en estudio se lograron identificar 59 casos de Borreliosis de Lyme. Los pacientes confirmados fueron principalmente adultos de 42 años, económicamente activos, algunos con riesgo ocupacional (exposición a vectores) como trabajadores forestales, de campos deportivos y de zoológicos; y otro grupo en donde se sospecha que la exposición al vector fue al visitar zonas forestales ó parques cercanos a la Ciudad de México. En estas zonas se ha reportado la presencia de hospederos de la garrapata *Ixodes* como el roedor *Peromyscus* sp y el venado cola blanca (29,33). Otro grupo de pacientes fueron niños menores de 10 años, con exposición a la garrapata en bosques y parques de la zona conurbana de la Ciudad de México. Esta curva bimodal en la edad de presentación ha sido reportada por Farher y cols (16).

Los pacientes de esta muestra presentaron un predominio de manifestaciones neurológicas, en el 78% de los casos, comparado con los casos cutáneos (17%) y articulares (5%). Esto puede estar relacionado con un sesgo de selección de la

población estudiada ya que provienen de hospitales de referencia donde además el diagnóstico etiológico en casos neurológicos es más difícil, sin embargo, también puede sugerir que la presentación clínica de la Enfermedad de Lyme en la población mexicana estudiada es semejante a la expresión clínica en Europa donde la frecuencia de neuroborreliosis de Lyme es de 50% comparado con los pacientes Norteamericanos donde es del 11% (4,19,22).

En neuroborreliosis la parálisis facial es la manifestación principal, con una frecuencia en Europa de 65% y en EUA de 50% (4,7); en la muestra de nuestro estudio, 23/46 pacientes (50%) presentaron esta manifestación. Además estuvo presente en 9/23 pacientes con meningopoliradiculopatía, lo que hace un total de 32/46 (69%) pacientes con neuroborreliosis de Lyme.

Nieman y cols. reportaron un estudio retrospectivo en pacientes con parálisis facial por *B. burgdorferi* que no recibieron tratamiento y 10 años después el 12% de los casos presentaron parálisis facial recurrente (82). En el presente estudio se observó que de los 23 casos con parálisis facial seropositivos a *B. burgdorferi*, 9 ya habían presentado 2 a 6 episodios de parálisis facial previamente, lo que sugiere que en pacientes con parálisis facial recurrente el riesgo de estar infectados por *B. burgdorferi* fue de 3 veces más que en los casos únicos.

Por otra parte la prevalencia de infección por *B. burgdorferi* asociada a Síndrome de Guillain Barré ó polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda reportada en Norteamérica es del 3 a 5% (4). Mientras que en nuestra población, 9 de los 46 pacientes con neuroborreliosis (20%) tuvieron esta presentación clínica.

En borreliosis de Lyme algunos estudios reportan la presencia de manifestaciones clínicas asociadas a la manifestación clínica principal, con lo que seleccionan el grupo de pacientes para diagnóstico a priori, e incrementan la sensibilidad de las

pruebas de inmunodiagnóstico (2,3). En este estudio el 56% de pacientes con la enfermedad presentó otras manifestaciones como EM, artritis, parálisis facial recurrente y carditis. En este grupo de pacientes estos datos clínicos nos permitieron confirmar el diagnóstico en el 90% de los casos seropositivos.

La morbilidad observada después de tratamiento fue baja, sólo 2 pacientes con neuroborreliosis presentaron secuelas, esto confirma el diagnóstico y demuestra la evolución benigna de la enfermedad una vez tratada adecuadamente. De hecho, el tiempo de recuperación de la parálisis facial y la polirradiculoneuropatía de pacientes infectados se redujo en casos con tratamiento a cinco semanas y dos meses respectivamente, comparado una recuperación de 8.5 semanas y 3 meses en pacientes con otra etiología, lo que es semejante a lo reportado por Hansen y cols. (83).

En Borreliosis de Lyme las manifestaciones cutáneas, principalmente el eritema migratorio es el signo patognomónico de la enfermedad (2). En el universo de pacientes del presente estudio esta manifestación se presentó en el 3.5% de los casos. Otra manifestación cutánea de la etapa aguda es el linfocitoma borrelial, que se presenta en 2 a 3 % de los casos de Borreliosis de Lyme, siendo una manifestación rara en Europa y sólo algunos casos reportados en E.U.A (8). En contraste, en pacientes mexicanos se presentó en el 8.5% de los pacientes. Esta lesión se localiza comúnmente en el lóbulo de la oreja y areola mamaria, en nuestros pacientes además del lóbulo de la oreja se localizó en lugares menos frecuentes como la región malar y el antebrazo; la lesión en estos sitios ha sido descrita en niños por Strle y cols (8). Los hallazgos histológicos son característicos en Linfocitoma benigno cutis donde la presencia de un infiltrado mononuclear formando centros germinales ocurre en el 80% de las biopsias de piel (84), además

la inmunohistoquímica muestra un infiltrado linfocitario policlonal, esto aunado a la presencia de bacterias de forma espirilar sugestivas de espiroquetas (8,85). Estos hallazgos fueron confirmados en 5 de nuestros pacientes seropositivos a la infección; además, se identificó el DNA de la bacteria en el tejido de la lesión en 3 de estos casos.

La infección por *B. burgdorferi* en población general, ha sido reportada en Norteamérica y Euroasia. La prevalencia de esta infección se ha realizado utilizando un método de escrutinio como la prueba de ELISA (2,3). Sin embargo, en la última década se han reconocido las limitaciones que tiene éste método debido principalmente a la presencia de reacciones cruzadas con otras espiroquetas y enfermedades autoinmunes. Por lo anterior, el CDC recomienda la inmunotransferencia como el método para confirmar el diagnóstico serológico de infección por *B. burgdorferi* (22,81). Dresler y cols reportaron que la mitad de los sueros positivos por ELISA pueden ser confirmados con inmunotransferencia (68,72). En este estudio el 91% de los pacientes seropositivos con ELISA fueron confirmados con Western-blot.

Por otra parte, es importante señalar que las pruebas serológicas comerciales para la detección de anticuerpos vs *B. burgdorferi* presentan diferencias en la sensibilidad durante el estadio temprano de la infección. Solo el 20-30% de los pacientes pueden tener seroconversión con anticuerpos IgM durante las primeras 2 semanas de la infección comparada con 70-80% de positividad para IgM e IgG alcanzada para la tercera y cuarta semana (66). En cambio, la mayoría identifican con alta sensibilidad a los pacientes en las formas tardías (66,72). Por lo anterior los estudios serológicos tienen un alto peso en el diagnóstico de las formas crónicas de la enfermedad. En este estudio, de los pacientes en la etapa aguda, el 66% fueron

seropositivos a los 16 días de evolución, mientras que el 34% restante seroconvirtió después de la 4ta semana. En las formas crónicas como artritis, ACA y escleroderma fueron seropositivos desde la primera muestra utilizando ensayos de ELISA y WB con antígenos preparados en el laboratorio y confirmamos en algunos casos con métodos comerciales ya validados.

Los criterios para considerar un WB positivo han tenido modificaciones en EUA y Europa (72, 82), lo cual se ha relacionado con la heterogeneidad genética de la bacteria y su área geográfica. Por lo anterior, en este estudio, se incluyeron los criterios establecidos por ambos, el CDC en EUA y la EUCALB en Europa (22,72). Estos criterios fueron aplicados de acuerdo a los antígenos de las diferentes especies utilizados, como por ejemplo, para *B. burgdorferi* sensu stricto se requieren la identificación de mínimo 5 de 10 proteínas reportadas por el CDC y 2 bandas presentes en *B. burgdorferi* sensu lato reportadas por Wilske et al. (72). Dentro de las bandas de las proteínas de *B. burgdorferi* sl que fueron consideradas como necesarias para confirmar el diagnóstico por Western-blot fueron las proteínas de 39, 41, 45 y 58 kDa. En nuestro estudio, al menos dos de éstas 4 bandas fueron encontradas en las muestras positivas para *B. burgdorferi* sl. La proteína de 39-kDa es un antígeno específico de la especie *B. burgdorferi* como lo reporta Schwan y cols (62). La presencia y su reactividad en sueros de humanos excluye a los sueros falsos positivos para otras enfermedades como leptospirosis, fiebre de las Montañas Rocosas, Fiebre recurrente transmitida por garrapata y Sífilis (62). En los pacientes mexicanos seropositivos esta proteína se encontró en el 23% de los sueros lo que sugiere una alta especificidad del antígeno utilizado. Otra proteína que es inmunodominante en la respuesta inmune a la espiroqueta es la flagelina de 41 kDa. Su frecuencia en pacientes mexicanos fue

del 100% en los casos con manifestaciones cutáneas y 92% en pacientes neurológicos.

Una de las proteínas más inmunodominantes durante la respuesta inmune temprana a *B. burgdorferi* es OspC. Esta proteína forma parte de la membrana externa de la bacteria y es expresada en el microorganismo al momento de transmitirse al humano durante la mordedura de la garrapata. Es por esta razón que en los casos con enfermedad temprana se presentan anticuerpos contra esta proteína de 23 kDa (69). En este estudio esta banda fue detectada en el 33 % de los sueros de pacientes con manifestaciones tempranas, con promedio de evolución de 16 días y que presentaron EM y linfocitoma; se identificó además en el 39% de pacientes con manifestaciones neurológicas (poliradiculoneuritis y neuropatía craneal).

Por otra parte, la proteína de 93 kDa ha sido asociada a infección tardía (69). En nuestro estudio el 38.6% de suero de pacientes mostraron anticuerpos contra esta proteína y se asoció a manifestaciones crónicas de ACA y esclerodermia. Mientras que en casos neurológicos se observó reacción a otras proteínas como las de 58 y 66 kDa.

La reactividad antigénica a diferentes genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato se han asociado a diversas manifestaciones clínicas, Dressler y cols. observaron en pacientes alemanes con meningopolineuritis, una mayor respuesta a polipéptidos de *B. garinii* en el WB; mientras que los pacientes con artritis y ACA reconocieron más a los antígenos de *B. afzelii*. Por lo tanto éstas diferencias entre los 3 grupos del complejo de *B. burgdorferi* lleva a variaciones en la respuesta de anticuerpos en Borreliosis de Lyme en Europa (72). En pacientes mexicanos se observó reactividad a proteínas de la cepa PBi de *B. garinii*, cepa PKO de *B. afzelii* y la cepa VS166 de *B. valaisiana* en los casos con manifestaciones neurológicas,

semejante a lo observado en Europa. Sin embargo los casos cutáneos tempranos y la artritis tuvieron mayor reactividad a proteínas de la cepa B31 de *B. burgdorferi* sensu stricto.

Estas diferencias en la respuesta a 4 diferentes genopecies de *Borrelia burgdorferi* permite sugerir la existencia de otras especies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato como agente de la Enfermedad de Lyme en México.

Las técnicas de amplificación del genoma, en particular la PCR han mostrado ser altamente sensibles y eficaces, en particular en la Borreliosis de Lyme donde el bajo número de organismos infectantes en las lesiones dificulta la eficacia de otras pruebas diagnosticas como el cultivo (46,73). La carga de espiroquetas transmitidas por el vector en el momento de la infección puede oscilar de unos cientos hasta 5.000 pero el número de genomas en líquidos corporales puede ser menor de 50/ml (73). Es por esto que diferentes investigadores han desarrollado estudios con PCR utilizando diversas secuencias como iniciadores (cebadores) y en algunos casos PCR anidado para incrementar la detección a 10 espiroquetas/ml en líquidos corporales (86). En nuestro estudio, al aplicar dos secuencias de iniciadores en esta muestra de pacientes se observó una mayor sensibilidad con secuencias del gene *fla* (72%), comparada con el gene *ospA* (15%).

Otros estudios han mostrado una sensibilidad variable de acuerdo a la muestra clínica; así, en biopsias de piel de pacientes con manifestaciones cutáneas tempranas estas pruebas moleculares tienen una sensibilidad del 59 al 80%, que es considerablemente más alta que el cultivo y la serología. En pacientes mexicanos con EM o linfocitoma logramos detectar el DNA de *Borrelia* en 100% de las muestras. En cambio en la etapa aguda diseminada la sensibilidad de la prueba baja considerablemente, hasta 35 a 50% en líquidos corporales como plasma, LCR y

orina por la baja cantidad de espiroquetas en los mismos (73,86). En nuestros pacientes con meningoradiculoneuritis y poliradiculopatía se logro amplificar DNA de *Borrelia* en el 40% de los pacientes seropositivos.

