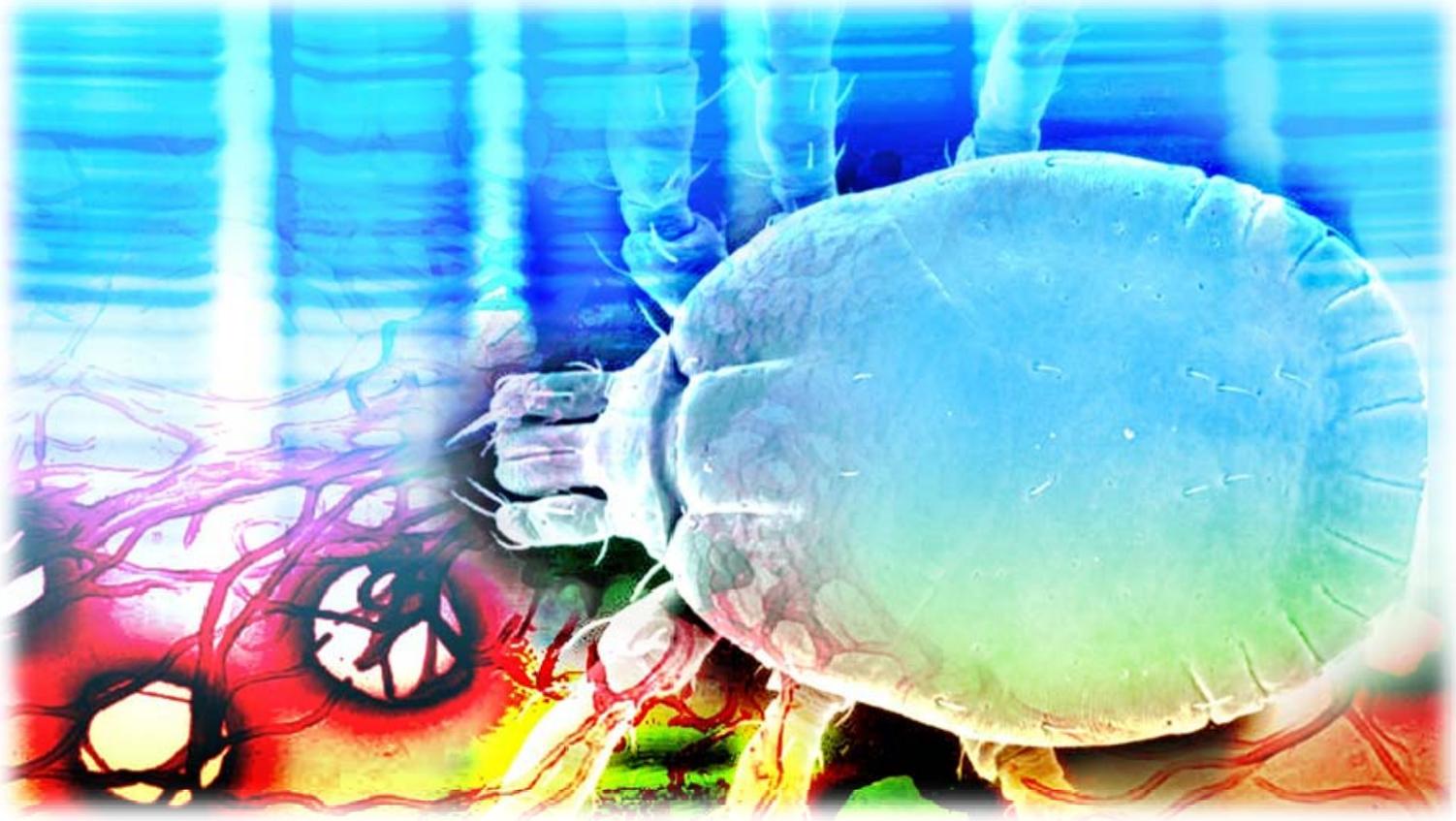


**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
VICEDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**



**EVIDENCIAS DE INFECCIÓN POR  
*Borrelia burgdorferi* sensu lato EN CUBA**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**ISLAY RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**

**La Habana, 2011**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
VICEDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

**EVIDENCIAS DE INFECCIÓN POR  
*Borrelia burgdorferi* sensu lato EN CUBA**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. ISLAY RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, MC**

**Asesora: Prof. Tit., Lic. Gilda Toraño Peraza, Dr C**

**La Habana, 2011**

“El sentido de las cosas no está en las cosas mismas,  
sino en nuestra actitud hacia ellas”

Antoine de Saint-Exupéry

*At la memoria del  
Prof. Armando Fernández Martínez*

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero ofrecer mi más sincera gratitud a todos los que de una forma u otra han contribuido, durante estos 16 años, a mi formación como investigador, pero antes debo mencionar a la persona que me incitó a escoger este camino desde que contaba con sólo 14 años, al **Lic. Urbano González**, profesor y metodólogo de Química por aquel entonces en el municipio Guanajay, actual provincia Artemisa; no olviden que soy del campo.

Agradezco al **Dr. Gerardo Martínez**, quien fue el jefe del Dpto. Bacteriología-Micología, y a la **DraC Alina Llop**, Vicedirectora de Microbiología, por permitir mi inserción en el Dpto. como Reserva Científica, específicamente en el Laboratorio Nacional de Espiroquetas. Gracias por haberme dado esa posibilidad y tantas otras, y por todas las sugerencias realizadas a este trabajo. Gracias Dra. Alina por los regaños también.

A la **DraC Ana Margarita Obregón**, investigadora de cualidades únicas. Mi tutora mientras fui estudiante y Reserva Científica; fue ella la que recién incorporado al laboratorio me dijo: “tienes que impartir la docencia relacionada con los temas de borrelias y treponemas”, en ese momento tuve el desafío de prepararme para esa actividad, pero después le siguió el gran reto de intentar hacer algo, aun cuando las borrelias continúan siendo un tema controversial. Gracias Ana por haberme ofrecido ese camino y por toda tu colaboración y crítica oportuna en estos años.

A la **Dra. Carmen Fernández**, investigadora y jefa ejemplar, por su interés en el tema desde el inicio, por facilitarnos y exigirnos la superación personal, la entrega al trabajo, el deseo de hacer ciencia y haber logrado la unión en el grupo. Siempre te agradeceré la confianza depositada en mí, como trabajador y persona.

Al **Lic. Omar Fuentes**, uno de los colegas que acompañó al Prof. Armando Fernández en sus trabajos de campo, y quien siempre ha estado presente cuando de enfermedad de Lyme se trata. Gracias Omar por toda tu colaboración, consideración y apoyo científico. Aún nos queda mucho por hacer.

Al **Téc. José Enrique Rodríguez**, por ser la persona a quien le debo mis primeras habilidades técnicas en el laboratorio. Gracias “Tolete”.

A los colegas más jóvenes del grupo: **Lic. Nadia María Rodríguez**, **Lic. Yaindrys Rodríguez**, **Lic. Brian Arturo Mondeja** y **Téc. Yanais Valdés** por todo el apoyo, por los buenos y malos momentos compartidos, por la motivación y confianza que siempre me han transmitido. Al **Téc. Eduardo Echevarría**, por asumir sin vacilación y responsablemente varias tareas relacionadas con este tema durante los últimos tres años. Al **Lic. Angel Alberto Noda**, joven investigador de recién incorporación al grupo y con ansias de continuar esta línea de trabajo; gracias Angel por tu ayuda y solidaridad.

## AGRADECIMIENTOS

---

A la **DraC Gilda Toraño**, por haber aceptado la asesoría de este trabajo siendo un tema poco común para ella. Gracias Gilda por tu modestia, tus valiosas observaciones y sugerencias en todo momento, tu inigualable forma de revisar los manuscritos (a pesar del poco tiempo con que contaste) y por esa facilidad que tienes para manejar la gramática española, aspecto tan difícil cuando se trata de escribir un documento científico.

A la **DraC María Eugenia Toledo**, por detener sus incesantes actividades diarias y dedicar un tiempo (del que casi no disponía) para revisar este documento y ofrecerme sugerencias muy valiosas como científica y médico que es. **Al DrC Alberto Balí** por su ayuda en la interpretación de resultados estadísticos. Gracias también Mary y Balí por la preocupación constante y el calor humano.

**Al Lic. Manuel Morejón** (CECMED), **DraC Lizet Sánchez** y **Lic. Ileana Valdés** por sus recomendaciones tan útiles para plasmar en la tesis el aseguramiento de la calidad, análisis estadístico y aspectos éticos, respectivamente. A la **Dra. Lilia María Ortega** por la revisión del lenguaje médico empleado.

A todos los **colegas del Dpto. Bacteriología-Micología**, a los que ya tengo agobiados con las reiteradas presentaciones de estos resultados, pero que siempre me han ofrecido tanta ayuda y recomendaciones sinceras para mejorar el trabajo y las presentaciones. En especial al **DrC Carlos Fernández** (quien fue presidente del Tribunal de Predefensa), **DrC Ernesto Montoro** (jefe del Dpto. y miembro de los Tribunales de Examen de Mínimo de la Especialidad y de Predefensa), **DraC Rosabel Falcón** (secretaria del Tribunal de Predefensa), **DrC Raúl Díaz**, **DraC Dihadenys Lemus** y **DraC Laura Bravo** (miembros del Tribunal de Predefensa).

A los **miembros de la Comisión Científica Especializada de Microbiología** que evaluaron el trabajo de tesis y su presentación, emitiendo criterios válidos en su gran mayoría en aras de mejorar los mismos.

Al resto de los miembros del Tribunal de Predefensa: **DraC Rosmary Rodríguez** y **DrC Denis Verdaser** por aceptar la tarea y por emitir sus impresiones.

Un ESPECIAL AGRADECIMIENTO para dos profesionales suizos, de reconocido prestigio internacional, que desde el primer momento y sin cuestionamiento alguno me aceptaron en el seno de sus laboratorios. Ellos pusieron a mi disposición sus instalaciones y recursos, lo que me permitió profundizar en la temática, contribuyendo en gran medida con mi formación, e incentivaron en mí el deseo de explorar el mundo de los patógenos transmitidos por garrapatas y sus enfermedades. A ellos, **Prof. Lise Gern** y **Prof. Reto Lienhard**, les debo gran parte de los resultados alcanzados y plasmados en este documento. Gracias Lise por tu amabilidad, confianza, entrega y conocimiento científico. Gracias Reto por buscarme, por tu ayuda, por aceptar responder a mis inquietudes en cualquier momento, pero sobre todo por tu amistad. Sea extensivo este agradecimiento a sus excelentes grupos de trabajo, y a la Confederación Suiza por ofrecerme las becas.

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco también a la **DraC Hilda García** (Instituto Finlay) y **DraC Belkis Corona** (CENSA), por haber aceptado ser oponentes de esta tesis para el acto de Predefensa, por sus minuciosas y críticas revisiones, señalamientos y sugerencias que han contribuido a mejorar la calidad del documento.

A la **DraC Nereyda Cantelar** y **Lic. Maribel Chao** de la Vicedirección de Docencia, por facilitarme transitar por las diferentes etapas para alcanzar el objetivo final.

Al **Lic. Roberto González** y la **Téc. Bárbara Martínez** por la colaboración brindada desde “Las Terrazas”.

Al **Dr. Luis C. Méndez**, Director del Centro Nacional de Parasitología del Instituto de Medicina Veterinaria, por las informaciones ofrecidas.

A los **médicos cubanos** de las diferentes especialidades que han tenido presente o han incorporado en su pensamiento clínico a la enfermedad de Lyme, lo que ha permitido en gran medida la obtención de las evidencias mostradas en este documento.

Al **Ing. Raúl Portela** por su colaboración en la impresión a color del documento.

Al **Lic. Lázaro González** por estar siempre dispuesto a ayudar cuando más estresados estamos y casi siempre contra-reloj, por darle el toque final a la tesis.

