

UNIVERSIDAD DE SONORA  
UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS, QUÍMICO Y AGROPECUARIAS



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

*“Detección De Enfermedad De Lyme Mediante  
Reacciones Inmunológicas (ELISA) En Pacientes Con  
Síndrome Febril Inespecífico En El Sur Del Estado De  
Sonora”*

**TESIS PRÁCTICA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

**PRESENTA**

**Marcos Pedro Félix Gil**

NAVOJOA, SONORA

JUNIO DE 2016

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## APROBACION

Los miembros del jurado asignado para revisar la Tesis Profesional de **Marcos Pedro Félix Gil**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como

requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

---

**Dra. Norma Patricia Adán Bante**  
**Director**

---

**Dr. Danilo Manuel González Román**  
**Secretario**

---

**M.C. Ramona Icedo García**  
**Vocal**

## DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permite y agradece las citas breves del material contenido en este trabajo de Tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se dé crédito correspondiente al autor

y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación por escrito del manuscrito en cuestión del Director de Tesis.

---

**M. C. Ramona Icedo García**

**Jefe de Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias**

## AGRADECIMIENTOS:

*A mi institución educativa:*

*“Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur”, por ser el pilar fundamental de mi*

*formación profesional, por darme la oportunidad y facilidades para prepararme en*

*esta carrera que hoy concluyo.*

*A mis maestros:*

*Por compartir sus conocimientos y experiencias, mismos que servirán de herramientas con las cuales emprenderé mi camino como profesionalista.*

*... Y a todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron a que este momento de culminar llegara, a todos aquellos que me alentaron e hicieron que cada día fuera más llevadero.*

*A Dios y a todos ellos, Gracias.*

## DEDICATORIA

*A mi familia:*

*Por darme su apoyo incondicional, especialmente a mi madre, Dora Evelia Gil Moroyoqui.*

*A mis maestros:*

*Que han sido un pilar fundamental en mi formación profesional.*

# CONTENIDO

	Pág.
APROBACION .....	I
DECLARACION INSTITUCIONAL.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
<b>CONTENIDO</b> .....	V
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
INTRODUCCION.....	XI
OBJETIVOS.....	XII
General.....	XIII
Específico.....	XIII
HIPOTESIS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
CAPITULO I. FAMILIA <i>Spilochetae</i> .....	1
1.1 Características Morfológicas.....	1
1.2 Clasificación Taxonómica.....	4
1.3 Patogenia.....	6
1.4 Virulencia.....	6
1.5 Manifestaciones Clínicas.....	7
1.5.1 Fiebre Recurrente.....	7
1.5.2 Enfermedad de Lyme.....	7
1.6. Diagnóstico de Laboratorio.....	7
1.6.1 Fiebre Recurrente.....	7
1.6.2 Enfermedad de Lyme.....	8
1.7 Prevención.....	8
1.8 Tratamiento.....	9
CAPITULO 2. <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	10
2.1 Antecedentes.....	10
2.2 Morfología Microbiológica y Molecular.....	10

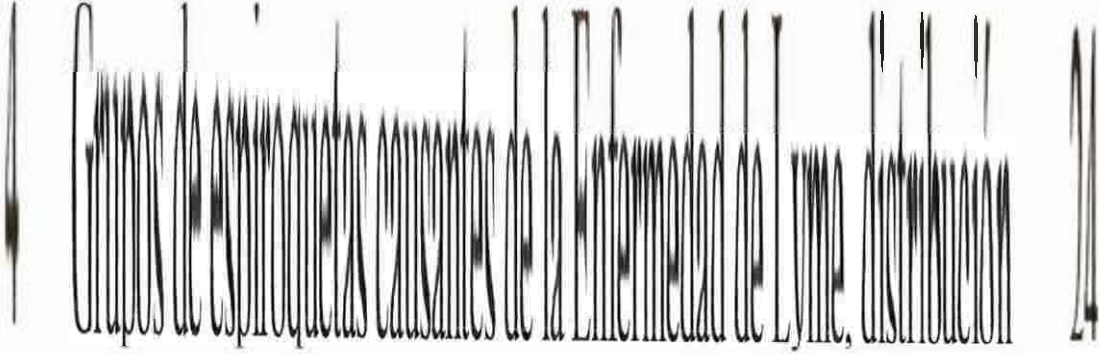
2.5 Inmunidad Frente a <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	16
2.6 Epidemiología.....	18
2.7 Transmisión.....	19
CAPITULO 3. VECTOR.....	21
3.1 Antecedentes.....	21
3.2 Características Generales.....	21
3.3 Taxonomía.....	23
3.4 Características Morfológicas.....	26
3.5 Ciclo Biológico.....	28
3.6 Patogenia.....	30
3.7 Epidemiología.....	30
CAPITULO 4. ENFERMEDAD DE LYME.....	31
4.1 Antecedentes.....	31
4.2 Manifestaciones Clínicas.....	31
4.2.1 Estadio I: Infección Temprana Localizada.....	32
4.2.2 Estadio II: Infección Temprana Diseminada.....	34
4.2.3 Estadio III: Infección Tardía.....	34
4.2.4 Enfermedad Post-Lyme.....	36
4.3 Infección Congénita.....	36
4.4 Coinfección.....	38
4.5 Diagnóstico.....	38
4.5.1 Diagnóstico Diferencial.....	40
4.6 Tratamiento para la Enfermedad de Lyme.....	41
4.7 Prevención.....	42
CAPITULO 5. DIAGNOSTICO MEDICO.....	46
5.1 Síndrome Febril Inespecífico.....	46
5.2 Exámenes de Laboratorio.....	47
5.2.1 Cultivo.....	48
5.2.2 Examen de Sangre Periférica.....	48
5.2.3 Examen de LCR.....	49
5.2.4 Histología.....	49



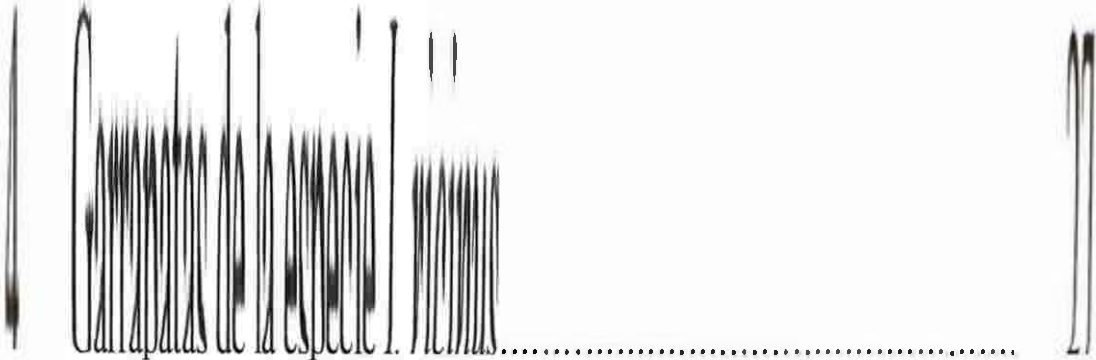
5.2.5.2 Linfocitoma borrelial (LB).....	50
5.2.5.3 Acrodermatitis crónica atrófica (ACA).....	51
5.2.6 Métodos Moleculares.....	51
5.2.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	51
5.2.7 Serología.....	53
5.2.7.1 Inmunofluorescencia.....	53
5.2.7.1.1. Tipos de Inmunofluorescencia.....	54
5.2.7.2 Western Blot.....	54
5.2.7.3. ELISA.....	56
5.2.7.3.1. Tipos de ensayos ELISA.....	57
CAPITULO 6. MATERIAL Y METODOS.....	59
6.1 Población de Estudio y Tamaño de Muestra.....	59
6.2 Criterios de Inclusión.....	59
6.3 Criterios de Exclusión.....	59
6.4 Diagnóstico de Síndrome Febril Inespecífico.....	59
6.5 Toma de Muestra y Transporte.....	60
6.6 Detección de Anticuerpos Contra <i>Borrelia burgdorferi s.l.</i> .....	60
6.7 Preparación de Muestra y Reactivos.....	60
6.8 Procedimiento General.....	61
6.9 Proceso de Lavado Automatizado.....	62
6.10 Pasos de Incubación.....	62
6.11 Interpretación de los Resultados.....	65
6.12 Control de Calidad.....	67
CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	68
7.1 Características Sintomatológicas en los Pacientes Analizados.....	70
7.2 Detección de IgM Contra <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	70
7.3 Detección de IgG Contra <i>Borrelea burgdorferi</i> .....	72
CAPITULO 8. CONCLUSION.....	74
GLOSARIO.....	75
REFERENCIAS.....	78
A NEXOS.....	83
Insertos ELISA para la detección de IgM.....	83
Insertos ELISA para la detección de IgG.....	83

Formato de registro médico.....	98
Formato de sintomatología.....	99

## LISTA DE TABLAS

No.	Tabla	Pág.
1	Géneros de espiroquetas y sus características.....	3
2	Taxonomía <i>Borrelia spp.</i> .....	5
3	Complejo <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> y su distribución geográfica.....	14
		
	geográfica, hospedador animal y vectores.....	
5	Clasificación taxonómica de la familia <i>Ixodidae</i> .....	25
6	Manifestaciones clínicas más frecuentes por especie y distribución geográfica.....	35
7	Manifestaciones dermatológicas de la EL y diferencias entre la manifestadas en Norteamérica y Europa.....	37
8	Tratamiento contra <i>Borrelia burgdorferi s.l.</i> en adultos.....	44
9	Tratamiento contra <i>Borrelia burgdorferi s.l.</i> en niños.....	45
10	Interpretaciones resultados DO ELISA.....	65
11	Características sociodemográficas de la población estudiada.....	69
12	Resultados espectrofotométricos para la detección de IgM.....	71
13	Resultados de seropositividad a IgM en base a la procedencia de la muestra.	71
14	Resultados espectrofotométricos para la detección de IgG.....	73
15	Resultados de seropositividad de IgG en base a la procedencia de la muestra.....	73

## LISTA DE FIGURAS

No.	Figura	Pág.
1	Características morfológicas de movilidad de las espiroquetas.....	2
2	Morfología <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	11
3	Clasificación taxonómica de las garrapatas.....	23
		
5	Ciclo biológico del vector <i>I ricinus</i> .....	29
6	Eritema migratorio (EM).....	33
7	Diagrama de Flujo General.....	64

## INTRODUCCION

El síndrome febril inespecífico se define clásicamente como la elevación de la temperatura corporal a 38°C con duración de más de 3 semanas, sin diagnóstico etiológico. Según la literatura médica se agrupan en 3 categorías: enfermedades infecciosas, neoplásicas y autoinmunes. La importancia etiológica de cada una de las

categorías depende básicamente de la época, lugar geográfico y de los métodos de selección e incluso de los pacientes catalogados en cada estudio. Dentro de estas causas infecciosas se encuentra la Borreliosis o Enfermedad de Lyme.

La Enfermedad de Lyme es un proceso multisistémico, de distribución mundial, provocado por *Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.)* y transmitida por las garrapatas duras del género Ixodes. En el futuro, nos enfrentamos a un posible aumento en la distribución de casos de la enfermedad de Lyme y, en general, de enfermedades transmitidas por vectores, ya que el calentamiento global propicia el establecimiento de éstos fuera de su ambiente habitual, aunado a la migración humana a causa de la inestabilidad económica del país y al comercio.

En México, el vector se encuentra distribuido en gran parte de la república, se ha reportado la presencia de éste en los estados de Baja California, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo, Veracruz, Nuevo León, México, Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Puebla, Tabasco, Colima, Jalisco, Coahuila, Tamaulipas y Sinaloa. Los primeros casos fueron reportados en Sinaloa y Nuevo León confirmando la presencia de la bacteria *Borrelia burgdorferi* en el 2003 y 2007.

A la Enfermedad de Lyme se la conoce como “el último gran imitador”, por el amplio espectro clínico que puede provocar. Salvo en el caso de eritema migratorio (patognomónico de la enfermedad), el resto de manifestaciones son síndromes febriles inespecíficos. Algunos médicos realizan diagnósticos de la Enfermedad de Lyme con clínica inespecífica, incluso con pruebas microbiológicas negativas de infección frente a *Borrelia burgdorferi*, siendo los análisis serológicos y técnicas de biología molecular, las pruebas confirmatorias de tal patología.

El diagnóstico de un síndrome febril inespecífico, y la detección de *Borrelia burgdorferi*, dependen en gran medida de un interrogatorio preciso, un examen físico detallado y un gran apoyo de medios diagnósticos, desarrollados principalmente en el laboratorio de análisis clínicos. Actualmente existen diferentes métodos de laboratorio que permiten la identificación, ya sea métodos directos o indirectos. Algunos ejemplos de métodos directos serían la microscopía de campo oscuro, técnicas de tinción

inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, y cultivos bacteriológicos, estos métodos se

emplean como pre-diagnósticos, debido a que indican la presencia de la espiroqueta sin diferenciar los géneros de la familia *Spirochetales* (*Leptospira*, *Borrelia*, y *Treponema*). Los métodos indirectos se basan principalmente en la gran sensibilidad y especificidad inmunológica que tienen los anticuerpos, por ello, se han diseñado diferentes métodos para la detección de anticuerpos en infecciones agudas, tales como: Inmunofluorescencia, ELISA y Western Blot.

En el presente estudio se busca establecer una relación del síndrome febril inespecífico y la detección de *Borrelia burgdorferi* causante de la Borreliosis de Lyme, mediante la técnica de ELISA cuantificando los anticuerpos de tipo IgG e IgM en sueros de pacientes del sur del estado de Sonora.

## OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación entre el síndrome febril inespecífico asociado a la Borreliosis de Lyme en el sur del estado de Sonora.

### Objetivos Específicos

Determinar y cuantificar anticuerpos (IgM) contra *Borrelia burgdorferi*, mediante el método de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Determinar y cuantificar anticuerpos (IgG) contra *Borrelia burgdorferi*, mediante el método de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

## **HIPÓTESIS**

La detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en pacientes del sur del estado de Sonora, diagnosticados con síndrome febril inespecífico.



## RESUMEN

La Borreliosis de Lyme es una enfermedad emergente considerada una zoonosis de distribución mundial cuya bacteria causante es *Borrelia burgdorferi*, sus signos y síntomas clínicos son variados, entre ellos, un síndrome febril inespecífico. El objeto de esta investigación es establecer la relación directa entre el síndrome febril inespecífico y

la detección de anticuerpos (IgG e IgM) contra *Borrelia burgdorferi*, causante de la

Enfermedad de Lyme mediante la técnica de ELISA.

Se analizaron los sueros de 94 pacientes provenientes de los centros de salud del sur del estado de Sonora, que después de haber sido valorados clínicamente fueron referidos al Laboratorio de Investigación de Zoonosis y Enfermedades Tropicales por presentar síndrome febril inespecífico sin diagnóstico etiológico. Los resultados por ELISA detectaron una seroprevalencia del 32% IgM y 20% IgG en los municipios de Navojoa, Álamos, Etchojoa y Huatabampo. En conclusión, la Borreliosis de Lyme se encuentra presente en el sur del estado de Sonora, siendo ésto, un resultado de importancia clínica y epidemiológica.

## CAPITULO 1. FAMILIA *Spirochetae*

### 1.1 Características Morfológicas

Las espiroquetas son bacterias Gram negativas, móviles, enrolladas en forma de espiral cerrada. Éstas se encuentran presentes en muchos ambientes acuáticos y animales. Algunas son patógenas para el humano, provocando enfermedades como la Borreliosis

de Lyme, sífilis, leptospirosis y la fiebre recurrente (Romero, 2011).

Las células de las espiroquetas están formadas por un cilindro citoplasmático, que incluyen las regiones envueltas por la pared celular y la membrana citoplasmática. La movilidad se confiere por uno o más flagelos que emergen de ambos polos, a diferencia de los flagelos bacterianos comunes, los flagelos de las espiroquetas se pliegan desde el polo hacia el cilindro protoplasmático y se mantienen localizados en el periplasma de la célula; es por ello que se les denomina endoflagelos. Tanto estos como el cilindro protoplasmático están envueltos por una membrana multicapa flexible denominada vaina externa (Guerrero y Escudero, 2005; Winn y cols., 2009). Los endoflagelos tienen movimiento rotatorio, igual que los flagelos bacterianos típicos. Sin embargo, el cilindro protoplasmático es rígido, mientras la vaina externa es flexible, cuando los dos endoflagelos giran en la misma dirección, el cilindro protoplasmático gira en dirección opuesta generando torsión en la célula. Todo esto hace que las espiroquetas se muevan mediante movimientos de flexión o de látigo, como consecuencia del par de torsión ejercido en ambos extremos del cilindro protoplasmático por el giro de los flagelos, ver Figura 1 (Guerrero y Escudero, 2005; Romero y cols., 2007).

Las espiroquetas se clasifican en ocho géneros, principalmente en base a su hábitat, patogenicidad, filogenia, y características fisiológicas y morfológicas, ver Tabla 1 (Madigan y cols., 2009; Guerrero y Escudero, 2005; Romero y cols., 2007; Romero, 2011).

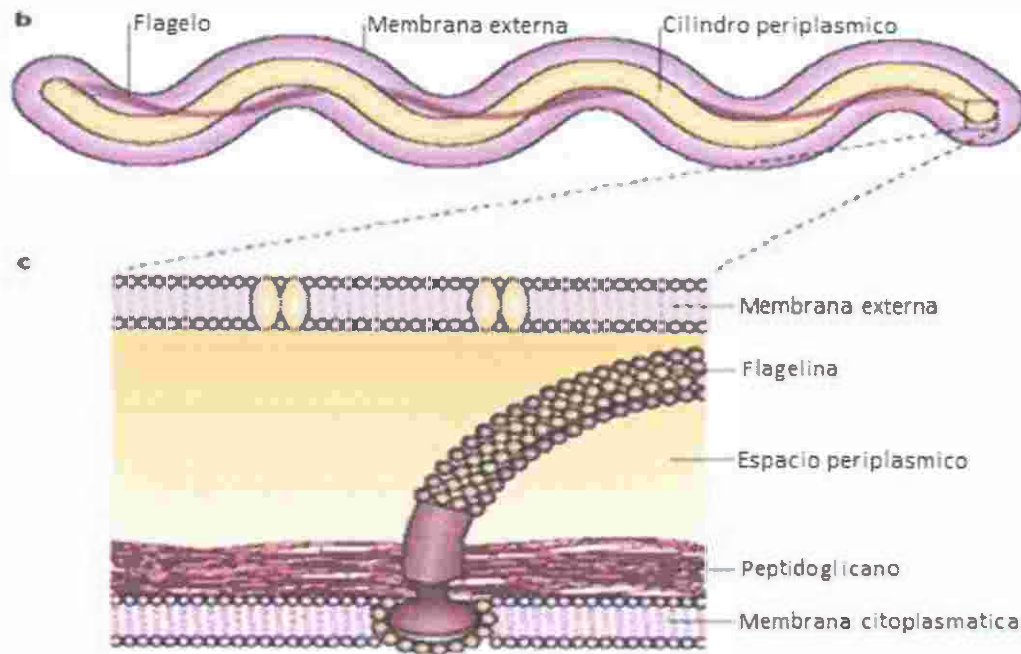


Figura 1. Características morfológicas de movilidad de las espiroquetas (Karami, 2012).

Tabla 1. Géneros de espiroquetas y sus características (Clark y col., 2009).

Género	Dimensión Largo por Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Características	Nº E*	Hábitat	Enfermedad
<i>Cristispira</i>	(30-150) x (0.5-3.0)	3-10 vueltas de espiral; manojo de endoflagelos visibles a través de microscopia de contraste de fase.	>100	Tracto digestivo de moluscos, no ha sido cultivado.	Sin definir
<i>Spirochaeta</i>	(5-250) x (0.2-0.75)	Anaerobios y aerobios facultativos; vueltas de espiral floja o apretada.	2-40	Acuáticas, de vida libre, agua dulce y salada.	Sin definir
<i>Treponema</i>	(5-15) x (0.1-0.4)	Microaerófilos o anaerobios, vueltas de espiral helicoidales o aplanadas con amplitudes de 0.5 $\mu\text{m}$ .	2-32	Comensal o parasítica en humanos y otros animales.	Sifilis, Disentería porcina, Pinta
<i>Borrelia</i>	(8-30) x (0.2-0.5)	Microaerófilo; 5-7 vueltas de aproximadamente 1 $\mu\text{m}$ de amplitud.	7-20	Humanos y otros mamíferos, artrópodos.	Fiebres recurrentes, Enfermedad de Lyme, Borreliosis bovina y ovina.
<i>Leptospira</i>	(6-20) x (0.1)	Aerobios, fuertemente enrollados y curvados con extremos en ganchos; requiere de ácidos grasos de cadena larga.	2	Vida libre o parásitos en humanos y otros mamíferos.	Leptospirosis
<i>Leptonema</i>	(6-20) x (0.1)	Aerobios; no requiere ácidos grasos de cadena larga.	2	Vida libre.	Sin definir
<i>Brachyspira</i>	(7-10) x (0.35-0.45)	Anaerobios.	8-28	Intestino de animales de sangre caliente.	Diarrea en pollos y cerdos.
<i>Brevinema</i>	(4-5) x (0.2-0.3)	Microaerófilicos, por análisis de rRNA 16s determina una bifurcación profunda en el linaje de las espiroquetas.	2	Sangre y otros tejidos de ratones y musarañas.	Infección para ratones de laboratorio.

\*Número de endoflagelos.

Las especies del género *Borrelia* son microaerófilas, móviles y se transmiten por medio de un vector artrópodo, característica fundamental que las distingue de las otras espiroquetas como *Treponema* y *Leptospira*, por lo que se les considera una zoonosis de distribución mundial y una de las enfermedades emergentes más importantes. En la actualidad se han descrito casi treinta especies entre patógenos humanos y animales (Guerrero y Escudero, 2005; García y cols., 2014; Romero y cols., 2007).

En relación a las características metabólicas de *Borrelia spp*, comúnmente son microaerófilas, sin embargo, se han reportado que pueden crecer en anaerobiosis. Su temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre los 33 y 37°C, siendo el tiempo de duplicación de 24 horas (rango entre 12 y 48 horas). Posee superóxidodismutasa y ausencia de peroxidasa y catalasa. Utiliza la glucosa como principal fuente de energía, siendo su principal metabolito el ácido láctico. Requiere una fuente orgánica de hierro, N-acetil-glucosamina (NAG) y una amplia variedad de azúcares y sales (Aránzazu y Oteo, 2014; Navarro, 2005; Romero, 2011).

El cultivo se realiza de modo preferente en medios líquidos complejos muy enriquecidos con aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, N-acetil-glucosamina, albúmina sérica y suero de conejo, siendo el más utilizado el medio de Barbour Stoenner-Kelly modificado (Madigan y cols., 2009; Guerrero y Escudero, 2005; Romero y cols., 2007).

## **1.2 Clasificación Taxonómica**

La clasificación taxonómica de *Borrelia* fue establecida según criterios genéticos a través del análisis de 16s ARNr, hibridación recíproca DNA-DNA, estudio de proteínas de superficie y el análisis mediante anticuerpos monoclonales la tabla 2 muestra la clasificación taxonómica de este género (Aránzazu y Oteo, 2014; Navarro, 2005).

Tabla 2. Taxonomía *Borrelia spp.* (Navarro, 2003).

<b>Reino</b>	<b>Procaryotae</b>
División	<i>Gracilicutes</i>
Clase	<i>Scotobacteria</i>
Orden	<i>Spirochetales</i>
Familia	<i>Spirochetae</i>
Género	<i>Borrelia</i>

### 1.3 Patogenia

Las *Borrelia* son responsables de dos enfermedades, fiebre recurrente y la Enfermedad de Lyme. La fiebre recurrente se presenta en forma endémica y epidémica: la primera se denomina así, por las condiciones del hábitat natural de las garrapatas blandas de la familia *Argasidae* y la segunda por el mecanismo de transmisión de humano a humano, o forma epidémica que es transmitida por el piojo del cuerpo (*Pediculus humanus humanus*). La Enfermedad de Lyme o Borreliosis de Lyme, de la cual sólo se conoce su forma endémica y se transmite a través de garrapatas duras de la familia *Ixodidae* (Guerrero y Escudero, 2005; Madigan y cols., 2009; Sotelo y Valencia, 2012).

### 1.4 Virulencia

Se desconoce la producción de exotoxinas, aunque el lipopolisacárido de su membrana externa es un poderoso inductor de fiebre. Su principal factor de virulencia es su mutabilidad antigénica, ya que estos microorganismos expresan diferentes proteínas estructurales en el transcurso de la infección, como un medio de adaptación al sistema inmune del hospedero, ya sea su hospedero artrópodo o vertebrado. Los anticuerpos producidos actúan inicialmente como un factor selectivo, que sólo permite la supervivencia de variantes antigénicas distintas. La evolución recidivante de la enfermedad al parecer se debe a la multiplicación de estas variantes antigénicas contra las cuales el huésped debe entonces desarrollar nuevos anticuerpos (Navarro, 2005; Madigan y cols., 2009; Romero y cols., 2007).