La sensibilidad de la PCR también disminuye con el tiempo de evolución de la enfermedad, hasta un 65% en etapas tardías, que representa una sensibilidad menor a la reportada para serología en los casos crónicos, como lo reporta Breitsneider y cols (73,74). En las muestras clínicas de pacientes mexicanos detectamos el DNA de la bacteria en el 50% de los pacientes seropositivos con manifestaciones crónicas.

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular con una sensibilidad para detectar hasta 10 espiroquetas en líquidos corporales. La PCR en tiempo real es una técnica que además de incrementar la sensibilidad en la detección de la espiroqueta a permitido genotipificar tres de las especies patógenas conocidas de *Borrelia burgdorferi* (86). En este estudio empleamos la PCR en tiempo real aplicando un mayor espectro de sondas del gen flagelar para detectar las 11 genoespecies conocidas al momento de la realización del estudio (87-89). Con esta técnica logramos genotipificar al 77% de los DNAs amplificados por PCR, y solo dos de las muestras clínicas no pudieron ser genotipificadas. Recientemente se reportaron 2 nuevas genoespecies, *B. californianus* y *B. sinica*; estas especies fueron reportadas en garrapatas de California y China respectivamente, pero se desconoce su papel como patógenos en humanos (90).

En la población de pacientes mexicanos del presente estudio se encontró una gama de formas clínica asociadas a Borreliosis de Lyme con un espectro clínico tan amplio como las reportadas en Europa (91). El agente etiológico en esta muestra de pacientes infectados, de acuerdo a las técnicas de genotipificación molecular, en la

República Mexicana es *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, que es la especie predominante reportada en los Estados Unidos de América. Sin embargo, el patron de respuesta humoral a antígenos de cuatro diferentes especies, aunado a la presencia de DNA en muestras clínicas que no pudieron ser tipificables, deja abierta la posibilidad de que en nuestro país existen otras genoespecies de *Borrelia*, que con los métodos actuales no se pudieron tipificar ó son aún desconocidas.

Es importante concluir señalando que por todo lo anterior, se propone que los médicos de nuestro país consideren la posibilidad de *Borreliosis* de Lyme dentro del diagnóstico diferencial en pacientes con manifestaciones neurológicas, cutáneas y articulares, como las descritas en el presente estudio. Esto permitirá acortar significativamente la duración de los episodios, prevenir el desarrollo de la etapa diseminada de la enfermedad como es la paresia periférica y detener la progresión a la etapa crónica como encefalomielitis, artritis y acrodermatitis crónica atrófica. Lo que reducirá el tiempo de estancia hospitalaria, la atención en clínicas de rehabilitación y de consulta externa por los médicos especialistas. Además de que en el 70% de los casos previene eficazmente la aparición de episodios recurrentes.

Las técnicas de inmunodiagnóstico y de biología molecular empleadas en este estudio permitirán seleccionar las pruebas de diagnóstico adecuadas para la población mexicana de acuerdo a la epidemiología infecciosa de nuestro país. Así como proponer las herramientas de vigilancia epidemiológica de *Borreliosis* de Lyme aplicables en pacientes y de manera muy importante, también en el vector.

Este trabajo muestra las evidencias epidemiológicas, clínicas, inmunológicas y moleculares para confirmar que esta región de la República Mexicana es una zona endémica de *Borreliosis* de Lyme, de acuerdo a los criterios del CDC.

Por la información acumulada hasta el momento en nuestro país, las instituciones de Salud Pública deben estar alerta a esta zoonosis emergente y considerar el mantener en vigilancia epidemiológica las zonas del país que hasta el momento hemos estudiado y son endémicas para esta enfermedad.

15. CONCLUSIONES:

- 1- Este es el primer reporte de pacientes con Borreliosis de Lyme en pacientes mexicanos.
- 2- Se demostró la infección en pacientes con todo el espectro clínico de Borreliosis de Lyme, desde la etapa temprana hasta la formas crónicas con manifestaciones cutáneas, neurológicas y articulares.
- 3- La serología con 4 diferentes genoespecies del complejo *B. burgdorferi* permitió diagnosticar a la sexta parte de pacientes sin otro diagnóstico etiológico y con manifestaciones sugestivas de Enfermedad de Lyme.
- 4- El uso de PCR para los genes, *fla* y *ospA*, permitió confirmar al 57% de los casos seropositivos; es importante resaltar que la identificación fue del 100% en pacientes con manifestaciones cutáneas.
- 5- El uso de la PCR en tiempo real permitió genotipificar el 77% de las muestras.
- 6- La genoespecie mas frecuente en esta muestra de pacientes con enfermedad de Lyme adquirida en México es *B. burgdorferi* sensu stricto semejante a la reportada en los Estados Unidos de América pero con expresión clínica similar a la de Europa.
- 7- La secuenciación muestra una alta homología, de 99% con el gene *fla*, la cual disminuye a 96% con el gene *ospA*.
- 8- Médicos que atienden pacientes mexicanos con EM, linfocitoma, monoartritis, parálisis facial recurrente y meningopoliradiculopatía deben considerar dentro del diagnóstico diferencial la infección por *Borrelia burgdorferi*.

16. BIBLIOGRAFIA.

1. Steere AC, Grodzicky RL, Kornblat AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorferi W. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 1983;308:733-40.
2. Walther PH, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspect. *Lancet* 1994;343: 1013-16.
3. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Arkenase PW and Andiman WA. Erythema chronic migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Annals Int med* 1997;86:685-698.
4. Pachner Ar, Steere AC. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 1985;35:47-53.
5. Feder MH, Zalneratis LE, Reink L et al. Lyme disease: Acute Focal Meningoencephalitis in a Child. *Pediatrics* 1988;82:931-34.
6. Belman LA, Lerr M, Coyle KP et al. Neurologic manifestations in children with North American Lyme disease. *Neurology* 1993;43:2609-14.
7. Halperin JJ, Little WB, Coyle KP et al. Lyme disease: Cause of a treatable peripheral neuropathy. *Neurology* 1987;37:1700-1706.
8. Strle F, Peterski-Rigle D, Stanek G, Pejovnik-Pustinek A, Rusie E and Cimperman J. Solitary Borrelial Lymphocytoma: Report of 36 cases. *Infection* 1992;20:201-206.
9. Shapiro DE, Steere AC and Lesser RL. Lyme disease in children, musculoskeletal and ocular manifestations of Lyme disease. *Am J Med* 1995;98(suppl 4A):44A-73.
10. Fritz A, Lagerholm B. Acrodermatitis chronica atrophicans, erythema migrans and Lymphadenosis benigna cutis; spirochetal diseases?. *Acta Dermatol Venereol* 1983;63:432-36.
11. Fan W, Leonardi CL, Penneys NS. Absence of *Borrelia burgdorferi* in patients with scleroderma (morphea). *J Am Acad Dermatol* 1995;33:682-4.
12. Schempp Ch, Bocklage H., Lange R., Kölmel HW, Orfanos CE, and Gollnick H. Further Evidence for *Borrelia burgdorferi* Infection in Morphea and Lichen Sclerosus et Atrophicus confirmed by DNA Amplification. *J Invest Dermatol* 1993;100:717-720.
13. Van Dam VP, Kulper H, Vos K, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 1993;17:708-17.
14. Guzman L y Neira O. Lyme disease in Chile. *J Rheumatol* 1993;20:774-5.

15. Ciceroni L, Bartoloni A, Guglielmetti P et al. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* in human settlements of the Cordillera Province, Bolivia. *J Trop Med Hyg* 1994;97:13-7.
16. Fahrer H, Van der LSM, Sauvain M J, Gern L, Zhioua E and Aeschliman A. The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme Borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* 1991;163:305-10.
17. Rath PM, Ibershoff B, Albig J, Fehrenbach FJ and cols. Seroprevalence of Lyme Borreliosis in forestry workers from Brandenburg, Germany. *Eur Clin Microb Infect Dis* 1996; 15:372-77.
18. Cooper C, Muhlemann MF, Wright DJM, Hutchinson CA, Armstrong R and Maini RN. Arthritis as manifestation of Lyme disease in England. *Lancet* 1987;1:1313-4.
19. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, Spielman A. Longitudinal assesment of clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J Infect Dis* 1986; 154:295-300.
20. Steere AC. Lyme disease: a growing threat to urban population. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91 :2378-83.
21. 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.
22. CDC. Lyme Disease United Status, 2003-2005. *MMWR* 2007; 56:573-6.
23. Magos LC, Sánchez Villareal F, Gutiérrez G, Tapia CR. Banco Nacional de sueros. *Salud pública* 1992; 34:136-147.
24. Gordillo PMG, Solórzano SF, Torres LFJ, Cedillo RR, Tapia CR y Muñoz HO. Evidence serologic of Lyme Disease in Mexico. *Arch Med Res* 1999; 30:64-8.
25. Steere AC, Malawista SE. Cases of Lyme disease in the United States: Locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann Int Med* 1979; 91:730-33.
26. Hofman A (1962). Monografía de los Ixodoidea de México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 23:240-286.
27. Holden K, Boothby JT, Anand S, Massung RF. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) From a coastal region of California. *J Med Entomol* 2003; 40(4):534-9.
28. Barbour AG. Fall and rise of Lyme disease and other *Ixodes* tick-borne infections in North America and Europe. *British Medical Bulletin* 1998; 54(3):647-58.

29. Vaca GD, Fragoso SH, Franco BR, Martínez IF, Santamaría VM y Soberanes CN. Manual de Identificación de las especies de garrapatas de importancia en México. IICA 1996; 1:30-77.
30. Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, et al. Capacity of European animals as reservoir host for the Lyme disease spirochet. J Infect Dis 1992; 165:479.
31. Anderson JF, Magnarelli LA. and cols. Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun. 1986;51:394.
32. Durlan F. Symposium on Lyme disease (Environmental risk and Prevention of Lyme disease). Am J Med 1995; suppl 4 A:2s-5s.
33. Martinez A, Salinas A, Martínez F, Cantu Z y Miller DK. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. J. Wildlife Dis.1999;35:799-803.
34. Barbour AG, Maupin GO, Teltow GJ, Carter CJ, and Piesman J. Identification of an uncultivable *Borrelia* Species in the Hard Tick *Amblyomma americanum*: Possible Agent of a Lyme Disease-like Illness. J Infect Dis 1996;173:403-9.
35. Barbour AG. Fall and rise of Lyme disease and other *Ixodes* tick-borne infections in North America and Europe. British Medical Bulletin 1998;54(3):647-58.
36. Fujikura T. Report of a WHO workshop on Lyme Borreliosis. WHO/CDC/VPH 1993;132:3-19.
37. Barbour AG and Hayes SF. Biology of *Borrelia* Species. Microbiol Rev 1986;50:381-400.
38. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes Yale J Biol Med 1984;57:521-25.
39. Postic D, Assous Mv, Grimont PAD, Barandon G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5s) intergenic spacer amplicons. Int J Syst Bacteriol 1994;44:743-52.
40. Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23 S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. And genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J Clin Microbiol 1995; 33:2427-34.
41. Postic D, Assous M, Belfaiza J and Baranton G. Genetic diversity of *Borrelia* of Lyme borreliosis. Wien Klin Wochenschr 1996;108:748-51.
42. Campbell G L, Mitchell PD and Persing D H. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the United States. J Infect Dis 1997;175:98-107.

43. Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB et al. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J.Clin. Microbiol.1993; 31:340-50.
44. Wilske B, Jauris-Heipke S, Pradel I. et al. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies:relationship to genospecies and OspA serotype. J.Clin.Microbiol.1995;33:103-109.
45. Wang G, Van Dam AP, Schwartz I, and Dankert J. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical implications Clin Microbiol Rev 1999;12:633-653.
46. Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections.Clin Microbiol Rev 1997;10:185-201.
47. Picken RN. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. J. Clin. Microbiol.1992;30:99-114
48. Postic D, Belfaiza J, Isogai E, Saint GI, Grimont PAD, Baranton G. New genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. Res Microbiol 1998;144:467-73.
49. Schneider BS, Zeidner NS, Burkot TR, Maupin GO and Piesman J. *Borrelia* isolates in Northern Colorado identified as *Borrelia bissettii*. J Clin Microbiol 2000;38:3103-5
50. Baranton G, Postic D, Saint Girons I et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42:378-83.
51. Busch U, Hizo TC and Boehmer R. Three species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed field gel electrophoresis and PCR. J Clin Microbiol 1996; 34:1072-8.
52. Liveris D, Wormser GP and Nowakowski J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1996; 34:1306-9.
53. Belfaiza J, Postic D, Bellenger E, Baranton G, Saint G. Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1993; 31:2873-7.