A toda **mi familia** en general: padres, hermana, sobrinas y sobrinos, suegros, cuñados, aunque quizá alguno no logre entender si vale la pena pasar por todo este esfuerzo y sacrificio, pero sí estoy seguro de que se sienten orgullosos por ello.

A mi esposa, amiga y madre de mis hijos, quien llegó justo a mi vida hace 16 años cuando comenzaba toda esta historia. Por ser la persona que es, por estar siempre ahí, por escuchar todas mis peroratas. Gracias **Idalmis**.

Y a mis dos pequeñas y bellas criaturas, **Alejandra y Adrián**, que aun sin saber que significa ser Doctor en Ciencias de la Salud cuando me ven trabajando en casa saben que estoy haciendo algo para ser “Doctor”, e incluso Ale me ha preguntado: ¿Papá ya eres doctor? Gracias mis niños por alegrarme la vida, por ser como son aunque a veces me hagan perder la paciencia.

A todos, **MUCHAS GRACIAS**

Islay

## SÍNTESIS

Se presentan los resultados de un conjunto de investigaciones realizadas con el propósito de aportar evidencias científicas sobre la presencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* sensu lato en Cuba, que incluyó la evaluación de métodos microbiológicos para la detección de esta espiroqueta, la confirmación de la infección en muestras clínicas de pacientes con sospechas clínico-epidemiológicas de enfermedad de Lyme, la estimación de la seroprevalencia de anticuerpos contra este agente en una población de riesgo y la detección molecular de borrelias en garrapatas de importancia médico-veterinaria. Las herramientas microbiológicas evaluadas (medio de cultivo modificado, métodos de extracción de material genético a partir de garrapatas para su posterior uso en la detección de *B. burgdorferi* sensu lato por Reacción en Cadena de la Polimerasa, y sensibilidad analítica de dos juegos de cebadores) fortalecieron al Laboratorio Nacional de Espiroquetas para futuras investigaciones. Se encontraron evidencias serológicas específicas de la infección autóctona por este microorganismo en las muestras de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas, y en los expuestos a mordeduras por garrapatas. No se logró la detección de material genético de *B. burgdorferi* sensu lato en las garrapatas analizadas lo que no las descarta como posibles vectores del agente. Éste constituye el primer trabajo de su tipo en el país, y sienta las bases para próximos estudios sobre la infección por *B. burgdorferi* sensu lato.

## ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	2
1.1 Introducción	2
1.2 Hipótesis	5
1.3 Objetivos	5
1.4 Novedad científica	6
1.5 Valor teórico	6
1.6 Valor práctico	7
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	9
2.1 Antecedentes históricos de la enfermedad de Lyme	9
2.2 Agente etiológico	10
2.2.1 Ubicación taxonómica	10
2.2.2 Características generales	11
2.2.3 Características genéticas	11
2.2.4 Ciclo de vida	13
2.3 Epidemiología	14
2.4 Patogénesis	17
2.5 Manifestaciones clínicas	19
2.6 Diagnóstico de laboratorio	21
2.7 Definición de caso para la vigilancia	27
2.8 Tratamiento	29
2.9 Profilaxis, prevención y control	30
2.10 Antecedentes de la enfermedad de Lyme en Cuba.	32
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
3.1 Diseño general	36
3.2 Técnicas y procedimientos	37

	Pág.
3.2.1 Evaluación de métodos microbiológicos para la detección de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	37
3.2.1.1 Evaluación de un medio de cultivo modificado para <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	37
3.2.1.1a Elaboración del medio de cultivo modificado	37
3.2.1.1b Evaluación cualitativa del crecimiento de cepas de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato en el medio de cultivo modificado	37
3.2.1.1c Evaluación cuantitativa del crecimiento de cepas de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato en el medio de cultivo modificado	38
3.2.1.1d Evaluación de la expresión y antigenicidad de las proteínas de las borrelias en el medio de cultivo modificado	38
3.2.1.2 Evaluación de la eficacia de métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas duras	39
3.2.1.2a Extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas	39
3.2.1.2b Evaluación de la eficacia de los métodos de extracción de ácidos nucleicos	44
3.2.1.3 Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	45
3.2.1.3a Evaluación de la PCR - 5S-23S	45
3.2.1.3b Evaluación de la PCR - 16S	46
3.2.1.3c Estudio del límite de detección o sensibilidad analítica de las PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	47
3.2.2 Diagnóstico microbiológico de la infección por <i>B. burgdorferi</i> sensu lato en muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas	47
3.2.2.1 Estudio de serie de casos 1	47
3.2.2.2 Estudio de serie de casos 2	48
3.2.3 Prevalencia de anticuerpos contra <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto en una población expuesta a mordeduras por garrapatas	50
3.2.4 Detección molecular de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato en garrapatas	51
3.2.4.1 Estudio observacional 1	51
3.2.4.2 Estudio observacional 2	53
3.3 Aseguramiento de la calidad	54
3.4 Análisis estadístico	55
3.5 Aspectos éticos	56

	Pág.
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	58
4.1 Evaluación de métodos microbiológicos para la detección de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	58
4.1.1 Evaluación de un medio de cultivo modificado para <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	58
4.1.2 Evaluación de la eficacia de métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas duras	62
4.1.3 Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	68
4.2 Diagnóstico microbiológico de infección por <i>B. burgdorferi</i> sensu lato en muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de la misma	71
4.2.1 Estudio de serie de casos 1	71
4.2.2 Estudio de serie de casos 2	73
4.3 Prevalencia de anticuerpos contra <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto en individuos de una población expuesta a mordeduras por garrapatas	79
4.4 Detección molecular de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato en garrapatas de importancia médica y veterinaria	86
<b>V. CONSIDERACIONES GENERALES</b>	92
<b>CONCLUSIONES</b>	96
<b>RECOMENDACIONES</b>	98
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	100
<b>ANEXOS</b>	
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS</b>	
<b>PUBLICACIONES DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS</b>	

# **I. INTRODUCCIÓN**

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Introducción

La enfermedad o borreliosis de Lyme se describió por primera vez en el marco de una epidemia de artritis en niños, transmitida por la mordedura de garrapatas (*Ixodes dammini*) durante la década de 1970 en la pequeña ciudad de Lyme, estado de Connecticut, Estados Unidos de América (EUA). En esta especie, Willy Burgdorfer observó espiroquetas que más tarde se denominaron, en su honor, como *Borrelia burgdorferi* (Steere *et al.*, 1983, Baranton *et al.*, 1986; Gern, 2004). Hacia finales del siglo XX se reconoce a esta entidad como una importante enfermedad emergente por sus graves secuelas a la salud humana y por las dificultades para su prevención y control (Steere, 2001).

Es una zoonosis para la que los mamíferos pequeños, como los roedores, y los mamíferos grandes, silvestres y domésticos, constituyen los principales reservorios de las borrelias, las que se diseminan fundamentalmente por garrapatas duras del género *Ixodes* (Gern, 2004; Steere *et al.*, 2004; Rabinowits *et al.*, 2007), aunque se han constatado también en otros artrópodos como mosquitos, pulgas y moscas del caballo y del venado (Magnarelli y Anderson, 1988; Zakovska *et al.*, 2002; Kosik-Bogacka *et al.*, 2004). Las aves, y en especial las migratorias, tienen un importante papel en el mantenimiento de los ciclos zoonóticos e incluso han sido reportadas también como reservorios (Rand *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 2003; Poupon *et al.*, 2006).

Actualmente se reconocen 18 genomaespecies de borrelias que se agrupan en el complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Rudenko *et al.*, 2009a; Rudenko *et al.*, 2009b; Stanek y Reiter, 2011), seis de ellas se consideran patógenas al hombre (Grubhoffer *et al.*, 2005; Wilske *et al.*, 2007).

Esta enfermedad sólo se ha descrito en el hemisferio norte y constituye la entidad transmitida por vectores más común en EUA y regiones de Eurasia (Gern, 2004; CDC, 2008; Hubálek, 2009). En países de América Latina y El Caribe se han realizado estudios de seroprevalencia y

para la búsqueda de la enfermedad en humanos y animales, con intentos de aislamiento y detección molecular de las borrelias, en los que se han mostrado evidencias serológicas de la infección, fundamentalmente a través de pruebas de pesquisa ya que en la mayoría de los países no se han empleado métodos confirmatorios (Stanchi y Balague, 1993; Arocha-Sandoval *et al.*, 1994; Ciceroni *et al.*, 1994; Palacios *et al.*, 1999; Osorio, 2001). Sin embargo, en Brasil por ejemplo, se concluyó que los casos estudiados se correspondían con un síndrome similar o imitador de la enfermedad de Lyme ya que se encontraron diferencias en los perfiles clínicos y de laboratorio (Mantovani *et al.*, 2007), y en México se logró detectar ácido desoxirribonucleico (ADN) de *B. burgdorferi* sensu stricto en garrapatas, así como anticuerpos específicos en sueros de pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas de la enfermedad (Gordillo-Pérez *et al.*, 2007; Gordillo-Pérez *et al.*, 2009).

La borreliosis de Lyme es una infección multisistémica, que evoluciona clínicamente en distintos estadios, usualmente comienza con una lesión característica en piel conocida por eritema migratorio en el sitio donde ocurrió la mordedura de la garrapata; en pocos días a semanas continúa con afectaciones musculoesqueléticas, neurológicas o cardíacas, y en semanas a meses más tarde cursa por diferentes formas de artritis o lesiones crónicas en piel, que pueden ser difíciles de tratar (Steere, 2006; Bratton *et al.*, 2008; Vanousová y Hercogová, 2008). También la infección por *B. burgdorferi* sensu lato se puede presentar de forma asintomática, aunque no es usual (Wormser *et al.*, 2001; Steere *et al.*, 2003).

Debido a la multiplicidad de los síntomas, el diagnóstico clínico se hace difícil, sobre todo en períodos tardíos de la enfermedad, cuando faltan los datos sobre una infección primaria. A causa del escaso número de gérmenes en las muestras clínicas y de las complejas condiciones para su cultivo y crecimiento, el diagnóstico de laboratorio de esta entidad, prácticamente sólo se apoya en las pruebas serológicas. Entre ellas, las más importantes son los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA, de sus siglas en inglés Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay) y los Western blot, a través de los que se detectan anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu lato. La sensibilidad y especificidad de ambos métodos dependen del momento en que se toma la muestra clínica. Estos no permiten diferenciar entre infección activa y pasada pues los anticuerpos persisten durante meses o años, lo que no significa que ofrezcan inmunidad protectora (Steere *et al.*, 2006; Wilske *et al.*, 2007; Bratton *et al.*, 2008).

Ante estas dificultades los lineamientos para el diagnóstico recomiendan siempre la realización de dos pruebas: un ELISA seguido de un Western blot, o ambos simultáneamente (CDC, 1995).

Los métodos moleculares, específicamente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), permite la detección de *B. burgdorferi* en diversos tipos de muestras pero no se recomienda para el diagnóstico de rutina por presentar una sensibilidad similar a la del cultivo (Wilske *et al.*, 2007; Bratton *et al.*, 2008). Sin embargo, la PCR se utiliza para la detección e identificación de estas espiroquetas en garrapatas de diferentes orígenes (Rijpkema *et al.*, 1995; Stanczak *et al.*, 1999; Alekseev *et al.*, 2001; Poupon *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2008).

En Cuba, desde la década de 1980, se sospecha la ocurrencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en la comunidad “Las Terrazas”, situada en Sierra del Rosario, Candelaria, provincia Artemisa (anteriormente Pinar del Río). En este lugar la infestación de garrapatas es alta, fundamentalmente a expensas de *Amblyomma cajennense*, y entre su población humana se notifican históricamente síndromes idiopáticos que por las características clínicas y los antecedentes epidemiológicos remedan a la enfermedad de Lyme, pero que no pudieron ser confirmados por no disponer de diagnóstico de laboratorio (Grandío *et al.*, 1988; Fernández A. Comunicación personal. Investigador<sup>†</sup> del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 1997).