Para la transmisión de espiroquetas, requiere que el vector se fije por lo menos 48 horas durante las cuales los microorganismos se multiplican y cruzan el epitelio intestinal hacia la hemolinfa, se diseminan hacia las glándulas salivales e infectan al hospedero a través de la saliva de la garrapata (Aránzazu y Oteo, 2014; Guerrero y Escudero, 2005; Romero, 2011).

## **1.5 Manifestaciones Clínicas**

### **1.5.1 Fiebre Recurrente**

El agente causal es *Borrelia recurrentis* y se caracteriza por fiebre alta y dolor muscular generalizado que dura entre 3-7 días, seguida de un período de convalecencia de entre 7-9 días. En ausencia de tratamiento la fiebre se repite entre 2 y 3 ciclos más y causa la muerte por hemorragia y fallo multiorgánico de hasta 40% de los individuos infectados (Sotelo y Valencia, 2012; Guerrero y Escudero, 2005; Madigan y cols., 2009; Romero y cols., 2007).

### **1.5.2 Enfermedad de Lyme**

El agente causal es *Borrelia burgdorferi* se transmite a través de un insecto vector perteneciente a la familia *Ixodidae*. Se disemina mediante vía hematológica, desarrollando una infección sistémica que lleva a la aparición de síntomas agudos propios de la enfermedad como dolor de cabeza, espalda, escalofríos y cansancio.

En el 75 % de los casos se observa en el sitio de la picadura de la garrapata una gran erupción llamada eritema migratorio (EM). Sin tratamiento ésta puede pasar a una fase crónica, semanas o meses después de la mordedura de la garrapata. En esta etapa el 40-60% muestran complicaciones articulares, el 15-20% problemas neuronales y el 8% cardíacas (Félix, 2010; Aránzazu y Oteo, 2014; Madigan y cols., 2009; Maroto y Gutiérrez, 2009).

## **1.6. Diagnóstico de Laboratorio**

### **1.6.1 Fiebre Recurrente**

El análisis directo de espiroquetas en sangre periférica se obtiene con un 70% de probabilidad de observación positiva en los picos febriles de la enfermedad. Los



microorganismos se pueden detectar en preparaciones frescas de sangre bajo microscopio de campo oscuro o bien con tinciones de Wright o Giemsa, naranja de acridina o inmunofluorescencia. Por otra parte la serología y las técnicas de biología molecular se muestran como una opción rápida y fiable en la detección de *Borrelia ssp.* (Guerrero y Escudero, 2005; Romero y cols., 2007; Sotelo y Valencia, 2012)

### **1.6.2 Enfermedad de Lyme**

La respuesta inmunológica mediante anticuerpos ocurre de 4 a 6 semanas después de la infección que puede detectarse por una prueba de enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA) o por inmunofluorescencia. En la detección de *Borrelia burgdorferi* en tejido o muestras del hospedador se han implementado técnicas de biología molecular, un ejemplo de éstas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (Boria, 2012; Aránzazu y Oteo, 2014; Romero, 2011; Madigan y cols., 2009).

## **1.7 Prevención**

Entre las medidas preventivas de las Borreliosis se encuentra la educación a la población respecto al modo de transmisión de estas enfermedades. La erradicación de la población de garrapatas de las áreas geográficas es imposible, dada la gran variedad de hospedadores.

La prevención se centra en evitar, en la medida de lo posible, las zonas infestadas por garrapatas, el uso de repelentes aplicados a la ropa o piel y mediante el uso de ropa adecuada, además del examen corporal para eliminar las garrapatas adheridas después de permanecer en una zona endémica. La forma más adecuada para eliminar la garrapata es realizar una tracción con pinzas de forma perpendicular a la piel y de un modo suave y constante para evitar que el hipostoma de la garrapata quede introducido en la piel (Aránzazu y Oteo, 2014; Romero, 2011).

## 1.8 Tratamiento

En el tratamiento de las fiebres recurrentes, por efectividad es la tetraciclina, pero la penicilina, el cloranfenicol o los macrólidos son también efectivos. Las tetraciclinas en una sola dosis (0.5 g) son el tratamiento de elección. En los niños menores de 8 años y mujeres embarazadas se utiliza la eritromicina en dosis única (Navarro, 2005; Madigan y cols., 2009; Fauci y cols., 2009).

El tratamiento de la Enfermedad de Lyme en su etapa aguda se puede llevar a cabo con doxiciclina, amoxicilina, o cefuroxima, usualmente en un período de 14 días. Para pacientes con síntomas neurológicos o cardíacos por infección de *B. burgdorferi* se suele utilizar ceftriaxona parenteralmente ya que éste cruza la barrera hematoencefálica (Fauci y cols., 2009; Romero, 2011).

## **CAPITULO 2. *Borrelia burgdorferi***

### **2.1 Antecedentes**

En 1982 Willy Burgdorfer y Allan Barbour describieron y cultivaron un nuevo agente biológico, a partir de la sangre obtenida del dueto digestivo de una garrapata del género *Ixodes*, al que se designó como *Borrelia burgdorferi* en 1984, en honor a su descubridor. Ackermann Asbrink y Preac Mursic en Europa lograron aislarla en pacientes con Eritema Migratorio (EM) y Síndrome de Bannwarth, el cual se caracterizaba por problemas neurológicos acompañados de parálisis facial. Así se demostró el carácter sistémico e infeccioso de la nueva enfermedad conocida actualmente como enfermedad de Lyme o Borreliosis de Lyme (Orestes y cols., 2011; Madigan y cols., 2009).

### **2.2 Morfología Microbiológica y Molecular**

*Borrelia burgdorferi* es una bacteria gran negativa, que en contraste a éstas, no posee lipopolisacáridos y sí abundantes lipoproteínas de superficie, es de forma helicoidal o espiral, de necesidades microaerofílicas y que mide  $0.33 \times 10\text{-}20 \mu\text{m}$  de diámetro, en la Figura 2 se muestra la morfología de *B. burgdorferi* (Karami, 2012; García y cols., 2014).

Su composición genética fue publicada por primera vez en 1997 por el Institute of Genome Research (TIGR) como *B. burgdorferi* cepa B31 por la asociación de Fraser et al. y fue consumado por Casjens y cols., en el año 2000. Es conformado por un cromosoma ADN lineal de 1 kb, 22 plásmidos y el genóforo bacteriano que contiene 853 genes (Karami, 2012; García y cols., 2014; Aránzazu y Oteo, 2014; Romero, 2011).

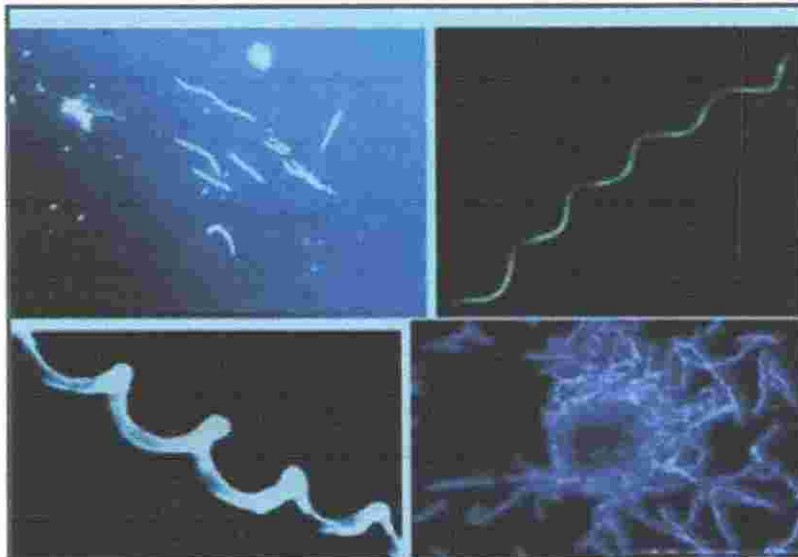


Figura 2. Morfología *Borrelia burgdorferi* (Orestes y col., 2011).

El cromosoma de *Borrelia burgdorferi* es relativamente pequeño, contiene 1, 521,419 pares de bases y no posee genes para reacciones de biosíntesis celular, como aminoácidos, ácidos grasos o enzimas que actúen como cofactores, a esto se le atribuye que *Borrelia burgdorferi* necesite de un ambiente complejo que contenga los medios suficientes para su supervivencia (García y cols., 2014; Karami, 2012). Las lipoproteínas conocidas, incluyen las proteínas de superficie exterior (outer-surface protein) Osp A hasta OspF. La Osp A y Osp B se codifican por el mismo plásmido lineal de 50 kb y comparten una homología de secuencia de 56 %. Estas proteínas se expresan contiguo con la lipoproteína 6.6 (Lp6.6), principalmente en el ciclo enzoótico en el artrópodo.

Durante la infección temprana, se han identificado una cantidad de proteínas expresadas en forma diferencial incluida las proteínas A y B ligados de decorina (DmpA y DmpB). En esta fase, se ha identificado una variación antigénica importante en la lipoproteína variable mayor protein-like sequence, expressed (VlsE) (Lin y cols., 2014; romero, 2011). Otras proteínas adicionales de las espiroquetas incluyen una proteína de membrana de *Borrelia* de 39 kD (BmpA), el antígeno flagelar de 41 kD, las proteínas de golpes de calor de 60 y 73 kD, una proteína integral de membrana exterior de 66 kD que puede funcionar como porina y un antígeno de 93 kD que es parte del cilindro protoplasmático (Margos y cols., 2011; Fera y cols., 2014; Madigan y cols., 2009).

### 2.3 Clasificación Taxonómica

El término general utilizado es *Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.)* para referirse al sentido amplio, ya que ésta se compone de múltiples genoespecies. La Tabla 3 muestra las 15 especies que forman parte del complejo *B. burgdorferi s.l.* a nivel mundial (Karimi, 2012; Ocwieja y cols., 2014; Margos y cols., 2011; García y cols., 2014). En el continente europeo se conocen al menos tres especies de este complejo, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* y *B. afzelii*, en contraste con la única especie que ha demostrado ser patógena en EE.UU., *B. burgdorferi sensu stricto*. En México, los estudios

moleculares demuestran una distribución de genoespecies cercana a la reportada en Europa (Félix, 2010; Aránzazu y Oteo, 2014; Romero, 2011; Margos y cols., 2011).

Tabla 3. Complejo *Borrelia burgdorferi* s.l. y su distribución geográfica. (García, 2014).

<b>Especie</b>	<b>Distribución geográfica</b>
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	EE.U.U, Europa Occidental
<i>B. garinii</i>	Europa , partes de Asia
<i>B. afzeli</i>	Europa , partes de Asia
<i>B.japonica</i>	Japón
<i>B. andersonii</i>	Norteamérica
<i>B. lanukii</i>	Japón
<i>B. tutdi</i>	Japón
<i>B. valaisiana</i>	Europa , partes de Asia
<i>B. lusitaniae</i>	Europa central y Mediterráneos
<i>B. sinica</i>	China
<i>B. bissettii</i>	EE.U.U
<i>B. californiensis</i>	EE.U.U (Oeste)
<i>B. carolinensis</i>	EE.U.U (Sureste)
<i>B. spielmanii</i>	Europa
<i>B. yangtze</i>	China
<i>B. americana</i>	Norteamérica
<i>B. bavariensis</i>	Europa
<i>B. kurtenbachii</i>	Norteamérica

## 2.4 Determinantes Patogénicos

No se han definido determinantes de virulencia por lo cual se relaciona el papel patogénico de *Borrelia burgdorferi s.l.* con la elevada capacidad de modificar su morfología y estructura antigénica, ya que debe adaptarse a ambientes muy diferentes, debe ser capaz de sobrevivir en el intestino de la garrapata, pasar a través de las glándulas salivales de ésta y penetrar en el torrente sanguíneo del huésped, evadiendo la respuesta inmunológica para diseminarse al tejido blanco, otras de las funciones de las proteínas de superficie, es que permiten a la espiroqueta unirse a proteínas, integrinas, glucosaminoglicanos o glucoproteínas del mamífero para facilitar su invasión (Aránzazu y Oteo, 2014; García y cols., 2014; Margos y cols., 2011).

Para conservar su complejo ciclo enzoótico *Borrelia burgdorferi s.l.* debe adecuarse a dos ambientes muy diferentes: la garrapata y el huésped mamífero, por ejemplo, en el intestino medio de la garrapata, la espiroqueta expresa OspA. Durante la alimentación de la garrapata, a medida que la espiroqueta migra desde el intestino medio a la glándula salival, el nivel de la OspC, codificada por un plásmido circular de 26 kb, se eleva a un nuevo punto de equilibrio, ésta se une a una proteína de la glándula salival del artrópodo (Salp15), necesaria para infectar al mamífero hospedador. Más tarde, durante la infección se expresan otras proteínas esenciales para la patogenia de la enfermedad (Margos y cols., 2011; Fera y cols., 2014).

Después que la garrapata inocula a *Borrelia burgdorferi s.l.* y luego de un periodo de incubación de 3 a 32 días, la espiroqueta suele reproducirse primero localmente en la piel del sitio de la mordedura, en término de días o semanas después, ésta se disemina. En la etapa temprana de la enfermedad, la espiroqueta ha sido recuperada de lesiones de eritema migratorio, sangre, músculo, hueso, bazo, liquido cefalorraquídeo y cerebro mostrando distintos tropismos según sea la genoespecie, por ejemplo *Borrelia burgdorferi sensu stricto* muestra una inclinación por las articulaciones ocasionando artritis de Lyme, mientras que *Borrelia afzelii* y *garinii* se caracterizan por problemas



dermatológicos y neurológicos principalmente (Feria y cols., 2014; Petnicki y Kern, 2014).

La dispersión de la bacteria dentro del huésped, posiblemente es facilitada por la habilidad de la espiroqueta de ligar a su superficie el plasminógeno humano y el activador del plasminógeno tipo urocinasa. La plasmina, que es la forma activada de plasminógeno, es una potente proteasa que puede promover la invasión tisular de *Borrelia burgdorferi s.l.*

*Borrelia burgdorferi s.l.* puede adherirse a muchos tipos diferentes de células de mamíferos por dos mecanismos identificados actualmente, el primero consiste en la interacción con varios receptores de la familia de las integrinas, incluido el receptor de integrinas específico de las plaquetas y los receptores de vitronectina y fibronectina (Karami, 2012; Petnicki y Kern, 2014; Margos y cols., 2011).

La segunda vía para la adhesión celular es medida por los azúcares de la célula huésped, las proteínas Osp A Y Osp B expresadas por la espiroqueta pueden ligarse a decorinas, un glucosaminoglucano que está en la fibras de colágeno; esta unión pudiera explicar por qué el microorganismo suele estar alineado con las fibrillas de la matriz extracelular del corazón, sistema nervioso y articulaciones. Ésta atraviesa la mono capa celular a través de las uniones intracelulares, aunque puede penetrar a través del citoplasma celular. En conclusión, es capaz de utilizarlos sistemas enzimáticos del hospedador para su supervivencia, lo que le permite establecerse en los tendones y en el cerebro donde las células de nuestro sistema inmune tienen dificultada la entrada (Golovchenko y cols., 2014; Lin y cols. 2014; Romero, 2011).

## **2.5 Inmunidad Frente a *Borrelia burgdorferi s.l.***

Se conoce la capacidad de activar o inhibir moléculas asociadas a la respuesta mediada por anticuerpos en ausencia de mecanismos líticos del complemento. Esto lo logra a

través de la unión a ciertas proteínas reguladoras del sistema de complemento (FHL-1/reconectina o factor H). Habichty cols., (1985) y Defosse y cols., (1992) confirmaron in vitro la potente inducción de factor de necrosis tumoral (TNF), INF-alfa y de la interleucina (IL-1) por las células mononucleares en sangre periférica (Petnicki y Kern, 2014; García y cols., 2014).

Para controlar y erradicar a *Borrelia burgdorferi s.l.*, el hospedador activa sus respuestas innata y adaptativa, con la cual la espiroqueta es destruida por macrófagos y anticuerpos. Las quimiocinas producidas por constituyentes de la piel, permiten el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos; estos últimos liberan citocinas pro inflamatoria muy potentes.

La respuesta de anticuerpos se desarrolla lentamente, la respuesta de IgM alcanza un pico entre la tercera y la sexta semana de la infección y a menudo, se asocia con la activación policlonal de células B, lo que incluye niveles séricos elevados de IgM total, complejos inmunes circulantes y crioglobulinas. La respuesta de IgG específica se desarrolla gradualmente en meses a una serie creciente de polipéptidos espiroquetarios y antígenos no proteicos. A pesar de la respuesta inmune *Borrelia burgdorferi s.l.* puede sobrevivir durante años en los pacientes no tratados, en ciertas localizaciones dentro de las articulaciones, sistema nervioso o la piel (Aránzazu y Oteo, 2014; Madigan y cols., 2009).

Algunos de los mecanismos importantes de evasión inmunitaria son la capacidad de la espiroqueta para disminuir la expresión de antígenos proteicos expuestos en la superficie y en el caso de la lipoproteína VlsE, la capacidad de cambiar la secuencia de aminoácidos en la proteína. A esta característica se atribuye la supervivencia de la misma. (Petnicki y Kern, 2014; Margos y cols., 2011).

## 2.6 Epidemiología

En Europa la infección es endémica. La prevalencia en trabajadores forestales en Alemania, Holanda y Suecia es del 8-27%, en la población general es del 4%.

En EE.UU. la mayoría de los casos de enfermedad de Lyme se reportan en los estados del noreste (82%). Según el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), durante los años 2003-2005 se informaron un total de 64,382 casos de enfermedad de Lyme en 46 estados de EE.UU. Entre 2008 y 2009 hubo un incremento del 3.6% en el número de casos confirmados y del 35.6% en el número de casos probables. Además, la enfermedad de Lyme fue la sexta enfermedad diagnosticada nacionalmente, más común en EE.UU.

En México se han reportado casos en Sinaloa en el que se diagnosticó el eritema crónico migratorio y en Nuevo León, Salinas y Welsh, encontraron un paciente con lesiones crónicas cuya biopsia fue positiva por PCR para *Borrelia spp.* Gordillo y colaboradores reportaron 0.3% de positividad en prueba al azar en sueros congelados provenientes de donadores de todo el país. El mayor número de casos positivos fue de individuos del Noreste y el Centro de México; en el año 2003 se reportó el estudio de un banco de sueros de la Ciudad de México y el Noreste de la República mexicana, en donde se encontró 12.6% de casos positivos por Elisa, de los cuales 3.43% se confirmaron por Western blot en el Distrito Federal y 6.2% en el Noreste del país, incluidos Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.

En un estudio realizado en Houston, Texas, área considerada no endémica, se encontró un número inesperadamente elevado de seropositividad y se planteó la posibilidad de la presencia de la enfermedad no diagnosticada (Aránzazu y Oteo, 2014; Romero, 2011; Gordillo y Solórzano, 2010; Feria y cols., 2014; Montiel y cols., 2007; Skinner-Taylor C. y cols 2007).

## 2.7 Transmisión

*Borrelia burgdorferi s.l.* infecta a los humanos a través de la mordedura de las garrapatas del género *Ixodes*. La presencia de garrapatas *Ixodes* y *Amblyomma* infectadas en el noreste de México sugiere que ésta es una zona endémica de la Enfermedad de Lyme y que representa un riesgo de transmisión de *Borrelia burgdorferi s.l.* al humano. *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* prevalecen en el continente norteamericano mientras que *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ricinus* se encuentran principalmente en Europa, Asia y África (Félix, 2010; Feria y cols., 2014; Gern y Herrmann, 2015; Buczek, 2014).

Para transmitir la infección a los humanos se necesita un reservorio animal, principalmente mamíferos pequeños y aves donde *Borrelia burgdorferi s.l.* permanezca viable durante largos periodos. Los venados cola blanca son portadores de las formas adultas de las garrapatas y a partir de éstos se infestan otros mamíferos menores, como ratones y liebres (Gern y Herrmann, 2015; Feria y cols., 2014).

Las garrapatas *Ixodes* completan su ciclo de vida en un periodo de dos años y durante este tiempo pasan por cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, ninfa y adulto. Una vez que las larvas se alimentan de un huésped infectado, éstas pueden adquirir la espiroqueta, mantener la infección a lo largo de toda la vida y transmitirla a hospederos futuros. El estadio de ninfa es el más peligroso para los humanos por dos razones: en primer lugar las ninfas son diminutas (miden aproximadamente 1 mm de diámetro), por lo que son difíciles de detectar y en segundo lugar son más activas durante los meses de verano, coincidiendo con el pico de actividades al aire libre. Por el contrario, las garrapatas adultas, aunque tienen mayor riesgo de estar infectadas son más grandes, y por lo tanto, más fácilmente detectables (Félix, 2010; García y cols., 2014).

En el futuro, es posible un aumento en la distribución de casos de Enfermedad de Lyme y en general de otras enfermedades transmitidas por garrapatas. El calentamiento global propicia el establecimiento de poblaciones de garrapatas fuera de su ambiente habitual,

el cambio de rutas migratorias de las aves que se conoce que vehiculan garrapatas infectadas por *Borrelia burgdorferi* s.l. y podría cambiar la distribución de los artrópodos o establecerse nuevas genoespecies de *Borrelia burgdorferi* s.l. en regiones en las que no existían (Navarro, 2005; Alekseev y cols., 2012; Rodríguez, 2013).

## CAPITULO 3. VECTOR

Un vector es todo artrópodo hematófago que facilita la transmisión de un patógeno de forma biológica. Dentro de los artrópodos vectores los ácaros constituyen el segundo grupo en importancia después de los dípteros. La distribución cosmopolita de las garrapatas, así como su ciclo biológico, hacen que sean consideradas como vectores potenciales de patógenos (Mádigan y cols., 2009; Rodríguez, 2013; Margos y cols., 2011).

### 3.1 Antecedentes

En 1981, la espiroqueta actualmente conocida como agente biológico de la enfermedad de Lyme se aisló del intestino medio de garrapatas *Ixodes dammini*, recogidas en la Isla de Shelter, Nueva York. Este microorganismo, que se denominó *Borrelia burgdorferi*, es sólo la segunda especie dentro de las espiroquetas asociadas a garrapatas duras. Desde entonces, otros cinco géneros ixódidos (*Amblyomma*, *Dermacentor*, *aemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*) se han visto naturalmente infectados con *Borrelia burgdorferi* (Navarro, 2005; Rodríguez, 2011; Félix, 2010; Forbes, 2009).

### 3.2 Características Generales

Con el nombre de garrapatas se refiere a una serie de artrópodos perteneciente al orden *Acarina*, que se caracterizan por su régimen de vida estrictamente parásito y por realizar tres mudas a lo largo de su vida. Se diferencian dos grandes grupos, las llamadas garrapatas blandas y las duras. Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados que parasitan toda clase de mamíferos, aves, reptiles e incluso anfibios, distribuidos por casi todas las regiones del mundo. Son conocidas aproximadamente 879 especies pertenecientes a dos familias principales, las “garrapatas duras” o *Ixodidae*, designadas así por poseer un escudo dorsal esclerotizado, y las “garrapatas blandas” o *Argasidae*,

denominadas así por la presencia de una cutícula externa flexible. Existe una tercera familia, *Nuttalliellidae*, que incluye una sola especie, distribuida únicamente en el sur de África. La familia *Ixodidae*, es la más numerosa con mayor importancia médica y veterinaria. La Figura 3 muestra la designación taxonómica de éstas (Janus, 2014; Félix, 2010; Rodríguez, 2013; Feria y col., 2014; Montiel y cols., 2007).

Las garrapatas presentan tres estadios: larva, ninfa y adulto. Las garrapatas *Ixodidae* y *Argasidae* se diferencian tanto por su anatomía, como por sus ciclos biológicos. Los *ixódidos* reúnen una serie de particularidades que les otorga un potencial como vectores de agentes patógenos, se alimentan durante largos periodos de tiempo, su mordedura es generalmente indolora, y permanecen fuertemente fijados sobre el hospedador. Cada estadio se alimenta una sola vez, pudiendo parasitar a una gran variedad de especies animales en diferentes tipos de hábitats, en la Tabla 4 se muestra los grupos de espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme, sus vectores y distribución geográfica (Margos y cols., 2011; Buczek, 2014).

Las primeras corresponden a la familia *Argasidae* y se definen por poseer una cutícula de tipo coriáceo y por alimentarse velozmente, permaneciendo en el hospedador sólo el tiempo necesario para hacerlo. Se trata principalmente de parásitos de aves y reptiles, aunque su mayor importancia económica se debe a que algunas especies transmiten la peste porcina africana en Europa (Félix, 2010; Navarro, 2005; Margos y cols., 2011; Buczek, 2014).