54. Gautom RK .Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organism in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2977-80.
55. Wang Q, Van Dam AP, Spanjaard L and Dankert J. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:768-76.
56. Persing DH, Telford SR, Spielman AS, and Barthold SW. Detection of *B. burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. *J Clin Microb* 1990; 28:566-72.
57. Persing DH, Telford SR, Rys PN, Dodge DE, Malawista SE and Spielman A. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science* 1990; 249:1420-1423.
58. Barbour AG. Laboratory aspects of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:399-414.
59. Anderson JF and Magnarelli LA. Epizootiology of Lyme Disease and Methods cultivating *Borrelia burgdorferi* *Trop Vet Med* 1992; 653: 52-63.
60. Rusell H, Sampson JS, Schmid GP, Hazel WW and Plikayti B. Enzyme-Linked Immunofluorescence Assay and Indirect Immunofluorescence Assay for Lyme Disease 1984; 149: 465-470.
61. Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF and Riviere GR. Cross-Reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microb* 1990; 28: 1276-79.
62. Schwan TG, schrumpf ME, Gage KL and Gilmore RD Jr. Analysis of *Leptospira* spp., *Leptonema illini*, and *Rickettsia rickettsii* for the 39-kilodalton antigen (p39) of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:735-8.
63. Craven RB, Quan TJ, Bailey RE, Dattwyler R, Ryan RW, and Gubler DJ. Improved serodiagnostic testing for Lyme disease: Results of a multicenter serologic evaluation. *Emerg Infect Dis* 1996; 2:136-140.
64. Johnson BJB, Robbins KE, Dennis DT, and cols. Serodiagnosis of Lyme disease: Accuracy of a Two-step approach using a flagella based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996; 174:346-53.

65. Heikkilä T, Huppertz H, Seppälä I, et al. Recombinant or peptide antigens in the serology of Lyme arthritis in children. *J Infect Dis* 2003; 187:1888-94.
66. Heikkilä T, Seppälä I, Saxén H, et al. Recombinant BBK32 protein in serodiagnosis of early and late Lyme Borreliosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1174-6.
67. Heikkilä T, Saxen H, Seppälä I, et al. New antigens for serologic diagnosis of Neuroborreliosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24:709-12.
68. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, and Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993;167:392-400.
69. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G and Hogrefe W. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinni*, and *B. afzelii* Western Blots (immunoblots). *J Clin Microb* 1996; 34:1732-1738.
70. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R and Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microb* 1997; 35:1433-1444.
71. Hilton E, Devoti J and Sood S. Recommendation to include OSP A and OspB in the new immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microb* 1995;34:1353 - 1354.
72. Tilton RC, Sand MR and Manak M. The Western immunoblot for Lyme disease Determination of sensitivity, specificity, and Interpretive criteria with use of commercially available performance panels. *Clin Infect Dis* 1997;25(Suppl 1):S31-34.
73. Zbinden, Goldenberger D, Martinetti LG, Altwegg M. Comparison of two methods for detecting intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi* specific antibodies and PCR for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1795-8.
74. Goodman JL, Bradley JF, Ross AE y cols. Bloodstream from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. *Am J Med* 1995; 99 (1):6-12.
75. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, et al, eds. *Current protocols in molecular biology*. Vol 1 Brooklyn, New York: John Wiley & Sons 1988:2.4.1-2.4.5.

76. Johnson BJB, Happ CHM., Mayer LW and Piesman J. Detection of *Borrelia burgdorferi* in ticks by species-specific amplification of the flagellin gene. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:730-741.
77. Maradiaga CMA, Llausás VA y Kumate RJ. Eritema crónico migratorio asociado a artritis. Enfermedad de Lyme (?) o una variante. *Cong Mex Inf XIV* 1989;1 (res):1.
78. Arroyave CM, Támez GR. Enfermedad de Lyme. Informe de dos casos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994; 51:117-120.
79. Gordillo PG, Estrada G, Solórzano SF, Torres LJ. Confirmación de neuroborreliosis de Lyme por métodos serológicos y moleculares en el Valle de México. Los Cabos B.C.; Congreso de Neurología 1999. Oct 30- Nov 2. Memorias.
80. Gordillo-Pérez Guadalupe, Torres J, Solorzano-Santos F, Garduno-Bautista V, Tapia-Conyer R and Munoz F. Estudio Seroepidemiológico de Borreliosis de Lyme en la Ciudad de México y el noreste de la República Mexicana. *Sal Pub Mex* 2003;45:351-5.
81. CDC. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR* 1997; 46(RR-10):20.
82. Nieman G, Koksal A.M, Oberle A. et al. Facial palsy and Lyme Borreliosis: Long term follow-up of children with antibioticly untreated "idiopathic" facial palsy. *Klin padiatric* 1997; 209:95-99.
83. Hansen K and Lebech A. The clinical and epidemiological profile of Lyme neuroborreliosis in Denmark 1985-1990. *Brain* 1992;115:399-423.
84. Colli C, Leinweber B, Müllegger R, Chott A, Kerl H and Cerroni L. *Borrelia burgdorferi* – associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. *J Cutan Pathol* 2004; 31:232-40.
85. Mc Ginley-Smith DE and Tsao SS. Dermatoses from ticks. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:363-92.
86. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM and cols. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin Microb Rev* 2006;19:165-256.
87. Fraser CM, Casjens S, Huang WM et al. Genomic sequence of Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997; 390:580-6.
88. Hubàlek Z and Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European J Epidemiol* 1997;13:951-7.

89. Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T and Sato Y. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease *Borrelia*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:898-905.
90. Picken RN, YuCheng, Sterle F and Picken MM. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *J Infect Dis* 1996; 174:1112-5.
91. Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F and cols. *Borrelia burgdorferi* infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. *Emerg Inf Dis* 2007; 13: 1556-8.

17. ANEXOS.

ANEXO 1

REPORTE DE CASO DE BORRELIOSIS DE LYME

Folio _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____ EDAD: _____ SEXO _____

DOMICILIO _____ TEL. _____

ESTADO: _____ CD _____ OCUPACION: _____

DX DE ENVIO: _____

SINTOMAS Y SIGNOS DEL CUADRO CLINICO ACTUAL (MARCAR LA RESPUESTA CORRECTA CON UNA X O SUBRAYAR)

ANTECEDENTES:

Ha salido de paseo al campo en los últimos 6 meses SI NO

Ha estado en un bosque o parque zoológico 6 meses previos SI NO

Las lesiones actuales iniciaron después del paseo SI NO

Cuánto tiempo después: 1 sem 2 sem 3 sem 4 sem más de 1 mes

Convive con perros en casa SI NO

Tiene vacas SI NO

DERMATOLOGICO:

Tipo de lesión macular ó papular SI NO

Tiene forma de anillo SI NO

¿Cuántas lesiones? Unica 2-5 5-10 más de 10

Las lesiones están: aisladas confluentes

Miden: menos de 5 cm 5 a 10 cm 11 a 15 cm mayor de 15 cm

Localización: Cuello axilas pliegues de codo y rodilla cara tronco
piernas brazos

En extremidades se localiza: Parte distal parte proximal

La lesión es: unilateral bilateral

Borde de la lesión : regular irregular

Coloración del borde: rojizo pálido

Coloración del centro de la lesión: violáceo rojo blanco ó rosa pálido

La lesión reaparece: SI NO

En cuantas ocasiones: 2 veces 3-5 más de 5

La lesión se transformó: SI NO

La transformación fué de mácula ó pápula a: placa piel atrófica (piel adelgazada)

La lesión se acompaña: Nada Prurito dolor sensibilidad aumentada

REUMATOLOGICOS:

Tiene artralgias SI NO

Tiene aumento de volumen articular SI NO

Cuántas articulaciones están afectadas Unica 2 3a5 más de 5

Localización: Rodilla cadera hombro codo tobillo muñeca interfalángicas

La artritis es: Unilateral bilateral

Simétrica asimétrica

Tiempo de inicio de la artritis: 1 mes 2-5meses 6 - 12 meses más de 1 año

La artritis es: Continua recurrente

SISTEMA NERVIOSO : **Tiene meningítis aséptica:**

Presenta síndrome meníngeo: SI NO

El citológico de LCR tiene más de 8 células: SI NO

Los leucocitos son predominio: Polimorfonuclear Mononuclear (linfocitos - monocitos)

El porcentaje es : 5 a 50% 51- 75% 76- 100%

Glucosa : menor de 40 41-80 más de 80

Proteínas menor de 35 36-45 mayor de 45mg/dl

Tinción de Gram: Es negativa Bacterias hongos

¿ El paciente cursa con poliradiculoneuritis (parálisis flácida de miembros inferiores) ?

Tiene disminución de la fuerza muscular de extremidades inferiores: SI NO

De acuerdo a la escala de fuerza muscular 0 a IV en que número está: 0 I II III IV

Localización es: simétrica asimétrica

La sensibilidad está : normal disminuida aumentada

Presenta parálisis facial : SI NO

Localización: unilateral bilateral

Afecta: Comisura labial toda hemicara

CARDIOLOGICO:

El paciente cursa con bloqueo atrioventricular de 2do ó 3er grado SI NO
Requirió hospitalización en este episodio SI NO
¿Cuánto tiempo? 1-7 dias 8-14 dias 15-21 dias 21 - 30 dias más de 1
mes
Recibió antibióticos SI NO
¿CUÁLES?

Por cuánto tiempo? 1-7 dias 8-14 dias 15 - 21 dias 22-28 dias 1 mes ó más

ESTUDIOS DE LABORATORIO:

VDRL	SI	NO	POSITIVO	NEGATIVO
IgG	SI	NO	POSITIVO	NEGATIVO
IgE	SI	NO	POSITIVO	NEGATIVO
Factor reumatoide	SI	NO	POSITIVO	NEGATIVO
ACS ANTINUCLEARES	SI	NO	POSITIVO	NEGATIVO

NOMBRE DEL MÉDICO: _____ TEL _____

DOMICILIO: _____ CD _____

UNIDAD MEDICA IMSS SSA ESTADO OTRA _____

SI TIENE ALGUNA DUDA COMUNICARSE A LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS, HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CMN SXXI, IMSS, MEXICO, D.F. CON DRA. MARIA GUADALUPE GORDILLO PEREZ tel 01 (55) .56 27 69 00 ext. 3203 ó 3204 fax 01 (55) 56 27- 69 49.

ANEXO 2

INSTRUCTIVO PARA EL LLENADO DE LAS HOJAS DE NOTIFICACION DE CASO.

La hoja de captación de datos consta de la definición y características clínicas de las principales manifestaciones de Borreliosis de Lyme.

Posteriormente consta de 6 apartados, los que deberán llenarse en caso de que presenten la característica clínica correspondiente.

I.- Características demográficas:

Se refiere a las características basales de los pacientes. Deberá llenar con una cruz el espacio correspondiente y el número que se solicite.

- 1.- Nombre.- Coloque el nombre completo iniciando con apellido paterno, materno y nombres.
- 2.- La edad : en años y meses cumplidos.
- 3.- El sexo: anotar en el cuadro el número 1 cuando sea masculino y no. 2 femenino.
- 4.- Folio.- El número progresivo correspondiente que estará foliado.
5. Domicilio: La dirección de casa actual con su delegación correspondiente, teléfono en casa u oficina, Ciudad y Estado de procedencia.
- 6.- Institución; Institución de salud que envía al paciente.
- 7.-Ocupación: Empleo ó actividad a la que se dedica en el último año.

II En esta parte se trata de identificar a los pacientes con manifestaciones cutáneas tempranas y tardía de la enfermedad.