La primera evidencia de un caso probable de infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba, data también de la década de 1980. Se trató de un paciente que nunca antes había viajado al exterior del país, al que se le diagnosticó en 1984 una mielorradiculitis en el Instituto de Neurología y Neurocirugía de La Habana, y entre sus antecedentes epidemiológicos se recogieron frecuentes mordeduras por garrapatas (biólogo de ocupación). Tres años más tarde el paciente viajó a la antigua República de Checoslovaquia, donde por interés personal solicitó el examen de una muestra de suero para enfermedad de Lyme. Se le diagnosticó entonces, retrospectivamente, una neuroborreliosis, que no fue confirmada por los métodos serológicos recomendados (Dickinson *et al.*, 1997; Fernández A. Comunicación personal. Investigador<sup>†</sup> del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 1997).

Este hallazgo serológico en un individuo cubano reforzó la sospecha sobre la existencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba; por lo que iniciar investigaciones microbiológicas que proporcionaran evidencias científicas al respecto, se mostró desde entonces como una necesidad.

La introducción del diagnóstico de laboratorio de esta entidad en el país permitirá la detección de la respuesta inmune humoral específica en pacientes con sospechas clínicas o epidemiológicas, así como la demostración del agente etiológico en muestras clínicas y en garrapatas de importancia médica y veterinaria. Por ello, es imperioso la capacitación de recursos humanos en esta temática y trabajar en la búsqueda, evaluación e implementación de herramientas microbiológicas convencionales y moleculares para la detección, de forma directa o indirecta, de este agente infeccioso y su posterior aplicación en el diagnóstico a partir de muestras clínicas humanas o de vectores potenciales, así como en el estudio de poblaciones humanas expuestas a la mordedura de garrapatas, lo que permitirá confirmar o no la presencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba.

### **1.2 Hipótesis**

Existen evidencias que corroboran la presencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba.

### **1.3 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Proporcionar evidencias científicas de la presencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba.

#### **Objetivos específicos**

1. Evaluar métodos microbiológicos para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato.
2. Confirmar la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de la enfermedad de Lyme.

3. Estimar la prevalencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* sensu stricto en una población expuesta a mordeduras por garrapatas.
4. Detectar la presencia de material genético de *B. burgdorferi* sensu lato en garrapatas de importancia médica y veterinaria.

### 1.4 Novedad científica

La novedad científica de este trabajo radica en que en el mismo:

- Se muestran las primeras evidencias serológicas específicas de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en individuos con sospechas clínicas o epidemiológicas de enfermedad de Lyme en Cuba.
- Se sugiere un medio de cultivo modificado como alternativa para el crecimiento de *B. burgdorferi* sensu lato.
- Se propone una metodología novedosa internacionalmente para la extracción de ácidos nucleicos en garrapatas.

### 1.5 Valor teórico

El presente documento contiene toda la información relacionada con el primer estudio microbiológico sobre la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba, que incluye:

- La evaluación de un medio de cultivo modificado para la multiplicación de *B. burgdorferi* sensu lato.
- La evaluación y aplicación de diferentes protocolos para la extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas duras.
- Los resultados de la aplicación de novedosos métodos para el diagnóstico de laboratorio de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en muestras de pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas.
- Las evidencias serológicas de la circulación de *B. burgdorferi* sensu lato en individuos de una comunidad cubana con alta infestación por garrapatas.

- Los resultados de los primeros estudios moleculares para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato en ixódidos cubanos.

Las publicaciones nacionales (2) e internacionales o extranjeras (4) sobre el tema, la participación en eventos científicos nacionales (2) e internacionales (9), la impartición periódica y sistemática de cursos de postgrado (residencia médica en Microbiología y maestría en Bacteriología-Micología), la presentación y aprobación de 1 Resultado Relevante Institucional, así como la realización de tesis (3) han permitido dar divulgación a los resultados de estas investigaciones, lo que ha propiciado que durante la última década se haya incrementado de cierta manera el pensamiento clínico sobre la sospecha de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en pacientes cubanos, y que se hayan iniciado intercambios científicos con instituciones nacionales y extranjeras.

### 1.6 Valor práctico

- Se implementa por primera vez en Cuba, a nivel del Laboratorio Nacional de Espiroquetas (LNE-IPK), el diagnóstico microbiológico (bacteriológico, serológico y molecular) de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato.
- Las evidencias serológicas, altamente sugestivas de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en diferentes regiones del país, representan una alerta epidemiológica para las autoridades nacionales de salud pública y veterinaria.
- Los resultados de esta investigación constituyen la base para futuras investigaciones sobre la búsqueda del agente etiológico de esta entidad infecciosa y su vector.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antecedentes históricos de la enfermedad de Lyme

La borreliosis o enfermedad de Lyme como entidad nosológica infecciosa transmitida por vectores resulta aparentemente nueva, sin embargo, existen antecedentes de que en 1909 Afzelius describió el eritema crónico migratorio en Suecia. Más tarde, Garin y Bujadoux, y Bannwarth reportaron un síndrome en Europa, que incluía meningitis linfocítica, radiculitis dolorosa y parálisis del nervio craneal, relacionado con los eritemas crónicos migratorios y la mordedura de garrapatas *I. ricinus* (Baranton *et al.*, 1986; Sigal 1988).

El primer caso de esta enfermedad en los EUA se describió en 1962 en Great Island, Massachusetts, en una mujer de 35 años que padeció por tres años de ataques intermitentes de artritis inflamatoria en las rodillas, seguidos de episodios de rigidez en las manos y marcada fatiga durante los siguientes 15 años. Los ulteriores reportes de infecciones humanas se produjeron una década después, un caso en 1972 y otro en 1974 (Steere *et al.*, 1986).

En 1975, reaparece esta enfermedad como consecuencia de una epidemia de artritis que afectó a niños y adultos, en la que la cuarta parte de los enfermos presentaba una lesión cutánea característica en forma de “ojo de buey” precedente a la aparición de la artritis. Los casos estaban agrupados en el lado este del río Connecticut en EUA (Old Lyme, Lyme y East Haddam) (Steere *et al.*, 1977). Esta epidemia fue estudiada por el epidemiólogo Allen Steere de la Universidad de Yale, quien sospechó inicialmente que se debía a una enfermedad desconocida, de origen viral y transmitida por un artrópodo no identificado, pero rechazó esta hipótesis ante la observación de uno de los pacientes, que era ecologista, y que aportó una garrapata (*I. dammini*, actualmente *I. scapularis*) que lo había mordido previamente a la enfermedad. Estos, asociado al hecho de que otros pacientes mencionaron un inusual eritema que aparecía semanas antes de comenzar los síntomas, similar al reportado en Europa y al parecer causado por la mordedura de una garrapata, apuntó a que quizás éste fuera el vector de la enfermedad, a la que se denominó inicialmente artritis de Lyme y más tarde enfermedad de

Lyme, por la población donde aparecieron los primeros casos (Steere *et al.*, 1977; Steere *et al.*, 1978; Baranton *et al.*, 1986).

Cuando el entomólogo Willy Burgdorfer, al disectar el tubo digestivo de una garrapata *I. dammini*, recolectada en Shelter Island, New York, EUA, lo encontró repleto de espiroquetas (fundamentalmente en el intestino medio, final y en la ampolla rectal) y sospechó que éstas podrían ser el agente causal de la enfermedad. Posteriormente demostró que estos microorganismos desarrollaban en conejos blancos de Nueva Zelandia una lesión igual al eritema migratorio. Este hallazgo y el que se aislaron espiroquetas a partir de sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) de enfermos de Lyme reafirmaron que la espiroqueta de *I. dammini* estaba involucrada en la etiología de la enfermedad, y que el conejo doméstico era susceptible. Por otra parte, se demostró el valor de la Inmunofluorescencia Indirecta como herramienta para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme (Burgdorfer *et al.*, 1982).

En 1983 R. C. Johnson demostró que este microorganismo, reconocido como espiroqueta de *I. dammini* (Burgdorfer *et al.*, 1982; Steere *et al.*, 1983), era una nueva especie del género *Borrelia* y propone el nombre *B. burgdorferi* en honor a su descubridor (Johnson *et al.*, 1984).

## **2.2 Agente etiológico**

### **2.2.1 Ubicación taxonómica**

El género *Borrelia* es uno de los miembros de la familia Spirochetaceae del orden Spirochaetales. Las especies de *Borrelia* se dividen en dos categorías atendiendo a sus características ecológicas y genéticas: las del grupo de fiebre recurrente y las de enfermedad de Lyme (Wang *et al.*, 1999). En esta última se sitúa el complejo *B. burgdorferi* sensu lato, en el que se reconocen actualmente 18 genomaespecies: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmani*, *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. bissetti*, *B. sinica*, *B. californiensis*, *B. yangtze*, *B. carolinensis*, *B. americana*, *B. bavariensis* y *B. kurtenbachii*. Las primeras seis son consideradas patógenas para el hombre (Rudenko *et al.*, 2009a; Rudenko *et al.*, 2009b; Margos *et al.*, 2009; Stanek y Reiter, 2011).

### 2.2.2 Características generales

Las borrelias son microorganismos unicelulares helicoidales, muy flexibles, con un cilindro protoplasmático (envuelto por una membrana externa) que posee de 3 a 10 vueltas, aunque puede llegar hasta 30 espirales, separadas unas de otras de 2 a 4  $\mu\text{m}$ . Presentan una pared celular no rígida, miden entre 10 y 30  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Poseen de 15 a 20 flagelos periplásmicos, también llamados fibrillas axiales, fibrillas periplásmicas o endoflagelos, dirigidos hacia el centro de la célula donde se superponen; estas estructuras son las responsables de su activa y característica movilidad de rotación en contra de las manecillas del reloj (Steere, 2005; Krupka *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2007). La composición de la envoltura celular es similar a la de las bacterias Gram negativas, excepto que no presentan lipopolisacáridos pero sí abundantes lipoproteínas (Krupka *et al.*, 2007).

Estas bacterias se pueden visualizar por microscopía en campo oscuro o contraste de fases. También pueden ser reconocidas por microscopía luminosa al emplear los colorantes habituales de hematología, las tinciones de Giemsa, Wright y la impregnación con sales de plata (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2007). Son cultivables pero sólo en medios bacteriológicos que contengan suero o extractos de tejidos, y fundamentalmente a partir de muestras extraídas del ácaro vector. El medio de cultivo que se emplea universalmente es el Barbour-Stoenner-Kelly modificado (BSK II), estandarizado y comercializado como BSK-H, al que se le puede añadir agentes antimicrobianos como neomicina y co-trimoxazol (Mursic *et al.*, 1986). Una temperatura de 33-35°C y condiciones de microaerofilia resultan óptimas para el cultivo (Joklik *et al.*, 1998; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Krupka *et al.*, 2007). También las líneas celulares de fibroblastos de ratón (L-929) se pueden usar para aislar borrelias a partir de muestras clínicas (Tylewska y Chmielewski, 1997).

### 2.2.3 Características genéticas

El genoma de *B. burgdorferi* sensu lato, a diferencia de los genomas de las bacterias de vida libre, es relativamente pequeño, lo que refleja probablemente su modo de vida como parásito obligado. En él falta la maquinaria reconocida convencionalmente para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos y cofactores enzimáticos, los que tiene que obtener

del hospedero, y por eso para su cultivo *in vitro* se requiere de medios químicamente complejos (Tilly *et al.*, 2008; Marques, 2010).

Este genoma, descrito como inusual, está constituido por un cromosoma lineal de aproximadamente 1 Mb y numerosos plásmidos circulares y lineales (Baril *et al.*, 1989; Fraser *et al.*, 1997; Tilly *et al.*, 2008). Específicamente para *B. burgdorferi* sensu estricto se describe un genoma de 1 521 419 pares de bases (pb) con un cromosoma lineal de 910 725 pb y 21 plásmidos, 12 lineales y 9 circulares, que en conjunto tienen un tamaño de 610 694 pb (Fraser *et al.*, 1997, Casjens *et al.*, 2000; Krupka *et al.*, 2007). El número de plásmidos y sus tallas varía entre cepas y genomaespecies (Marques, 2010).