La familia *Ixodidae*, encierra la mayor parte de las especies de interés clínico y veterinario. Se trata de ácaros que presentan un escudo de cutícula endurecida y que pueden parasitar la mayor parte de vertebrados terrestres, en la Tabla 5 se muestra la clasificación taxonómica de la familia *Ixodidae* (Aránzazu y Oteo, 2014; Félix, 2010; Caride, 2002).

### 3.3 Taxonomía

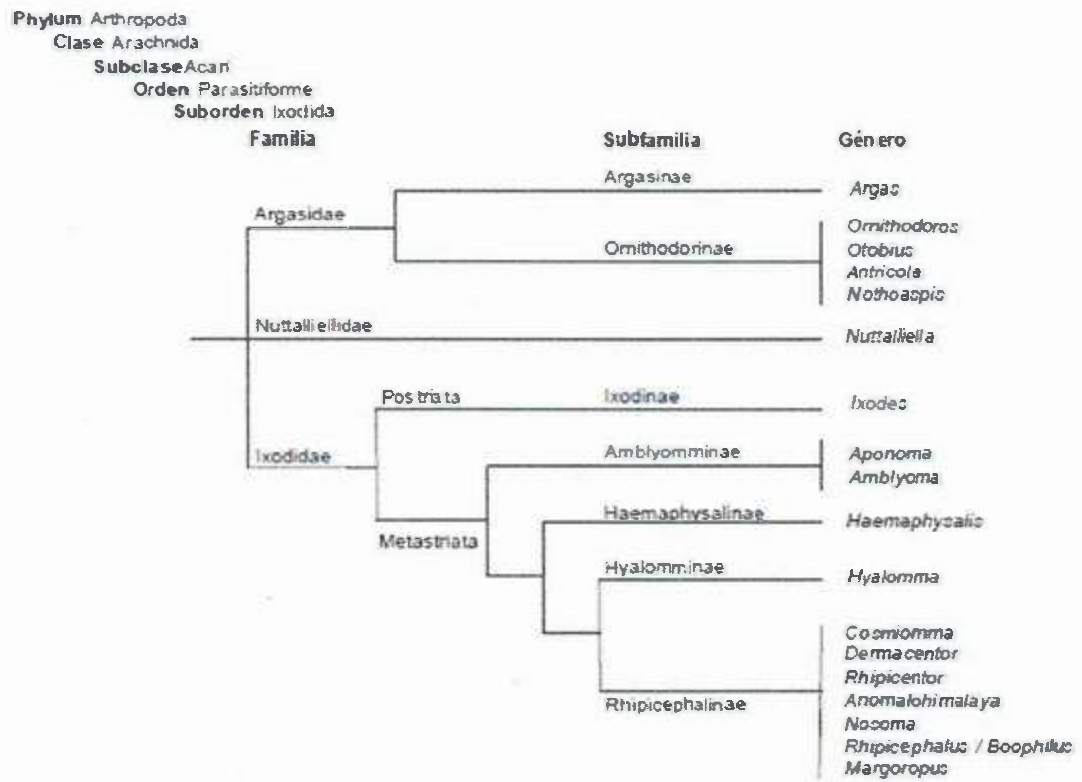


Figura 3. Clasificación taxonómica de las garrapatas (Félix, 2010).



Tabla 4. Grupos de espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme, su distribución geográfica, hospedador animal y vectores (Margos, 2011).

Species (c/p) (type strain)	Distribución	Hospedador animal	Vector
<i>B. afzelii</i> (c) (VS461)	Europa, Asia	<i>Apodemus</i> spp., <i>Myodes glareolus</i> , <i>Sorex</i> spp., <i>Sciurus</i> spp., <i>Erinaceus</i> spp., <i>Rattus</i> spp.	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. hexagonus</i> .
<i>B. americana</i> (p) (SCW-41)	Norte América	<i>Thryothorus</i> , <i>ludovicianus</i> , <i>Pipilo erythrophthalmus</i> .	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i> .
<i>B. andersonii</i> (e) (21038)	Norte America	<i>Sylvilagus</i> spp. (Passeriformes spp.)	<i>I. dentatus</i> .
<i>B. bavariensis</i> (p) (PBi)	Europe, Asia	<i>Apodemus</i> spp., <i>Myodes</i> sp., <i>Microtus</i> spp.	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> .
<i>B. bissettii</i> (c)(DNI27-cl9-2)	Norte America, Europe	<i>Neotoma</i> spp. <i>Peromyscus</i> spp., <i>Sigmodon</i> spp. EU: unknown	<i>I. pacificus</i> , <i>I. spinipalpis</i> , <i>I. affinis</i> , EU: unknown
<i>B. burgdorferi</i> (c) (B31)	Norte America, Europe	<i>Peromyscus</i> spp., <i>Tamias</i> spp., <i>Neotoma</i> spp., <i>Sorex</i> spp., <i>Sciurus</i> spp., <i>Sigmodon</i> spp., <i>Erinaceus</i> spp., <i>Rattus</i> spp., <i>Procyon</i> <i>lotor</i> , <i>Turdus migratorius</i> ,	<i>I. ricinus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I.</i> <i>pacificus</i> , <i>I. affinis</i> , <i>I. minor</i> , <i>I. spinipalpis</i> , <i>I. muris</i> , Unknown
<i>B. ealiforniensis</i> (c) (CA446)	Este USA	<i>Dipodomys ealifornensis</i>	Unknown
<i>B. carolinensis</i> (e) (SCW-22)	Sureste USA	<i>P. gossypinus</i> , <i>N. floridana</i> .	Unknown ( <i>I. minor</i> )
<i>B. garinii</i> (e) (20047)	Europe, Asia, circulo Artico	<i>Turdus merula</i> , <i>T. philomelos</i> , <i>Parus major</i> , seabirds ( <i>Puffin</i> , <i>Guillemot</i> , <i>Kittiwake</i> , <i>Razorbill</i> )	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. uriae</i>
<i>B. Japonica</i> (e) (H014)	Japón	<i>Sorex unguiculatus</i> , <i>Apodemus</i> spp., <i>Eothenomys smithi</i>	<i>I. ovatus</i>
<i>B. kurtenbachii</i> (p) (25015)	Norte América, Europa	<i>Microtus pennsylvanicus</i> , <i>Zapus</i> <i>hudsonius peromyscus</i>	Unknown ( <i>I. scapularis</i> )
<i>B. lusitaniac</i> (e) (PoTiB2)	Mediterraneo, China	Lacertidae <i>Niviventer confucianus</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. ovatus</i>
<i>B. sinica</i> (c) (CMN3)			
<i>B. spielmanii</i> (e) (PC-Eq17N5)	Europa	<i>Glis glis</i> , <i>Eliomys quercinus</i>	<i>I. ricinus</i>
<i>B. tanukii</i> (c)(Hk501)	Japón	<i>Apodemus</i> sp. <i>Clethrionomys</i> <i>rufocanus</i> , <i>Eothenomys smithii</i>	<i>I. tanuki</i>
<i>B. turdi</i> (c)(Ya501)	Japón	<i>Turdus</i> spp.	<i>I. turdis</i>
<i>B. valaisiana</i> (e) (VSI 16)	Europa, Japón	<i>Turdus merula</i> , <i>T. philomelos</i> , <i>Parus</i> <i>major</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. columnae</i>
<i>B. yangtze</i> (e) (nd)	China	<i>Niviventer fulvescens</i> , <i>Apodemus</i> sp.	<i>I. granulatus</i> , <i>I. nipponensis</i> .
<i>B. Genomospecies2</i>	USA	Unknown	<i>I. spinipalpis</i> , <i>I. pacificus</i>

Tabla 5. Clasificación taxonómica de la familia *Ixodidae* (Caride, 2002; Villamil, 2002).

<b><i>Phylum arthropoda</i></b>	
Clase	<i>Arachnida</i>
Subclase	<i>Acari</i>
Orden	<i>Parasitiformes</i>
Suborden	<i>Ixodida</i>
Superfamilia	<i>Ixodida</i>
Familia	<i>Ixodidae</i>
Géneros	<i>Ixodes, Rhipicephalus,</i> <i>Boophilus, Hyalomma,</i> <i>Amblyomma, Dermacentor,</i> <i>Haemaphysalis, Aponomma,</i> <i>Anocentor, Nosomma,</i> <i>Margaropus, etc.</i>

### 3.4 Características Morfológicas

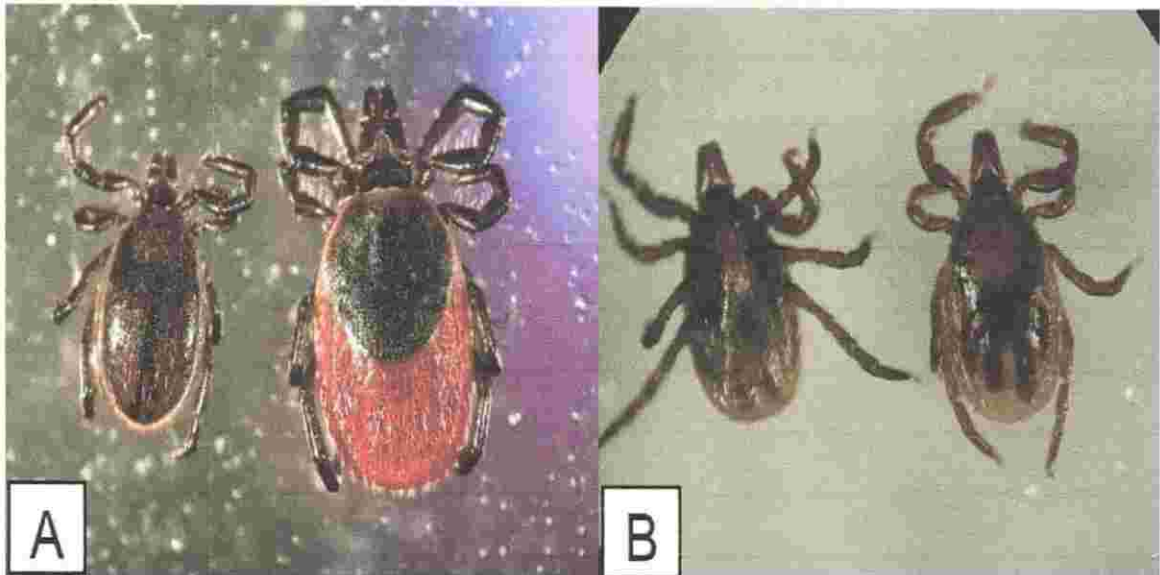
El cuerpo de las garrapatas tiene la morfología característica de los arácnidos, clase a la que corresponden. En general, el cuerpo de las garrapatas es más largo que ancho, en los adultos no alimentados el tamaño del cuerpo, incluido el capítulo, alcanza a medir desde 2 mm, hasta casi 30 mm. El cuerpo de las garrapatas está constituido por el capítulo o gnatosoma y el idiosoma. El capítulo sostiene las partes bucales, incluidos los quelíceros, los palpos y el hipostoma es con el que se fijan al hospedador (Caride, 2002; Buczek, 2014).

El idiosoma se subdivide en el podosoma, el cual sobrelleva las patas y el poro genital, y en el opistosoma, región posterior donde se encuentran las placas espiraculares y la apertura anal. La cobertura externa del cuerpo y de sus apéndices, similar al de otros artrópodos, se denomina tegumento, está constituida por la epidermis y por la cutícula, parte externa que actúa como protección primaria frente a la pérdida de agua. El tegumento sirve también como exoesqueleto, proporcionando protección frente a agresiones de tipo mecánico o físico (Félix, 2010; Navarro, 2005; Boria, 2012).

Para la Enfermedad de Lyme los vectores aptos, son aquellos artrópodos que adquieren y transmiten de forma eficaz *Borrelia burgdorferi s.l.* a los hospedadores susceptibles. Una especie eficiente de vectores será aquella que posea propiedades fisiológicas y ecológicas que permitan la infección y promuevan la transmisión. Los vectores de la Borreliosis de Lyme son garrapatas *ixódidas* estrechamente relacionadas, que forman parte del complejo *Ixodes ricinus*. En los estados Norteamericanos del noroeste y centro oeste, el vector es *Ixodes scapularis*, y en el oeste, es *Ixodes pacificus*. En Europa el vector principal es *Ixodes ricinus* y en Asia *Ixodes persulcatus* (Caride, 2002; Buczek, 2014).

Aún que se ha demostrado la presencia de *Borrelia burgdorferi s.l.* en la mosca del ciervo y en los mosquitos, sólo las garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* son

importantes en la transmisión de la espiroqueta a los seres humanos, en la Figura 4 se muestra la morfología de *Ixodes ricinus* (Félix, 2010; Buczek, 2014; Caride, 2002).



A: Macho (izquierda) y hembra (derecha). B: Ninfas, vista ventral (izquierda) y dorsal (derecha)

Figura 4. Garrapatas de la especie *I. ricinus* (Félix, 2010).

### 3.5 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de las diferentes especies de garrapatas *ixódidas* es bastante similar entre sí, todas tienen un único estadio de ninfa, las hembras aumentan de tamaño durante la alimentación, y la fecundación tiene lugar mientras se alimentan en el hospedador. Tras la fecundación, las hembras ingieren sangre hasta su repleción, una vez saciadas se desprenden del hospedador y comienzan la ovoposición. Tras un periodo pre ovopositor, las hembras depositan varios miles de huevos en un ciclo continuo de ovoposición. La puesta de huevos es rápida, alcanzándose el pico de producción entre el tercer y el quinto día tras el comienzo. En general, la gran mayoría de los huevos son depositados en los primeros 10 días, en los 5-10 días posteriores continua la puesta de un número menor de huevos, tras la cual las exhaustas hembras morirán. Esta capacidad ovopositora de las garrapatas *ixódidas* las sitúan entre las más prolíficas de todos los artrópodos (Félix, 2010; Herrmann y Gern, 2015; Fernández, 2003; Buczek, 2014).

En estas garrapatas, la gametogénesis comienza en el momento de la transformación de la ninfa en adulta, siendo los jóvenes adultos sexualmente activos tras finalizar la muda. Este hecho hace que la cópula entre los machos y las hembras pueda tener lugar antes de la alimentación, cuando se hallan en la vegetación, o cuando se encuentran en el hospedador. Tras la ovoposición comienza la incubación, y después de la eclosión, las larvas emergentes se dispersarán en la vegetación cercana a la espera del hospedador. Aquellas que tengan éxito en la búsqueda, se fijarán e ingerirán sangre lentamente durante varios días hasta completar su alimentación. La larva repleta se soltará del hospedador y buscará un hábitat protegido donde tendrá lugar la muda. La nueva ninfa buscará de nuevo un hospedador, repitiéndose el proceso de fijación, repleción, descenso del hospedador y búsqueda de un lugar adecuado donde completar la muda hacia el estadio adulto. Tras su emergencia los adultos buscarán un nuevo hospedador, se alimentarán, se fecundarán, y las hembras repletas realizarán la ovoposición, completando el ciclo biológico, en la Figura 5 se ilustra el ciclo biológico de *ixodes ricinus* (Rodríguez, 2013; Golovchenko y cols., 2014; Herrmann y Gern, 2015; Caride, 2002; Margos y cols., 2011).

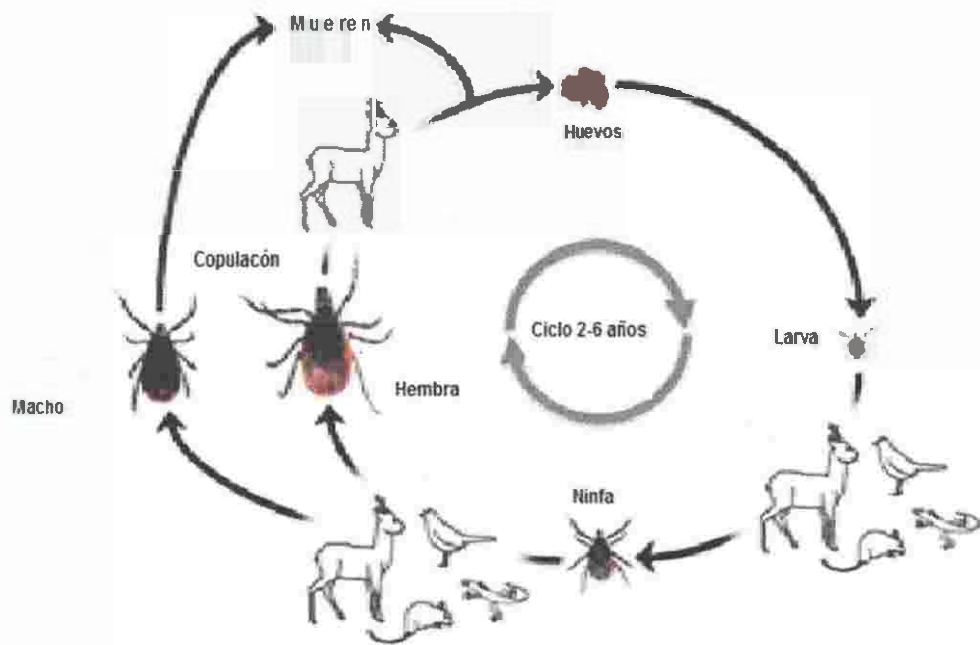


Figura 5. Ciclo biológico del vector *Ixodes ricinus* (Herrmann y Gern, 2015).

### 3.6 Patogenia

La transmisión de espiroquetas necesita que la garrapata se fije por lo menos 48 horas durante las cuales los microorganismos se multiplican y cruzan el epitelio intestinal hacia la hemolinfa, se diseminan hacia las glándulas salivales e infectan al hospedero a través de la saliva de la garrapata. Estas garrapatas sólo pueden sobrevivir en zonas donde haya una buena cubierta de vegetación y una alfombra de hojas caídas para que en la base de esta vegetación se mantenga una humedad relativa superior al 80% durante los períodos del año más secos, normalmente en verano. Además, en estas áreas deberán estar presentes un número y variedad determinada de hospedadores para cada estadio parásito de la garrapata (Buczek, 2014; Caride, 2002; Fernández, 2003; Margos y cols., 2011).

### 3.7 Epidemiología

En México se reporta la presencia de tres especies de *Ixodes*, el vector de la Enfermedad de Lyme. El vector *Ixodes scapularis*, relacionado con la transmisión de la enfermedad de Lyme en Estados Unidos, ha sido detectado en zonas de Coahuila y Sur de Texas. Además, se identificaron *Ixodes* en Baja California, Península de Yucatán, el Golfo de México y la zona del Noreste de la República mexicana.

Se encontró prevalencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* de 3% en venados de cola blanca del Noreste de México. Los venados son hospederos finales de los *Ixodes* adultos y su función primaria es mantener el vector. En caballos del área suburbana de Monterrey se detectó también seropositividad en un pequeño porcentaje. Otro estudio en el área detectó *Borrelia spp.* en perros residentes del área metropolitana de Monterrey en un 16% (Skinner y col. 2007; Aránzazu y Oteo, 2014; Romero, 2011; Gordillo y Solórzano, 2010)

## CAPITULO 4. ENFERMEDAD DE LYME

### 4.1 Antecedentes

La primera descripción de la enfermedad de Lyme (EL), fue realizada en 1883 por Alfred Buchwald; después de esto, en 1902 lo hicieron Karl Heixheimer y Kuno Hartmann en pacientes con acrodermatitis crónica atrófica (ACA). A inicios del siglo XX, Benjamin Lipschutz y Arvid Afzelius establecieron las primeras descripciones del eritema crónico migratorio (ECM) en Europa. Afzelius asoció de las lesiones de ECM con la mordedura de una garrapata en 1906. Casi 70 años después, se reconoció la enfermedad de Lyme, cuando en 1975 se estudiaron un total de 51 pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide juvenil en residentes de tres comunidades contiguas de la ciudad de Connecticut, en EE.UU.: Old Lyme, Lyme y East Haddam (Romero, 2011).

En 1982 Willy Burgdorfer y Allan Barbour describieron y cultivaron un nuevo agente biológico a partir de la sangre obtenida del tubo digestivo de una garrapata del género *Ixodes*, al que se denominó *Borrelia burgdorferi* en 1984. Esta espiroqueta, entonces desconocida, fue aislada posteriormente por Steere y Benach de los pacientes con artritis de Lyme. Ackermann Asbrinky Preac-Mursic en Europa lograron aislarla en pacientes con eritema migratorio y síndrome de Bannwarth, respectivamente. Así se demostró el carácter sistémico e infeccioso de la nueva enfermedad conocida hoy como Enfermedad de Lyme o Borreliosis de Lyme (Orestes y cols., 2011; Rodríguez, 2013; Aránzazuy Oteo, 2014; Winn y cols., 2006).

### 4.2 Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clásicas de la Borreliosis de Lyme son similares a nivel mundial. Sin embargo, existen variaciones regionales, principalmente entre la enfermedad que se presenta en América causada exclusivamente por *Borrelia burgdorferi sensu stricto* y aquella que se presenta en Europa causada por *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii*.



Para propósitos clínicos, éstas se dividen en tres estadios: enfermedad temprana localizada, enfermedad temprana diseminada y enfermedad tardía, aunque algunos autores manejan una cuarta etapa de estadio crónico, denominado como Síndrome post-Lyme (Aránzazu y Oteo, 2014; Winn y cols., 2006; Maroto y Gutiérrez, 2009).

#### **4.2.1 Estadio I: Infección Temprana Localizada**

Ésta empieza al momento que ocurre la mordedura de garrapata hasta la inoculación de *Borrelia burgdorferi s.l.* La enfermedad de Lyme (EL) es un proceso que afecta a múltiples órganos y sistemas y, como tal, su espectro clínico es muy variado, se observan manifestaciones típicas y patognomónicas, como el eritema migratorio (EM), y manifestaciones atípicas, pero no específicas de ahí que en la bibliografía la EL se conozca como “el último gran imitador”. En el 75 % de los pacientes, posteriormente de un periodo de incubación de 3-32 días, surge la lesión clásica conocida como eritema migratorio en el sitio de la mordedura. Se caracteriza por una placa eritematosa-violácea, indolora, que crece de manera centrifuga mientras su centro se aclara. La localización más frecuente es en las extremidades inferiores. El tamaño de la lesión es proporcional a su duración. En promedio, mide 10-16 cm de diámetro y tiende a ser de mayor tamaño cuando se localiza en el tronco, en la Figura 6 se muestra una de las manifestaciones patognomónicas llamada eritema migratorio (EM) (Borgermans y cols., 2014; Orestes y cols., 2011; Maroto y Gutiérrez, 2009).



Figura 6.Eritema migratorio (Orestes, 2011).

#### 4.2.2 Estadío II: Infección Temprana Diseminada

El inicio es inconstante, las manifestaciones pueden presentarse a partir de la primera semana pos infección, e incluso meses más tarde y es común que existan periodos asintomáticos, sin embargo, por los tratamientos, las manifestaciones se ven con menos frecuencia. Este estadio se delimita por un involucro sistémico; las espiroquetas se diseminan con afección del sistema músculo esquelético (60%), piel (20-25%), sistema nervioso central (SNC) (10%) y corazón (5%). Los pacientes presentan síntomas constitucionales caracterizando por un síndrome febril inespecífico como lo son: fiebre, cefalea, rigidez de nuca leve, dolor músculo esquelético generalizado, artralgias, algunas veces los pacientes tienen irritación meníngea, encefalopatía leve, dolor músculo esquelético migratorio, hepatitis, linfadenopatía generalizada o esplenomegalia, odinofagia, tos no productiva o tumefacción testicular. Los síntomas y signos tempranos son típicamente intermitentes y cambiantes, excepto la fatiga y la letargia que a menudo son constantes (Winn y cols., 2006; Aránzazu y Oteo, 2014; García y cols., 2014).

#### 4.2.3 Estadío III: Infección Tardía

Los meses posteriores al comienzo de la enfermedad y dentro del contexto de fuertes respuestas inmunes celular y humoral contra *Borrelia burgdorferi s.l.*, alrededor del 60 % de los pacientes comienzan a sufrir ataques intermitentes de tumefacción y dolor articular, principalmente en las grandes articulaciones, en especial las rodillas. Las manifestaciones de la EL tardía se pueden dividir en dos grandes grupos: manifestaciones en las cuales la infección persistente por *Borrelia burgdorferi s.l.* siendo la causa de los síntomas, como en la acrodermatitis crónica atrófica (ACA), la artritis persistente de Lyme y la neuroborreliosis, y manifestaciones debidas a mecanismos autoinmunes y daño tisular establecido e irreversible; entre estas últimas se encuentran la encefalopatía y la cardiomiopatía dilatada de Lyme, así como la artritis resistente a antibióticos. La Tabla 6 muestra las manifestaciones clínicas más frecuentes por especie y distribución geográfica (Winn y cols., 2006; Boria, 2012; Rodríguez, 2011).

Tabla 6. Manifestaciones clínicas más frecuentes por especie y distribución geográfica (Aránzazu y Oteo, 2014; García, 2014).