- 1- Tiene lesiones en piel, las preguntas son mutuamente excluyentes , marque con una X en el cuadro correspondiente si la respuesta es positiva = Si , si es negativa = No.
- 2- Tuvo lesiones en piel marque que una X la respuesta correspondiente SI u No en caso de ser negativa pasa a la sección III –pregunta 12.
- 3- De igual manera en las siguientes preguntas sobre manifestaciones cutáneas marque con una X las características positivas de las lesiones y el número de las mismas.

En el rubro III se identifican las manifestaciones articulares y sus características , así como la localización.

En cada uno de las preguntas marque con una X la respuesta correspondiente.

El rubro IV determina las características clínicas del sistema nervioso.

ANEXO 3

Hoja de consentimiento informado

Título del estudio de investigación: **CARACTERIZACION MOLECULAR DE *Borrelia burgdorferi* ADQUIRIDA EN LA REPUBLICA MEXICANA Y DE LA RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS DE DIFERENTES ESPECIES DE *BORRELIA* EN PACIENTES CON BORRELIOSIS DE LYME.**

Investigadores: Dra. María Guadalupe Gordillo Pérez y Dr. Javier Torres López. Hospital de Pediatría y UIMEIP, CMN SXXI, IMSS, México. D.F.

Objetivo: Determinar las especies de *Borrelia burgdorferi* que infectan a pacientes mexicanos con Borreliosis de Lyme adquirida en la República Mexicana mediante caracterización molecular y la respuesta inmune a antígenos de diferentes especies de *Borrelia*.

PROCEDIMIENTO:

Si consiento participar sucederá lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre mi historia médica, que dura 30 minutos.
2. Me realizarán una exploración física rutinaria y revisarán mi expediente como parte de las actividades del personal de salud que atiende mi caso.
3. Me extraerán sangre aproximadamente 5-10 ml del brazo con aguja, para estudios de laboratorio con la finalidad de detectar una causa infecciosa de mi padecimiento. La punción duele unos segundos y en ocasiones se produce un hematoma (moretón) pero es poco frecuente.
4. En casos con afección neurológica se realizará el procedimiento de punción lumbar para la obtención de líquido cefalorraquídeo y poder ser analizado en el laboratorio. Este procedimiento se realizará bajo estricta supervisión médica en todo momento y con riesgo mínimo. En casos muy raros pueden presentarse complicaciones

BENEFICIOS: Conocer los resultados de los estudios, el posible diagnóstico de su enfermedad y recibir tratamiento específico en los casos que lo ameriten.

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

DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR EL ESTUDIO.

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

La Dra. Guadalupe Gordillo y/o colaboradores, han discutido esta información y se han ofrecido a responder mis preguntas. En caso de cualquier duda, puedo ponerme en contacto a los teléfonos 5627- 6900 ext 22408

CONSENTIMIENTO.

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

NOMBRE Y FIRMA: _____

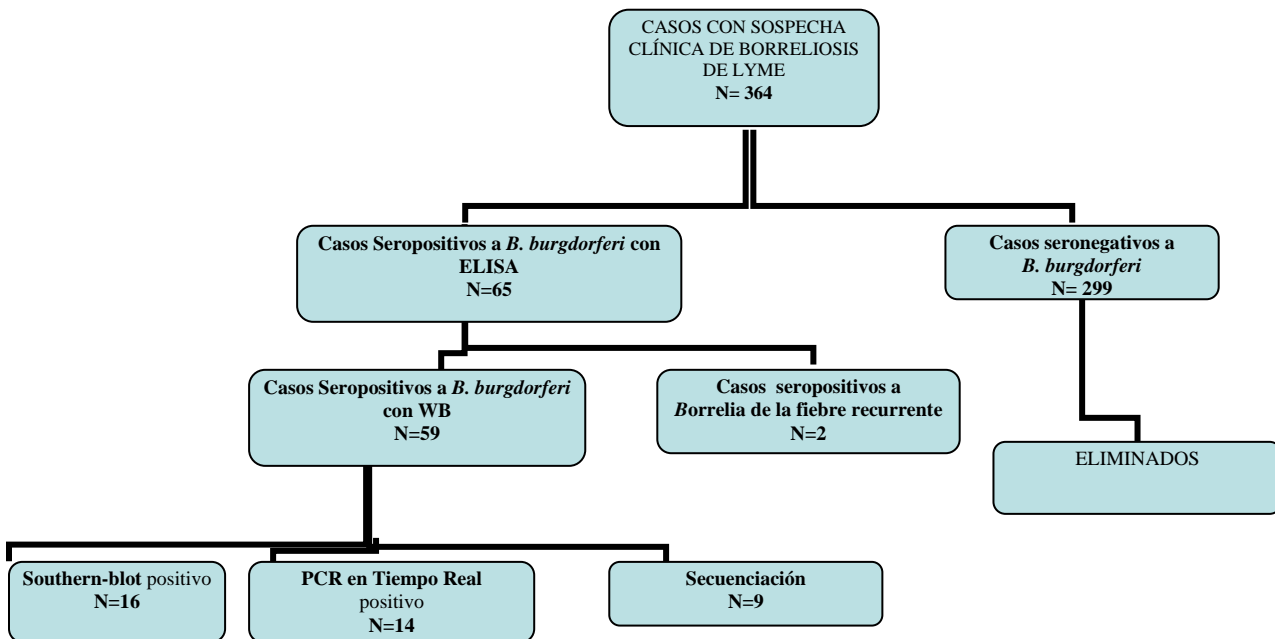
FECHA: _____

TESTIGO (Nombre y Firma): _____

Firma del Médico: _____

ANEXO 4

Diagrama de flujo para Estudio de paciente con diagnóstico diferencial de Borreliosis de Lyme



ANEXO No.5

PCR EN TIEMPO REAL

La amplificación fué realizada de acuerdo a las guías generales provistas por el fabricante. En un capilar de vidrio con un volumen de 20 μ l se agregó 2 μ l de la mezcla maestra Lightcycler –fast Start DNA Master (taq DNA polimerase, buffer de reacción, mezcla de DNTPs, MgCl₂ 3mM, 20 ng de albúmina bovine, 0.5 μ M de primers y 220 ng de anticuerpo TaqStart y 5 μ l del DNA extraído.

Preparación del DNA (concentración 10 pmol/ μ l): Se extrajo DNA de las cepas de referencia de *B. burgdorferi* sensu stricto B31, *B. garinii* 20047, *B. afzelii* VS461, *B. valaisiana*, *B. andersonii*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. turdi*, *B. tanuki*, *B. sp* Am501, *B. spielmani*(A14S) y fueron usadas como control positivo. Los 2 controles positivos y un control negativo fueron incluidos en cada corrimiento de PCR.

Los primers fueron probados para la especificidad de amplificación con diferentes géneros de bacterias (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*, *Eikenella corrodens*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Burkholderia cepacia*, *Leptospira interrogans*, *Treponema pallidum subsp. pallidum* y *Borrelia hermsii* HS1).

El programa de amplificación incluyó el paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 20 s y 50 ciclos con desnaturalización a 95°C por 10 s, alineamiento 55 °C por 10s, y extensión a 72°C por 11 segundos. La fluorescencia fué medida al final de cada extensión. Después de la amplificación, una curva fué obtenida calentando el producto de 20 °C/s a 95°C, enfriando a 20°C/s a 40 °C, guardándolo a 35°C por 20s, y entonces calentar lentamente de 0.1°C/s a 94°C. La fluorescencia fue medida durante la etapa de calentamiento lento.

La temperatura de alineamiento T_m obtenida se utilizó para genotipificar cada especie del complejo y fue la siguiente: *B. burgdorferi* sensu stricto 67.4°C, *B. garinii* 60 °C, *B. afzelii* 55.1°C, *B. japonica* 56.6°C, *B. andersoni* 56°C, *B. bissetii* 60.3°C, *B. turdi* 65.6 °C *B. tanuki* 50 °C. *Borrelia* sp Am501 58 °C, *B. spielmanii* (A14S) 63.8°C.

Borrelia burgdorferi Infection and Cutaneous Lyme Disease, Mexico

Guadalupe Gordillo-Pérez,* Javier Torres,*
Fortino Solórzano-Santos,* Sylvie de Martino,†
Dan Lipsker,† Edmundo Velázquez,*
Guillermo Ramon,* Muñoz Onofre,*
and Benoit Jaulhac†

Four patients who had received tick bites while visiting forests in Mexico had skin lesions that met the case definition of erythema migrans, or borrelial lymphocytoma. Clinical diagnosis was supported with histologic, serologic, and molecular tests. This study suggests that *Borrelia burgdorferi* infection is in Mexico.

Lyme disease is the most frequently reported vector-borne infectious disease in the United States and Europe (1,2). Studies have suggested that *Borrelia burgdorferi* infection might be endemic to Mexico (3,4). We searched for histologic, immunologic, and molecular evidence of *B. burgdorferi* infection in patients with cutaneous manifestations suggestive of Lyme disease in Mexico.

The Study

From June 1999 to October 2000, 4 patients in Mexico City had clinical manifestations suggestive of Lyme disease (5,6). Two (36 and 54 years of age) had erythema migrans lesions, and 2 (9 and 34 years of age) had borrelial lymphocytoma lesions. Two reported having been bitten by a hard tick; the other 2, by a nonflying insect. Bites occurred while camping in forests: 3 near Mexico City (National Park La Marquesa) and 1 in Quintana Roo, a southern state in Mexico. All patients lived in Mexico City and had never traveled outside Mexico.

Two patients were treated for acute skin lesions (consistent with erythema migrans), malaise, and arthralgia. The skin lesion was an erythematous macula with regular, reddish edges and a pink center. One patient had a 5-cm lesion on the left forearm; the other had a 6-cm lesion on the left thigh. For the 2 other patients, a nodular erythematous cutaneous lesion (consistent with lymphocytoma), 0.5–2 cm in diameter with regular edges, developed 2 months after the bite. One patient's lesion was on the earlobe; the other's, on the left cheek.

*Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico; and †Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France

Serum from each patient was tested for immunoglobulin M (IgM) and IgG against *B. burgdorferi sensu lato* by using a commercial ELISA (cutoff optical density 0.200 and indeterminate 0.200–0.400) (Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg, Germany) (7). A *Treponema pallidum* ELISA (Abbott Murex, Wiesbaden, Germany) was performed to rule out cross-reaction with *T. pallidum* infection. Serum samples positive for *B. burgdorferi* by ELISA were further tested by Western blot (WB) by using the Marxblot assay (MarDx Diagnostics, Carlsbad, CA, USA) and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) criteria (5).

Serum samples from the 2 lymphocytoma patients were positive for *B. burgdorferi* by ELISA and WB (Figure 1, panel A; Table). For the 2 erythema migrans patients, serum samples taken 2 weeks after the tick bite were negative for *B. burgdorferi* IgM and IgG; but 2 months later, 1 patient became seropositive, confirmed by WB (Figure 1, panel B; Table).

Histologic examination of skin biopsy specimens from each erythema migrans lesion showed a mononuclear cell infiltrate in the superficial and deep dermis; infiltrate included lymphocytes and plasma cells around the perivascular zones. Biopsy samples of lymphocytoma lesions showed dense nodular lymphocytic infiltrates in the reticular dermis with well-delineated lymphoid follicles, no atypical mitosis, B-lymphocytes (anti-CD20, DAKO, Carpenteria, CA, USA) in the germinal center (Figure 2, panel A), T-lymphocytes (anti-CD45 RO+) in the follicular zone (Figure 2, panel B), and no CD3+ cells.

DNA was extracted from the biopsy samples (RoMag Mini Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA) and used for PCR amplification of a fragment of *fa* gene specific for *B. burgdorferi sensu lato* species as well as for a fragment of *ospA* gene, as described (8–10). DNA from a skin biopsy of a patient with systemic lupus erythematosus was used as negative control, and DNA (10 pg/μL) from *B. burgdorferi sensu stricto* B31 served as positive control. All procedures from DNA extraction to amplification were performed twice for each sample. Amplified products were further tested by Southern blot (SB) hybridization with probes

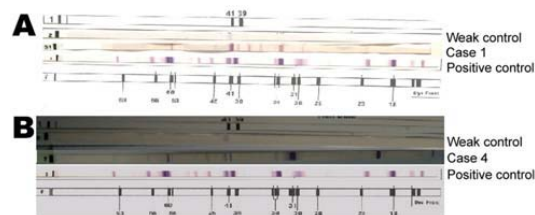


Figure 1. Western Blot (WB) immunoglobulin G results from cutaneous cases. A) WB with serum from patient 1, showing erythema migrans. B) WB with serum from patient 4, showing lymphocytoma; a strong positive and a weak positive control were included.