A pesar de la forma atípica del genoma, la mayoría de los genes cromosomales se encuentran comúnmente en otros genomas bacterianos, y codifican para proteínas necesarias para la replicación, metabolismo energético y transporte de nutrientes; sin embargo, los genes ubicados en los plásmidos son menos reconocibles y la mayoría de ellos parecen ser únicos del género *Borrelia*, e imprescindibles para la infectividad o persistencia de la bacteria en la garrapata o el hospedero (Casjens *et al.*, 2000; Tilly *et al.*, 2008; Marques, 2010).

La expresión de los genes varía según la especie de hospedero afectado, la temperatura, la ubicación en el cuerpo del hospedero y otros factores locales, y su control es diferente al de la mayoría de las eubacterias estudiadas (Fraser *et al.*, 1997).

Estas espiroquetas presentan además una organización única de los genes que codifican para las subunidades ribosomales del ácido ribonucleico (ARNr). Tienen una simple copia del gen de la subunidad 16S (*rrs*) y dos copias repetidas en tándem de los genes que codifican para las subunidades 23S (*rrl*) y 5S (*rrf*) (Davidson *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1992; Ojaimi *et al.*, 1994). Además se ha demostrado que en estos microorganismos los genes *rrs* están alejados de los genes *rrl/rrf* y que se expresan de forma separada, fenómeno antes observado en la eubacteria termófila *Thermus thermophilus* y el planctomiceto *Pirellula marina* (Fukunaga *et al.*, 1992).

#### 2.2.4 Ciclo de vida

*B. burgdorferi* sensu lato tiene un ciclo de vida complejo debido a que circula entre vectores artrópodos y hospederos vertebrados. Los vectores más frecuentes son las garrapatas del género *Ixodes* y entre los hospederos vertebrados se reconocen diferentes especies de aves, mamíferos e incluso reptiles (lagartijas), por lo que se tiene que adaptar a ambientes muy diferentes (Krupka *et al.*, 2007; Tilly *et al.*, 2008).

Las garrapatas en estadio de larva adquieren las espiroquetas de los roedores infectados. Después de la muda a ninfa, las infectadas perpetuarán el ciclo en nuevos reservorios, entre los que se incluyen los roedores, pero al mudar a adultos se alimentarán exclusivamente de mamíferos de mayor tamaño, los que no son hospederos competentes para *B. burgdorferi* sensu lato. Las espiroquetas son raramente transmitidas por vía transovárica, lo que hace a los estados de larvas y ninfas cruciales para el mantenimiento de la espiroqueta. Aunque las ninfas y adultos ocasionalmente se alimentan de los humanos, el pequeño tamaño de las ninfas las hace de difícil detección, y por eso se pueden alimentar durante el tiempo suficiente para transmitir la espiroqueta y causar la enfermedad de Lyme (Tilly *et al.*, 2008; Marques, 2010).

Las borrelias tienen que ser capaces de adherirse y sobrevivir en el intestino de la garrapata, pasar del epitelio de éste a la hemolinfa y transportarse a través de las glándulas salivares al flujo sanguíneo del hospedero, evitar la reacción inmune y diseminarse a los órganos diana. En todo este proceso tienen un importante papel varias proteínas de membrana externa como la A (OspA), B (OspB), C (OspC), E (OspE) y F (OspF), proteínas adhesivas como las de unión a las decorinas A y B (DbpA, DbpB), a los glicosaminoglicanos (Bgp) y fibronectina (BBK32) (Steere, 2006; Krupka *et al.*, 2007).

Cuando las condiciones no son favorables para la multiplicación de *B. burgdorferi* sensu lato, como puede ser la presencia de antibióticos (fundamentalmente betalactámicos), el LCR o de otros medios con déficits de nutrientes, éstas cambian su morfología espiroquetal característica y móvil a esferoplastos o formas L o quistes no móviles (también conocidas como formas císticas). A ello se le atribuye la sobrevivencia por largos periodos en el sistema nervioso central y periférico y en las articulaciones, así como la desaparición de los anticuerpos dependientes de pared celular. Una vez que las condiciones son normales nuevamente ellas revierten a su forma espiroquetal, fenómeno que ha sido demostrado *in vitro* e *in vivo*. La

formación de quistes se debe fundamentalmente a reestructuraciones físico-químicas de la membrana externa que conllevan a la fusión de la misma (Mursic *et al.*, 1996; Gruntar *et al.*, 2001; Murgia *et al.*, 2002; Miklossy *et al.*, 2008).

### 2.3 Epidemiología

Desde finales del siglo XX la borreliosis de Lyme se considera como una importante zoonosis emergente, por las graves secuelas que produce a la salud humana y por las dificultades para su prevención y control (Steere, 2001; Heyman *et al.*, 2010).

Tiene una distribución mundial, aunque se describe prácticamente sólo en el hemisferio norte y constituye la enfermedad transmitida por vectores más común en EUA y regiones de Eurasia (Gern, 2004; Steere, 2005; CDC, 2008; Hubálek, 2009). En EUA, durante el periodo 1992-2006, se reportaron 248 074 casos con una tendencia anual al incremento de un 101%; de 9 908 casos en 1992 a 19 931 casos en el 2006, (CDC, 2008). Ya en el año 2008 se reportaron 35 198 casos, de ellos 28 921 confirmados y 6 277 probables (CDC, 2010a).

Según información de la Organización Mundial de la Salud, en Europa se reportan anualmente de 14 a 140 casos / 100 000 habitantes, y Eslovenia y Austria son los países de mayor incidencia (120 y 130 casos / 100 000 habitantes, respectivamente), pero estos valores no constituyen un reflejo real de la situación epidemiológica ya que existen insuficiencias en los sistemas de reportes de casos (Derdáková y Lencáková, 2005).

Los casos de borreliosis de Lyme en EUA son reportados de forma voluntaria por los Departamentos de Salud al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, de sus siglas en inglés Centers for Disease Control and Prevention), como parte del Sistema Nacional de Vigilancia de Enfermedades Notificables (CDC, 2008). En los países europeos, durante la primera década del 2000 se suprimió la obligación de declararla y a pesar de ello se continúa reportando como un problema de salud (Evison *et al.*, 2006a).

En América Latina y El Caribe existen evidencias clínicas y de laboratorio sobre la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en diversos países como Argentina (Stanchi y Balague, 1993), Bolivia (Ciceroni *et al.*, 1994), Chile (Neira *et al.*, 1996; Osorio, 2001), Colombia (Palacios *et al.*, 1999) y Venezuela (Arocha-Sandoval *et al.*, 1994). En éstos se han llevado a cabo estudios

de seroprevalencia y de búsqueda de la infección en humanos y animales, con intentos de aislamiento y detección molecular de las borrelias, que han permitido mostrar evidencias serológicas de la infección, pero que en la mayoría de los países no se han confirmado. Brasil y México constituyen la excepción, ya que en Brasil los estudios clínicos, serológicos y moleculares han permitido describir un síndrome similar o imitador de la enfermedad de Lyme (Mantovani *et al.*, 2007), y en México prácticamente se ha reportado la enfermedad de Lyme pues se ha detectado recientemente ADN de *B. burgdorferi* sensu stricto en garrapatas, además de las evidencias serológicas específicas constatadas con anterioridad en pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas de la enfermedad (Gordillo-Pérez *et al.*, 2007; Gordillo-Pérez *et al.*, 2009).

La borreliosis de Lyme se presenta en individuos de cualquier edad. En EUA se describe con una distribución bimodal; las mayores tasas se reportan entre niños de 5-9 años y adultos de 55-59 años (8,6 casos/100 000 hab y 7,8 casos/100 000 hab, respectivamente), aunque el mayor número de casos se constata entre 5-19 años y 30-64 años (CDC, 2008). Es más frecuente en los hombres, en los que se comprobó un marcado incremento de las tasas anuales (194%) en relación a las mujeres (114%) (CDC, 2008). También desde el punto de vista serológico se describen diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos IgG, según el sexo del individuo (Schwarzwalder *et al.*, 2010).

El principal factor de riesgo para adquirir la infección por *B. burgdorferi* sensu lato es la permanencia en zonas boscosas o en las que predomine la vegetación, por lo que se considera a la borreliosis de Lyme como una enfermedad profesional para los guardabosques, leñadores, agricultores y ganaderos (Cinco *et al.*, 2004; Killilea *et al.*, 2008). Se debe tener cuidado también en las áreas residenciales, especialmente al remover las literas de hojas secas que se crean en los jardines pues éstas albergan con frecuencia garrapatas (Bratton *et al.*, 2008).

La distribución geográfica de las genomaespecies de *B. burgdorferi* sensu lato patógenas al hombre varía de un continente a otro. En EUA sólo se reporta *B. burgdorferi* sensu stricto; en Europa, se encuentran las seis, aunque con mayor frecuencia *B. garinii*, *B. afzelii* y *B. burgdorferi* sensu stricto; mientras que en Asia sólo se reportan *B. garinii* y *B. afzelii* (Gern, 2004, Comstedt *et al.*, 2009; Stanek y Reiter, 2011).

En Europa la tasa media de infección de las garrapatas por borrelias varía entre los diferentes estadios, de 10,8% en las ninfas a 17,4% en los adultos, e incluso en Suiza se constata que pueden variar entre 5% y 47,5% (Gern, 2004). También se ha comprobado que en zonas montañosas la frecuencia de garrapatas y la tasa de infección de éstas varía en relación a la altitud (Jouda *et al.*, 2004a).

El conocimiento de la densidad de garrapatas y la tasa de infección de éstas por *B. burgdorferi* sensu lato en una región permite calcular el riesgo de encontrar una garrapata infectada; por ejemplo, en Suiza, se conoce que existen regiones en las que el riesgo es mínimo (2 garrapatas infectadas / 100 m<sup>2</sup>) y otras en las que es máximo (69 garrapatas infectadas / 100 m<sup>2</sup>). El riesgo de transmisión se hace mayor cuando estas zonas colindan con las ciudades (Gern, 2004).

Las garrapatas se encuentran sobre la vegetación, fundamentalmente durante los meses de febrero-marzo a octubre-noviembre, con dos picos de mayor frecuencia: uno en la primavera (a veces el más importante) y otro en el otoño (Gern, 2004). Esto provoca una estacionalidad de la borreliosis. Aunque se reportan casos durante todos los meses del año, la mayoría de los pacientes debutan con la enfermedad durante los meses de verano (junio-julio-agosto), ya que se corresponden con los de mayor actividad de las garrapatas en búsqueda de sus hospederos mamíferos, y que coinciden con los de mayor actividad de los humanos al aire libre (CDC, 2008).

El tiempo necesario para la transmisión de las borrelias por las garrapatas, una vez que comienzan a alimentarse sobre el hospedero, varía según la genomaespecie; *B. afzelii* se transmite durante las primeras 24 horas, mientras que *B. burgdorferi* sensu stricto requiere más de 48 horas (Gern, 2004; Marques, 2010). La saliva de la garrapata contiene numerosas sustancias, entre las que se encuentran anticoagulantes y otras que modulan la respuesta inmune del hospedero y que actúan como anestésicos que hacen indolora la mordedura (Gern, 2004), por lo que sólo un 50%-70% de los pacientes las recuerdan (Bratton *et al.*, 2008).

Las garrapatas constituyen los únicos vectores reportados hasta el momento capaces de transmitir las borrelias y causar la enfermedad en humanos y animales. Entre las garrapatas, las del género *Ixodes* son las mayormente implicadas en el ciclo zoonótico de estas espiroquetas. En EUA, *I. scapularis* e *I. pacificus*; en Europa, *I. ricinus* e *I. persulcatus* y en

Asia, *I. persulcatus* constituyen los principales agentes de diseminación (Gern 2004; Steere *et al.*, 2004; Tilly *et al.*, 2008).

Entre los factores que influyen directamente en la reproducción y supervivencia de las garrapatas se encuentra el microclima. La temperatura entre 27-39°C y la humedad relativa de 60-80% son las más favorables, dependiendo de la especie de garrapata presente en cada región (Rodríguez y Domínguez, 1998).