Cuadro clínico	Estados Unidos ( <i>B. burgdorferi</i> s.s)	Europa y Asia ( <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> )
<u>Dermatológico</u>		
Fase aguda	Rápido desarrollo y resolución del EM, con intensa inflamación debida a diseminación hematológica.	Presentación y resolución lenta del EM, con poca inflamación, debida a diseminación local o de áreas contiguas.
Fase crónica	Rara vez acrodermatitis	Acrodermatitis Atrófica ( <i>B. afzelii</i> )
<u>Sistema nervioso</u>		
Fase aguda	Meningitis, cefalea intensa, rigidez de nuca, baja incidencia de radiculoneuritis	Dolor radicular intenso, pleocitosis, escasos signos menígeos acompañantes ( <i>B. garinii</i> )
Fase crónica	Polineuropatía sensorial sin acrodermatitis encefalopatía, deterioro cognitivo, escasa producción de anticuerpos intratecales	Polineuropatía sensorial con acrodermatitis encefalomiелitis severa, espasticidad, deterioro cognitivo, intensa producción de anticuerpos intratecales ( <i>B. garinii</i> )
<u>Cardíaco</u>		
Fase aguda	Bloqueo AV, miocarditis	Bloqueo A-V, miocarditis
Fase crónica	Ausente	Miocardopatía dilatada
<u>Articular</u>		
Fase aguda	Artritis oligoarticular, intensa inflamación articular	Menor frecuencia de artritis oligoarticular, escasa inflamación articular.
Fase crónica	Artritis resistente al tratamiento en 10% de los pacientes, mecanismo autoinmune	Artritis rara vez resistente, mecanismo no autoinmune.
Infección asintomática	En el 10% de los pacientes	En > 10% de los pacientes
Respuesta a anticuerpos	Expansión de la respuesta a múltiples proteínas de las espiroquetas.	Expansión de la respuesta a pocas proteínas de las espiroquetas.

Entre las manifestaciones dermatológicas, la acrodermatitis crónica atrófica (ACA) manifiesta un hallazgo cutáneo característico de la enfermedad de Lyme tardía en Europa, y es la segunda forma más común de dermatoborreliosis. Es una dermatosis crónica que se presenta principalmente en la región acral y, a diferencia del EM y el Linfocitoma borrelial, no se cura de manera espontánea y sin tratamiento, en la Tabla 7 se citan las principales manifestaciones dermatológicas de la Enfermedad de Lyme, así como las diferencias entre Norteamérica y Europa (Rodríguez, 2013; Orestes y cols., 2011).

#### **4.2.4 Enfermedad Post-Lyme**

Las espiroquetas pueden sobrevivir en ciertos órganos y sistemas, desencadenando manifestaciones de carácter crónico y de difícil diagnóstico. Las manifestaciones tardías ocurren hasta un año después de la infección. Se ha planteado una reacción de tipo autoinmune como resultado de una mimetización entre proteínas de *Borrelia burgdorferi s.l.* y el antígeno humano de función leucocitaria de tipo 1 (hLFA-1) como mecanismo de la artritis persistente (García y cols., 2014).

#### **4.3 Infección Congénita**

A mediados de la década de 1980, se informó la transmisión transplacentaria de *Borrelia burgdorferi s.l.* en dos lactantes, cuyas madres habían padecido Borreliosis de Lyme durante el primer trimestre del embarazo. Ambos bebés murieron durante la primer semana de vida, en ambos se encontró la bacteria en tejido, evidenciándola con el colorante de plata de Dieterle, no se realizaron cultivos ni pruebas serológicas (García y cols., 2014). Otros investigadores efectuaron estudios afines con esta transmisión sin determinarlo en forma concluyente, estos reportes indicaron el estudio de 19 casos, en los cuales, solo 5 se asociaron con la evolución fetal adversa relacionada con la espiroqueta (García y cols., 2014; Fauci y cols., 2009).

Tabla 7. Manifestaciones dermatológicas de la EL y diferencias entre la manifestadas en Norteamérica y Europa (García y cols., 2014).

Manifestación cutánea	<i>B. burgdorferi</i> (Norteamérica):	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> (Europa y México):	Diagnósticos diferenciales	Cuadro de niños
EM (estadio I)	Lesiones múltiples por diseminación hematígena, extensión rápida y duración corta.	Diseminación contigua o local, patrón de migración lento y duración prolongada.	Granuloma anular, eritema fijo pigmentado morfea, pidermitis, tiña.	Eritema figurado más frecuente en niños. Asociado a urticaria, se localiza en manos, cuello y extremidades.
Linfocitoma borrelial (Estadio I/II)	No se reporta.	I: en el sitio de la mordedura de garrapatas, II: localizada en areola, lóbulo de la oreja, axila y escroto.	Linfoma cutáneo, sarcoidosis, sarcoma de Kaposi, picadura por artrópodos.	Es el 5% de las dermatosis de Lyme, más frecuente en el lóbulo de la oreja y la areola.
ACA (Estadio III)	No se reporta.	Segunda forma más común de dermatoborreliosis, más en mujer de edad avanzada.	Morfea, esclerodermia localizada.	Rara vez se reporta.

#### 4.4 Coinfección

La infección polimicrobiana y el aumento del número de casos reportados de coinfecciones en pacientes con enfermedad crónica o post Lyme, nos muestran un panorama cada vez más crítico para un diagnóstico certero, cabe mencionar que el vector trasmisor de *Borrelia burgdorferi s.l.*, no sólo transmite a ésta, sino también otros agentes infecciosos, incluidos, cepas de *Ehrlichia*, *Bartonella* y *Babesia*, que son cada vez más reportadas en pacientes con Enfermedad de Lyme, particularmente en aquellos con enfermedad crónica. Estudios recientes sugieren que la enfermedad de Lyme es más grave y resistente al tratamiento en pacientes coinfectados, por lo que es obligatoria la detección y tratamiento concurrente de las coinfecciones., aunque *Borrelia burgdorferi s.l.* continúa siendo el patógeno más comúnmente transmitido por mordedura de garrapata (Aránzazu y Oteo, 2014; Fauci y cols., 2009).

#### 4.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la Enfermedad de Lyme debe sustentarse en un ambiente epidemiológico adecuado, como encontrarse en zonas en las que exista el artrópodo vector y el antecedente de mordedura de garrapata o su posibilidad. Además debe presentar manifestaciones clínicas compatibles con la infección por *Borrelia burgdorferi s.l.* como lo son el eritema migratorio (EM) o linfadenosis cutánea benigna o linfocitoma borrelial, que son muy específicas de la infección, aun que deben ser confirmadas microbiológicamente (Aránzazu y Oteo, 2014).

En el transcurso de una infección en la fase precoz localizada puede existir ausencia de una respuesta inmune medible por su precocidad, siendo necesaria la confirmación microbiológica, como en el resto de las enfermedades infecciosas, el cultivo es la prueba microbiológica de referencia. Éste se realiza en medios bacteriológicos enriquecidos, como Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) u otros modificados a partir del medio de Kelly, como el modificado Kelly-Pettenkofer (MKP). Estos métodos tienen poca sensibilidad, salvo cuando se aplican en el EM u otras afecciones cutáneas. Son laboriosos, lentos

(hasta 12 semanas en observación), de fácil contaminación y solo están disponibles en centros de referencia (Aránzazu y Oteo, 2014; Boria, 2012; Maroto y Gutiérrez, 2009).

Al considerarse *Borrelia burgdorferi s.l.* un microorganismo fastidioso, las técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación se han incorporado a la rutina diagnóstica de la EL en muchos hospitales, sin embargo, no están estandarizadas. Como dianas de la PCR se utilizan diferentes fragmentos de genes de *Borrelia burgdorferi s.l.* (*ospA*, *ospB*, *flaB*, *p66*, *rrs* o el espacio intergénico ARNr 5S/23S, entre otros). Un resultado de PCR negativo no excluye una infección por *Borrelia burgdorferi s.l.* En caso de positividad, el análisis de la secuencia nucleotídica nos informará, además, sobre la genoespecie implicada (Margos y cols., 2011; Delibes 2014; Maroto y Gutiérrez 2009).

En la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, el diagnóstico de la infección por *Borrelia burgdorferi s.l.* se realiza mediante técnicas serológicas. Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) o de inmunofluorescencia (IFA) de Lyme basados en sonidos de células enteras que contienen múltiples antígenos. Estas son poco específicas y presentan alto riesgo de reacciones cruzadas, aunque su sensibilidad es alta. Por este motivo, las sociedades científicas americanas y europeas incluidas en éstas la CDC (Center for Disease Control and Prevention) recomiendan un diagnóstico microbiológico en 2 pasos, que incluye: la utilización de ELISA o IFA como técnica de cribado y si esta prueba resulta positiva o dudosa, realizar una inmunotransferencia (western blot o inmunoblot) (Orestes y cols., 2011; Murray y cols., 2008; Maroto y Gutiérrez, 2009).

Durante el primer mes de infección se debe valorar las respuestas de anticuerpos IgM e IgG a la espiroqueta, de preferencia en muestras de suero de fase aguda y de convalecencia. Se ha observado que 20 a 30 % de los pacientes tienen una respuesta positiva detectable en muestras de suero en fase aguda, mientras que en fase de convalecencia muestras un 70 a 80 % (de dos a cuatro semanas después de adquirir la infección). Después de un mes de infección, ya que ésta se encuentra en su etapa



diseminada, muestra una alta sensibilidad y especificidad a la respuesta IgG (95 a 99 %) (Skinner, 2008; Fernández, 2003).

Además hay que tener en cuenta que la IgG y la IgM pueden persistir durante años, por lo que un valor de IgM no puede interpretarse como demostración de infección reciente ni de reinfección, salvo en el caso de que aparezca una IgG negativa que se positivase transcurridas 3-6 semanas en presencia de las características clínicas y epidemiológicas adecuadas. Actualmente se recomiendan los ensayos de ELISA de al menos, segunda generación, que usan un extracto antigénico purificado de la bacteria. La incorporación de péptidos sintéticos, como el VIsE (Variable major protein-like sequence, expressed), a la inmunotransferencia (pruebas de tercera generación) ha mejorado el rendimiento en los estadios tempranos de la infección por *Borrelia burgdorferi s.l.* (Petnicki y Kern 2014; Aránzazu y Oteo 2014; Gordillo y cols., 2003; Krämer, 2014; Fernández, 2003).

#### 4.5.1 Diagnóstico Diferencial

El EM clásico es un eritema de expansión lenta, con lesiones que presentan aclaramiento central. Cuando la lesión se expande poco, puede representar la pápula roja de una mordedura de una garrapata no infectada. Si la lesión se expande rápidamente puede representar celulitis. Un ejemplo sería celulitis estreptocócica o una reacción alérgica quizá por la saliva de la garrapata (López y Mada, 2003).

En pacientes con lesiones anulares secundarias se puede considerar la posibilidad de un eritema multiforme, pero la infección de *Borrelia burgdorferi s.l.* no suele acompañarse de lesiones mucosas ampulosas, ni afección en plantas o palmas. Cabe mencionar que el vector de esta bacteria, también transmite *Babesia microti*, parásito de los eritrocitos o *Anaplasma phagocytophila*.

La Babesiosis y la Anaplasmosis suelen ser asintomáticas, pero la infección con cualquiera de los tres microorganismos puede ocasionar síntomas generalizados inespecíficos y en caso de coexistencia de las infecciones puede haber síntomas más

intensos y persistentes que en el individuo que sea parasitado por un solo microorganismo infectante.

La respuesta serológica de tipo IgM pudiera confundir el diagnóstico. Por ejemplo *Anaplasma Phagocytophila* puede desencadenar una respuesta positiva de IgM contra *Borrelia burgdorferi s.l.* Por otro lado las personas con artritis de Lyme, por lo regular muestran las máximas respuestas de anticuerpos IgG contra distintas proteínas de la espiroqueta, que se observan en la infección, mientras que en la artritis no se observan.

En las pruebas neurológicas se necesita un estudio más profundo pues la neuroborreliosis comparte sintomatología con muchas patologías. Un análisis de líquido cefalorraquídeo evidenciará la existencia de la espiroqueta (Fauci y cols., 2009; Murray y cols., 2008; Maroto y Gutiérrez, 2009).

#### 4.6 Tratamiento para la Enfermedad de Lyme

Las diferentes manifestaciones de la Enfermedad de Lyme, logran tratarse con éxito con antibióticos por vía oral, excepto las alteraciones neurológicas. Para la fase inicial de la enfermedad de Lyme, la doxiciclina resulta eficaz para los varones y las mujeres no grávidas. Una de las ventajas es que este antibiótico también contrarresta la infección por *Anaplasma*, la cual también se transmite por la misma garrapata, transmisora de la Enfermedad de Lyme.

En los niños, la amoxicilina resulta eficaz, en caso de alergia a la penicilina, puede darse acetilcefuroxima o eritromicina. En la Tabla 8 y 9 se ilustran los regímenes terapéuticos en adultos y niños (Fauci y cols., 2009; Murray y cols., 2008; Aránzazu y Oteo, 2014).

La sociedad de enfermedades infecciosas de América (IDSA) recomienda el tratamiento profiláctico si un paciente cumple con los criterios de la establecidos por ésta, que a continuación se citan (Millien y cols., 2014; García y cols., 2014; Caride, 2002). Criterios para iniciar el tratamiento profiláctico según la IDSA a garrapata unida al cuerpo ha sido identificada como un adulto o ninfa del género *I. scapularis*, y ha estado unida durante más de 36 horas.

- La profilaxis puede ser iniciada dentro de las 72 horas posteriores a que la garrapata haya sido removida.
- La información ecológica local demuestra más del 20% de las garrapatas locales están infectada por *Borrelia burgdorferi s.l.*
- No hay contradicciones para el uso de doxiciclina.

En embarazadas, niños o pacientes en que está contraindicada la doxiciclina, las guías de la IDSA no recomiendan dar un antibiótico alternativo. Independientemente de que cumplan o no con los criterios para el tratamiento profiláctico, se recomienda que todos los pacientes que se hayan removido una garrapata adherida al cuerpo, se mantengan en vigilancia durante 30 días e inicien el tratamiento si desarrollan síntomas o signos de enfermedad de Lyme, babesiosis y/o erlichiosis (Fauci y cols., 2009; García y cols., 2014).

Después de un tratamiento adecuado a esta enfermedad, un porcentaje pequeño de enfermos siguen teniendo síntomas subjetivos, en particular dolor del aparato locomotor, dificultades neurológicas y fatiga crónica, a este fenómeno se le da el nombre de Enfermedad post Lyme, es una enfermedad incapacitante semejante al síndrome de fatiga crónica o fibromialgia (Fauci y cols., 2009).

#### **4.7 Prevención**

Actualmente la mejor forma de prevención a la infección por *Borrelia burgdorferi s.l.* u otros patógenos transmitidos por garrapata, evitar la exposición a los vectores. En caso

de que la exposición sea inevitable, las recomendaciones incluyen el uso de vestimenta protectora y repelente de garrapatas (N-dietil-toluamida), checar el cuerpo en busca de garrapatas diariamente y la remoción temprana y adecuada de cualquier garrapata antes de que tenga lugar la transmisión de microorganismos.

Tabla 8. Tratamiento contra *Borrelia burgdorferi* en adultos (Aránzazu Portillo, 2014).

Situación	Régimen
InfecCión precoz (local o diseminada)	Doxicilina, 100 mg v.o. cada 12 h x 10-14 días*.
	Amoxicilina, 500 mg v.o. cada 8 h x 14-21 días.
Si alergia o intolerancia a doxiciclina o amoxicilina	Cefuroxima, 500 mg v.o. cada 12 h x 14-21 días.
	- Eritromicina, 250 mg v.o. cada 6 h x 14-21 días.
Patología neurológica	
Meningorradiculitis y otras.	-Ceftriazona, 2 g i. v. cada 24 h x 14-28 días.
	-Cefotaxima, 2 g i. v cada 8 h x 14-28 días.
	-Penicilina G sódica, 3,3 MU i.v. cada 4h (20 MU/ día) x 14- 28 días.
Si alergia o intolerancia a ceftriaxona o penicilina.	-Doxicilina, 100 mg v.o. cada 8 h x 30 días.
Parálisis facial aislada	-Régimen v.o. puede ser eficaz.
Artritis (intermitente o crónica)	-Regimen v.o. x 30-60 días o i.v. x 14-28 días.
Patología cardiaca	
BAV 1.er grado	Tratamiento v.o. x 14-21 días
BAV 2º - 3º grado	Tratamiento i.v. y monitorización cardiaca. Tras su estabilización, pasar a v.o.
Mujeres embarazadas	Evitar la doxicilina.

Tabla 9. Tratamiento contra *Borrelia burgdorferi* en niños (Aránzazu Portillo, 2014).

Situación	Régimen
Infección precoz (local o diseminada)	-Doxicilina <sup>a</sup> , 4 mg/kg/día (máximo, 100 mg 2 veces al día) dividiendo en 2 dosis x 10-14 días.  -Amoxicilina, 250 mg v.o. cada 8 dh o 50 mg/kg/di dividiendo en 3 dosis x 14-21 días.
Si alergia o intolerancia a amoxicilina	-Cefuroxima, 125 mg v.o. cada 12 h o 30 mg/kg/día dividido en 2 dosis x 14- 21 días.  -Eritromicina, 250 mg v.o. cada 8 h o 30 mg/kg/día dividido en 3 dosis x 14- 21 días.  -Azitromucina, 10 mg/kg/día (máximo 500 mg 1 vez al día) x5-10 días.
Patología neurológica	-Ceftriaxona, 75-100 mg/kg/ día (máximo 2 g.) i.v. cada 24 h x 14-28 días.  -Cefotaxima, 150 mg/kg/día dividido en 3-4 dosis (máximo 6 g) x 14-28 días.  -Penicilina G sódica, 200.000-400.000 U/ kg/día i.v. dividiendo en 6 dosis x 14-28 días.
Parálisis facial aislada	-Doxicilina, 4 mg/kg/día (máximo, 100 mg 2 veces al día) x 14-21 días.
Artritis (intermitente o crónica)	-Doxicilina, 4 mg/kg/día (máximo, 100 mg 2 veces al día) durante 28 días. En menores, amoxicilina o cefuroxima a las mismas dosis que en la patología neurológica durante 28 días.
Artritis recurrente tras tratamiento oral)	-Mismas pautas orales durante 28 días o ceftriaxonona durante 14-28 días
Patología clínica BAV 1.er grado mismas pautas orales durante 14-21 días. BAV 2.ª- 3 er. Grados Tratamiento I.v. y monitorización cardiaca.	Tras su estabilización, considerado el riesgo del uso de tetraciclinas.

## CAPITULO 5. DIAGNOSTICO MEDICO

La enfermedad de Lyme es difícil de diagnosticar puesto que los síntomas no son consistentes, ni específicos. El síntoma principal es una erupción en la piel, que está presente hasta en el 75% de los casos de EL, éste puede mimetizar problemas en la piel tales como urticaria, eczema, quemadura de sol, contacto con hiervas tóxicas y la picadura de pulgas. La lista de síntomas posibles es larga, como fiebre, dolor generalizado, fatiga, inflamación de ganglios, entre otros síntomas manifestados durante varios días o semanas después de la picadura de una garrapata infectada, diagnosticándose como un síndrome febril inespecífico (Mayne, 2015; Rodriguez, 2013; López y Mada, 2003).

### 5.1 Síndrome Febril Inespecífico

El síndrome febril inespecífico se define clásicamente como la elevación de la temperatura corporal a 38°C con duración de más de 3 semanas, sin diagnóstico etiológico. Las causas del síndrome febril son múltiples y variadas, la literatura médica muestra aproximadamente 200 causas distintas asociadas etiológicamente a este síndrome y se agrupan en tres categorías: enfermedades infecciosas, neoplásicas y autoinmunes. Algunos de los síntomas podría confundirse con un resfriado común, tales como:

- Rigidez de la nuca
- Molestias y dolores en músculos y articulaciones
- Fiebre de pocos grados y escalofríos
- Fatiga
- Falta de apetito
- Dolor de garganta
- Glándulas inflamadas
- Dolor de cabeza

(Mayne, 2015).

## 5.2 Exámenes de Laboratorio

El diagnóstico del laboratorio de la enfermedad de Lyme se basa en:

1. El aislamiento de la espiroqueta del paciente.
2. Pruebas serológicas (ELISA de Lyme y *Western Blot*) para detectar anticuerpos IgM e IgG frente al patógeno.
3. Emplear la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el DNA de *Borrelia burgdorferi s.l.*

El uso de la serología es la base fundamental para el diagnóstico de la Enfermedad de Lyme. Sin embargo sólo deben practicarse cuando existen datos clínicos muy sugerentes, y en la ausencia de dichos datos clínicos no debe usarse una prueba positiva como diagnóstico de esta enfermedad. Las pruebas más ampliamente utilizadas son la prueba indirecta con anticuerpos fluorescentes (IFA) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se encuentran en el mercado una gran variante de estos ensayos, las cuales utilizan diferentes preparaciones de antígenos, técnicas y puntos de corte (Skinner, 2008; Caride, 2002).

El análisis de inmunoblot (*western blot*) se realiza para confirmar los resultados obtenidos por otras pruebas serológicas. Los antígenos de *Borrelia burgdorferi s.l.* se separan a través de electroforesis, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, y se someten a reacción con el suero de los pacientes. La interpretación del inmunoblot se basa en el número y tamaño molecular de los anticuerpos que interactúan con las proteínas de la bacteria (López y Mada, 2003).

El título máximo de anticuerpos IgM reactivos se alcanzan de tres a seis semanas después de iniciada la enfermedad y están dirigidos a una proteína flagelar y de manera secuencial a algunas proteínas de superficie, mientras que la IgG aumenta de una manera lenta. Particularmente en la etapa temprana de la enfermedad las alteraciones de



laboratorio inespecíficas son la elevación de la eritrosedimentación y de los niveles séricos de IgM y transaminasa glutámico oxalacética (GOT/AST) la mayoría de los pacientes que experimentan esta elevación también tienen niveles séricos elevados de transaminasa glutámico-pirúvica y lactato deshidrogenasa (Petnicki y Kern 2014; Aránzazu y Oteo 2014; García y cols., 2014; Gordillo y col., 2003).

### 5.2.1 Cultivo

*Borrelia burgdorferi s.l.* se puede aislar de sangre, líquido cefalorraquídeo, y lesiones cutáneas, aunque se le considera un procedimiento demasiado complejo, debido a los requerimientos de esta bacteria, así como las condiciones microaerófilas que esta bacteria necesita. Este microorganismo se cultiva con mayor facilidad a partir de garrapatas que de muestras humanas.

La espiroqueta de Lyme puede ser recuperada de varios tejidos, entre los cuales se encuentran especímenes de biopsias de piel y lavado de lesiones de EM, biopsias de lesiones de ACA y de Linfocitoma borrelial, además de líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre. A pesar de su valor diagnóstico y de la alta sensibilidad del cultivo, esta modalidad diagnóstica es de utilidad principalmente en ensayos clínicos, pero no se recomienda como prueba diagnóstica de rutina en la práctica clínica por el tiempo del reporte.

Los medios líquidos actualmente utilizados para aislar *Borrelia burgdorferi s.l.* han sido derivados del medio de Kelly original; las versiones más actualizadas son BSK II (Barbour-Stoener-Kelly II medium), BSK-H y MKP (Kelly médium Preac-Mursic) (Aránzazu y Oteo 2014; Washington y cols., 2006; Murray y cols., 2008).

### 5.2.2 Examen de Sangre Periférica

La mayoría de los pacientes presentan normal o ligeramente elevados los valores de la velocidad de sedimentación globular, al igual el conteo de células blancas, aunque

algunos autores manejan como determinante la disminución de la respuesta de linfocitos CD57 como una característica patológica, así como una disminución en la expresión de proteínas del sistema de complemento, evitando la respuesta de inmunidad innata del huésped, los niveles elevados de crioglobulinas son ocasionalmente encontrados en etapas activas de la enfermedad. Al inicio de la infección, se pueden observar las espiroquetas de *Borrelia burgdorferi s.l.* en frotis sanguíneos con tinciones de Wright o Giemsa (Maroto y Gutiérrez 2009; Rodríguez 2013; López y Mada, 2003).

### 5.2.3 Examen de LCR

El mejor indicador de neuroborreliosis activa, es un LCR con características inflamatorias y una pleiocitosis linfocítica siendo esta característica de gran importancia para el diagnóstico.

La producción intratecal de anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi s.l.* puede ser demostrada en el 90% de los pacientes con meningitis linfocítica y en la mayoría de los pacientes con encefalomielitis, sin embargo, los pacientes con neuropatía periférica no presentan signos meníngeos ni producción intratecal de anticuerpos. En la fase crónica de la EL se acompaña de una pleocitosis linfocítica y elevación de IgG total (García y cols. 2014; Krämer 2014; Maroto y Gutiérrez 2009).

### 5.2.4 Histología

Los cortes histológicos se caracterizan por la presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas con tropismo por los vasos sanguíneos, algunas veces se pueden observar eosinófilos y polimorfonucleares. La principal razón para realizar un estudio histopatológico de las lesiones de Lyme es para descartar otros diagnósticos diferenciales.