Table. Serologic IgG and molecular test results for patients with cutaneous lesions suggestive of Lyme borreliosis*

Diagnosis	ELISA OD	WB, molecular weight, kDa†	PCR for <i>fla</i> gene	SB‡
Erythema migrans	0.469	23,30,39,41,45,58	+	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
Erythema migrans	0.146	NT	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
Lymphocytoma	0.472	23,28,39,41,58,66	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
Lymphocytoma	0.574	23,39,41,45,66,83	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto

*Ig, immunoglobulin; OD, optical density; WB, Western blot; SB, Southern blot; NT, not tested.

†WB assay with *B. burgdorferi* sensu stricto antigen (Marxolot test), protein size of the bands recognized by the patient's serum.

‡SB assay was done by using the probe specific for *B. burgdorferi* sensu stricto.

specific for *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*, as described (9). DNA from the 4 biopsy samples was positive for *B. burgdorferi* sensu lato *fa* gene by PCR and confirmed as *B. burgdorferi* sensu stricto by SB (online Appendix Figure, available from www.cdc.gov/EID/content/13/10/1556-appG.htm; Table). All DNA biopsy samples were negative by SB with the probes specific for *B. garinii* and *B. afzelii*. We were able to amplify the *OspA* gene for only 1 case of erythema migrans, by using PCR and SB tests (data not shown).

The PCR products of the *fa* gene from 3 patients and of the *ospA* gene from 1 patient were sequenced by using a commercial kit (GenomeLab DTC'S-Quick Start Kit, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) with the sequencer from Beckman Coulter, Inc., according to manufacturer's instructions. We used the DNAMAN program (Lynnon Corporation, Vaudreuil-Dorion, Quebec, Canada) to align the sequences with the reported sequences of the *B. burgdorferi* sensu stricto B31 strain (online Appendix Figure). For the 2 erythema migrans cases, we found 3 base substitutions (online Appendix Figure, panel C), 1 of which was not conserved, leading to a change in amino acid (G for R in the 75 aa); these 2 sequences had 99% homology with the sequence of *B. burgdorferi* *fa* gene of isolate B31 (BLAST program) (11). For the lymphocytoma case, we found 2 base substitutions, the same as those of the erythema migrans cases, including the nonconserved base substitution (online Appendix Figure, panel C).

Regarding the *ospA* gene in the erythema migrans case, the sequence showed 1 base substitution that was not conserved, leading to a change in the amino acid 5 (L for I). The sequence of this case had 99% homology with the plasmid *Ip54* gene of B31 strain sequence (11) (online Appendix Figure, panel D).

The 3 adult patients received doxycycline 200 mg/day for 3 weeks; the child received amoxicillin 50 mg/kg/day for 3 weeks. For all patients, lesions were gone at the end of the treatment and had not recurred 3 years later.

Conclusions

Erythema migrans is the diagnostic marker for Lyme disease associated with *B. burgdorferi* infection (5,6). Histologic data from our 2 erythema migrans cases agreed with data reported for other erythema migrans cases (5). Moreover, the 2 erythema migrans cases were positive for

B. burgdorferi sensu stricto *fa* gene and 1 for *ospA* gene; the 3 cases had a high degree of homology to the sequences of strain B31. In addition, 1 case met CDC criteria for seropositivity to *B. burgdorferi* infection (5).

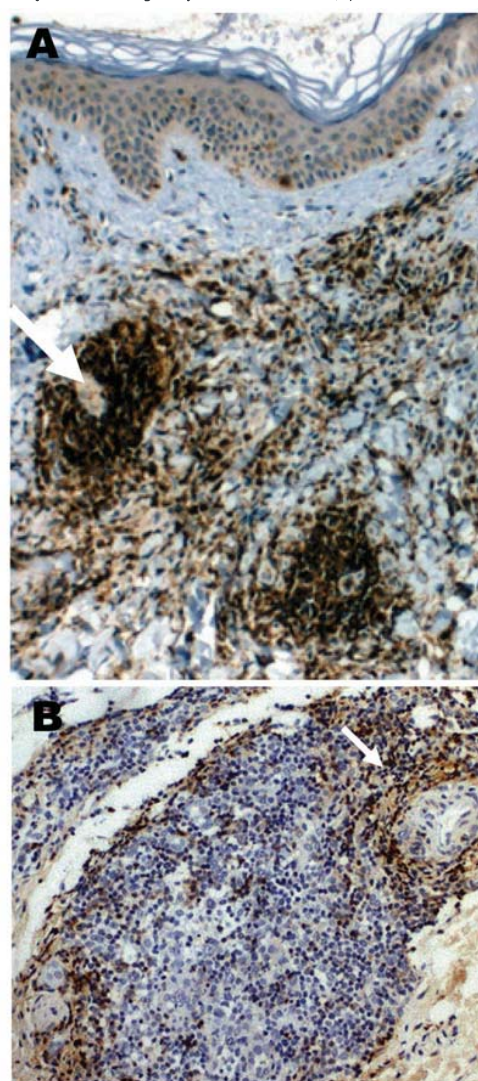


Figure 2. A case of lymphocytoma. A) Immunohistochemical image with anti-CD20 antibody showing a nodule with a dense B-lymphocytes infiltrate in the dermis (arrow); magnification $\times 100$. B) Immunohistochemical image with anti-CD45 Ro antibody showing T-lymphocytes at the periphery of a nodule (arrow); magnification $\times 200$.

Borrelial lymphocytoma is a rare clinical entity reported mostly in Europe (12–14) and sporadically in the United States (15). In this study, histologic and immunohistochemical data from the 2 lymphocytoma cases agreed with data from previous cases. These results were not specific enough to be considered diagnostic; however, germinal centers are present in 80% of borrelial lymphocytoma cases (12). Serum samples from 2 patients were positive by WB, which fulfills CDC criteria (5). In 1 case, *fa* gene was amplified and sequenced, showing high homology with the *fa* gene from *B. burgdorferi* sensu stricto strain B31 (11). Few reports describe genotyping of *B. burgdorferi* species in borrelial lymphocytoma. In Slovenia, *B. afzelii* and *B. bissettii* were identified (13); in Germany, *B. garinii* was identified (14). In our lymphocytoma patients, we identified *B. burgdorferi* sensu stricto. That the 2 borrelial lymphocytoma cases occurred in patients who had visited the same national park suggests that *B. burgdorferi* is endemic to that area.

This study documents *B. burgdorferi* infection in Mexican patients. Relevant epidemiologic data are 1) cases occurred after visiting forest areas, 2) patients reported having been bitten by a nonflying insect, 3) cases occurred during the summer-fall season, 4) no patient reported having traveled to another country, and 5) all skin lesions resolved after treatment with an antimicrobial drug. Our results suggest that *B. burgdorferi* infection occurs in Mexico and that continuous surveillance for Lyme disease in Mexico should be mandatory.

Acknowledgments

We thank C. Barthel for her excellent technical assistance.

Financial support was provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (grant 30694-M) and by the Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), grant IIP-2003-119, México. J.T. has a Fundación-IMSS exclusivity scholarship.

Dr Gordillo-Pérez is an associate researcher in the Infectious Diseases Research Unit at the Paediatric Hospital, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, in Mexico City. Her research interests are diagnosis and epidemiology of Lyme borreliosis in Mexico, molecular typing of *B. burgdorferi* and its vectors, and infections of the central nervous system.

References

- Centers for Disease Control and Prevention. Lyme Disease—United States, 2001–2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004;53:365–9.
- Rath PM, Forshoff B, Mohnhaupt A, Albig J, Eljaschewitsch B, Jürgens D, et al. Seroprevalence of Lyme borreliosis in forestry workers from Brandenburg, Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:372–7.
- Gordillo G, Torres J, Solorzano I, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. Serological evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. Arch Med Res. 1999;30:64–8.
- Gordillo-Pérez G, Torres J, Solorzano-Santos F, Garduño-Barrista V, Tapia-Conyer R, Muñoz O. Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the northeast of the Mexican Republic [in Spanish]. Salud Publica Mex. 2003;45:351–5.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the second national conference on serologic diagnosis of Lyme disease. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1995;44:590–1.
- Stanek G, O'Connell S, Cimmino M, Aberer E, Kristoferitsch W, Gratzström et al. European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. Wien Klin Wochenschr. 1996;108:741–7.
- Hirshfeld KP, Ernst M, Zachary P, Jauliac B, Sonneborn HH, Brade V. Development and laboratory evaluation of a new recombinant ELISA for the serodiagnosis of Lyme disease. Wien Klin Wochenschr. 2002;114:580–5.
- Jauliac B, Clary-Valckenaere I, Sibilia J, Javier RM, Liétout Y, Kuntz JL, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* by DNA amplification in synovial tissue samples from patients with Lyme arthritis. Arthritis Rheum. 1996;39:736–45.
- Jauliac B, Heller R, Limbach FX, Hartsmann Y, Lipsker D, Monteil H, et al. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with Lyme arthritis. J Clin Microbiol. 2000;38:1895–900.
- Moser SF, Hoffmann H, Wächter R, Simon M, Kramer M. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by *OspA*-specific PCR. J Clin Microbiol. 1994;32:2980–8.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature. 1997;390:580–6.
- Colli C, Leinweber B, Müllberger R, Chott A, Kohl H, Cerroni L. *Borrelia burgdorferi*-associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. J Cutan Pathol. 2004;31:232–40.
- Picken RN, Stule T, Rozic-Sablje E, Marespic V, Lotric-Furlan S, Cimperhar J, et al. Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from five patients with solitary lymphocytoma. J Invest Dermatol. 1997;108:92–7.
- Basch U, Hizo-Tschel C, Böhmer R, Fingerle V, Rössler D, Wilske B, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from cutaneous Lyme borreliosis biopsies differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. Scand J Infect Dis. 1996;28:583–9.
- Finkel MF, Johnson RC. *Borrelia* lymphocytoma: a possible North American case. Wis Med J. 1990;89:683–6.

Address for correspondence: Guadalupe Gordillo-Pérez, Calle Bruselas #109-6 Col. Del Carmen, Coyoacan, D.F. 04100, México; email: lugope2@hotmail.com