Existen otros vectores en los que se han demostrado la presencia de *B. burgdorferi* *sensu lato* en sus intestinos, pero no se ha constatado la transmisión a humanos o animales. Entre éstos se encuentran mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (Zakovska *et al.*, 2002; Kosik-Bogacka *et al.*, 2004), y las moscas del caballo y del venado (Magnarelli y Anderson, 1988).

Los reservorios principales lo constituyen los mamíferos, entre los que se destacan los pequeños, especialmente los roedores. También se reportan como reservorios las aves, fundamentalmente las migratorias, las que tienen un papel importante en la diseminación de garrapatas hacia otras regiones (Derdáková y Lencáková, 2005).

La presencia de *B. burgdorferi* *sensu lato* o la respuesta de anticuerpos contra ella también se ha documentado en animales domésticos como perros, caballos, ganado bovino y gatos, los que pueden desarrollar la enfermedad de Lyme (Derdáková y Lencáková, 2005; Bratton *et al.*, 2008). La posibilidad actual de estudiar el material genético extraído de las garrapatas permite conocer acerca del tipo de hospedero del cual obtuvieron la sangre para su alimentación, lo que facilita los estudios ecológicos (Kirstein y Gray, 1996; Morán-Cadenas *et al.*, 2007a).

### **2.4 Patogénesis**

Después de 3 a 32 días de la inyección por la garrapata de *B. burgdorferi* *sensu lato*, esta última se multiplica localmente en la piel en el sitio de la mordedura (Steere, 2005; Marques, 2010), donde tiene lugar el primer contacto con las células del sistema inmune (células dendríticas y macrófagos) (Steere, 2005; Tilly *et al.*, 2008).

*B. burgdorferi* *sensu lato* induce una respuesta proinflamatoria primaria en las células inflamatorias en las lesiones en piel, y las células mononucleares de la sangre periférica producen citoquinas proinflamatorias; de esta forma se activa la respuesta inmune innata y

adaptativa (Steere, 2005). Días o semanas después las borrelias se diseminan a otros sitios, periodo durante el que se recuperan espiroquetas en sangre y LCR; también, aunque en menor número, a partir de muestras de miocardio, retina, músculo, hueso, bazo, hígado, meninges y cerebro. Entre los mecanismos que permiten la diseminación de las borrelias, se destacan la expresión de la proteína OspC, la unión del plasminógeno y sus activadores a la superficie de la espiroqueta y la unión de ésta a receptores del hospedero (Coburn *et al.*, 1998; Steere, 2005). Todos los tejidos afectados muestran una infiltración de linfocitos y células plasmáticas; el daño vascular en múltiples sitios incluye vasculitis u oclusión hipervascular (Steere, 2005).

Durante la infección diseminada, la respuesta adaptativa de las células B y T en los nódulos linfáticos permite la producción de anticuerpos contra diversos componentes de la bacteria. La respuesta de inmunoglobulinas (Ig) M específicas está asociada frecuentemente con la activación policlonal de las células B, incrementándose el nivel de IgM en suero, así como de complejos inmunes circulantes y crioglobulinas. La respuesta de IgG específica se desarrolla gradualmente, durante semanas a meses después, contra polipéptidos y antígenos no proteicos de las espiroquetas. La muerte de las borrelias está dada primariamente por las respuestas de anticuerpos bactericidas producidos por las células B, que utilizan la vía clásica del complemento (Steere, 2004; Steere, 2005).

A pesar de la fuerte respuesta inmune, las borrelias pueden sobrevivir durante años en las articulaciones, sistema nervioso o piel, presumiblemente por una disminución en la expresión de proteínas de membrana externa como OspC y variaciones antigénicas de la lipoproteína VlsE, por la inactivación de mecanismos efectores o escondiéndose en compartimentos menos accesibles como la matriz extracelular (Steere, 2005; Krupka *et al.*, 2007; Tilly *et al.*, 2008; Rupprecht *et al.*, 2008).

Durante la infección persistente (artritis, neuroborreliosis) las células T helper CD4<sup>+</sup> producen citoquinas proinflamatorias e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , de sus siglas en inglés interferon- $\gamma$ ). En los pacientes con artritis de Lyme se pueden encontrar células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ , mientras que en pacientes con acrodermatitis se ha observado en infiltrados de células T y macrófagos un perfil restringido de citoquinas, con poca o ninguna producción de IFN- $\gamma$ ,

elemento que podría explicar la ineficiencia de la respuesta inmune para eliminar la espiroqueta de este sitio (Steere, 2005; Steere, 2006).

## 2.5 Manifestaciones clínicas

Después de la transmisión eficiente de *B. burgdorferi* sensu lato la enfermedad de Lyme se presenta generalmente en diferentes estadios: infección localizada, diseminada y persistente; sin embargo, la infección es variable, algunos pacientes sólo presentan la infección localizada mientras que otros las manifestaciones tardías. Las características clínicas de esta enfermedad son similares a nivel mundial, aunque existen variaciones regionales, fundamentalmente entre las encontradas en América y las descritas en Europa y Asia (Steere, 2004). Dado que es una enfermedad multisistémica y proteiforme que puede simular o parecerse a otras (infecciosas y no infecciosas), algunos autores la consideran dentro del grupo de “Las Grandes Imitadoras” y por ello su diagnóstico clínico en ocasiones se hace difícil (Sigal, 1988). La enfermedad de Lyme puede ser causa de incapacidad, pero raramente es fatal (Bratton *et al.*, 2008; Kugeler *et al.*, 2011).

Las principales características de los estadios clínicos por los que cursa la borreliosis son las siguientes:

*Infección localizada* (estadio 1): después del periodo de incubación (3 a 32 días), en el 70 - 80% de los pacientes se forma, en el sitio de la mordedura de la garrapata, una lesión que se expande lentamente y que es conocida por eritema migratorio (Steere, 2004; Bratton *et al.*, 2008) o eritema crónico migratorio, como se le nombró en un inicio en los pacientes europeos, debido a que la expansión ocurría muy lenta y persistía durante un mayor tiempo (Steere 2006). El rash aparece como una lesión anular, eritematosa y homogénea que puede exhibir un aclaramiento central parcial en el transcurso clínico de la enfermedad. Para que una lesión sea clasificada como eritema migratorio debe tener un diámetro de al menos 5 cm (talla media de 15 cm), aunque lesiones más pequeñas pueden ser consideradas atendiendo al cuadro clínico. Las áreas comúnmente afectadas son muslos, ingle, nalgas y axilas (Bratton *et al.*, 2008). Esta lesión en piel se acompaña frecuentemente de síntomas catarrales como malestar y fatiga, dolor de cabeza, artralgias, mialgias y fiebre (Steere, 2004; Bratton *et al.*, 2008). Un 20% de

los pacientes no muestran las manifestaciones características en piel y muchos no presentan ni fiebre alta ni síntomas sistémicos (Bratton *et al.*, 2008).

*Infección diseminada* (estadio 2): durante unos días a semanas después del comienzo de la enfermedad las borrelias comienzan a diseminarse, y pueden aparecer lesiones secundarias anulares o múltiples eritemas migratorios en la piel, meningitis linfocítica aguda, neuropatía craneal, radiculoneuritis, bloqueo nodal atrioventricular, dolor musculoesquelético migratorio en articulaciones, tendones, músculos o hueso, y raramente manifestaciones oculares (episcleritis, queratitis intersticial, uveítis anterior, vasculitis retinal, neuritis óptica) (Steere, 2004; Bratton *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2008). Es infrecuente que esta etapa curse de forma asintomática (Steere 2004).

*Infección persistente* (estadio 3): meses después del comienzo de la enfermedad, un 60% de los pacientes no tratados muestran ataques intermitentes de artritis, fundamentalmente en las articulaciones grandes como las rodillas y en las caderas. También se pueden presentar acrodermatitis crónica atroficante, condición que ocurre primariamente en las superficies de la piel de las extremidades distales expuestas al sol, y un amplio rango de anormalidades neurológicas que incluye la encefalomiелitis por borrelias, una enfermedad similar a la esclerosis múltiple, la polineuropatía o encefalopatía de Lyme, que se manifiesta por trastornos cognoscitivos insidiosos, dolor radicular espinal o parestesias distales (Steere, 2004; Bratton *et al.*, 2008).

Posterior a esta etapa se describen dos síndromes post-infecciosos: a) la artritis de Lyme resistente al tratamiento, que se manifiesta aproximadamente en el 10 % de los pacientes con artritis en los que persiste la inflamación de las articulaciones durante meses e incluso años después del tratamiento correcto con antibióticos, a pesar de que ya no se detecte la espiroqueta en la articulación; b) el síndrome post-enfermedad de Lyme, que se presenta en un pequeño porcentaje de los pacientes con enfermedad de Lyme bien documentada, los que desarrollan dolores musculoesqueléticos incapacitantes, síntomas neurocognoscitivos o fatiga durante meses o años después del tratamiento de la infección (Steere, 2004).

Se ha observado que existe cierta relación entre las genomaespecies de *Borrelia* y las manifestaciones clínicas. Por ejemplo, *B. garinii* es la especie más relacionada con los

problemas neurológicos, *B. burgdorferi* sensu stricto con la artritis y *B. afzelii* con las lesiones en piel como la acrodermatitis crónica atrofiante (Gern, 2004; Evison *et al.*, 2006a).

Aunque la presentación asintomática de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato no es común y se desconoce su frecuencia, una investigación realizada en EUA constató la seroconversión de IgG en el 11% (30/269) de individuos asintomáticos involucrados en un estudio de evaluación de vacuna (Steere *et al.*, 2003).

Desde 1985 se reportan casos puntuales de transmisión transplacentaria de *B. burgdorferi* sensu lato y por ende de borreliosis de Lyme congénita, la que puede causar partos prematuros, muerte fetal intrauterina, así como la muerte del recién nacido debido a anomalías cardiovasculares, daños cerebrales perinatales, etc. Se ha propuesto una posible asociación entre la borreliosis gestacional y los resultados adversos del embarazo; sin embargo, no se ha reportado teratogenicidad por lo que no se ha probado una relación causal. La borreliosis gestacional parece estar asociada con un bajo riesgo de resultados adversos del embarazo, particularmente cuando se ha aplicado una antibióticoterapia apropiada (Hercogova y Vanousova, 2008).

## 2.6 Diagnóstico de laboratorio

Las pruebas de laboratorio clínico comúnmente usadas no revelan información útil para el diagnóstico de enfermedad de Lyme, pues los resultados de hemoglobina, hematocrito, creatinina y de orina son usualmente normales y el conteo de glóbulos blancos o leucocitos puede ser indistintamente normal o elevado. Si existe afectación neurológica, en muestras de LCR puede observarse una pleocitosis linfocítica moderada, concentraciones de proteínas elevadas y de glucosa de normal a ligeramente baja (Bratton *et al.*, 2008).