Se puede detectar la presencia *in situ* de *Borrelia burgdorferi* s.l. mediante tinción con plata (Warthin-Starry) o inmunohistoquímica, sin embargo, son métodos que toman tiempo y difíciles de realizar, por lo que no se utilizan de manera rutinaria (Navarro 2005; Madigan y cols., 2009; Murray y cols. 2008).

### **5.2.5 Manifestaciones Dermatológicas de la Enfermedad de Lyme.**

**5.2.5.1 Eritema migratorio (EM).** Se presenta en 75 % de los casos como signo inicial. Es una lesión generalmente única, eritematosa, homogénea o circular, papular, no dolorosa, con diseminación centrifuga. Se desarrolla en 3 días a 16 semanas después de la mordedura de la garrapata y se resuelve espontáneamente en 3 a 6 semanas. En niños, se localiza en la cabeza, piernas, brazos y espalda. Se acompaña de fatiga y cefalea en el 50-60% de los casos, además de fiebre y artralgias en 30%. Las lesiones de EM múltiple son más pequeñas y se desarrollan cuando el paciente no recibió tratamiento. El cuadro histopatológico del EM es generalmente no específico, con alguna infiltración peri vascular principalmente de linfocitos y en algunas ocasiones células plasmáticas (Caride, 2002; Garcia y cols., 2014; López y Mada, 2003).

**5.2.5.2 Linfocitoma borrelial (LB).** Inicia de 6 a 180 días (en promedio 30 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 sólo hay un caso reportado. 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 brazos. 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. Es caracterizado por una infiltración linfocítica de la dermis por células plasmáticas, macrófagos, y eosinófilos, la histología puede ser una prueba confirmatoria en el diagnóstico del linfocitoma, pero los signos no son únicos y puede ser difícil diferenciar

de otros linfocitomas malignos (Caride, 2002; Garcia y cols., 2014; López y Mada, 2003).

**5.2.5.3 Acrodermatitis crónica atrófica (ACA).** Es una lesión atrófica de la piel, se presenta de 6 meses a años después de que ocurre la mordedura de la garrapata en el mismo sitio. La ACA y el Linfocitoma borrelial están bien documentados en pacientes europeos con Borreliosis de Lyme; sin embargo, en Estados Unidos son casos raros, y se asocian más con infección por *Borrelia afzelii* (Caride, 2002; Garcia y cols., 2014; López y Mada, 2003).

## 5.2.6 Métodos Moleculares

**5.2.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** La reacción en cadena de la polimerasa, son técnicas de gran ayuda diagnóstica, en la detección e identificación de microorganismos patógenos. El fundamento de la PCR, consiste en copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco, mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines. El desarrollo de esta técnica permite estudiar y manipular al ADN, facilitando el establecimiento de protocolos experimentales en biología molecular. El progreso de esta técnica ha sido muy notable y paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

La limitante más importante de esta técnica se debe al pequeño número de espiroquetas que se encuentran en tejidos infectados. La sensibilidad de la PCR para la detección de ADN de *Borrelia burgdorferi* s.l. en lesiones de EM varía del 33 al 88%. Sin duda, de todos los especímenes utilizados tanto para cultivo de *Borrelia burgdorferi*, como para su estudio molecular, los más prometedores son las muestras de biopsias de piel (López y Mada, 2003).

Se ha reportado que los resultados de muestras de fluidos corporales son pobres. Una excepción es la PCR de líquido sinovial, que es positiva en un 50-70%, mientras que los cultivos rara vez son de utilidad. La PCR es principalmente útil para el diagnóstico de los pacientes que se encuentran en el periodo de ventana entre la infección y la seroconversión con formación de anticuerpos, en quienes la serología resulta negativa, así como en el seguimiento de los pacientes, ya que se ha demostrado que la PCR se negativiza de forma posterior a un tratamiento adecuado. Actualmente la PCR de piel es el método más sensible para identificar especies de *Borrelia burgdorferi s.l.* en pacientes con EM.

La introducción de técnicas de biología molecular en Borreliosis de Lyme 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*.

La PCR puede ser tres veces más sensible que el cultivo en estadio temprano de Borreliosis de Lyme y podría ser un indicador de enfermedad diseminada. En biopsias de piel de pacientes con EM se logra aumentar la sensibilidad hasta 75%, con una especificidad del 97%, amplificando el gen *ospA*. En pacientes con manifestaciones tardías, como acrodermatitis crónica atrófica (ACA), la PCR tiene una sensibilidad del 57% comparada con el cultivo, donde la sensibilidad es de 19% y especificidad de 100%. En pacientes con artritis, se ha logrado cultivar la bacteria en líquido sinovial aunque es poco utilizada por los requerimientos exigentes de *Borrelia burgdorferi s.l.*, por lo que la PCR es de elección para la confirmación del diagnóstico con una sensibilidad del 88% y con especificidad de 100%, amplificando los genes *flagelar* y *ospA* (Delibes, 2014; Margos y cols., 2011; Karami, 2012; Maroto y Gutiérrez, 2009; Mayne, 2015; Janus, 2014).

### 5.2.7 Serología

Estos análisis se basan en la especificidad que muestran los anticuerpos contra distintos antígenos específicos de agentes infecciosos llevando a la identificación de éste. Las pruebas serológicas pueden apoyar el diagnóstico, pero no siempre son esenciales para realizarlo. Los métodos más utilizados en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA indirecto o de captura y Western-Blot o Immunoblot (Roitt, 2014; López y Mada, 2003).

Debido a las limitaciones para la detección directa de *Borrelia burgdorferi s.l.* en especímenes clínicos, los métodos de detección de anticuerpos han sido la modalidad de elección para apoyar el diagnóstico clínico de la Borreliosis de Lyme.

En términos generales el serodiagnóstico, con los distintos métodos disponibles, es complicado en la enfermedad de Lyme por las reacciones cruzadas de distintos polipéptidos con otros antígenos, la demora en el desarrollo de la respuesta inmune humoral y el efecto supresivo de la terapia antimicrobiana temprana sobre dicha respuesta. A pesar de todo, hoy en día son la mejor opción en pruebas de laboratorio con que se dispone para el diagnóstico (Maroto y Gutiérrez, 2009; Gordillo y cols., 2003; Krämer, 2014; Skinner, 2008).

**5.2.7.1 Inmunofluorescencia.** Esta técnica fue una de las primeras pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. Si estos son retenidos por los antígenos específicos, los complejos inmunes formados se harán visibles por la fluorescencia emitida por el anticuerpo marcado, al ser excitado por luz ultravioleta (López y Mada 2003).

El fenómeno de fluorescencia se produce por la propiedad de algunas moléculas para absorber luz a una longitud de onda y emitirla como una longitud de onda más larga. Si la luz emitida tiene una longitud de onda en la región visible del espectro, el colorante fluorescente puede usarse para obtener imágenes de cualquier molécula unida por ese colorante (Maroto y Gutiérrez, 2009; Fernández, 2003; Forbes, 2009; Abbas, 2012;).

#### **5.2.7.1.1 Tipos de Inmunofluorescencia.**

**Primaria o IFD:** La inmunofluorescencia primaria, o directa, también conocida por sus siglas IFD, hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluoróforo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente. En el caso de utilizarse como técnica de tinción inmunohistoquímica la región donde se deposita la molécula diana puede ser identificada al microscopio de fluorescencia como una zona brillante. Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la IFI (indirecta). Reduce el número de etapas necesarias, por lo tanto es más rápida y por otro lado es menos sensible a interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas.

**Secundaria o IFI:** La inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja que la IFD, requiere más pasos y es más posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es mucho más flexible que una técnica directa e implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica (Madigan y cols., 2009; Maroto y Gutiérrez, 2009; López y Mada, 2003).

**5.2.7.2 Western Blot.** Fue desarrollado en el laboratorio de George Stark, en la Universidad de Stanford. El nombre (Western, occidental en inglés) le fue dado por W. Neal Burnette.

Inmunoblot o electro transferencia, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada; mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (López y Mada, 2003).

Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

Esta técnica es hoy en día imprescindible en varios campos de la biología, como la biología molecular, la bioquímica, la biotecnología o la inmunología. Existe toda una industria especializada en la venta de anticuerpos monoclonales y policlonales.

De acuerdo a la CDC, una prueba de Western blot de IgM es considerada positiva si se encuentran presentes dos de las siguientes bandas 23 Y 41 kD. Mientras que para una prueba de Western blot de IgG es considerada positiva si se encuentran presentes 5 de la siguientes 10 bandas 18,23,28,30,39,41,45,58,66,y 39 kD (Krämer, 2014; Madigan M. y cols., 2009; Abbas, 2012;López y Mada 2003).



**5.2.7.3 ELISA** (acrónimo del inglés Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay: ‘ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas’). Este procedimiento tiene un gran número de importantes ventajas sobre la inmunofluorescencia, siendo ahora la prueba más frecuentemente utilizada en el serodiagnóstico de la enfermedad de Lyme, la principal ventaja de este método es su relativa facilidad para usarse en pruebas de gran escala. Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra (Abbas, 2012; Owen y cols., 2014).

Las enzimas conjugadas se seleccionan con base a su capacidad para catalizar la conversión de un sustrato en un producto coloreado, fluorescente o quimioluminiscente, con el fin de determinar cualitativa y cuantitativamente la reacción antígeno-anticuerpo mediante esta reacción. Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes hasta las actuales micro placas de 96 pocillos de plástico tratado, para aumentar su capacidad de adsorción (en su superficie) de moléculas, y con fondos de pocillo ópticamente claros que permitan realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA (Roitt, 2014).

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda; son las que se corresponden con las

necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados (Washington y cols., 2006; Abbas, 2012; Owen y cols., 2014; Roitt, 2014).

**5.2.7.3.1 Tipos de ensayos ELISA.** Cada tipo de ELISA puede usarse de manera cualitativa para detectar la presencia de anticuerpo o antígeno. En la actualidad se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales) o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes (Will y cols., 2006; Roitt, 2014).

**ELISA Indirecto:** Mediante este ensayo es posible detectar anticuerpos, o determinar su concentración. Se añade el suero o alguna otra muestra que contenga el anticuerpo primario (Ab1) a un pozo de microtitulación cubierto con antígeno, y se permite que reaccione con el antígeno fijo al pozo. Después de eliminar por lavado cualquier Ab1 libre, el anticuerpo unido al antígeno se detecta al añadir un anticuerpo secundario conjugado con una enzima Ab2 que se une a Ab1. De nuevo cualquier Ab2 es eliminado por lavado y se añade un sustrato para la enzima. Usando un lector de placa especializado, se mide la cantidad de producto de reacción coloreado, fluorescente, o luminescente que se forma, y se compara con la cantidad de producto generado cuando el mismo grupo de reacciones se efectúa usando una curva estándar de concentraciones Ab1 conocida (Roitt, 2014).

**ELISA Sándwich:** En esta técnica, el anticuerpo (en lugar del antígeno) es inmovilizado en un pozo de microtitulación, ésta permite que una muestra que contiene cantidades desconocidas de antígeno reaccione con el anticuerpo inmovilizado. Después que se lava el pozo, se añade el segundo anticuerpo específico ligado a enzimas para un epitopes diferente sobre el antígeno, y se permite que reaccione con el antígeno unido. Después de que cualquier segundo anticuerpo libre se elimina mediante lavado, se añade sustrato, y se mide el producto de la reacción colorimétrica (Winn y cols., 2006).

ELISA Competitivo: Esta variante proporciona una gran herramienta de alta sensibilidad para medir cantidades de antígeno. En esta técnica, primero se incuban anticuerpos en una solución con una muestra que contiene antígeno. La mezcla de antígeno-anticuerpo a continuación se añade a un pozo de microtitulación cubierto con antígeno. Mientras más antígeno está presente en la muestra de fase de solución inicial, menos anticuerpos libres estarán disponibles para unirse al pozo cubierto por antígeno. Después de eliminar por lavado el anticuerpo no unido, puede añadirse un Ab2 conjugado con enzima específico para el isotipo del Ab1 para determinar la cantidad de Ab1 unido al pozo. En este tipo de ensayo, cuanto más alta es la concentración de antígeno en la muestra original, más baja es la señal final (Winny cols., 2006; Roitt, 2014).

Sistema de enzimas disponibles para ELISA: Las tres enzimas comúnmente usadas son la fosfatasa alcalina, la beta-galactocidasa y la peroxidasa de rábano picante, cada una de las cuales puede usarse con sustratos cromogénicos. De estas tres la beta-galactocidasa es la que se emplea con menor frecuencia. El sustrato más común para la fosfatasa alcalina es el p-nitro-fenil fosfato, que es altamente soluble e incoloro. La fosfatasa alcalina divide el grupo fosfato desde este sustrato para dar p-nitrofenol, que es amarillo y absorbe luz a 460 nm. Tanto el sustrato como el producto son no tóxicos y de fácil adquisición. Como se mencionó anteriormente los sustratos cromogénicos, nos dan un producto coloreado y son particularmente útiles para ensayos cualitativos, pues pueden interpretarse a simple vista, se usan con rapidez, y no necesitan instrumentación costosa. Además de adaptarse a aplicaciones cuantitativas mediante el uso de una curva y un lector de placas espectrofotométricas. En contraste, los sustratos fluorogénicos y quimioluminogénicos ofrecen ventajas importantes en término de sensibilidad, pero requieren equipo especializado (Winn y cols., 2006; Madigan M. y cols., 2009; Roitt, 2014).

## **CAPÍTULO 6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Población de Estudio y Tamaño de Muestra**

Las muestras analizadas fueron aportadas por el Laboratorio de Investigación de Zoonosis y Enfermedades tropicales, el cual recibió un total de 94 de pacientes provenientes de los centros de salud ubicados en el sur del estado de Sonora, pertenecientes a los municipios de Huatabampo, Etchojoa, Navojoa y Álamos, que después de haber sido valorados, fueron referidos por presentar síndrome febril inespecífico, sin diagnóstico etiológico, durante el periodo de Enero a Octubre del 2013. A todos los pacientes incluidos en el estudio se les explicó el tipo de estudio y se obtuvo su consentimiento oral y escrito.

### **6.2 Criterios de Inclusión**

1. Pacientes con valoración clínica, con manifestaciones de síndrome febril inespecífico.
2. Pacientes que manifestaron síndrome febril inespecífico, que aprobaron la carta de consentimiento para la realización de los exámenes serológicos.

### **6.3 Criterios de Exclusión**

1. Pacientes con cuadros febriles identificables etiológicamente.
2. Pacientes que no acepten participar en el estudio.

### **6.4 Diagnóstico de Síndrome Febril Inespecífico**

La elección de los pacientes correspondió al diagnóstico clínico de síndrome febril inespecífico, los cuales fueron valorados en su unidad de salud correspondiente, en las

que se le realizó una exploración física, así como un interrogatorio, en el que se evalúan criterios propios al síndrome febril inespecífico.

### **6.5 Toma de Muestra y Transporte**

Se recolectó la muestra de sangre venosa periférica, se centrifugó para obtener el suero y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de efectuar el análisis de laboratorio.

### **6.6 Detección de Anticuerpos Contra *Borrelia burgdorferi* s.l.**

Todas las muestras se determinaron con la prueba de ELISA IgM e IgG (Diagnostic Automation, INC. Lyme Disease IgG e IgM, Cat # 1428-2Z y 1424-2Z respectivamente). Se consideró positivo el índice mayor 1.10, indeterminado de 0.91 a 1.09 y negativo menor 0.90 en ambas pruebas. Los datos fueron analizados utilizando estadística descriptiva y la prueba de Ji-cuadrada para análisis de frecuencia. El programa utilizado fue Sigma plot 11.0.

### **6.7 Preparación de Muestra y Reactivos**

- Los sueros al igual que reactivos fueron puestos a temperatura ambiente para su posterior utilización. ( $20-25^{\circ}\text{C}$ )
- Se realizó una dilución en una equivalencia de 1:21 del Control negativo, control positivo, calibrador y de cada suero analizado con el diluyente incluido en el kit. Una botella de 30 ml (tapa verde) que contiene, suero bovino Tween-20 albúmina y tamponada con solución fosfato-salina, ( $\text{pH } 7.2 \pm 0.2$ ) lista para usar.
- Se diluyó el tamoón de lavado concentrado en 10x: 1 parte de concentrado + 9 partes de agua des ionizada o destilada.

## 6.8 Procedimiento General

1. Retirar los componentes del almacenamiento y permitir que alcancen la temperatura ambiente (20-25 ° C).
2. Establecer el número de micropocillos necesarios para el estudio. Asignar seis determinaciones de control / calibrador (un blanco, un control negativo, un control positivo y tres calibradores) por serie. Un blanco de reactivo debe ejecutarse en cada ensayo. Comprobar software y requisitos de lectores para los controles correctos / configuraciones del calibrador. Devolver las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, sello, y regresar a su almacenamiento entre 2 y 8 ° C.
3. Preparar una dilución de uno y veintiún (por ejemplo: 10 $\mu$ L de suero + 200 $\mu$ L de diluyente de la muestra.) del Control negativo, control positivo, calibrador y de cada suero a analizar. (Tabla 10).
4. Añadir 100  $\mu$ L solución absorbente a los pocillos apropiados de una placa de dilución en blanco. Con una pipeta multicanal, transferir 50  $\mu$ L de cada muestra y control de suero diluido a la placa de dilución que contiene el absorbente. Retirar y expulsar las muestras varias veces para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
5. Para los pozos individuales, añadir 100  $\mu$ L de cada control diluido, calibrador y muestra de la placa de absorción a la placa de ensayo. Asegurar que las muestras se mezclen correctamente. Utilizar una punta de pipeta diferente para cada muestra.
6. Agregar 100  $\mu$ L de diluyente de muestras a A1 como blanco de reactivo.
7. Incubar la placa a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante 25 + 5 minutos.
8. Lavar las tiras de micropocillos 5 veces.
9. Añadir 100  $\mu$ L de conjugado a cada pocillo, incluyendo reactivos bien en blanco, a la misma velocidad y en el mismo orden que se añadieron las muestras.
10. Incubar la placa a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante 25 + 5 minutos.
11. Lavar las microplacas siguiendo el procedimiento como se describe en el paso 8.
12. Agregar 100  $\mu$ L de TMB a cada pocillo, incluyendo reactivos y en blanco, a la misma velocidad y en el mismo orden que los especímenes fueron añadidos.
13. Incubar la placa a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante 10 a 15 minutos.

14. Detener la reacción añadiendo 50  $\mu$ L de solución de parada a cada pocillo, incluyendo reactivos y en blanco, a la misma velocidad y en el mismo orden que se añadió que la TMB. Las muestras positivas se volverán de azul a amarillo. Después de añadir la solución de parada, pulsar en la placa varias veces para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.

15. Ajustar el lector de micro placas (Stat Fax 4700) a leer a una longitud de onda de 450 nm y medir la densidad óptica (DO) de cada pocillo en contra de la reactivo en blanco. La placa deberá leerse en los 30 minutos después de la adición de la solución de parada.

#### **6.9 Proceso de Lavado Automatizado.**

1. Si se utiliza un sistema automático de lavado (Stat Fax 2600), ajuste el volumen dispensado en 300-350 $\mu$ L / pocillo.
2. Programar el ciclo de lavado para 5 lavados sin interrupción entre los mismos.
3. Si es necesario, la placa de micro pocillos se puede quitar de la lavadora, invertida sobre una toalla de papel y golpeando con firmeza para eliminar cualquier solución de lavado residual de los pocillos.

#### **6.10 Pasos de Incubación:**

1. Los sueros se diluyen con el diluyente incluido en el kit. El diluyente de muestra contiene anti- IgG humana que precipita y quita IgG y el factor reumatoide de la muestra dejando IgM libre para reaccionar con el antígeno inmovilizado. Durante incubación, en la muestra, cualquier anticuerpo IgM específica de antígeno se unirá al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no unido y otros componentes del suero.
2. El conjugado con peroxidasa de cabra anti-IgM humana (cadena  $\mu$  específica) se añade a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el

anticuerpo IgM inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los pocillos para eliminar el conjugado no unido.

3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Después de un periodo de tiempo se detiene la reacción y la intensidad del color de la solución y se mide fotométricamente. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra de prueba original. Figura 7.

Nota: la única variante en el procedimiento entre IgM y IgG, es que para la evaluación de actividad de IgG se le añade al diluyente anticuerpos anti-IgM humana, precipitando éstos, y así evitar la competición y evaluar la actividad individual de éstos.



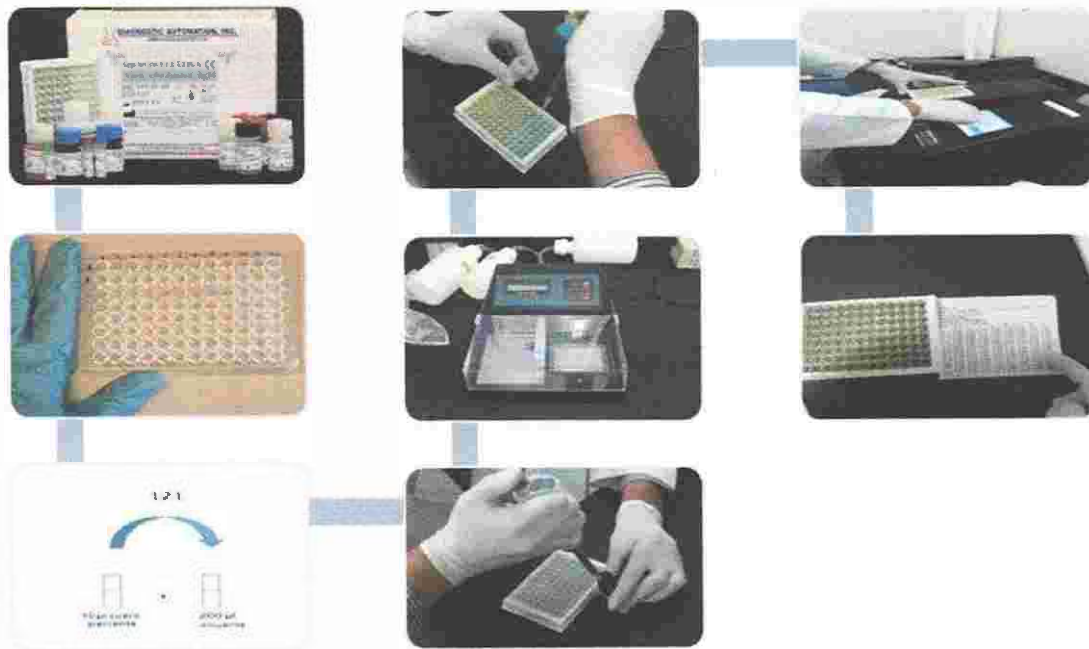


Figura 7. Diagrama de Flujo General

## 6.11 Interpretación de los Resultados

### A. Cálculos:

#### 1. Factor Corrección (CF)

Un valor de DO de corte para las muestras positivas se ha determinado por el fabricante y correlacionado con el calibrador. Los factores de corrección (CF) le permitirán determinar el valor de corte para las muestras positivas y corregir las pequeñas variaciones del día a día en los resultados de la prueba. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la lista de componentes que se encuentra en el cuadro del kit.

#### 2. Valor de corte o punto de corte DO

Para obtener el valor de corte DO, multiplique el CF por la DO media del calibrador determinado anteriormente. (CF x media de DO del calibrador = valor de corte DO)

#### 3. Valores índice o cocientes de DO

Calcule el valor índice o cociente de DO para cada muestra dividiendo su valor de DO por la DO de corte del el paso 2, Tabla 10.

Valores índices o cocientes de DO se interpretan de la siguiente manera:

Tabla 10. Interpretación de DO ELISA.

	<b>Valores índices o cocientes de DO</b>
Suero negativo	<0.90
Suero inseguro	0.91 a 1.09
Suero positivo	>1.10

La relación de OD se interpreta y se informó de la siguiente manera:

Negativa: No anticuerpo IgM detectable; el resultado no excluye la infección por *Borrelia burgdorferi s.l.* Una muestra adicional debe ser probada dentro 4-6 semanas si se sospecha infección temprana.

Equívoca: Las recomendaciones actuales indican que los resultados equívocos se deben seguir por suplementario prueba Western Blot. (Ensayos de Western Blot para anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi s.l.* son complementarios). Este resultado no debe ser reportado hasta que se complete la prueba suplementaria.

Positivo: anticuerpos IgM a *Borrelia burgdorferi s.l.* presuntamente detectado. Por recomendaciones actuales, el resultado no puede ser más interpretado sin suplementario prueba Western Blot. (Ensayos de Western Blot para anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi s.l.* son complementarios para su confirmación, ya que su especificidad no es la óptima, sobre todo para la detección de IgM.) Los resultados no deben ser reportados hasta que se complete la prueba suplementaria.