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

FIGURA No. 1

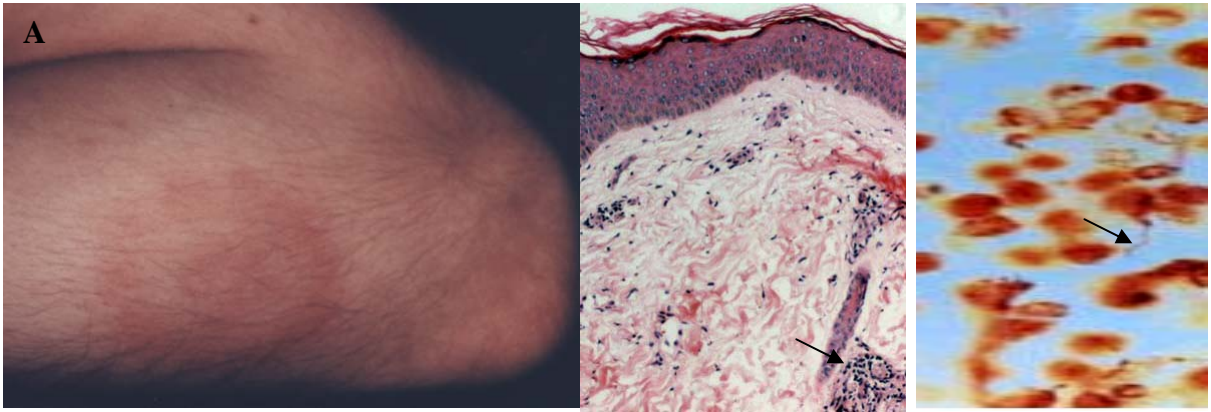
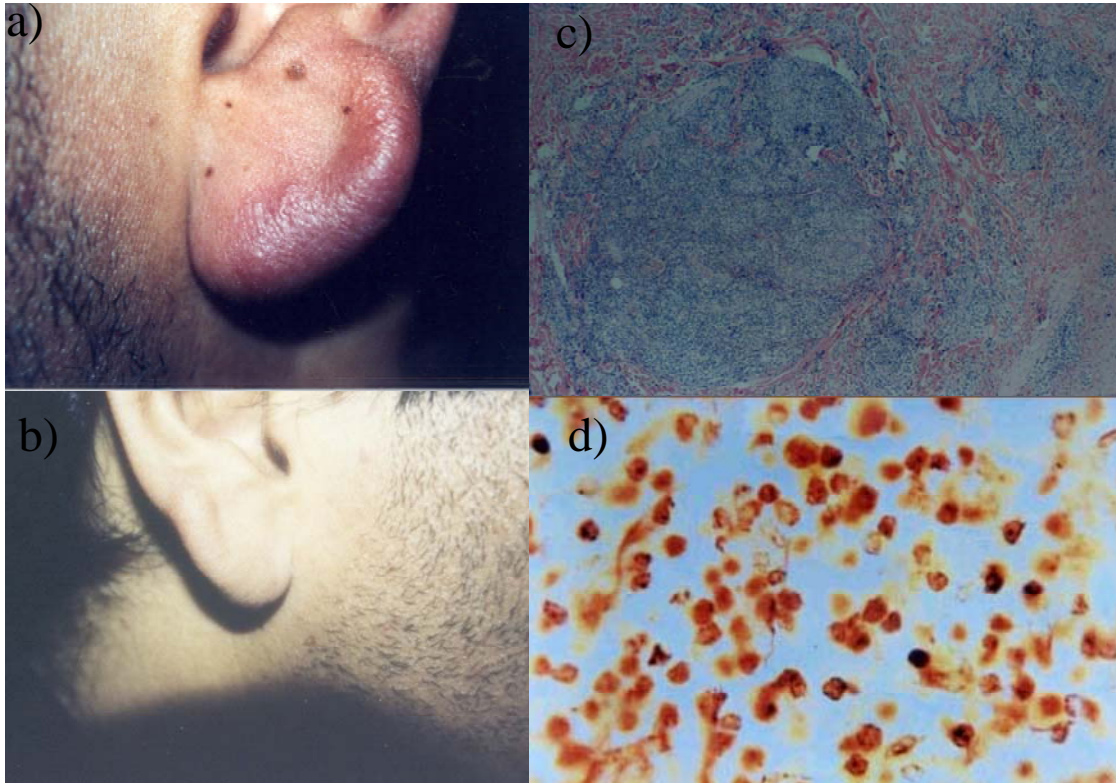


Figura 1. A) Eritema migrans en el antebrazo izquierdo. B) Tinción de hematoxilina-eosina muestra infiltrado inflamatorio en dermis (aumento del original, X25).C) Tinción de Warthin-Starry (aumento del original, X25).

FIGURA No. 2

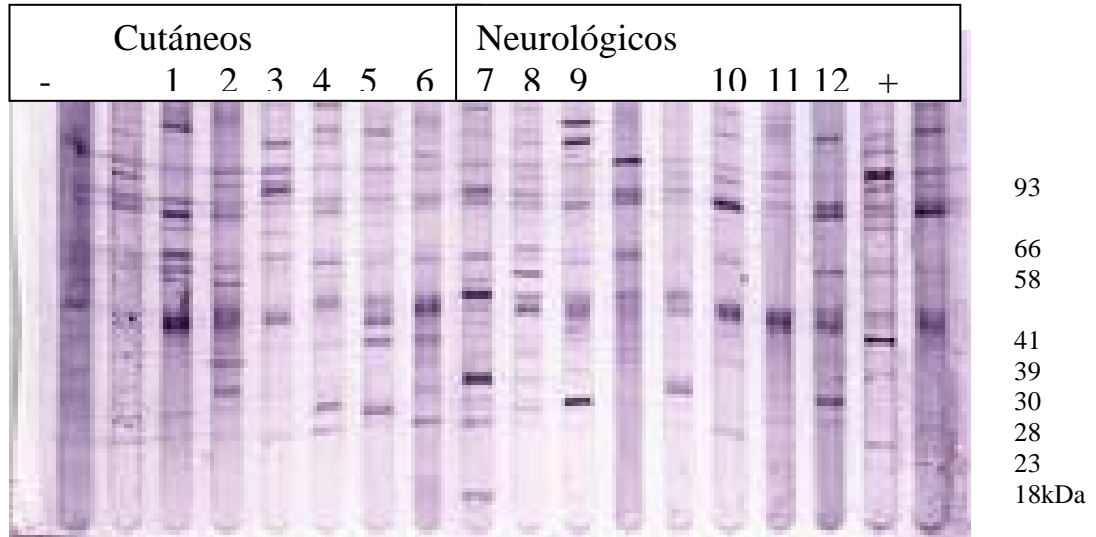


A) Linfocitoma del lóbulo de la oreja. B) Respuesta a tratamiento antibiótico. C) Tinción de H-E muestra un infiltrado denso de linfocitos con centro germinal (amplificación original 25X). D) Tinción de Whartin-Starry muestra espiroquetas (original magnification, X40).

FIGURA 3

WB IgG vs *B. burgdorferi* sensu stricto en sueros de pacientes mexicanos con manifestaciones cutáneas y neurológicas.

A



A) WB IgG vs *B. burgdorferi* sensu stricto cepa B31 (Criterios del CDC 5 bandas de p93,p66,p58,p41,p39,p31,p30,OspC,p21,p18). **B) WB IgG vs Bbss cepa PKa** (Criterios de la EUALB).

B

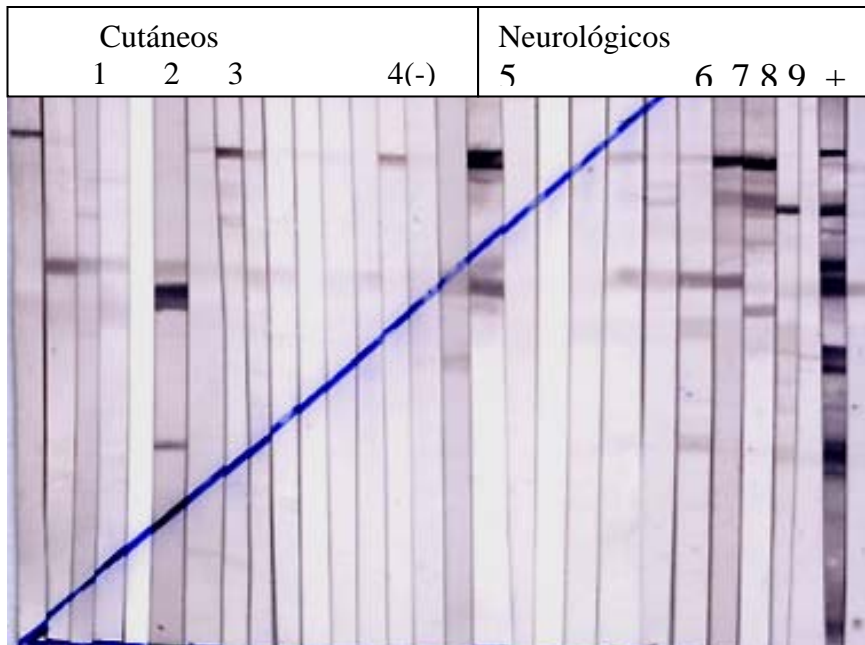
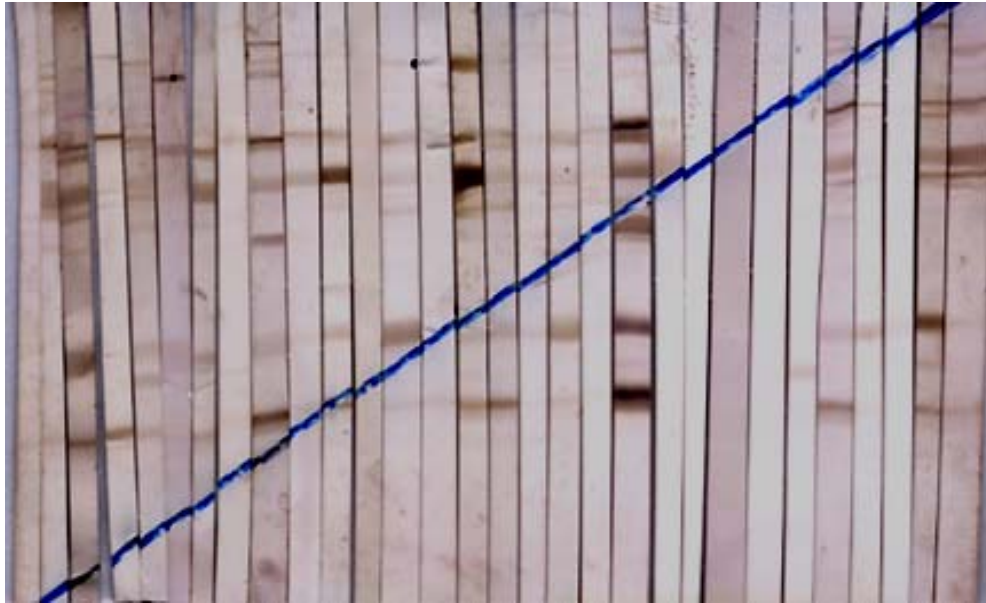


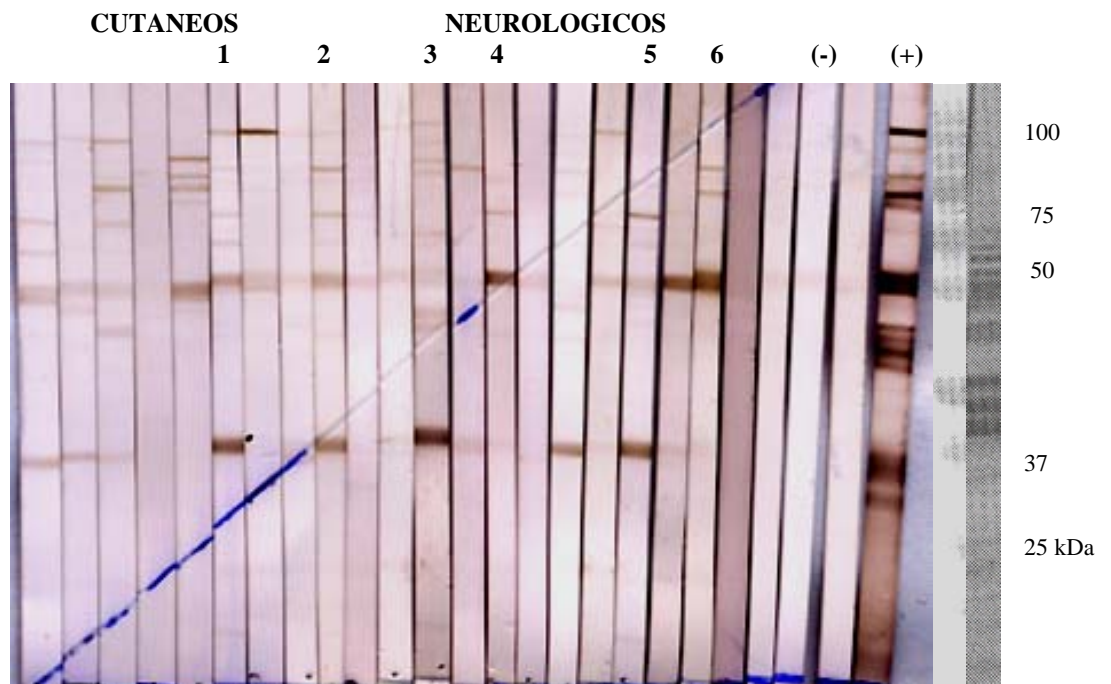
Figura No. 4

Western-blot anti IgM vs *Borrelia burgdorferi* sensu lato en suero de pacientes con manifestaciones neurológicas y cutáneas.