El diagnóstico de esta enfermedad, excepto en los casos con manifestaciones patognomónicas como los eritemas migratorios, requiere de ensayos microbiológicos (Wilske, 2005; Marques, 2010). Entre ellos se encuentran los métodos de detección directa y los de detección de anticuerpos (Wilske, 2005; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Las técnicas de laboratorio para la detección directa de *B. burgdorferi* sensu lato son aquellas que ofrecen evidencias de la presencia de las espiroquetas intactas o de sus componentes,

como ADN y proteínas, en vectores, reservorios o pacientes. Entre ellas se listan los ensayos basados en microscopía, la detección de proteínas o ADN específicos y el cultivo (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

La detección microscópica directa de *B. burgdorferi* sensu lato en campo oscuro y los métodos de detección de antígenos, tienen una aplicación limitada debido al número escaso de microorganismos presentes en las muestras clínicas (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Para el cultivo de *B. burgdorferi* sensu lato se utilizan los medios de cultivo líquidos derivados del medio original de Kelly (Kelly, 1971). Entre las versiones actuales se encuentran los medios BSK II (Barbour, 1984), BSK-H (Pollack *et al.*, 1993) y el medio de Kelly-Pettenkofer modificado (MKP, de sus siglas en inglés modified Kelly-Pettenkofer) (Preac-Mursic *et al.*, 1986). Una ventaja del medio BSK-H es que puede ser conservado a -20°C por lo menos durante ocho meses (Pollack *et al.*, 1993). Estos medios pueden ser solidificados al añadirles agarosa lo que permite la obtención de un clon a partir de una colonia (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Los cultivos se incuban usualmente a 30 - 34°C (temperaturas por encima de 39°C pueden reducir el crecimiento) en condiciones de microaerofilia, durante 12 semanas o más, debido al tiempo de generación prolongado de estas espiroquetas (7-20 horas) (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Wilske, 2005). También se ha reportado la propagación de cepas en líneas celulares obtenidas de garrapatas y mamíferos (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Los aislamientos de borrelias se han logrado fundamentalmente a partir de tejidos y fluidos corporales, que incluyen biopsias de las lesiones en piel (eritemas migratorios, acrodermatitis crónica atrofiante, linfocitoma), LCR y sangre completa (suero y plasma). También se han recuperado, aunque con menor frecuencia, de líquido sinovial, tejido cardíaco e iris (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005, Wilske, 2005).

La sensibilidad del cultivo para muestras clínicas no está definida, pero se conoce que es relativamente baja (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Marques, 2010). No se recomienda para la práctica clínica de rutina, pues la variabilidad en la calidad de los lotes de medios de cultivo repercute negativamente en la promoción del crecimiento de las espiroquetas; por otro lado hay fluctuaciones en la disposición comercial. Además, es un método laborioso, caro y lento, para el que disminuye la sensibilidad cuando los pacientes han recibido tratamiento con

antibióticos. A pesar de ello, representa el método de referencia para el diagnóstico de la borreliosis de Lyme (Ruzic-Sabljić y Strle, 2004; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Marques, 2010).

Entre los métodos moleculares se destacan los basados en la PCR, para los cuales se han desarrollado varios protocolos. Las muestras de biopsias de piel de pacientes con eritemas migratorios o acrodermatitis crónica atrofiante son las que más se utilizan para la demostración del ADN de las borrelias, pero también se pueden analizar en dependencia de las manifestaciones clínicas, sangre, LCR y líquido sinovial (Schmidt, 1997; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). En todos los casos, éstas deberán procesarse en el menor tiempo posible después de su colecta o conservar en congelación hasta su estudio. Las extracciones de ADN a partir de tejidos congelados proporcionan mejores resultados que los que provienen de tejidos embebidos en parafina o fijados con formalina (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

El ADN del hospedero puede interferir con la detección por PCR de *B. burgdorferi* *sensu lato* en muestras clínicas y de garrapatas, por lo que es esencial disponer de métodos estandarizados de extracción de ADN. También existen inhibidores en las muestras biológicas como la sangre, orina, líquido sinovial y LCR que pueden conllevar a resultados negativos. Para minimizar la inhibición se recomienda realizar diluciones del ADN extraído (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Para propósitos de diagnóstico la PCR cualitativa (PCR convencional o anidada) es suficiente. Sin embargo, en la actualidad se encuentran disponibles comercialmente opciones para la automatización en los laboratorios para la PCR cuantitativa (PCR en tiempo real) (Courtney *et al.*, 2004; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Portnoi *et al.*, 2006).

Los laboratorios de investigación han empleado diversos genes como dianas en los ensayos de PCR, pero sólo unos pocos han sido utilizados por los laboratorios de diagnóstico, por ejemplo: genes portados cromosómicamente como los del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), *flaA*, *recA* y *p66*, y genes plasmídicos como *ospA* (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Wilske, 2005).

La sensibilidad de la PCR es muy variable (10 - 83%) pues depende del tipo de muestra clínica y del gen diana seleccionado para la amplificación, por ello no se recomienda su uso en los laboratorios de diagnóstico. Los valores más altos se reportan para la detección de

borrelias en muestras de biopsias de piel de eritemas migratorios, pero esta prueba es raramente necesaria cuando la lesión es característica; mientras que los valores más bajos se obtienen cuando se parte de muestras de sangre y LCR (Schmidt, 1997; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Los métodos de detección directa son más sensibles cuando persiguen demostrar la presencia de *B. burgdorferi* sensu lato en garrapatas, pero este examen se realiza sólo con objetivos epidemiológicos o científicos. Los resultados del examen de las garrapatas removidas del hospedero humano no deben ser tomados en cuenta para decidir la profilaxis con antibióticos (Wilske, 2005; CDC, 2010b).

Debido a las limitaciones en la detección directa de *B. burgdorferi* sensu lato en muestras clínicas, los métodos de detección de anticuerpos constituyen los de mayor uso en los laboratorios; sin embargo, la complejidad en la composición antigénica de *B. burgdorferi* sensu lato y las marcadas diferencias antigénicas entre las genomaespecies dificultan el serodiagnóstico de la enfermedad (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Los anticuerpos IgM específicos alcanzan su título máximo entre la tercera y la sexta semana de la enfermedad, mientras que los anticuerpos IgG comienzan a aumentar lentamente luego de semanas o meses de iniciada la infección, llegando a sus títulos máximos durante la etapa de artritis (Evison *et al.*, 2006a; Bratton *et al.*, 2008).

Entre los métodos más utilizados para la detección de anticuerpos se encuentran la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), los ELISA y los Western blots. Cerca de un centenar de ellos han sido aprobados para su comercialización (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

La IFI emplea como antígeno células enteras de las borrelias y permite la detección de IgM e IgG. Las principales limitaciones para su uso son la necesidad de empleo de un microscopio de fluorescencia, personal bien entrenado, la subjetividad en la lectura e interpretación y la baja especificidad, pues se presentan con frecuencia reacciones cruzadas con anticuerpos a otras infecciones (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Los ELISA constituyen el formato más empleado para detectar los anticuerpos. Se recomienda el empleo, de al menos, pruebas de segunda generación (extractos de antígenos con previa adsorción con treponemas de Reiter) o en las que se utilizan antígenos purificados (componentes flagelares) o pruebas de tercera generación con antígenos recombinantes o

péptidos sintéticos para evitar las reacciones cruzadas (Wilske, 2005). Con estas pruebas se pueden detectar igualmente anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA, ya sea de forma individual o en combinación (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Una opción para el diagnóstico serológico de la neuroborreliosis es la detección de anticuerpos intratecales, para lo que se analizan paralelamente muestras de sueros y LCR, pues se considera que hay producción de anticuerpos intratecales cuando el título de anticuerpos en el LCR excede el título en suero, o sea, el índice resultante o relación entre ellos es mayor que 1. Esta prueba es mayormente usada para pacientes europeos, ya que en EUA se conoce muy poco sobre la sensibilidad de la misma (Marques, 2010).

Entre las limitaciones de los ensayos inmunoenzimáticos se encuentra la falta de estandarización, fundamentalmente por las variaciones antigénicas que se pueden presentar entre diferentes estuches comerciales e incluso entre lotes de un mismo estuche. Las preparaciones de antígenos a partir de células completas disminuyen la especificidad por la ocurrencia de reacciones cruzadas. Los ELISA tienen ventajas sobre los otros inmunoensayos, ya que son fáciles de realizar, generan de forma objetiva un valor numérico que se correlaciona con la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra y pueden ser automatizados (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Las muestras que resultan positivas, dudosas o equívocas deben ser analizadas con Western blot. De esta forma se cumple con el algoritmo recomendado por el CDC, que plantea el empleo de una prueba de pesquisa (IFI o ELISA) con alta sensibilidad, seguida de un Western blot con alta especificidad, o la realización de ambas simultáneamente (CDC, 1995; Bratton *et al.*, 2008).

El uso del Western blot ha permitido conocer los antígenos de *B. burgdorferi* sensu lato inmunodominantes en cada etapa clínica de la enfermedad (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Los pacientes con manifestaciones tempranas de neuroborreliosis tienen una respuesta inmune restringida a unas pocas proteínas, mientras que los que manifiestan enfermedad tardía tienen anticuerpos IgG contra un amplio espectro de antígenos (Wilske, 2005).

De forma general, los Western blot y los ELISA tienen sensibilidades similares, excepto en la detección de anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad temprana, donde el Western blot es más sensible. En cambio, la especificidad del Western blot es mayor que la del ELISA (aunque

menor de 100%) ya que la interpretación se basa en bandas de proteínas específicas inmunorreactivas (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Las principales limitaciones del Western blot incluyen la lectura visual e interpretación subjetiva de la intensidad de las bandas, la variabilidad de respuestas de anticuerpos en pacientes con iguales manifestaciones clínicas y el costo (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). En consecuencia, se han desarrollado sistemas comerciales para los que la lectura es automatizada, lo que reduce la subjetividad y el tiempo requerido para la prueba; sin embargo, éstas no se utilizan ampliamente (Binnicker *et al.*, 2008).

En un 6% de los pacientes con otras enfermedades como artritis reumatoidea, mononucleosis infecciosa y lupus eritematoso sistémico, se reportan resultados falsos positivos a IgM. La reactividad a esta inmunoglobulina puede persistir por periodos prolongados después del tratamiento de la borreliosis de Lyme temprana (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Bratton *et al.*, 2008).

Entre las consideraciones metodológicas importantes para la realización del Western blot se incluye el uso de un suero control positivo apropiado (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005), y que la interpretación de los resultados de las pruebas serológicas se debe hacer siempre en contexto con la información clínica (Wilske, 2005).

Dado que los hallazgos serológicos varían considerablemente y los anticuerpos pueden persistir por largos periodos en individuos tratados exitosamente, el seguimiento serológico no es útil para el control de la terapia. Recientemente se recomienda por autores norteamericanos el empleo del péptido C6 (péptido sintético de 26 aminoácidos que reproduce la secuencia de la sexta región invariable dentro del dominio central de la proteína VlsE) como antígeno para estos fines, e incluso se piensa que en un futuro el ELISA-C6 pueda ser empleado como única prueba, sin necesidad de confirmación por Western blot. La presencia de anticuerpos específicos no confirma la presencia de la enfermedad, éstos pueden deberse a infecciones subclínicas o clínicas en el pasado (Mogilyansky *et al.*, 2004; Wilske, 2005; Steere *et al.*, 2008; Marques, 2010).

Existen otros métodos comerciales que no se recomiendan para el diagnóstico porque no se han evaluado lo suficiente, como los de detección de antígenos en fluidos corporales, la PCR en orina (a pesar de las propuestas realizadas para la preparación de la muestra), y las pruebas

de transformación linfocítica (Bergmann *et al.*, 2002; Wilske, 2005; CDC, 2010b). Igualmente el CDC no recomienda la PCR en sangre y la tinción por inmunofluorescencia de formas deficientes de pared celular de *B. burgdorferi*, así como el uso de criterios no validados para la interpretación de los Western blot (CDC, 2005).

## 2.7 Definición de caso para la vigilancia

La más reciente definición de caso para propósitos de vigilancia, según el CDC, mantiene los mismos criterios clínicos que las versiones anteriores, pero modifican los de confirmación del laboratorio (CDC, 2011), quedando los aspectos a tener en cuenta de la siguiente manera:

- a) Presencia de eritema migratorio de 5 cm o más de diámetro, diagnosticado por un médico. Si no se conoce exposición a garrapatas, entonces se recomienda confirmación de laboratorio.
- b) Presencia de al menos una de las manifestaciones tardías (musculoesqueléticas, cardiovasculares o neurológicas) con confirmación de laboratorio de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato.

La confirmación, o evidencia de laboratorio, requiere el cumplimiento de uno de los siguientes aspectos:

- a) Cultivo positivo para *B. burgdorferi* sensu lato.
- b) Empleo de dos pruebas serológicas interpretadas según los criterios establecidos, donde:
  - es suficiente la respuesta de IgM positiva cuando el comienzo de los síntomas es menor o igual a 30 días.
  - es suficiente la respuesta de IgG positiva para cualquier momento de la enfermedad.
- c) Seropositividad por Western blot-IgG usando criterio de interpretación establecido.
- d) Anticuerpos en LCR, por ELISA o IFI, cuando el título es superior al del suero (anticuerpos intratecales).