## 6.12 Control de Calidad

1. Cada vez que se realiza el ensayo el calibrador se debe ensayar por triplicado. Un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo deben también ser incluidos en cada ensayo.
2. Calcular la media de los tres pozos del calibrador. Si alguno de los tres valores difiere en más del 15% de la media, que deseche valor y calcular la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador y los valores de la DO para el Controles Positivo y Negativo deben caer dentro de los siguientes rangos:

RangoOD

Control Negativo  $< 0.250$

Calibrador  $> 0.300$

Control Positivo  $> 0.500$

- a. La DO del control negativo dividido por la DO media del calibrador debe ser  $< 0.9$ .
  - b. La DO del control positivo dividida por la DO media del calibrador debe ser  $> 1,25$ .
  - c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba debe considerarse inválida y se debe repetir.
4. El control positivo y control negativo se pretende verificar fallos sustanciales de los reactivos, y no aseguran la precisión en el ensayo de corte.
  5. Controles adicionales pueden ser probados de acuerdo con las directrices o requisitos de locales, estatales y / o federales u organizaciones de acreditación.
  6. Consulte el documento NCCLS C24: Control estadístico de la calidad de las mediciones cuantitativas de orientación sobre control de calidad adecuada prácticas.

## CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras procedentes de Huatabampo, Etchojoa, Navojoa, y Álamos. Todos estos Municipios pertenecientes al sur del estado de Sonora. Las muestras se obtuvieron mediante venopunción en 94 pacientes con manifestaciones clínicas de síndrome febril, con un promedio de edad de 27 años (límite de 2 a 59 años); la proporción por sexo fue de 54 mujeres (57%) y 40 hombres (43%).

La mediana de la edad de los pacientes seropositivos por ELISA fueron para IgM 22 años y para IgG 29 años. La mayor prevalencia se dió en personas de 21-30 años para los anticuerpos IgM e IgG. En estudios anteriores la mediana de la edad de los sujetos positivos fue de 20 - 40 años, coincidiendo, en las edades activas laboralmente, quizá el contacto con el vector de *Borrelia burgdorferi s.l.* está relacionada con la exposición ocupacional (Gordillo y cols., 2003).

Se realizó un análisis estadístico respecto a las ocupaciones de los pacientes analizados. En la Tabla 11 se muestran los porcentajes en relación al sexo de los pacientes analizados, así como el trabajo que éstos desempeñan.

Tabla II. Características sociodemográficas de la población estudiada.

<b>Procedencia</b>	<b>Mujeres n (%)</b>	<b>Hombres n (%)</b>	<b>Total n (% de total)</b>
Navojoa	34(62.9 %)	20(37.1 %)	54(57.4%)
Álamos	0(0.0 %)	5(100 %)	5(5.3 %)
Huatabampo	13(52.0 %)	12(48.0 %)	25(26.6 %)
Etchojoa	7(70 %)	3(30 %)	10(10.6 %)
<b>Ocupación</b>			
Estudiante	16(45.7 %)	19(54.3 %)	35(37.2%)
Jornalero	0(0.0 %)	3(100 %)	3(3.2%)
Carnicero	0(0.0 %)	1(100%)	1(1.0 %)
Profesionista	4(66.0 %)	2(33.4 %)	6(6.4 %)
Ama de casa	12(100.0%)	0(0.0 %)	12(12.8%)
Obreros	4(100.0 %)	0(0.0 %)	4(4.3 %)
Otras actividades	18(54.5 %)	15 (45.5 %)	33 (35.1 %)
<b>Total</b>	<b>54(57.4 %)</b>	<b>40(42.6%)</b>	<b>94(100 %)</b>

### **7.1 Características Sintomatológicas en los Pacientes Analizados:**

Los pacientes seropositivos fueron clasificados según la sintomatología clínica que presentaron, el (100 %) de ellos presentó fiebre, (96%) cefalea, (96%) dolores musculares, (89%) artralgia, mialgias (96%) y escalofríos (65 %), ninguno reportó eritema migratorio. Estos resultados son similares a los reportados por otros investigadores quienes refieren que estos signos síntomas clínicos son sugestivos a Borreliosis de Lyme (Winn y cols., 2006; Aránzazu y Oteo, 2014; García y cols., 2014).

### **7.2 Detección de IgM Contra *Borrelia burgdorferi***

La detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi s.l.* se llevó de acuerdo al protocolo del método ELISA comercial (Diagnostic automation inc.), las lecturas obtenidas fueron expresadas como DO (densidad óptica). Los valores control de DO obtenidos en el presente trabajo fueron 0.053 (control negativo) y 3.447 (control positivo) los cuales se hallaron dentro de los parámetros del proveedor.

La Tabla 12 muestra los resultados de DO de los pacientes incluidos en el estudio. Se observó que las muestras analizadas positivas para IgM fueron 31 muestras, de las cuales 20 (65%) correspondían a casos del sexo femenino y 11 (35%) casos masculinos.

Por ELISA se detectaron 31 (32%) sueros con anticuerpos IgM contra *Borrelia burgdorferi s.l.* de los cuales se manejó porcentualmente en base a su procedencia los cuales se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12. Resultados espectrofotométricos para la detección de IgM.

0.053*	0.213	0.678	1.261	0.52	0.391
3.447**	0.152	0.184	0.284	0.371	0.706
0.162	0.097	0.188	0.175	1.497	0.753
0.496	0.364	0.579	1.099	0.469	0.74
0.358	0.396	0.49	0.391	0.553	0.684
0.306	0.7870	0.444	1.337	0.376	0.13
0.78	0.354	0.393	0.151	0.596	0.337
0.34	0.222	0.738	0.393	0.664	0.346
0.396	0.423	0.899	1.174	0.914	0.902
0.511	0.434	0.413	0.477	0.61	2.31
0.309	0.196	0.612	0.998	0.399	
3.435	0.567	0.229	0.167	0.367	
0.054	0.824	0.397	0.296	0.43	
0.287	0.334	0.077	0.324	0.291	
0.234	0.603	0.115	0.625	0.449	
0.062	0.148	0.045	0.482	0.243	

\*control negativo, \*\*control positivo, Lecturas DO.

Tabla 13. Resultados de seropositividad de IgM en base a la procedencia de la muestra

Navojoa	Álamos	Huatabampo	Etchojoa	indeterminados
16 (52%)	4 (13%)	9 (29%)	2 (6%)	9 (10%)

De acuerdo a la CDC, una prueba de Western blot confirmatoria de IgM es considerada positiva si se encuentran presentes dos de las siguientes bandas 23 Y 41 kD (García, 2005).



### 7.3 Detección de IgG Contra *B. burgdorferi*

La detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi s.l.* se llevó de acuerdo al protocolo del método ELISA comercial (Diagnostic automation inc.), las lecturas obtenidas fueron expresadas como DO (densidad óptica). Los valores control de DO obtenidos en el presente trabajo fueron 0.048 (control negativo) y 2.916 (control positivo) los cuales se hallaron dentro de los parámetros del proveedor.

La Tabla 14 muestra los resultados de DO de los pacientes incluidos en el estudio. Para IgG en el que se analizaron 19 muestras, 15 (79%) femenino y 4 (21%) masculino.

Por ELISA se detectaron 19 (20%) sueros positivos con anticuerpos IgG contra *Borrelia burgdorferi s.l.* de los cuales se manejó porcentualmente base a su procedencia. A continuación se muestran en la Tabla 15.

De acuerdo a la CDC, una prueba de Western blot de IgG es considerada positiva si se encuentran presentes 5 de la siguientes 10 bandas 18,23,28,30,39,41,45,58,66,y 39 kD (García , 2005).

La relación entre hombre y mujer en IgG fue de 1:3.75 y para IgM 1:1.8, estos resultados muestran una mayor tendencia de las mujeres en estar en contacto con el vector de transmisión de la enfermedad de Lyme, posiblemente su área de desenvolvimiento tenga un mayor contacto con el vector transmisor, otro factor importante es la edad de los pacientes, ya que en la estadística se muestra que la mediana se encuentra entre los 21 y 30 años en los casos positivos, una edad laboral ciertamente. Contradiendo resultados anteriores como los realizados por Gordillo y cols., 2003, en los que mostraba una prevalencia mayor en hombres.

Tabla 14. Resultados espectrofotométricos para la detección de IgG.

<b>0.048*</b>	0.25	0.15	0.17	0.122	0.552
<b>2.916**</b>	0.126	0.265	0.287	0.086	0.423
0.113	0.489	0.134	0.544	0.127	0.184
0.103	0.272	0.673	0.292	0.086	0.111
0.009	0.131	0.088	0.333	0.127	0.131
0.121	0.452	0.705	0.354	0.697	0.291
0.129	0.178	0.207	0.275	0.165	0.355
0.135	0.876	0.186	0.312	0.356	0.179
0.275	0.391	0.153	0.328	0.438	0.215
0.424	0.336	0.072	0.297	0.317	
0.122	0.217	0.161	0.112	0.171	
0.348	0.329	0.633	0.479	0.632	
0.263	0.238	0.2	0.166	0.115	
0.056	0.45	0.206	0.223	0.237	
0.258	0.199	0.261	0.159	0.057	
0.428	0.317	0.64	0.107	0.463	

\*control negativo, \*\*control positivo, Lecturas DO.

Tabla 15. Resultados de seropositividad de IgG en base a la procedencia de la muestra.

Navojoa	Álamos	Huatabampo	Etchojoa	indeterminados
13 (69%)	0	5 (26%)	1 (5%)	5 (5%)

Es importante mencionar que en el periodo en que se tomaron las muestras, de enero a octubre, coincide con el estadio de ninfa del vector siendo ésta la más peligrosa para los humanos ya que son diminutas (miden aproximadamente 1 mm de diámetro), por lo que son difíciles de detectar y porque son más activas durante los meses de verano, concordando con el pico de actividades al aire libre.

## CAPITULO 8. CONCLUSION

En el presente estudio se determinó la relación entre el síndrome febril inespecífico asociado a la Borreliosis de Lyme, en pacientes procedentes del sur del estado de Sonora; mediante el método de ELISA, determinando los anticuerpos IgM e IgG contra *Borrelia burgdorferi*. Los resultados obtenidos mostraron una seroprevalencia en ambos anticuerpos de los pacientes, con lo cual, se concluye que la enfermedad se encuentra presente en la región debido a su polimorfismo clínico que dificulta su diagnóstico y por tal motivo la presencia de esta enfermedad está subregistrada.

## GLOSARIO

**Meningitis Aséptica:** El término meningitis aséptica se utiliza para definir aquellas meningitis agudas, de etiología infecciosa o no, caracterizadas por la presencia de pleocitosis linfocitaria en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en las cuales no se identifica una causa aparente después de una primera evaluación y de realizar las tinciones y cultivos de rutina en el LCR.

**Neuropatía Periférica:** La neuropatía es la afección de algunos o todos los nervios periféricos que afectan a los axones, la vaina de mielina, o ambas. Se manifiestan por una combinación de signos y síntomas sensoriales.

**Artralgias:** El término "artralgias" engloba todo tipo de dolores a nivel de las articulaciones. El dolor puede ser de origen mecánico, después de repetidos esfuerzos, o inflamatorio, en cuyo caso está presente desde el momento de levantarse por la mañana y está asociado con rigidez muscular. La artralgia a menudo va ligada a la artrosis, a la artritis o a un esguince.

**La Odinofagia:** es el dolor que se produce cuando pasan los alimentos por el tracto gastrointestinal superior. Afecta especialmente a la faringe (el tubo que conecta la boca hasta el esófago) en el momento en que se ingiere un alimento (deglución) así como al esófago a través del cual pasan los alimentos para llegar al estómago. La odinofagia puede ser un síntoma de diversas enfermedades como las anginas y la faringitis, pues es la irritación local del fondo de la garganta la que provoca este síntoma.

**La Rinitis Aguda:** se manifiesta con síntomas de obstrucción nasal, rinorrea acuosa, prurito nasal y ocular y estornudos en salva, desencadenados en relación con la etiología causante. Así podremos clasificarla en alérgica y no alérgica. Dentro de las de causa noalérgica tendremos los síntomas de rinitis asociados al catarro común, tanto de etiología vírica, la más frecuente, como bacteriana. El forúnculo del vestíbulo nasal no es puramente una rinitis bacteriana, ya que no cumple todos los síntomas anteriormente nombrados, pero si la podemos considerar una rinitis circunscrita.

La Urticaria: tiene gran variedad de presentaciones clínicas y causas. Se caracteriza por la presencia de ronchas o placas eritematosas, edematosas, transitorias de diferente tamaño. Es una de las enfermedades dermatológicas más frecuentes. Se clasifica de acuerdo con el tiempo de evolución, en aguda (menos de 6 semanas) o crónica (más de 6 semanas).

EL Eccema: es una afección frecuente de la piel, no contagiosa. Aparece con frecuencia desde la infancia y preferentemente en los niños con predisposición alérgica; de ahí su posible asociación con otras enfermedades llamadas atópicas como el asma sobretodo. El eccema se caracteriza por manchas rojas ligeramente sobrelevadas sobre la que pueden aparecer vesículas (tipo de erupción transparente, que dan la impresión de contener un líquido) y evolucionar hacia costras. Estas lesiones pican mucho. También puede ser causado por ciertos productos irritantes. En caso de afectación importante se pueden prescribir antihistamínicos o cremas de esteroides.

Síndrome Bannwarth: Causado por *Borrelia burgdorferi s.l.* bacteria causante de la enfermedad de Lyme. Parálisis facial aguda uni o bilateral asociada a meningoradiculitis con reacción linfocítica y unos niveles de proteína incrementado en el LCR con mínimo o ningún síntoma meníngeo. Puede cursar con anorexia, cefalea, diplopia, parestesias, eritema migrans etc. Los hombres son más frecuentemente afectados que las mujeres, siendo los meses de Agosto y Septiembre los de mayor incidencia.

Linfadenopatía: Hablamos de linfadenopatía cuando existe una anomalía en el tamaño, consistencia o número de los nódulos linfáticos, causada por la invasión ó propagación de células inflamatorias o neoplásicas dentro del nódulo. Los nódulos o ganglios linfáticos son los órganos con más capacidad de reacción del sistema inmune. Pueden ser:

- Localizadas (el 75% del total): Sólo afectación de un área anatómica.

- Generalizadas (el 25% restante): dos o más áreas NO contiguas afectadas.

Región Acral: localizado en la porción distal de las extremidades (palmas, plantas, dedos, región subungueal y superficie dorsal).

**Encefalopatía:** El término encefalopatía significa desorden o enfermedad del encéfalo. En el uso moderno, encefalopatía refiere a un síndrome de disfunción cerebral, el cual puede ser causado por múltiples etiologías.

**Cardiopatía:** En sentido amplio, el término cardiopatía puede englobar a cualquier padecimiento del corazón o del resto del sistema cardiovascular. Habitualmente se refiere a la enfermedad cardíaca producida por asma o por colesterol. Sin embargo, en sentido estricto se suele denominar cardiopatía a las enfermedades propias de las estructuras del corazón.

**Neuroborreliosis:** Es un trastorno del sistema nervioso central causada por la infección con una espiroqueta del género *Borrelia*. La progresión microbiológica de la enfermedad es similar a la de la neurosífilis, otra infección por espiroquetas. Neuroborreliosis ocurre como una manifestación tardía de la enfermedad de Lyme, aunque también se ha informado durante la infección temprana.

## REFERENCIAS

- Abbas A. (2012). *Inmunología celular y molecular*. (7ª ed.) (pp. 345-364). Madrid, España. Elsevier Saunders.
- Alekseev A., Dubinina H., Movila A., Toderas I. y Uspenskaia I. (2012). *Lyme disease*. 1ª edición, (pp. 27-54). Shanghai, China. InTech.
- Allen S., Janda W., Koneman E., Schrenckenberger P., Procop G., Winn W. y Woods G. (2006). *Koneman diagnóstico microbiológico*. (6ª ed.) (pp.1086-1091). Buenos Aires Argentina. Editorial medica Panamericana.
- Aránzazu-Portillo S. y Oteo J. (2014). Enfermedad de Lyme. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 32 (1): 37-42.
- Félix J. (2010). *Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos*. Tesis doctoral, Universidad de León. Vasco, España.
- Beall, M., Breitschwerdt, E., Cerrito B., Chandrashekar R., Hegarty B., Liu J., Qurollo B., Stillman B., Pultorak E., Thatcher B., and Walsh M. (2014). A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infection Ecology and Epidemiology*, 4, 1-12.
- Boder E., Coumou J., Fikrig E., Hovius J., Schuijt T. and Narasimhan S. (2014). A Tick Gut Protein with Fibronectin III Domains Aids *Borrelia burgdorferi* Cotgregation to the Gut during Transmission. *PLoS Pathog* 10(8), 1-13.
- Boria-Gamboa B. (2012). "Enfermedad de Lyme: presentación de casos clínicos y conocimiento de la enfermedad entre veterinarios y estudiantes en los municipios de Veracruz y Boca del río". Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Veracruz, México.
- Bonilla D., Hardstone M., Kramer V., Kjemtrup A., Sola M., Padgett K. y Quintana M. (2014) Large Scale Spatial Risk and Comparative Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* *Sensu Lato* in *Ixodes pacificus*. *PLoS ONE*, 9 (10), 1-10.
- Bowman A., Forbes K., Gilbert L. y James M. (2014). The heterogeneity, distribution, and environmental associations of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme Borreliosis, in Scotland. *Front.PublicHealth*.2 (129), 1-10.
- Burton D., Delves P., Martin S. y Roitt I. (2014). *Roitt fundamentos inmunología*. (pp. 141-187). (12ª ed.) Madrid, España. Editorial Médica Panamericana

Buczek A. (2014). Threat of attacks of *Ixodes ricinus* ticks (*Ixodida: Ixodidae*) and Lyme Borreliosis within urban heat islands in south-western Poland. *Parasites & Vectors*. 7(562), 1-9.

Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Jameson J., Kasper D., Long D. y Loscalzo J. (2009). *harrison principios de medicina interna*. (pp.1058-1168) vol.1. (17ª ed.) New York, USA. Mc Graw Hill.

Caride-Villaamil E. (2002). *Epidemiología de Borrelia burgdorferi s.l. (Enfermedad de Lyme) en un ecosistema de pinar de montaña supra Mediterráneo*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria. Madrid, España.

Clark D., Dunlap P., Madigan M. y Martinko M. (2009). *brock biología de los microorganismos*. (pp. 1126-1128). (12ª ed.). Madrid España. Pearson Addison Wesley.

Davis S., Dunn J., Fitzpatrick M., Krause P., Vannier E. y col. (2014). *Borrelia burgdorferi* Promotes the Establishment of *Babesia microti* in the Northeastern United States. *PLoS ONE*, 9 (12), 1-21.

Dadhwal P., Li X., Liang F., Shi Y. (2014) BosR Functions as a Repressor of the ospAB Operon in *Borrelia burgdorferi*. *PLoS ONE*, 9 (10), 1-9.

Desrosiers N., Gaitan J., Gonzalez A., Fiset J., Koffi K., Lapointe F., Leighton P., Lindsay L., Suter D., Marotte R., Millien V., Milord F. y Rogic A. (2014). Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evolutionary Applications*, 7, 750-764.

Delibes, M. (2014). Molecular Characterization of *Borrelia burgdorferi* from Case of Autochthonous Lyme Arthritis. *Emerging Infectious Diseases*. 20 (12), 2168- 2170.

Feria-Arroyo T. y col. (2014). Implications of climate change on the distribution of the tick vector *Ixodes scapularis* and risk for Lyme disease in the Texas-Mexico transboundary region. *Parasites & Vectors*. 7 (199), 1-16.

Fernández-Soto P. (2003). *Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca facultad de biología. Salamanca, España.

Forbes B. (2009). *Bailey & Scott diagnóstico microbiológico*. (pp. 533-542). (12ª ed.). Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.



Fingerle V., Klier C., Stark K., Thamm M. and Wilking H. (2015). Antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato among Adults, Germany, 2008–2011. *Emerging Infectious Diseases*, 21 (1), 107-110.

Fish D., Margos G., Ogden N. y Vollmer S. (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection Genetics and Evolution*. 11, 1545–1563.

Fuentes-Moreno H., Montiel-Parra G. y Vargas M. (2007). Primer registro de *Ixodes cookei* (Acari: Ixodidae) para México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78, 205-206.

García-Meléndez M., Salas-Alanis J., Skinner-Taylor C. y Ocampo-Candiani J. (2014). Enfermedad de Lyme: actualizaciones. *Gaceta Médica de México*, 150, 84-95.

Garduño V., Gordillo G., Solórzano F., Muñoz O., Tapia R., y Torres J. (2003). Estudio seroepidemiológico de Borreliosis de Lyme en la Ciudad de México y el noreste de la República Mexicana. *Gaceta medica Mexicana*, 45, 351-355.

Gern L. y Herrmann C. (2015). Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, 8 (6) 1-8.

Gomes-Solecki M. (2014). Blocking pathogen transmission at the source: reservoir targeted OspA-based vaccines against *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4 (136), 1-7.

Gordillo Pérez M., Solórzano Santos F. (2010). Enfermedad de Lyme. Experiencia en niños mexicanos. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 67, 164-176.

Golovchenko M., Grubhoffer L., Hajdusek O., Oliver J. y Rudenko N. (2014). Invasive potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ospC type L strains increases the possible disease risk to humans in the regions of their distribution. *Parasites & Vectors*, 7 (538), 1-4.

Goldsby R., Osborne B. y Kindt T. (2014) *kuby inmunología*. (pp. 455-458). (6ª ed.) Madrid, España. Me Graw Hill

Guerrero-Espejo A. y Escudero-Nieto R. (2005). Enfermedades producidas por *Borrelia*. *Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales*. 23 (4), 232-240.

Infante-Ferrer J., Ramírez-Reyes C., Orestes-Herrera L. y Lavastida-Hernández H. (2011). Enfermedad de Lyme: historia, microbiología, epizootiología y epidemiología. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 50 (2), 231-244.

- Karami A. (2012). *Lyme Disease*. (pp. 1-26). (1ª ed.) Shanghai, China. InTech.
- Kramer F. (2014). Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. *Parasitol Res.*, 113, 3229–3239.
- Leong J., Lin Y., Martinez R. y Yang X. (2014) Strain-Specific Variation of the Decorin-Binding Adhesin DbpA Influences the Tissue Tropism of the Lyme Disease Spirochete. *PLoS Pathog.*, 10 (7), 1-14.
- López C. y Mada G. (2003) *Borrelia burgdorferi* causante de la enfermedad de Lyme. Tesis grado licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de ciencias biológicas y de la salud. Departamento químico biológico. Hermosillo, Son. México.
- Mayne P. (2015). Clinical determinants of Lyme Borreliosis, Babesiosis, Bartonellosis, Anaplasmosis, and Ehrlichiosis in an Australian cohort. *International Journal of General Medicine.* 8, 15–26.
- Murray P., Rosenthal K. y Pfaffer M. (2008) *Microbiología médica*. (pp. 427-442). (5ª ed.) Madrid, España. Elsevier.
- Navarro-García A. (2005). *Borreliosis de Lyme: estudio de posibles vectores ixódidos y evaluación de métodos de diagnóstico microbiológico*. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, España.
- Oteo J., Palomar A., Pesquera C. y Portillo A. (2015). Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.* and *Borrelia spp.*) in ticks collected from andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites & vectors.* 8 (46), 1-10.
- Petnicki-Ocwieja T. y Kern A. (2014). Mechanisms of *Borrelia burgdorferi* internalization and intracellular innate immune signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 4 (175), 1-7.
- Rodríguez-González I. (2011). *Evidencias de infección por Borrelia burgdorferi sensu lato en Cuba*. Tesis doctoral. Instituto de medicina tropical “Pedro Kourí”. Departamento de bacteriología-micología. La Habana, Cuba.
- Rodríguez-González C. (2013). Actualización acerca de *Borrelia burgdorferi sensu lato* y enfermedad de Lyme. *Revista Cubana de Medicina Tropical “Pedro Kourí” La Habana, Cuba.* 65 (2), 149-165.
- Romero Cabello R. (2011). *Microbiología y parasitología humana*. (pp. 583-589). (3ª ed.) DF, Mexico. Editorial Medica Panamericana.

Rolla D. (2014). Post-infectious glomerulonephritis presenting as acute renal failure in a patient with Lyme. *Disease Journal of Renal Injury Prevention*. 3 (1), 17-20.

Sotelo-Cruz N. y Valencia-Mayoral P. (2012). Borreliosis, fiebre recurrente causada por espiroquetas. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 69 (2), 121-125.

Skinner-Taylor C, Flores-González M, Colunga-Pedraza I, Salinas-Palacios K, Garza-Elizondo M (2007). Artículo de revisión. Enfermedad de Lyme. *Medicina Universitaria* 9(34), 24-32.