A



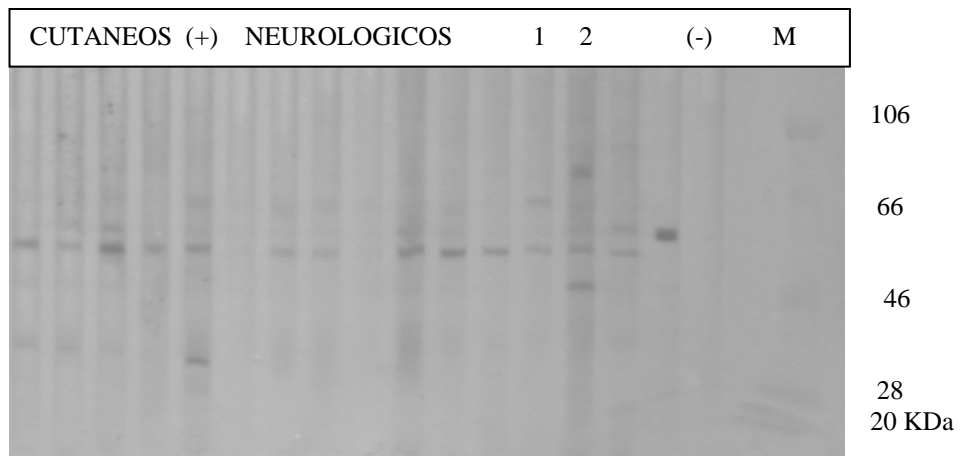
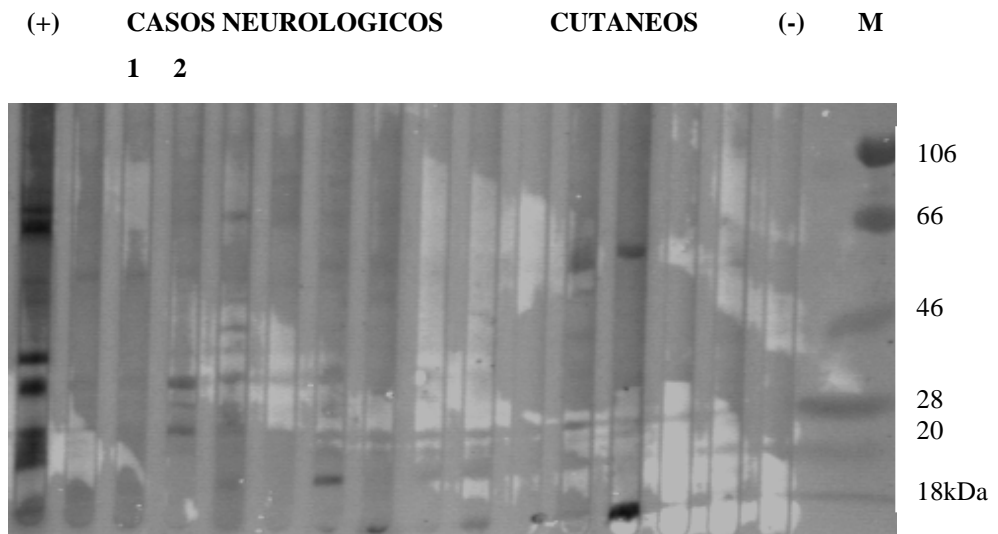
B



A) WB IgM vs *Borrelia garinii*. B) WB IgM vs *B. afzelii* (criterios EUCALB).

FIGURA No. 5

Western-blot IgG vs *B. valaisiana* y *Borrelia sp.* en suero de pacientes con manifestaciones neurológicas y cutáneas.



A) WB IgG vs *B. valaisiana* B)WB IgG vs *B.turicatae*

Figura 6

Slot-blot de DNAs de biopsias de piel y LCR de pacientes con sospecha de Borreliosis de Lyme con sonda del gen *fla* de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto marcada con P³².



Figura 7

PCR y Dot-blot con el gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu stricto en DNAs de LCR de casos con neuroborreliosis de Lyme.

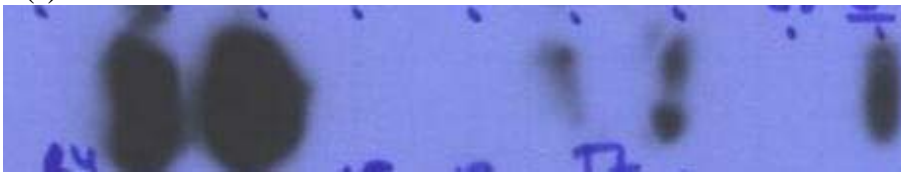
A)

(-) 1 2 3 4 5 6 7 6 1 2 4 (+)



B)

(-) 1 2 3 4 5 7



A) Casos neurológicos 1,2,4,5 y 7 positivos por PCR con el gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato, Efecto inhibitorio en la muestra 6. B) DNAs de LCR de los pacientes 1,2,4,5 y 7 positivos en Dot-blot con la sonda del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu stricto.

Figura 8



B)

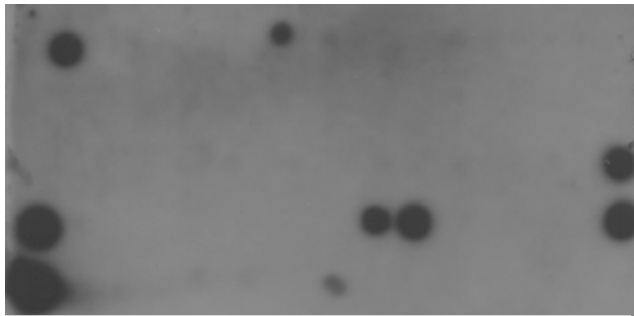


A) PCR del gen *ospA* de *B. burgdorferi* de pacientes con manifestaciones cutáneas y articulares. B) Dot-blot con la sonda *OspA* de *B.burgdorferi* ss muestra hibridación en 6 DNAs, 5 de biopsias de piel y 1 de líquido sinovial.

Figura 9

Dot-blot de DNAs de biopsias de piel y LCR con la sonda del gen *fla* de *Borrelia garinii*

+ cepa PBi



DNA de LCR de 3 pacientes que hibridó con la sonda de *B. garinii* con SB.

Figura 10

Slot-blot del gen fla con sonda para identificar *Borrelia afzelii*

+ cepa PKO.

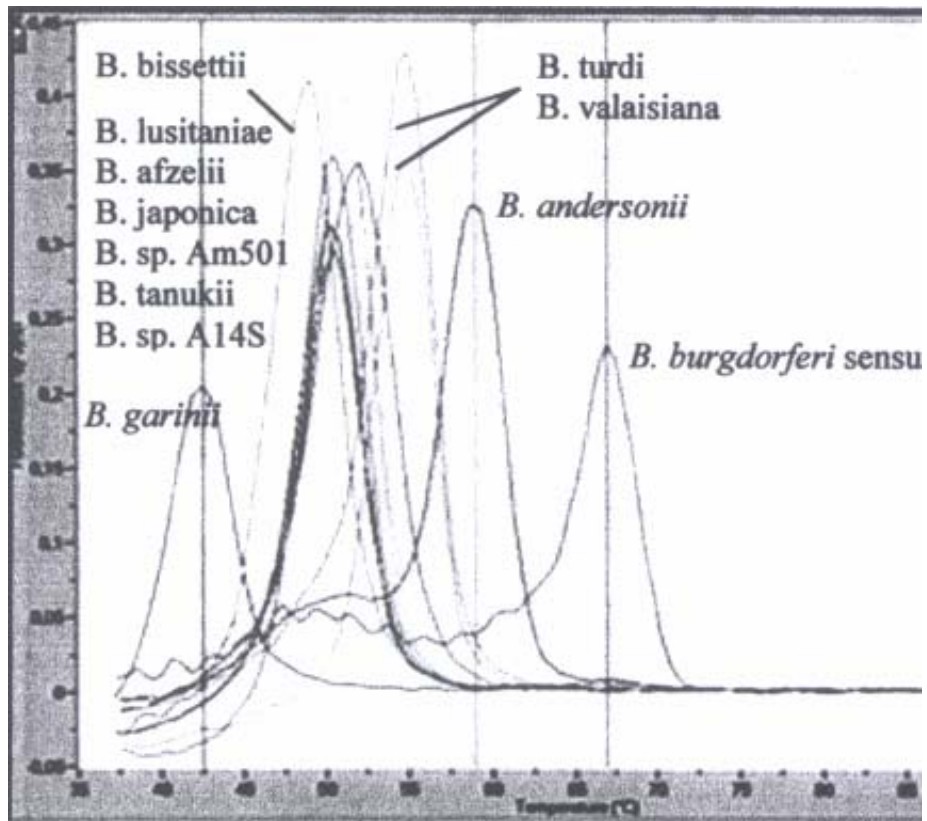


C-2

DNAs de biopsias de piel y LCR , 2 casos que hibridaron con la sonda de *B. afzelii*.

FIGURA No. 11

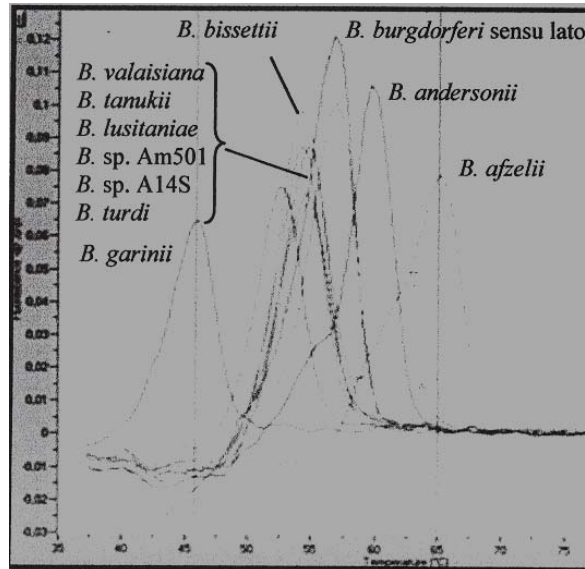
Genotipificación de *B. burgdorferi* sensu stricto con PCR en tiempo real



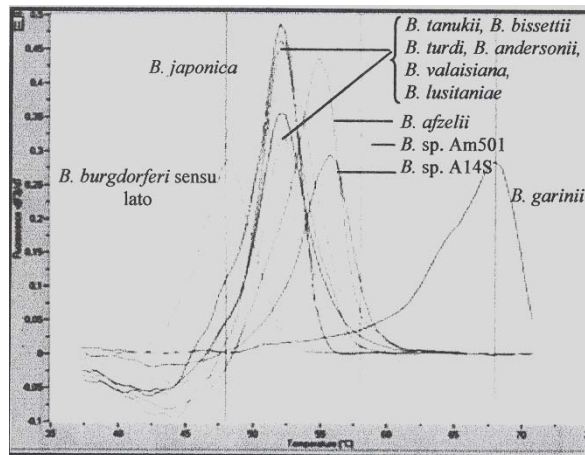
- A. Sonda específica de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto examinada con el ADN de todas las especies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato. Cada curva representa la temperatura de fusión (TM) de la sonda para la secuencia blanco de la especie estudiada.

FIGURA No. 12

Genotipificación del complejo *B. burgdorferi* sensu lato con PCR en tiempo real

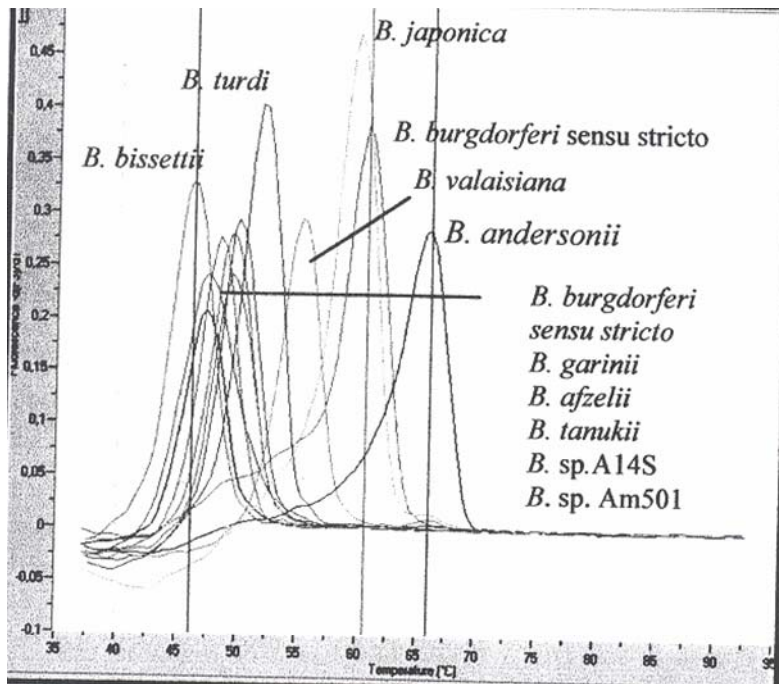


Sonda específica de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto examinada con el ADN de todas las especies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato. Cada curva representa la temperatura de fusión (TM) de la sonda para la secuencia blanco de la especie estudiada.