La Unión Europea para la Acción Concertada sobre la enfermedad de Lyme (EUCALB, de sus siglas en inglés European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) también plantea nuevas definiciones de caso, las que tienen en cuenta los mismos aspectos clínicos y de laboratorio que el CDC, sólo que incluyen como soporte la PCR a partir de biopsias de lesiones de piel, LCR, líquido sinovial y fluido ocular, en dependencia de la presentación clínica (Stanek *et al.*, 2011).

Así mismo, el CDC clasifica los casos en confirmados, probables o sospechosos (CDC, 2011):

Caso confirmado: a) caso con eritema migratorio con exposición conocida; b) caso con eritema migratorio y evidencia de laboratorio de la infección, sin exposición conocida; c) caso con al menos una de las manifestaciones tardías y evidencia de laboratorio de la infección.

Caso probable: cualquier otro caso diagnosticado por personal médico con evidencia de laboratorio de la infección.

Caso sospechoso: a) caso con eritema migratorio, sin exposición conocida y que no tiene evidencias de laboratorio; b) caso con evidencia de laboratorio de la infección sin información clínica disponible (son los conocidos como casos reportados por laboratorio).

El término de exposición se refiere a haber estado en áreas forestales o cubiertas de hierba en los días precedentes (30 días como máximo) al comienzo del eritema migratorio en una región donde la enfermedad de Lyme es endémica; se considera como tal aquella en la que al menos dos casos confirmados adquirieron la infección en la región o para la que se conoce que la población de garrapatas establecidas está infectada por *B. burgdorferi*. La historia de mordedura de garrapata no es trascendente (CDC, 2011).

## 2.8 Tratamiento

Las cepas de *B. burgdorferi* sensu lato son susceptibles *in vitro* a doxiciclina, amoxicilina, azitromicina, cefuroxime axetil, penicilina benzatínica, fenoximetilpenicilina, cefotaxima y ceftriaxona por lo que estos antibióticos son ampliamente utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Lyme, contrariamente a lo que se ha encontrado para la eritromicina y trimetoprin-sulfametoxazol (Baradaran-Dilmaghani y Stanek, 1996; Terekhova *et al.*, 2002 Vanousova y Hercogova, 2008).

Al iniciar un tratamiento se recomienda tener en cuenta: el estadio de la enfermedad, la presencia de síntomas neurológicos asociados, la duración de los síntomas, alergias, edad y estado de embarazo (Evison *et al.*, 2006b; Vanousova y Hercogova, 2008).

En las tablas siguientes se resumen los esquemas de tratamiento recomendados por un panel de expertos de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América y considerando la experiencia de especialistas europeos (Wormser *et al.*, 2006; Evison *et al.*, 2006b; Vanousova y Hercogova, 2008).

Tabla 1-1. Tratamiento de eritema crónico y linfocitoma

Antibiótico	Dosis/día (mg)	Dosis en niños/día (mg)	Vía	Duración (días)
<b>Doxiciclina</b>	2 x 100	A partir de 9 años 2-4 mg/kg	oral	10-21
<b>Amoxicilina</b>	3 x 500- 1000	50 mg/kg	oral	14-21
<b>Azitromicina<sup>a</sup></b>	2 x 500 (primer día) 1 x 500 (próximos días)	1 x 20 mg/kg (primer día) 1 x 10 mg/kg (próximos días)	oral	5-10
<b>Cefuroxime axetil<sup>b</sup></b>	2 x 500	30-40 mg/kg	oral	14-21

<sup>a</sup> en caso de alergia a penicilina y doxiciclina

<sup>b</sup> el tratamiento para linfocitoma puede ser prolongado hasta 28 días

Tabla 1-2. Tratamiento de neuroborreliosis y múltiples eritemas migratorios

Antibiótico	Dosis/día	Dosis en niños/día	Vía	Duración (días)
<b>Ceftriaxona</b>	1 x 2 g	50-100 mg/kg	i.v.	10-28
<b>Cefotaxima</b>	3 x 2 g	100-200 mg/kg	i.v.	14-21
<b>Penicilina G</b>	4 x 5 m.u.	0.25-0.5 m.u. /kg	i.v.	14-21
<b>Doxiciclina<sup>a</sup></b>	2 x 100-400 mg	A partir de 9 años 2-8 mg/kg	oral	10-28

<sup>a</sup> en caso de alergia a penicilina y cefalosporina

Tabla 1-3. Tratamiento de carditis de Lyme

Antibiótico	Dosis/día	Vía	Duración (días)
<b>Ceftriaxona</b>	1 x 2 g	i.v.	10-28
<b>Penicilina G</b>	4 x 5 m.u.	i.v.	14-21
<b>Cefotaxima</b>	3 x 2 g	i.v.	14-21

Tabla 1-4. Tratamiento de artritis de Lyme

Antibiótico	Dosis/día	Dosis en niños/día	Vía	Duración (días)
<b>Doxiciclina</b>	2 x 100 mg	A partir de 9 años 2-4 mg/kg	oral	21-28
<b>Amoxicilina</b>	3 x 500-1000 mg	50 mg/kg	oral	21-28
<b>Cefuroxime axetil</b>	2 x 500 mg	30 mg/kg	oral	28
<b>Ceftriaxona</b>	1 x 2 g	50-100 mg /kg	i.v.	14-21
<b>Cefotaxima</b>	3 x 2 g	100 mg/kg	i.v.	14-21

Tabla 1-5. Tratamiento de acrodermatitis crónica atrofianete

Antibiótico	Dosis/día	Vía	Duración (días)
<b>Doxiciclina</b>	2 x 100 mg	oral	21-28
<b>Amoxicilina</b>	3 x 500-1000 mg	oral	21-28
<b>Ceftriaxona</b>	1 x 2 g	i.v.	14-21
<b>Penicilina G</b>	4 x 5 m.u.	i.v.	14-21
<b>Cefotaxima</b>	3 x 2 g	i.v.	14-21

En estos esquemas se establece que las embarazadas deben ser tratadas como el resto de los pacientes, con la excepción de que no debe utilizarse la doxiciclina (Vanousova y Hercogova, 2008).

De forma general, los esquemas de tratamientos con antibióticos muestran resultados excelentes, pero se recomienda realizar futuros estudios con el objetivo de acortar la duración (Wormser y O'Connell, 2011).

## 2.9 Profilaxis, prevención y control

La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América recomienda administrar a todo paciente con historia previa de mordedura de garrapata y después de la observación del sitio de la mordedura, una dosis única de doxiciclina a adultos y niños mayores de 9 años cuando: a) la garrapata que causó la mordedura sea identificada como adulto o ninfa de *I. scapularis* y haya estado fijada a la piel por más de 36 horas (según el grado de ingurgitación con sangre), b) la profilaxis pueda ser iniciada dentro de las primeras 72 horas de haber sido removida la garrapata, c) la tasa de infección local de estas garrapatas con *B. burgdorferi* sensu lato es superior a 20 %, y d) el tratamiento con doxiciclina no esté contraindicado (Wormser *et al.*, 2006).

La prevención de la borreliosis de Lyme incluye limitar las actividades al aire libre en áreas endémicas para evitar las mordeduras de garrapatas, utilizar repelentes contra éstas, portar camisas de colores claros y mangas largas, pantalones plegados dentro de los zapatos, realizar la inspección frecuente de la piel (fundamentalmente de axilas, ingle, vacío de las rodillas) para la detección temprana y eliminación correcta de las garrapatas (Evison *et al.*, 2006c; Wormser *et al.*, 2006; Vanousova y Hercogova, 2008).

La impregnación de la ropa con permetrina constituye un método eficaz, pero es costoso, válido únicamente para exposiciones repetidas con la misma vestimenta (Evison *et al.*, 2006c).

El empleo de vacunas no es una alternativa disponible actualmente. A finales de los años 1990 se licenció para uso comercial en EUA una vacuna recombinante (CDC, 1999) que en poco tiempo se retiró voluntariamente del mercado como consecuencia de la poca aceptación que tuvo, dada por la baja percepción del riesgo de adquirir la enfermedad de Lyme; por otro lado, la necesidad de reactivaciones frecuentes y los costos relativamente altos de ésta, en comparación con los costos del tratamiento con antibióticos de la infección temprana. Además, para algunos casos raros pareció ser el iniciador de una artritis autoinmune (Steere, 2006), aunque recientemente se comprobó la imposibilidad de reproducir este fenómeno en modelos animales lo que sugiere que no existe tal peligro en humanos (Steere *et al.*, 2011). Esta vacuna no se introdujo en Europa atendiendo al conocimiento acerca de las diferencias existentes entre las cepas (Evison *et al.*, 2006c).

En estos momentos se cuenta con una vacuna efectiva, evaluada adecuadamente en grupos de alto riesgo pero están pendientes aún los resultados de seguridad, eficacia, costo y aceptación pública (Shen *et al.*, 2011).

El control de la enfermedad de Lyme depende principalmente de la educación médica y pública sobre las medidas de protección personal, signos y síntomas de la enfermedad y de la aplicación de una terapia apropiada (Steere, 2006).

## 2.10 Antecedentes de la enfermedad de Lyme en Cuba

A partir del año 1981 se iniciaron en Cuba diversos estudios sobre el papel de las garrapatas como vectores de enfermedades en el hombre, incluyendo la posible existencia de la borreliosis de Lyme, enfermedad que aún no está reportada en el país.

Entre otras actividades se efectuó una encuesta higiénico-sanitaria entre la población de "Las Terrazas", enclavada en la región de Sierra del Rosario, municipio Candelaria, provincia Artemisa. En ésta se recogieron datos acerca de antecedentes de mordeduras de garrapatas, presencia de lesiones en el sitio de la mordedura o cualquier otra sintomatología, lugar donde ocurrió, tipo de ropa que usaban, labor que realizaban, entre otros. A través de la encuesta se llegó a conocer que existía afectación social pues entre los habitantes se reportaban síndromes de etiología desconocida, que provocaban ingresos hospitalarios y afectación económica en la zona, relacionados con la presencia de *A. cajennense*. Estos resultados conllevaron a la aplicación de diferentes medidas educativas y sanitarias como: el empleo de garrapaticidas, la revisión de los niños a la entrada y salida del círculo infantil, chapea y quema dirigida, reforestación y control de los animales domésticos. (Fernández A. Comunicación personal. Investigador<sup>†</sup> del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", 1997).

En el transcurso de las investigaciones un colaborador científico enfermó. El paciente "C. O. J.", procedente de La Habana, de 36 años de edad, masculino y biólogo (especialista en ixódidos), nunca antes había viajado al exterior pero en numerosas ocasiones había sido atacado por garrapatas, principalmente del género *Amblyomma*. El mayor número de los ataques ocurrió en Sierra del Rosario, otros en Camagüey y en la cueva Majana en Baracoa, Guantánamo; en esta última ocasión fue atacado por el ácaro *Eutrombicula alfreddugesi* y *A. cajennense* y presentó días después signos clínicos evidentes, que provocaron su hospitalización en el Instituto de Neurología y Neurocirugía de La Habana (entre febrero y mayo de 1984). Los principales signos clínicos observados en este paciente fueron hiperestesia con pérdida de reflejos, incoordinación muscular e incapacidad para el control de esfínteres. La hiperestesia se instaló gradualmente desde las extremidades inferiores hasta las superiores y el tórax, primero la pierna izquierda y el pie derecho y en dos semanas tomó hipogastrio, alcanzando más tarde tórax y miembros superiores. Considerando este cuadro se le

diagnosticó una mielorradiculitis o síndrome de Guillain Barre. En correspondencia se trató y mejoró, pero persistieron algunas secuelas motoras e impotencia sexual.