Skinner-Taylor C. (2008). *Seropositividad contra Borrelia burgdorferi en una población Mexicana con sintomatología sugestiva de Enfermedad de Lyme*. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

## ANEXOS

### Insertos ELISA para la detección de IgM



**DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.**  
23961 Craftsman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302  
Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383  
[onestep@rapidtest.com](mailto:onestep@rapidtest.com)  
[technicalsupport@rapidtest.com](mailto:technicalsupport@rapidtest.com)  
[www.rapidtest.com](http://www.rapidtest.com)



## Lyme Disease IgM

Cat# 1424-2Z  
For *in vitro* diagnostic use

#### INTENDED USE

Diagnostic Automation *Borrelia burgdorferi* IgM ELISA kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative presumptive detection of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* in human serum. This ELISA test should only be used for patients with signs and symptoms that are consistent with Lyme disease. Equivocal or positive results must be supplemented by testing with a standardized Western Blot procedure. Positive supplemental results are supportive evidence of exposure to *B. burgdorferi* and can be used to support a clinical diagnosis of Lyme disease.

#### SIGNIFICANCE AND BACKGROUND

*Borrelia burgdorferi* is a spirochete that causes Lyme disease. The organism is transmitted by ticks of the genus *Ixodes*. In endemic areas, these ticks are commonly found on vegetation and animals such as deer, mice, dogs, horses, and birds.

*B. burgdorferi* infection shares features with other spirochetal infections (diseases caused by three genera in humans: *Treponema*, *Borrelia*, and *Leptospira*). Skin is the portal of entry for *B. burgdorferi* and the tick bite often causes a characteristic rash called erythema migrans (EM). EM develops around the tick bite in 60% to 80% of patients. Spirochetemia occurs early with wide spread dissemination through tissue and body fluids. Lyme disease occurs in stages, often with intervening latent periods and with different clinical manifestations.

In Lyme disease there are generally three stages of disease often with overlapping symptoms. Symptoms vary according to the sites affected by the infection such as joints, skin, central nervous system, heart, eye, bone, spleen, and kidney. Late disease is most often associated with arthralgias or CNS syndromes. Asymptomatic subclinical infection is possible and infection may not become clinically evident until the later stages.

Patients with early infection produce IgM antibodies during the first few weeks after onset of EM and produce IgG antibodies more slowly (1). Although IgM only may be detected during the first month after onset of illness, the majority of patients develop IgG antibodies within one month. Both IgG and IgM antibodies can remain detectable for years.

Isolation of *B. burgdorferi* from skin biopsy, blood, and spinal fluid has been reported (2). However, these direct culture detection methods may not be practical in the large scale diagnosis of Lyme borreliosis. Serological testing methods for antibodies to *B. burgdorferi* include indirect fluorescent antibody (IFA) staining, immunoblotting, and enzyme immunoassay (EIA).

*B. burgdorferi* is antigenically complex with strains that vary considerably. Early antibody responses often are to flagellum which has cross reactive components. Patients in early stages of infection may not produce detectable levels of antibody. Also, early antibiotic therapy after EM may diminish or abrogate good antibody response. Some patients may never generate detectable antibody levels. Thus, serological tests for antibodies to *B. burgdorferi* are known to have low sensitivity and specificity and because of such inaccuracy, these tests cannot be relied upon for establishing diagnosis of Lyme disease (3,4).

In 1994, the Second National Conference on Serological Diagnosis of Lyme disease recommended a two-step testing system toward standardizing laboratory serologic testing for *B. burgdorferi*. Because EIA and IFA methods were not sufficiently specific to support clinical diagnosis, it was recommended that positive or equivocal results from a sensitive EIA or IFA (first step) should be further tested, or supplemented, by using a standardized Western Blot method (second step) for detecting antibodies to *B. burgdorferi* (Western Blot assays for antibodies to *B. burgdorferi* are supplemental rather than confirmatory because their specificity is less than optimal, particularly for detecting IgM). Two-step positive results provide supportive evidence of exposure to *B. burgdorferi*, which could support a clinical diagnosis of Lyme disease but should not be used as a sole criterion for diagnosis.

#### PRINCIPLE OF THE ELISA ASSAY

The DAI Scientific, Inc. *Borrelia burgdorferi* ELISA test system is designed to detect IgM class antibodies to *B. burgdorferi* in human sera. Wells of plastic microwell strips are sensitized by passive adsorption with *B. burgdorferi* antigen. The test procedure involves three incubation steps:

1. Test sera are diluted with the Sample Diluent provided. The Sample Diluent contains anti-human IgG which precipitates and removes IgG and rheumatoid factor from the sample leaving IgM free to react with the immobilized antigen. During sample incubation, any antigen specific IgM antibody in the sample will bind to the immobilized antigen. The plate is washed to remove unbound antibody and other serum components.

2. Peroxidase Conjugated goat anti-human IgM ( $\mu$  chain specific) is added to the wells and the plate is incubated. The Conjugate will react with IgM antibody immobilized on the solid phase in step 1. The wells are washed to remove unbound Conjugate.
3. The microwells containing immobilized peroxidase Conjugate are incubated with peroxidase Substrate Solution. Hydrolysis of the Substrate by Peroxidase produces a color change. After a period of time the reaction is stopped and the color intensity of the solution is measured photometrically. The color intensity of the solution depends upon the antibody concentration in the original test sample.

#### MATERIALS PROVIDED

Each kit contains the following components in sufficient quantities to perform the number of tests indicated on packaging label  
 Note: All reactive reagents contain sodium azide as a preservative at a concentration of 0.1% (w/v).

PLATE	1. Plate. 96 wells configured in twelve 1x8-well strips coated with inactivated <i>B. burgdorferi</i> (B31 strain) antigen. The strips are packaged in a strip holder and sealed in an envelope with desiccant.
CONJ	2. Conjugate. Conjugated (horseradish peroxidase) goat anti-human IgM ( $\mu$ chain specific). Ready to use. One, 15 mL vial with a white cap.
CONTROL +	3. Positive Control (Human Serum). One, 0.35 mL vial with a red cap.
CAL	4. Calibrator (Human Serum). One, 0.5 mL vial with a blue cap.
CONTROL -	5. Negative Control (Human Serum). One, 0.35 mL vial with a green cap.
SOLN ABSORBENT	6. Absorbent Solution. One 12 mL bottle containing goat anti-human IgG ( $\gamma$ chain specific) and phosphate-buffered-saline, (pH 7.2 $\pm$ 0.2). Ready to use.
DILSPE	7. Sample diluent. One 30 mL bottle (green cap) containing Tween-20, bovine serum albumin and phosphate-buffered-saline, (pH 7.2 $\pm$ 0.2). Green solution, ready to use. Note: Shake Well Before Use. (Product # 007). Preservative added.
SOLN TMB	8. TMB: One 15 mL amber bottle (amber cap) containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Ready to use. Contains DMSO < 15% (w).
SOLN STOP	9. Stop solution: One 15 mL bottle (red cap) containing 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.7M HCl. Ready to use.
WASHBUF 10X	10. Wash buffer concentrate (10X): dilute 1 part concentrate to 9 parts deionized or distilled water. One 100 mL bottle (clear cap) containing a 10X concentrated phosphate-buffered-saline and Tween-20 solution (blue solution). NOTE: 1X solution will have a pH of 7.2 $\pm$ 0.2.

The following components are not kit lot number dependent and may be used interchangeably with the ELISA assays: TMB, Stop Solution, and Wash Buffer

#### Note: Kit also contains:

1. Component list containing lot specific information is inside the kit box.
2. Package insert providing instructions for use.

#### PRECAUTIONS

1. For *In vitro* Diagnostic Use.
2. Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves, and eyeface protection. Do not breathe vapor. Dispose of waste observing all local, state, and federal laws.
3. The wells of the ELISA plate do not contain viable organisms. However, the strips should be considered **POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIALS** and handled accordingly.
4. The human serum controls are **POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIALS**. Source material from which these products were derived were found negative for HIV-1 antigen, HBsAg, and for antibodies against HCV and HIV by approved test methods. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these products should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", current edition, and OSHA's Standard for Bloodborne Pathogens (19).
5. The sample diluent, wash buffer, absorbent, and conjugate contain sodium azide at a concentration of 0.1% (w/v). Sodium azide has been reported to form lead or copper azides in laboratory plumbing which may cause explosions on hammering. To prevent, rinse sink thoroughly with water after disposing of solution containing sodium azide.
6. Adherence to the specified time and temperature of incubations is essential for accurate results. All reagents must be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the assay. Return unused reagents to refrigerated temperature immediately after use.
7. Improper washing could cause false positive or false negative results. Be sure to minimize the amount of any residual wash solution (e.g. by blotting or aspiration) before adding Conjugate or Substrate. Do not allow the wells to dry out between incubations.
8. The Stop Solution is TOXIC. Causes burns. Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

DAI Code # 1424-2

2

9. The TMB Solution is HARMFUL. Irritating to eyes, respiratory system and skin.
10. The Wash Buffer concentrate is an IRRITANT. Irritating to eyes, respiratory system and skin (Continue Numbering from above.)
11. Wipe bottom of plate free of residual liquid and/or fingerprints that can alter optical density (OD) readings.
12. Dilution or adulteration of these reagents may generate erroneous results.
13. Reagents from other sources or manufacturers should not be used.
14. TMB Solution should be colorless, very pale yellow, very pale green, or very pale blue when used. Contamination of the TMB with conjugate or other oxidants will cause the solution to change color prematurely. Do not use the TMB if it is noticeably blue in color.
15. Never pipette by mouth. Avoid contact of reagents and patient specimens with skin and mucous membranes.
16. Avoid microbial contamination of reagents. Incorrect results may occur.
17. Cross contamination of reagents and/or samples could cause erroneous results.
18. Reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed free of all detergents.
19. Avoid splashing or generation of aerosols.
20. Do not expose reagents to strong light during storage or incubation.
21. Allowing the microwell strips and holder to equilibrate to room temperature prior to opening the protective envelope will protect the wells from condensation.
22. Wash solution should be collected in a disposal basin. Treat the waste solution with 10% household bleach (0.5% sodium hypochlorite). Avoid exposure of reagents to bleach fumes.
23. Caution: Liquid waste at acid pH should be neutralized before adding to bleach solution.
24. Do not use ELISA plate if the indicator strip on the desiccant pouch has turned from blue to pink.
25. Do not allow the conjugate to come in contact with containers or instruments that may have previously contained a solution utilizing sodium azide as a preservative. Residual amounts of sodium azide may destroy the conjugate's enzymatic activity.
26. Do not expose any of the reactive reagents to bleach-containing solutions or to any strong odors from bleach-containing solutions. Trace amounts of bleach (sodium hypochlorite) may destroy the biological activity of many of the reactive reagents within this kit.

**Materials required but not provided:**

- ELISA microwell reader capable of reading at a wavelength of 450nm.
- Pipettes capable of accurately delivering 10 to 200µL.
- Multichannel pipette capable of accurately delivering (50-200µL)
- Reagent reservoirs for multichannel pipettes.
- Wash bottle or microwell washing system.
- Distilled or deionized water.
- One liter graduated cylinder.
- Serological pipettes.
- Disposable pipette tips.
- Paper towels.
- Laboratory timer to monitor incubation steps.
- Disposal basin and disinfectant. (example: 10% household bleach, 0.5% sodium hypochlorite.)

**STORAGE CONDITIONS**

1. Store the unopened kit between 2° and 8°C.
2. Coated microwell strips: Store between 2° and 8°C. Extra strips should be immediately resealed with desiccant, and returned to proper storage. Strips are stable for 60 days after the envelope has been opened and properly resealed and the indicator strip on the desiccant pouch remains blue.
3. Conjugate: Store between 2° and 8°C. DO NOT FREEZE.
4. Calibrator, Positive Control and Negative Control: Store between 2° and 8°C.
5. Absorbent Solution: Store between 2° and 8°C.
6. TMB: Store between 2° and 8°C.
7. Wash Buffer concentrate (10X): Store between 2° and 25°C. Diluted wash buffer (1X) is stable at room temperature (20° to 25° C) for up to 7 days or for 30 days between 2° and 8°C.
8. Sample Diluent: Store between 2° and 8°C.
9. Stop Solution: Store between 2° and 25°C.

**SPECIMEN COLLECTION**

1. It is recommended that specimen collection be carried out in accordance with NCCLS document M29: Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease.
2. No known test method can offer complete assurance that human blood samples will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious.
3. Only freshly drawn and properly refrigerated sera obtained by approved aseptic venipuncture procedures should be used in this assay (5, 7). No anticoagulants or preservatives should be added. Avoid using hemolyzed, lipemic, or bacterially contaminated sera.
4. Store sample at room temperature for no longer than 8 hours. If testing is not performed within 8 hours, sera may be stored between 2° and 8°C for no longer than 48 hours. If delay in testing is anticipated, store test sera at -20°C or lower. Avoid multiple freeze/thaw cycles that may cause loss of antibody activity and give erroneous results.

**GENERAL PROCEDURE**

1. Remove the individual components from storage and allow them to warm to room temperature (20-25°C).
2. Determine the number of microwells needed. Allow six Control/Calibrator determinations (one Blank, one Negative Control, three Calibrators and one Positive Control) per run. A Reagent Blank should be run on each assay. Check software and reader requirements for the correct Controls/Calibrator configurations. Return unused strips to the resealable pouch with desiccant, seal, and return to storage between 2° and 8°C.

EXAMPLE PLATE SET-UP		
	1	2
A	Blank	Patient 3
B	Neg. Control	Patient 4
C	Calibrator	Etc.
D	Calibrator	
E	Calibrator	
F	Pos. Control	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

- Prepare a 1:21 dilution (e.g.: 10µL of serum + 200µL of Sample Diluent. NOTE: Shake Well Before Use) of the Negative Control, Calibrator, Positive Control, and each patient serum.
- Add 100 µL Absorbent solution to the appropriate wells of a blank dilution plate. Using a multichannel pipette, transfer 50µL of each diluted sample and control serum to the dilution plate containing the Absorbent. Withdraw and expel the samples several times to ensure that the samples are properly mixed.
- To individual wells, add 100µL of each diluted control, calibrator and sample from the absorption plate to the test plate. Ensure that the samples are properly mixed. Use a different pipette tip for each sample.
- Add 100µL of Sample Diluent to well A1 as a reagent blank. Check software and reader requirements for the correct reagent blank well configuration.
- Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 25 ± 5 minutes.
- Wash the microwell strips 5X.

**A. Manual Wash Procedure:**

- Vigorously shake out the liquid from the wells.
- Fill each microwell with Wash Buffer. Make sure no air bubbles are trapped in the wells.
- Repeat steps a. and b. for a total of 5 washes.
- Shake out the wash solution from all the wells. Invert the plate over a paper towel and tap firmly to remove any residual wash solution from the wells. Visually inspect the plate to ensure that no residual wash solution remains. Collect wash solution in a disposable basin and treat with 0.5% sodium hypochlorite (bleach) at the end of the days run.

**B. Automated Wash Procedure:**

If using an automated microwell wash system, set the dispensing volume to 300-350µL/well. Set the wash cycle for 5 washes with no delay between washes. If necessary, the microwell plate may be removed from the washer, inverted over a paper towel and tapped firmly to remove any residual wash solution from the microwells.

- Add 100µL of the Conjugate to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the specimens were added. (Continue Numbering from above.)
- Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 25 ± 5 minutes.
- Wash the microwells by following the procedure as described in step 8.
- Add 100µL of TMB to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the specimens were added. (Continue Numbering from above.)
- Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 10 to 15 minutes.
- Stop the reaction by adding 50µL of Stop Solution to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the TMB was added. Positive samples will turn from blue to yellow. After adding the Stop Solution, tap the plate several times to ensure that the samples are thoroughly mixed.
- Set the microwell reader to read at a wavelength of 450nm and measure the optical density (OD) of each well against the reagent blank. The plate should be read within 30 minutes after the addition of the Stop Solution.

**QUALITY CONTROL**

- Each time the assay is run the Calibrator must be run in triplicate. A reagent blank, Negative Control, and Positive Control must also be included in each assay.
- Calculate the mean of the three Calibrator wells. If any of the three values differ by more than 15% from the mean, discard that value and calculate the mean using the remaining two wells.
- The mean OD value for the Calibrator and the OD values for the Positive and Negative Controls should fall within the following ranges:

	<u>OD Range</u>
Negative Control	≤ 0.250
Calibrator	≥ 0.300
Positive Control	≥ 0.500

- The OD of the Negative Control divided by the mean OD of the Calibrator should be ≤ 0.9.
- The OD of the Positive Control divided by the mean OD of the Calibrator should be ≥ 1.25.
- If the above conditions are not met the test should be considered invalid and should be repeated.

- The Positive Control and Negative Control are intended to monitor for substantial reagent failure and will not ensure precision at the assay cut-off.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations.
- Refer to NCCLS document C24 Statistical Quality Control for Quantitative Measurements for guidance on appropriate QC practices.

## INTERPRETATION OF RESULTS

### A. Calculations:

#### 1. Correction Factor

A cutoff OD value for positive samples has been determined by the manufacturer and correlated to the Calibrator. The correction factor (CF) will allow you to determine the cutoff value for positive samples and to correct for slight day-to-day variations in test results. The correction factor is determined for each lot of kit components and is printed on the Component List located in the kit box.

#### 2. Cutoff OD Value

To obtain the cutoff OD value, multiply the CF by the mean OD of the Calibrator determined above.  
 $(CF \times \text{mean OD of Calibrator} = \text{cutoff OD value})$

#### 3. Index Values or OD Ratios

Calculate the Index Value or OD Ratio for each specimen by dividing its OD value by the cutoff OD from step 2.

Example:		
Mean OD Calibrator	=	0.793
Correction Factor (CF)	=	0.25
Cutoff OD	=	$0.793 \times 0.25 = 0.198$
Unknown Specimen OD	=	0.432
Specimen Index Value or OD Ratio	=	$0.432 / 0.198 = 2.18$

### B. Interpretations:

Index Values or OD ratios are interpreted as follows:

	Index Value or OD Ratio
Negative Specimens	< 0.91
Equivocal Specimens	0.91 to 1.09
Positive Specimens	≥ 1.10

### B. Interpretations

The OD ratio is interpreted and reported as follows:

**Negative:** No detectable IgM antibody; result does not exclude *B. burgdorferi* infection. An additional sample should be tested within 4-6 weeks if early infection is suspected (3).

**Equivocal:** Current recommendations state that equivocal results should be followed by supplemental Western Blot testing. (Western Blot assays for antibodies to *B. burgdorferi* are supplemental rather than confirmatory because their specificity is less than optimal, particularly for detecting IgM.) This equivocal result should be reported with results from Western Blot testing. Results should not be reported until the supplemental testing is completed.

**Positive:** IgM antibody to *B. burgdorferi* presumptively detected. Per current recommendations, the result cannot be further interpreted without supplemental Western Blot testing. (Western Blot assays for antibodies to *B. burgdorferi* are supplemental rather than confirmatory because their specificity is less than optimal, particularly for detecting IgM.) Results should not be reported until the supplemental testing is completed.

## LIMITATION OF THE ASSAY

- Sera from patients with other spirochetal diseases (syphilis, yaws, pinta, leptospirosis, and relapsing fever), and infectious mononucleosis may give false positive results (9, 10). In cases where false positive reactions are observed, extensive clinical epidemiological and laboratory workups should be carried out to determine the specific diagnosis. False positive sera from syphilis patients can be identified by running an RPR and a Treponemal antibody assay for syphilis antibody (11). True Lyme disease positive sera will be negative in these assays.
- False negative results may be obtained if serum samples are drawn too early after onset of disease before antibody levels have reached significant levels (12). Also, early antibiotic therapy may abort an antibody response to the spirochete (13).
- All data should be interpreted in conjunction with clinical symptoms of disease, epidemiological data, exposure in endemic areas, and results of other laboratory tests.
- Rheumatoid factor may cause false positive results.
- Screening of the general population should not be performed. The positive predictive value depends on the pretest likelihood of infection. Testing should only be performed when clinical symptoms are present or exposure is suspected.
- The performance characteristics of the DAI *B. burgdorferi* IgM ELISA test are not established with samples from individuals vaccinated with *B. burgdorferi* antigens.



**EXPECTED VALUES**

Only 10-14% of patients with ECM alone have detectable levels of antibody to *B. burgdorferi* (3,12,14). The IgM antibody response usually peaks from 3 to 6 weeks following infection, and is often not detectable during the first two weeks of infection. The IgG antibody response is frequently not detectable for 4 to 6 weeks after infection. A more complete serological picture may be obtained by testing acute and convalescent sera.

Most patients (94-97%) with neurological complications, and essentially all patients with arthritis have elevated IgG titers to the spirochete (14,15). In later stages, a positive antibody test may help distinguish Lyme disease from viral meningitis or unexplained nerve palsies. A positive antibody test may be particularly useful in differentiating Lyme arthritis from rheumatoid arthritis, juvenile arthritis, and Reiter's Syndrome (13). Patients without signs or clinical features of Lyme disease should test negative with the DAI *Borrelia burgdorferi* IgM ELISA test system.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**A. Comparative Study**

**STUDY NO. 1**

The *Borrelia burgdorferi* IgM ELISA test system was compared to a commercially available ELISA test for detection of IgM antibodies to *B. burgdorferi*. A total of 210 serum specimens were tested by both procedures. The test results are summarized below:

		Reference ELISA		
		+	-	±
DAI <i>Borrelia burgdorferi</i> IgM ELISA	+	42	111	23
	-	2	135	4
	±	3	8	2

Relative Sensitivity = 95.5% (42/44)  
 Relative Specificity = 92.5% (136/147)  
 Agreement = 93.1% (178/191)

\*Results that were equivocal by either method were excluded from the calculations for sensitivity, specificity, and agreement.

**STUDY NO. 2**

This study was done in the clinical immunology laboratory at a medical school. Twenty-one sera from patients with acute and convalescent Lyme disease were tested by the IgM ELISA. The patient sera were well characterized by a recognized authority. Acute phase (Stage 1) sera were from patients with a characteristic ECM skin rash. Convalescent sera had characteristic symptoms of Stage 2 or Stage 3 Lyme disease. As part of this study, the sera were also tested by five other commercial *Borrelia burgdorferi* IgG/IgM, and IgG specific ELISA assays. Results for the six ELISA assays are summarized below:

ELISA ASSAY FOR Sample No.	Disease Stage	IgG/IgM				IgG Test 5	DAI IgM Test 6
		Test 1	Test 2	Test 3	Test 4		
1	1	+	+	+	+	-	+
2	1	+	+	+	+	-	+
3	1	-	-	-	-	-	-
4	1	-	-	-	+	-	+
5	1	-	-	-	-	-	-
6	1	+	+	+	+	+	+
7	1	+	+	+	+	+	+
8	2	+	+	+	+	+	+
9	2	+	+	+	±	+	-
10	2	+	+	+	+	+	+
11	2	+	+	-	+	+	±
12	2	+	+	+	+	+	+
13	2	+	+	+	+	+	+
14	2	+	+	+	+	+	-
15	3	+	+	+	+	+	+
16	3	+	+	+	+	+	-
17	3	+	+	+	+	+	-
18	3	+	+	+	±	+	-
19	3	+	+	+	+	+	-
20	3	+	+	+	+	+	+
21	3	+	+	+	+	+	-

Table 1 shows test results obtained using a serum panel from the CDC. The results are presented as a means to convey further information on the performance of this assay with a masked, characterized serum panel. This does not imply an endorsement of the assay by the CDC.

**Table 1.**  
**The CDC *B. burgdorferi* Disease Serum Panel**  
**Stratified by Time After Onset**

Time from onset	Pos	±	Neg	Total	% agreement with clinical diagnosis
Normals	0	0	5	5	100%
< 1 month	3	0	2	5	60%
1-2 months	7	0	2	9	78%
3-12 months	5	0	15	20	25%
> 1 year	1	0	7	8	12%
Total	16	0	31	47	49%

### B. REPRODUCIBILITY

To assess the reproducibility of the test system, six serum samples were tested on three consecutive days. Eight replicates of each serum sample were run each day. The mean OD ratio and coefficient of variation (CV) were calculated for each sample. These data are shown below:

For Sample No.	Intra-Assay (n=9)						Inter-Assay (n=9)	
	Day 1		Day 2		Day 3		Mean Ratio	CV
	Mean Ratio	CV	Mean Ratio	CV	Mean Ratio	CV		
1.	1.63	3%	1.69	4%	1.43	10%	1.60	6%
2.	1.72	7%	1.80	6%	1.53	9%	1.68	7%
3.	1.33	8%	1.42	5%	1.21	5%	1.32	7%
4.	1.07	3%	1.29	4%	1.02	6%	1.13	10%
5.	0.85	7%	0.99	5%	0.89	7%	0.91	6%
6.	0.21	11%	0.26	14%	0.22	5%	0.24	13%

### C. CROSS REACTIVITY

Serum specimens from patients with North American brucellosis, yaws, pinta, leptospirosis, autoimmune diseases, and syphilis may crossreact (14).

Ten sera with IFA titers of 1:60 to 1:1280 for antibodies to nuclear antigens (ANA) were negative in the *B. burgdorferi* IgM ELISA test.