Sonda específica de *Borrelia afzelii* examinada con el ADN de todas las especies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato. Cada curva representa la temperatura de fusión (TM) de la sonda para la secuencia blanco de la especie estudiada.

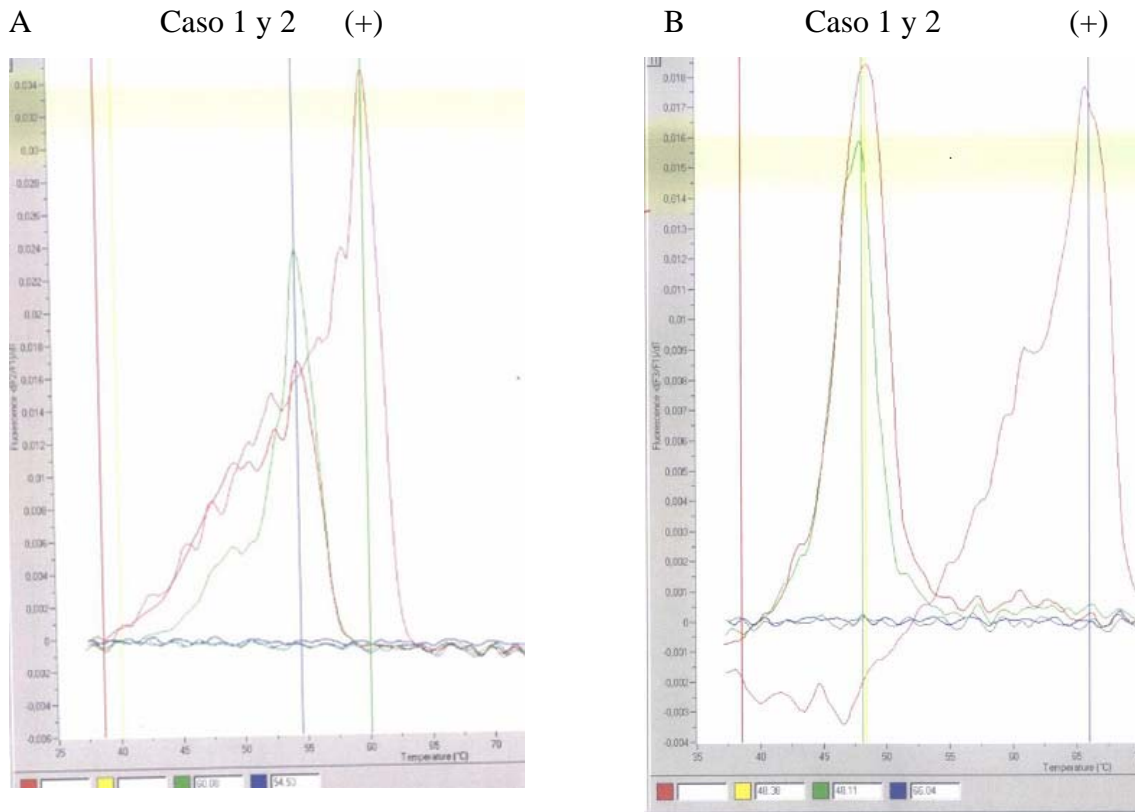
FIGURA No. 13



Sonda específica de *Borrelia andersonii* examinada con el ADN de todas las especies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato. Cada curva representa la temperatura de fusión (TM) de la sonda para la secuencia blanco de la especie estudiada.

FIGURA No. 14

PCR en Tiempo Real con sondas del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato



A. Sonda de *B. garinii* examinada con el ADN de pacientes con Borreliosis de Lyme. **B.** Sonda de *B. japonica* examinada con el ADN de pacientes con Borreliosis de Lyme. Cada curva representa la temperatura de fusión (TM) de la sonda para cada ADN estudiado con la respectiva especie.

Figura 15

**Producto de PCR de biopsia de piel clonado en el vector PCR 3.1 y digerido con
ECO R1.**

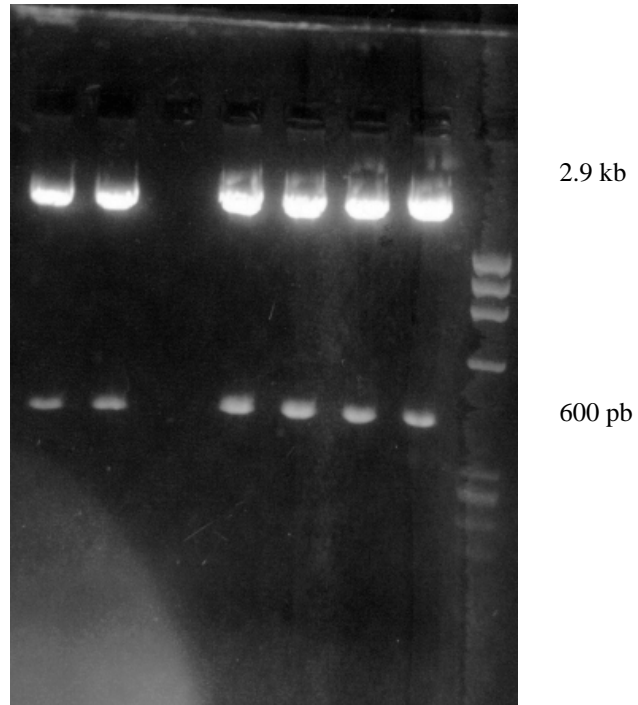


FIGURA No. 16

Secuenciación del gen *fla* de *Borrelia burgdorferi* en DNAs obtenidos de biopsias de piel y LCR de pacientes con Borreliosis de Lyme

A	B31	AACACAC CAG CAT CACTTT CAGGGTCTCAAGCGTCTTGGACTTAAAGAGTTCATGTTGGAGCAAACCAAGATGAAGCT	78
	1	-----	78
	2	-----	78
	3	-----	78
	4	-----	78
	5	-----	78
	6	-----	78
	7	-----	78
	B31	ATTGCTGTAAATATTTATGCAGCTAATGTGCAAACTCTTCTCTGGTGAGGGAGCTCAAACTGCTCAGGCTGCACCGGT	158
	1	-----	158
	2	-----	158
	3	-----	158
	4	-----	158
	5	-----t-----	158
	6	-----t-----	158
	7	-----	158
	B31	TC AAGAGGGTGTTC AACAGGAAGGAGCTCAACAGCCAGCACCTGCTACAGCACCTTCTCAAGGC GGAGTTAATT	232
	1	-----a-----	232
	2	-----a---a---a	232
	3	-----a-----a	232
	4	-----a---a---a	232
	5	-----a-----a	232
	6	-----t-----a-----a	232
	7	-----a-----a	232
B	B31	NTPASLSGSQASWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGQAQTAQAAAPVQEGVQQEGAQQPAPATAPSQGGVN	77
	1	-----r--	77
	2	-----r--	77
	3	-----r--	77
	4	-----s-----r--	77
	5	-----r--	77
	6	-----c-----r--	77
	7	-----r--	77

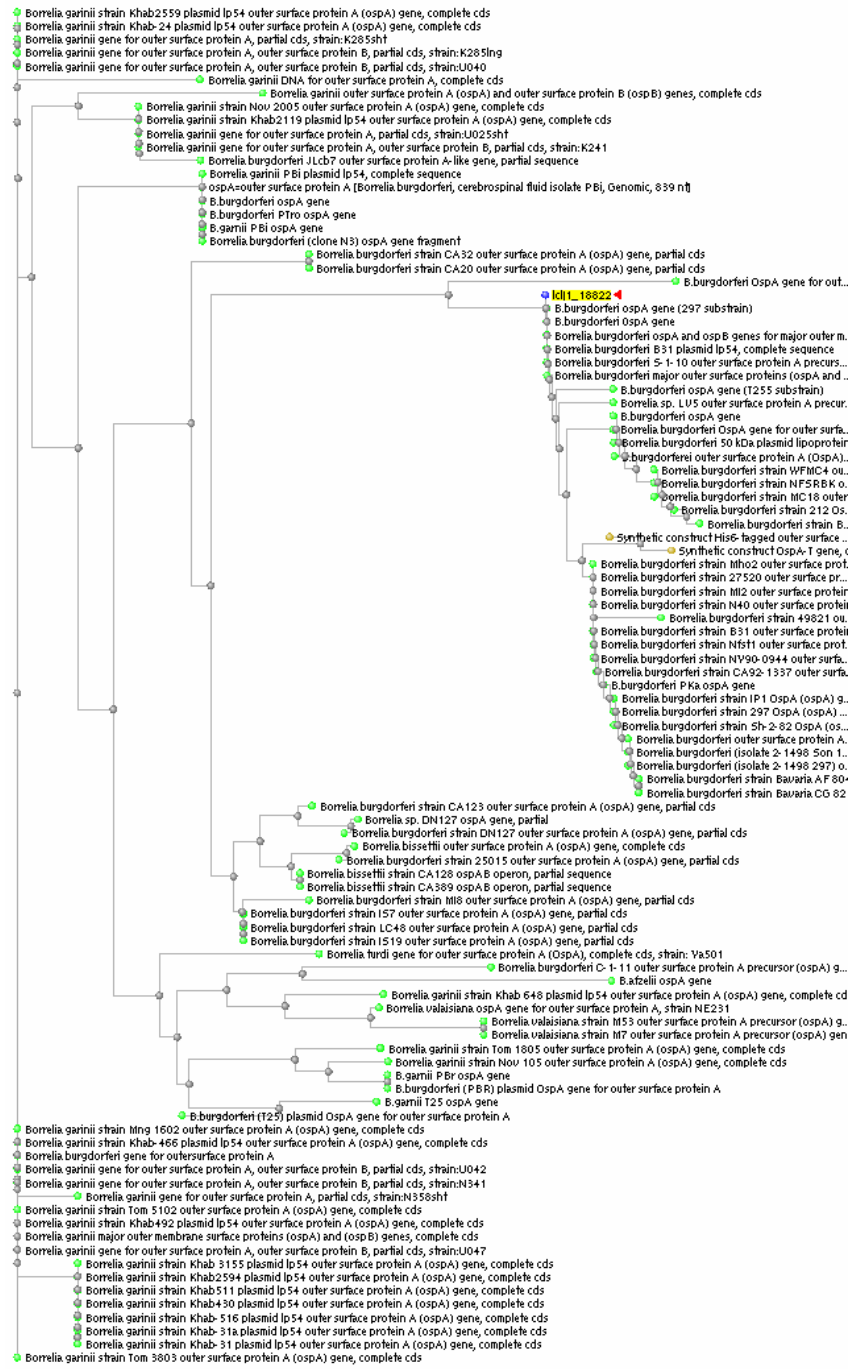
FIGURA No. 17

Secuenciación del gen *ospA* del plásmido Ip54 de *Borrelia burgdorferi* en biopsias de piel y LCR de pacientes con Borreliosis de Lyme adquirida en la República Mexicana

A

OspABbsR	AATAGGTC TAATA TTAGCCTTAATAGCATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGACGAGAAAAACAGCGTTTCAGTAGATTTGCCTGGTGA	90
OspABbs1	1 ----- a -----	90
	2 ----- a -----	90
	3 ----- a -----	90
	ARTGAAAGTTCITGTAAAGCAAGAAAAAACAAGACGGCAA GTACGATCTAATTGCACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTC	180
1	-----c-----	180
2	-----	180
3	-----	180
OspABbsR	GGAACTTCTGATAAAAACAATGGATCIGGAGTACITGAAGGCGTAAAAGCTGACAAAAGTAAAGTAAATTAAACAATTCIGTA	236
OspABbs1	1 -----	236
	2 -----	236
	3 -----	236

FIGURA 18



Dendrograma que muestra la localización de una de las secuencias del gene ospA del plásmido IP54 de *B. burgdorferi* de un paciente mexicano.