### REFERENCES


1. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, and Spielman A: Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J. Infect. Dis.* 164:250-300, 1990.
2. Rosenfeld MEA: Serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 31:3090-3095, 1993.
3. Steere AC, Grodzicki RL, Kombati AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, and Malawista SE: The spirochetal etiology of Lyme disease. *New Eng. J. Med.* 308:733-743, 1983.
4. Balcer LL, Calkins SM, Wand PJ, and Schell RF: Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 patients in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/Colege of American Pathologists Proficiency Testing Program. *J. Clin. Microbiol.* 35:537-543, 1997.
5. U.S. Department of Labor (OSHA): Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. 29 CFR 1910.1030.
6. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: NCCLS Procedure H13. Approved guideline.
7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
8. Rahn DW: Laboratory Aspects of Lyme Borreliosis. *Clin. Infect. Rev.* 1:350-352, 1988.
9. Russe H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, and Pilayus B: Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 149:465, 1984.
10. Magnarelli LA, Anderson JF, and Johnson RC: Cross-reactivity in serological test for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infect. Dis.* 155:103-106, 1987.
11. Hunter EF, Russe H, et al: Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponeme antibody-adsorption test for syphilis. *Sex. Trans. Dis.* 13:236, 1986.
12. Shroetman M, Grodzicki RL, and Steere AC: Diagnosing early Lyme disease. *Am. J. Med.* 78:235, 1985.
13. Steere AC, Hutchinson GJ, Rahn DW, Sigal LH, Craft JE, DeGanna ET, and Malawista SE: Treatment of the early manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 99:22, 1983.
14. Craft JE, Grodzicki RL, Shroetman M, Fischer DK, Garcia-Blanco M, and Steer AC: Antibody response in Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:561, 1984.
15. Reik L, Smith L, Khan A, and Nelson W: Demyelinating encephalopathy in Lyme disease. *Neurology* 35:207, 1985.

**ABBREVIATED TEST PROCEDURE**

1. Dilute Serum 1:21
2. Combine 50µL of diluted serum with 100 µL of Absorbent.
3. Add diluted serum to microwell 100 µL/well
4. → Incubate 20 to 30 minutes
5. Wash
6. Add Conjugate – 100 µL/well
7. → Incubate 20 to 30 minutes
8. Wash
9. Add TMB 100 µL/well
10. → Incubate 10 to 15 minutes
11. Add Stop Solution 50 µL/well - Mix
12. READ

**Date Adopted :**  
2006-07-05

**Reference No:**  
DA-Lyme Disease IgM-2008

 **DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.**  
23961 Craftsman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302  
Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383  
ISO 13485-2003



Revision Date: 5/21/08

## Insertos ELISA para la detección de IgG



DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.

21961 Craftman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302

Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-5383

[onestep@rapidtest.com](mailto:onestep@rapidtest.com)

[technicalsupport@rapidtest.com](mailto:technicalsupport@rapidtest.com)

[www.rapidtest.com](http://www.rapidtest.com)



# Lyme Disease IgG

Cat # 1428-2Z

### PRINCIPLE OF THE ELISA ASSAY

The Diagnostic Automation *B. burgdorferi* ELISA test system is designed to detect IgG class antibodies to *B. burgdorferi* in human sera. Wells of plastic microwell strips are sensitized by passive absorption with *B. burgdorferi* antigen. The test procedure involves three incubation steps:

1. Test sera (properly diluted) are incubated in antigen coated microwells. Any antigen specific antibody in the sample will bind to the immobilized antigen. The plate is washed to remove unbound antibody and other serum components.
2. Peroxidase Conjugated goat anti-human IgG ( $\gamma$  chain specific) is added to the wells and the plate is incubated. The Conjugate will react with IgG antibody immobilized on the solid phase in step 1. The wells are washed to remove unreacted Conjugate.
3. The microwells containing immobilized peroxidase Conjugate are incubated with peroxidase Substrate Solution. Hydrolysis of the Substrate by peroxidase produces a color change. After a period of time the reaction is stopped and the color intensity of the solution is measured photometrically. The color intensity of the solution depends upon the antibody concentration in the original test sample.

### SPECIMEN COLLECTION

1. It is recommended that specimen collection be carried out in accordance with NCCLS document M29: Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease.
2. No known test method can offer complete assurance that human blood samples will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious.
3. Only freshly drawn and properly refrigerated sera obtained by approved aseptic venipuncture procedures should be used in this assay (6, 7). No anticoagulant or preservatives should be added. Avoid using hemolyzed, lipemic, or bacterially contaminated sera.
4. Store sample at room temperature for no longer than 8 hours. If testing is not performed within 8 hours, sera may be stored between 2° and 8°C for no longer than 48 hours. If delay in testing is anticipated, store test sera at -20°C or lower. Avoid multiple freeze-thaw cycles that may cause loss of antibody activity and give erroneous results.

## EQUIPMENT AND MATERIALS:

Materials required but not provided:

- ELISA microwell reader capable of reading at a wavelength of 450nm
- Pipettes capable of accurately delivering 10 to 200  $\mu$ L
- Multichannel pipette capable of accurately delivering (50-200  $\mu$ L)
- Reagent reservoirs for multichannel pipettes.
- Wash bottle or microwell washing system
- Distilled or deionized water.
- One liter graduated cylinder.
- Serological pipettes.
- Disposable pipette tips.
- Paper towels.
- Laboratory timer to monitor incubation steps.
- Disposable basin and disinfectant. (example: 10% household bleach, 0.5% sodium hypochlorite.)

## MATERIALS PROVIDED

Each kit contains the following component in sufficient quantities to perform the number of tests indicated on packaging label. Note: All reactive reagents contain sodium azide as a preservative at a concentration of 0.1% (w/v).

PLATE	1	Plate: 96 wells configured in twelve 8x8 well strips coated with inactivated $\beta$ galactosidase (B31 strain) antigen. The strips are packaged in a strip holder and sealed in an envelope with desiccant.
CONJ	2	Conjugate: Conjugated (horseradish peroxidase) goat anti-human IgG (h) (human specific). Ready to use. One 15 mL vial with white cap.
CONTROL	3	Positive Control (Human Serum). One 0.35 mL vial with red cap.
CAL	4	Calibrator (Human Serum). One 0.35 mL vial with blue cap.
STRIP	5	Reagent Control (Human Serum). One 0.35 mL vial with green cap.
DILUTE	6	Complexation: One 30 mL bottle (green cap) containing Tween-20, bovine serum albumin and phosphate-buffered saline, (pH 7.2 $\pm$ 0.2). C-reen solution ready to use. Note: Shake Well Before Use. (Product # 104-02)
SOLO	7	TMB: One 15 mL amber bottle (amber cap) containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) Ready to use. Contains 0.490 $\pm$ 1% (w).
STOP	8	Stop solution: One 15 mL bottle (red cap) containing 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.7M HCl. Ready to use.
WASHBUF	9	Wash buffer concentrate (10x): dilute 1 part concentrate + 9 parts distilled or distilled water. One 100 mL bottle (clear cap) containing a 10x concentrated phosphate-buffered saline and Tween-20 solution (blue solution). NOTE: 1X solution will have a pH of 7.2 $\pm$ 0.2.

The following components are not kit lot number dependent and may be used interchangeably with the ELISA assays: TMB, Stop Solution, and Wash Buffer.

Note: Kit also contains:

1. Component list containing lot specific information is inside the kit box.
2. Package insert providing instructions for use.

Storage Requirements:

1. Store the unopened kit between 2° and 8°C.
2. Coated microwell strips: Store between 2° and 8°C. Extra strips should be immediately resealed with desiccant and returned to proper storage. Strips are stable for 60 days after the envelope has been

- opened and properly resealed and the indicator strip on the desiccant pouch remains blue.
3. Conjugate: Store between 2° and 8°C. **DO NOT FREEZE.**
  4. Calibrator, Positive Control and Negative Control: Store between 2° and 8°C.
  5. TMB: Store between 2° and 8°C.
  6. Wash Buffer concentrate (10X): Store between 2° and 25°C. Diluted wash buffer (1X) is stable at room temperature (20° to 25° C) for up to 7 days or for 30 days between 2° and 8°C.
  7. Sample Diluent: Store between 2° and 8°C.
  8. Stop Solution: Store between 2° and 25°C.

**QUALITY CONTROL**

1. Each time the assay is run the Calibrator must be run in triplicate. A reagent blank, Negative Control, and Positive Control must also be included in each assay.
2. Calculate the mean of the three Calibrator wells. If any of the three values differ by more than 15% from the mean, discard that value and calculate the mean using the remaining two wells.
3. The mean OD value for the Calibrator and the OD values for the Positive and Negative Controls should fall within the following ranges:

	<u>OD Range</u>
Negative Control	< 0.250
Calibrator	> 0.300
Positive Control	> 0.500

- a. The OD of the Negative Control divided by the mean OD of the Calibrator should be < 0.9.
- b. The OD of the Positive Control divided by the mean OD of the Calibrator should be > 1.25.
- c. If the above conditions are not met the test should be considered invalid and should be repeated.
4. The Positive Control and Negative Control are intended to monitor for substantial reagent failure and will not ensure precision at the assay cut-off.
5. Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations.
6. Refer to NCCLS document C24: Statistical Quality Control for Quantitative Measurements for guidance on appropriate QC practices.

**PROCEDURE STEPWISE:**

1. Remove the individual components from storage and allow them to warm to room temperature (20-25°C).
2. Determine the number of microwells needed. Allow six Control/Calibrator determinations (one Blank, one Negative Control, three Calibrators and one Positive Control) per run. A Reagent Blank should be run on each assay. Check software and reader requirements for the correct Controls/Calibrator configurations. Return unused strips to the resealable pouch with desiccant, seal, and return to storage between 2° and 8°C.

EXAMPLE PLATE SET-UP		
	1	2
A	Blank	Patient 3
B	Neg. Control	Patient 4
C	Calibrator	Etc.
D	Calibrator	
E	Calibrator	
F	Pos. Control	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

3. Prepare a 1:21 dilution (e.g.: 10 $\mu$ L of serum + 200 $\mu$ L of Sample Diluent. NOTE: Shake Well Before Use) of the Negative Control, Calibrator, Positive Control, and each patient serum.
4. To individual wells, add 100 $\mu$ L of each diluted control, calibrator and sample. Ensure that the samples are properly mixed. Use a different pipette tip for each sample.
5. Add 100 $\mu$ L of Sample Diluent to well A1 as a reagent blank. Check software and reader requirements for the correct reagent blank well configuration.
6. Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 25 + 5 minutes.
7. Wash the microwell strips 5X.
  - A. Manual Wash Procedure:
    - a. Vigorously shake out the liquid from the wells.
    - b. Fill each microwell with Wash Buffer. Make sure no air bubbles are trapped in the wells.
    - c. Repeat steps a. and b. for a total of 5 washes.
    - d. Shake out the wash solution from all the wells. Invert the plate over a paper towel and tap firmly to remove any residual wash solution from the wells. Visually inspect the plate to ensure that no residual wash solution remains. Collect wash solution in a disposable basin and treat with 0.5% sodium hypochlorite (bleach) at the end of the days run.
  - B. Automated Wash Procedure:
 

If using an automated microwell wash system, set the dispensing volume to 300-350 $\mu$ L/well. Set the wash cycle for 5 washes with no delay between washes. If necessary, the microwell plate may be removed from the washer, inverted over a paper towel and tapped firmly to remove any residual wash solution from the microwells.
8. Add 100 $\mu$ L of the Conjugate to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the specimens were added.
9. Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 25 + 5 minutes.
10. Wash the microwells by following the procedure as described in step 7.
11. Add 100 $\mu$ L of TMB to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the specimens were added.
12. Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 10 to 15 minutes.
13. Stop the reaction by adding 50 $\mu$ L of Stop Solution to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the TMB was added. Positive samples will turn from blue to yellow. After adding the Stop Solution, tap the plate several times to ensure that the samples are thoroughly mixed.
14. Set the microwell reader to read at a wavelength of 450nm and measure the optical density (OD) of each well against the reagent blank. The plate should be read within 30 minutes after the addition of the Stop Solution.

## **CALCULATIONS/REPORTING RESULTS:**

### **A. Calculation::**

#### **1. Correction Factor**

A cutoff OD value for positive samples has been determined by the manufacturer and correlated to the Calibrator. The correction factor (CF) will allow you to determine the cutoff value for positive samples and to correct for slight day-to-day variations in test results. The correction factor is determined for each lot of kit components and is printed on the Component List located in the kit box.

#### **2. Cutoff OD Value**

To obtain the cutoff OD value, multiply the CF by the mean OD of the Calibrator determined above.

$$(CF \times \text{mean OD of Calibrator} = \text{cutoff OD value})$$

#### **3. Index Values or OD Ratios**

Calculate the Index Value or OD Ratio for each specimen by dividing its OD value by the cutoff OD from step 2.

<b>Example:</b>			
	Mean OD of Calibrator	=	0.793
	Correction Factor (CF)	=	0.25
	Cut off OD	=	$0.793 \times 0.25 = 0.198$
	Unknown Specimen OD	=	0.432
	Specimen Index Value or OD Ratio	=	$0.432 / 0.198 = 2.18$

#### B. Interpretations:

Index Values or OD ratios are interpreted as follows:

	Index Value or OD Ratio
Negative Specimens	< 0.90
Equivocal Specimens	0.91 to 1.09
Positive Specimens	> 1.10

The OD ratio is interpreted and reported as follows:

**Negative:** No detectable IgG antibody, result does not exclude *B. burgdorferi* infection. An additional sample should be tested within 4-6 weeks if early infection is suspected (15).

**Equivocal:** Current recommendations state that equivocal result should be followed by supplemental Western Blot testing. (Western blot assays for antibodies to *B. burgdorferi* are supplemental rather than confirmatory because their specificity is less than optimal, particularly for detecting IgM.) This equivocal result should be reported with results from Western Blot testing. Results should not be reported until the supplemental testing is completed.

**Positive:** IgG antibody to *B. burgdorferi* presumptively detected. Per current recommendations, the result cannot be further interpreted without supplemental Western Blot testing. (Western Blot assays for antibodies to *B. burgdorferi* are supplemental rather than confirmatory because their specificity is less than optimal, particularly for detecting IgM.) Results should not be reported until the supplemental testing is completed.

#### PROCEDURE NOTES:

1. For In Vitro Diagnostic Use.
2. Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves, and eye/face protection. Do not breathe vapor. Dispose of waste observing all local, state, and federal laws.
3. The wells of the ELISA plate do not contain viable organisms. However, the strips should be considered **POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIALS** and handled accordingly.
4. The human serum controls are **POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIALS**. Source materials from which these products were derived were found negative for HIV-1 antigen, HBsAg, and for antibodies against HCV and HIV by approved test methods. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these products should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", current edition, and OSHA's Standard for Bloodborne Pathogens (5).
5. The sample diluent, controls, wash buffer, and conjugate contain sodium azide at a concentration of 0.1% (w/v). Sodium azide has been reported to form lead or copper azides in laboratory plumbing which may cause explosions on hammering. To prevent, rinse sink thoroughly with water after disposing of solution containing sodium azide.
6. Adherence to the specified times and temperature of incubations is essential for accurate results. All reagents must be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the assay. Return



- unused reagents to refrigerated temperature immediately after use.
7. Improper washing could cause false positive or false negative results. Be sure to minimize the amount of any residual wash solution (e.g., by blotting or aspiration) before adding Conjugate or Substrate. Do not allow the wells to dry out between incubations.
  8. The Stop Solution is TOXIC. Causes burns. Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.
  9. The TMB Solution is HARMFUL. Irritating to eyes, respiratory system and skin.
  10. The Wash Buffer concentrate is an IRRITANT. Irritating to eyes, respiratory system and skin.
  11. Wipe bottom of plate free of residual liquid and/or fingerprints that can alter optical density (OD) readings.
  12. Dilution or adulteration of these reagents may generate erroneous results.
  13. Reagents from other sources or manufacturers should not be used.
  14. TMB Solution should be colorless, very pale yellow, very pale green, or very pale blue when used. Contamination of the TMB with conjugate or other oxidants will cause the solution to change color prematurely. Do not use the TMB if it is noticeably blue in color.
  15. Never pipette by mouth. Avoid contact of reagents and patient specimens with skin and mucous membranes.
  16. Avoid microbial contamination of reagent. Incorrect results may occur.
  17. Gross contamination of reagents and/or samples could cause erroneous results.
  18. Reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed free of all detergents.
  19. Avoid splashing or generation of aerosols.
  20. Do not expose reagents to strong light during storage or incubation.
  21. Allowing the microwell strips and holder to equilibrate to room temperature prior to opening the protective envelope will protect the wells from condensation.
  22. Wash solution should be collected in a disposal basin. Treat the waste solution with 10% household bleach (0.5% sodium hypochlorite). Avoid exposure of reagents to bleach fumes.
  23. Caution: Liquid waste at acid pH should be neutralized before adding to bleach solution.
  24. Do not use ELISA plate if the indicator strip on the desiccant pouch has turned from blue to pink.
  25. Do not allow the conjugate to come in contact with containers or instruments that may have previously contained a solution utilizing sodium azide as a preservative. Residual amounts of sodium azide may destroy the conjugate's enzymatic activity.
  26. Do not expose any of the reactive reagents to bleach-containing solutions or to any strong odors from bleach-containing solutions. Trace amounts of bleach (sodium hypochlorite) may destroy the biological activity of many of the reactive reagents within this kit.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE:

1. Sera from patients with other spirochetal diseases (syphilis, yaws, pinta, leptospiriosis, and relapsing fever), or infectious mononucleosis and systemic lupus erythematosus may give false positive results (8, 9). In cases where false positive reactions are observed, extensive clinical, epidemiologic and laboratory workups should be carried out to determine the specific diagnosis. False positive sera from syphilis patients can be identified by running an RPR and a treponemal antibody assay on such specimens (10). True *B. burgdorferi* disease positive sera will be negative in these assays.
2. False negative results may be obtained if serum samples are drawn too early after onset of disease before antibody levels have reached significant levels (8). Also, early antibiotic therapy may abort an antibody response to the spirochete (11).
3. All data should be interpreted in conjunction with clinical symptoms of disease, epidemiologic data, exposure in endemic areas, and results of other laboratory tests.
4. Screening of the general population should not be performed. The positive predictive value depends on the pretest likelihood of infection. Testing should only be performed when clinical symptoms are present or exposure is suspected.
5. The performance characteristics of the DAI *B. burgdorferi* IgG ELISA test are not established with

samples from individuals vaccinated with *B. burgdorferi* antigens.

**REFERENCES:**

1. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, and Spielman A: Longitudinal assessment of the clinical and epidemiologic features of Lyme disease in a defined population. *J Infect Dis* 154:295-300, 1986.
2. Rowland NE: A Serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 31:3090-3095, 1993.
3. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblat AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, and Maravata SE: The spirochetal etiology of Lyme disease. *New Engl J Med* 308:733, 1983.
4. Bakken LL, Callister SM, Wand PJ, and Schell RF: Inter-laboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 116 patients in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene College of American Pathologists Proficiency Testing Program. *J Clin Microbiol* 35:537-543, 1997.
5. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. *Fed Register* 56:64175-64382, 1991.
6. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
7. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
8. Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, and Palkovits B: Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assays for Lyme disease. *J Infect Dis* 149:465, 1984.
9. Magnusath LA, Anderson JF, and Johnson KC: Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis* 156:183-188, 1987.
10. Hunter EP, Russell H, Farley CE, et al. Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent trepanoma antibody absorption test for spirocheta. *Sex Transm Dis* 13:236, 1986.
11. Steere AC, Hutchinson GJ, Rahn DW, Sigal LH, Craft JE, DeSarna ET, and Malawski SE: Treatment of the early manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 99:22, 1983.
12. Craft JE, Grodzicki RL, Shroetha M, Fischer DK, Garcia-Bunco M, and Steere AC: Antibody response in Lyme disease. *Yale J Biol Med* 57:561, 1984.
13. Shroetha M, Grodzicki RL, and Steere AC: Diagnosing early Lyme disease. *Am J Med* 78:235, 1985.
14. Rack L, Smith L, Khan A, and Nelson W: Demyelinating encephalopathy in Lyme disease. *Neurology* 35:267, 1985.
15. Barbour A: Laboratory Aspects of Lyme Borreliosis. *Clin Micro Rev* 1:399-414, 1988.

<b>Date Adopted</b>	<b>Reference No.</b>
2005-09-27	DA-Lyme Disease IgG-2008



**DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.**  
 23961 Craftsman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302  
 Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383  
 ISO 13485-2003



Revision Date: 8/6/08

**Anexo 1. Formato de registro médico.**

---

**CARTA DE CONSENTIMIENTO**

---

Navojoa, Sonora a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año 20 \_\_\_\_\_

El (la) suscrito (a), de nombre \_\_\_\_\_

Por este conducto, hace constar que dá su autorización para participar como paciente del estudio denominado: "DETECCIÓN DE *Leptospira interrogans* MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN PACIENTES PROCEDENTES DEL SUR DEL ESTADO DE SONORA" así como proporcionar información en relación a su salud y de tipo socioeconómica para el cumplimiento de los fines de investigación que tiene por objetivo dicho estudio, cabe mencionar que los datos personales del paciente quedarán en el anónimo.

Todos los datos obtenidos serán empleados para la realización de la tesis de licenciatura para obtener el título de QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO por el alumno Román Obed Cruz Gómez, con número de expediente 210216277 en la UNIVERSIDAD DE SONORA, UNIDAD REGIONAL SUR.

---

**Dra. Norma Patricia Adán Bante**


Responsable de Investigación

---


**Firma**

Paciente

**Anexo 2. Formato de sintomatología.**



**LABORATORIO DE INVESTIGACION  
ZOOINOSIS Y ENFERMEDADES TROPICALES  
DE LA REGION DEL MAYO**



PERU NO. DIST. EST.: \_\_\_\_\_

NOMBRE:	OCCUPACION:
SEXO:	DOMICILIO:
EDAD:	TEL:
LUGAR DE NACIMIENTO:	

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES FAMILIARES NO PATOLÓGICOS: \_\_\_\_\_

VIVIENDA: \_\_\_\_\_

CONTACTO C/ ANIMALES: PERROS, GATOS, RATONES, GANADO: \_\_\_\_\_ CERDOS, AVES: \_\_\_\_\_

PRESENCIA DE ANIMALES SILVESTRES: \_\_\_\_\_

AGUA: ENTUBADA  TINACO  CISTERNA  BOTES OTROS: \_\_\_\_\_

CUADRO CLINICO		
FIEBRE <input type="checkbox"/>	MIALGIA <input type="checkbox"/>	NEURITIS <input type="checkbox"/>
FEBRÍCULA <input type="checkbox"/>	DOLOR EN PIERNAS <input type="checkbox"/>	DISESTESIAS <input type="checkbox"/>
ESCALOFRIOS <input type="checkbox"/>	SUDORACIONES NOCTURNAS <input type="checkbox"/>	CAMBIO DE CARACTER <input type="checkbox"/>
DIÁFORESIS <input type="checkbox"/>	INTEOORISMO <input type="checkbox"/>	PERDIDA DE LA MEMORIA <input type="checkbox"/>
ASTENIA <input type="checkbox"/>	DISTENCIÓN ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	CONFUSIÓN MENTAL <input type="checkbox"/>
ADINAMIA <input type="checkbox"/>	DOLOR ABDOMINAL <input type="checkbox"/>	ACOLIA <input type="checkbox"/>
CEFALEA <input type="checkbox"/>	ANOREXIA <input type="checkbox"/>	DISURIA <input type="checkbox"/>
DOLOR OCULAR <input type="checkbox"/>	HIPERESTESIA CUTÁNEA <input type="checkbox"/>	EDEMIAS <input type="checkbox"/>
FOTOFOBIA <input type="checkbox"/>	FATIGA FACIL <input type="checkbox"/>	SOMNOLENCIA DIURNA <input type="checkbox"/>
CONGESTION CONJUNTIVAL <input type="checkbox"/>	DISNEA DE ESFUERZO <input type="checkbox"/>	INSIMINIO <input type="checkbox"/>
DISMINUCION AGUDA VISUAL <input type="checkbox"/>	ICTERICIA <input type="checkbox"/>	ORQUITIS <input type="checkbox"/>
ACUFENOS <input type="checkbox"/>	EXANTEMA <input type="checkbox"/>	ANSIEDAD <input type="checkbox"/>
VERTIGO <input type="checkbox"/>	PETEQUIA <input type="checkbox"/>	DEPRESION <input type="checkbox"/>
PALPITACIONES <input type="checkbox"/>	EQUIMOSIS <input type="checkbox"/>	CUADRO PSICOTICO <input type="checkbox"/>
ARTRALGIA <input type="checkbox"/>	SANGRADO <input type="checkbox"/>	TIPO MEDICAMENTO <input type="checkbox"/>
DOLOR DE ESPALDA ALTA <input type="checkbox"/> MEDIA <input type="checkbox"/> BAJA <input type="checkbox"/>		