En marzo de 1987, por motivos de trabajo viajó a la antigua República de Checoslovaquia, y motivado por obtener un diagnóstico de certeza sobre su afección, acudió a la Facultad de Biología de la Universidad de Carolina en Praga. A partir de un examen serológico de IFI y teniendo en cuenta su sintomatología clínica y antecedentes, se le diagnosticó neuroborreliosis (Dickinson *et al.*, 1997; Fernández A. Comunicación personal. Investigador<sup>†</sup> del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 1997).

También durante los años 1980 se reporta en el país otro posible caso de infección por *B. burgdorferi* sensu lato. El paciente “G. A. E.”, masculino, procedente del poblado “Las Terrazas”, sin antecedentes de viaje al exterior, a la edad de cinco años ingresó por varios meses en los servicios de Misceláneas del Hospital Pediátrico “William Soler” de La Habana, por un síndrome febril que padecía desde los 14 meses de edad, lesiones cutáneas, dolores articulares crónicos, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, antecedentes de meningoencefalitis y dolores precordiales. También presentaba epilepsia y anemia por déficit de hierro. Se investigaron todas las posibles causas de artropatías acompañadas de fiebre, así como de síndrome febril prolongado con hemopatías malignas y endocarditis. En ese momento se descartó una posible mononucleosis infecciosa y leucemia, por lo que no existió diagnóstico para su enfermedad y sí sospecha clínica y epidemiológica de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato, pues tenía el antecedente de haber sido mordido por garrapatas (Grandío *et al.*, 1988).

Estos reportes no ofrecen una evidencia conclusiva sobre la infección en el poblado de “Las Terrazas”, ni la magnitud de su importancia local, pero sugieren por primera vez la presencia de la borreliosis de Lyme en esta zona.

Desde entonces se insistió en la búsqueda de nuevos posibles casos atendiendo a las manifestaciones clínicas y antecedentes epidemiológicos, a pesar de que no se disponía de métodos microbiológicos para la demostración de la infección (Fernández A. Comunicación personal. Investigador<sup>†</sup> del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 1997).

En 1997, otros investigadores cubanos realizaron y publicaron en una revista médica de alcance nacional, una revisión bibliográfica sobre la temática y resaltaron el carácter de

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

enfermedad infecciosa emergente. En esta publicación se recogen aspectos históricos, microbiológicos, epidemiológicos, clínicos y de tratamiento, con el propósito de hacer una actualización en el tema, que en lo esencial mantiene vigencia (Dickinson y Battle, 1997).

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño general

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos se combinaron un grupo de estudios con diferentes diseños epidemiológicos según se describe a continuación:

- Se realizaron tres estudios experimentales para la evaluación de métodos microbiológicos de detección de *B. burgdorferi* sensu lato: a) evaluación de un medio de cultivo modificado para la multiplicación de *B. burgdorferi* sensu lato, b) evaluación de métodos para la extracción del material genético a partir de garrapatas, para su posterior uso en la detección de este agente por PCR, y c) evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR para detectar esta espiroqueta.
- Para la confirmación de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en humanos fueron conducidos dos estudios de series de casos utilizando muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas, divididos en dos periodos (1998-2002 y 2003-2010).
- Para la estimación de la seroprevalencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* sensu stricto en una población de riesgo se condujo un estudio observacional de corte transversal durante el periodo de enero a mayo de 2006.
- Para la detección de las borrelias en garrapatas (principales vectores de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato) se realizaron dos estudios observacionales en diferentes reservorios: a) garrapatas colectadas de bovinos y equinos, y b) garrapatas colectadas de bovinos, caninos y vivienda.

### **3.2 Técnicas y procedimientos**

#### **3.2.1 Evaluación de métodos microbiológicos para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato**

##### **3.2.1.1 Evaluación de un medio de cultivo modificado para *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

Esta investigación se realizó en colaboración con los laboratorios de Ecoepidemiología del Instituto de Biología de la Universidad de Neuchatel y el de Microbiología de La Chaux de Fonds, Suiza, durante el periodo de agosto a diciembre de 2006.

Se utilizaron como cepas controles *B. garinii* NE83 y NE4546, *B. burgdorferi* sensu stricto NE4502, *B. afzelii* NE4505 y *B. valaisiana* NE4555, aisladas a partir de garrapatas de la vegetación en Suiza, y que formaban parte de la colección del Laboratorio de Ecoepidemiología.

##### **3.2.1.1a Elaboración del medio de cultivo modificado**

El medio modificado para el cultivo de *B. burgdorferi* sensu lato se elaboró tomando como referencia la composición de la formulación BSK-II (nombre comercial: BSK-H) (Barbour, 1984). Se siguieron las recomendaciones de su autor para la preparación, sustituyendo el medio CMRL 1066 por el medio 199 por no disponer del mismo. En el Anexo 1 se describe detalladamente el procedimiento y la composición final del medio BSK modificado.

##### **3.2.1.1b Evaluación cualitativa del crecimiento de cepas de *B. burgdorferi* sensu lato en el medio de cultivo modificado**

Para esta evaluación se utilizaron las cepas NE83 y NE4555. La concentración inicial ( $1,5 \times 10^4$  células/mL) de cada uno de estos cultivos se ajustó utilizando una cámara de conteo de microorganismos que emplea las celdas de Helber. Cada una de las cepas se subcultivó por duplicado en tubos que contenían el medio BSK-H y el medio modificado, partiendo de inóculos de igual volumen (0,1 mL) y concentración de células, a 35°C durante 10 días. El crecimiento se evaluó macroscópicamente por cambio de coloración de los medios (de rosado a naranja), y microscópicamente por examen en campo oscuro.

### **3.2.1.1c Evaluación cuantitativa del crecimiento de cepas de *B. burgdorferi* sensu lato en el medio de cultivo modificado**

Se realizó una evaluación cuantitativa para comparar las curvas de crecimiento en ambos medios de cultivo de las tres genomaespecies de *Borrelia* más frecuentes a nivel mundial. Se utilizaron las cepas NE4502, NE4546 y NE4505.

Se prepararon e inocularon suspensiones de igual concentración ( $1,5 \times 10^4$  espiroquetas/mL), de cada una de las cepas, en 10 tubos del medio modificado y en 5 tubos del medio comercial. Los tubos se incubaron a 34°C y se realizaron conteos del número de espiroquetas utilizando las celdas de Helber, a los 2, 4, 7, 10, 14 y 23 días. Se calculó la concentración de espiroquetas/mL y se confeccionaron las curvas de crecimiento para cada una de las cepas.

### **3.2.1.1d Evaluación de la expresión y antigenicidad de las proteínas de las borrelias en el medio de cultivo modificado**

Se subcultivó la cepa NE83 en el medio BSK modificado y BSK-H por 10 días a 34°C. Se colectaron y lavaron las células por centrifugación (4000 rpm/12 min) y se obtuvieron las proteínas tras la lisis con el tampón Laemeli (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol; glicerol 50%; bromofenol azul 1%) (Laemeli, 1970) en “Baño María” por 3 min, y su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, de sus siglas en inglés: PoliAcrylamide Gel Electrophoresis) al 6% (gel concentrador) y 12,8% (gel separador). Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman® Schleider & Schuell, EUA) empleando la solución de transferencia (Tris, glicina, SDS 10%, metanol, agua destilada) en una cubeta de transferencia (Biorad, EUA) a 120 mA. Para revelar las proteínas se utilizó la tinción con oro coloidal y para poner de manifiesto sus características antigénicas un Western blot-IgG (Anexo 2) empleando un suero control positivo (mezcla de sueros humanos con resultados positivos), según los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) descritos en el laboratorio de Microbiología de La Chaux de Fonds.

*Tinción con oro coloidal:* se lavaron las membranas de nitrocelulosa con agua destilada durante 10 min y entonces se procedió a la adición, dos veces, de la solución salina tamponada con Tris y Tween (TTBS, de sus siglas en inglés: Tween-Tris-Buffered Saline) pH 7,5 por 20 min en agitación. Las membranas se lavaron nuevamente con agua destilada durante 2 min

y se añadió la solución de oro coloidal durante 20 min - 1 hora. Para finalizar se lavaron dos veces con agua destilada.

### **3.2.1.2 Evaluación de la eficacia de métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas duras**

Esta investigación se realizó durante el periodo de mayo a octubre de 2007.

Se utilizaron garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, capturadas sobre ganado bovino en el poblado “La Molina”, ubicado en Mariel, provincia Artemisa. Las mismas fueron identificadas hasta el taxón de especie según las claves reportadas para las garrapatas de la región Neotropical y clasificadas en dependencia de su estadio de vida y sexo (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

#### **3.2.1.2a Extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas**

Se evaluaron tres métodos para la extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas: método de fenol-cloroformo, método de acetato de potasio y método de hidróxido de amonio y calor. Todos se aplicaron en garrapatas en estado de ninfas (2 organismos/protocolo), adultos machos (2 organismos/protocolo) y adultos hembras (2 organismos/protocolo). Se realizaron modificaciones en los protocolos para incrementar la eficacia de los mismos.

#### **Extracción por el método de fenol-cloroformo**

Se evaluaron los protocolos propuestos por Weng *et al.* en el 2002 y Halos *et al.* en el 2004 para la extracción de ADN a partir de garrapatas, así como el referenciado por Fraga *et al.* en el 2004, para la extracción en triatomíneos (Weng *et al.*, 2002; Halos *et al.*, 2004; Fraga *et al.*, 2004). En la tabla 3-1 se resumen los protocolos y las modificaciones. A continuación se describen detalladamente cada una de las etapas.

*Extracción de ácidos nucleicos:* Se maceraron las garrapatas de forma individual con ayuda de nitrógeno líquido, se adicionó tampón de lisis en volúmenes de 172,5 µL y 400 µL; paralelamente se evaluaron diferentes concentraciones de los constituyentes del tampón [Tris-HCl (10 mM, 50 mM, 200 mM), EDTA (1 mM, 25 mM, 50 mM), NaCl (25 mM, 100 mM), SDS (1 %, 5 %)], proteinasa K (290 µg/mL, 500 µg/mL). Se agitó vigorosamente con vórtex y se incubó durante 3 h / 55°C seguido de 10 min / 100°C, 2 h / 56°C y toda la noche / 56°C según la variante correspondiente.

*Purificación de ácidos nucleicos:* A las mezclas anteriores se agregaron 100  $\mu\text{L}$  o 400  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (1:1), o 400  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y se homogenizó y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min para recuperar la fase acuosa, a la que se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo o 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) de acuerdo con la variante correspondiente. Nuevamente se agitó y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min con el propósito de recuperar la fase acuosa.

*Precipitación de ácidos nucleicos:* Se añadieron dos volúmenes (200  $\mu\text{L}$  o 800  $\mu\text{L}$  según correspondiese) de etanol absoluto frío y 10  $\mu\text{L}$  o 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M (pH 5,3). Se agitó con vórtex y se dejó precipitar en hielo durante 15-20 min, a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min o toda la noche a igual temperatura. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min y se desechó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 1 mL o 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%, se agitó suavemente, se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm y se desechó el sobrenadante.

El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$  o 50  $\mu\text{L}$  de tampón Tris-EDTA (TE) 1X [Tris-HCl 1 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM]. Los extractos se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Tabla 3-1. Protocolos evaluados para la extracción de ADN a partir de garrapatas utilizando el método de fenol-cloroformo.

Método Fenol-cloroformo		Weng <i>et al.</i> , 2002		Halos <i>et al.</i> , 2004			Fraga <i>et al.</i> , 2004				
		Sin modificar	Sin modificar	Modificado 1	Modificado 2	Modificado 3	Sin modificar	Modificado 1	Modificado 2	Modificado 3	
Extracción	Tampón lisis	Tris-HCl	10 mM	200 mM			50 mM				
		EDTA	1 mM	50 mM			25 mM				
		NaCl	25 mM	100 mM			25 mM				
		SDS	1%	5%			1%				
		Proteinasa K	290 µg/mL	500 µg/mL			500 µg/mL				
	Volumen tampón lisis	172,5 µL	400 µL			400 µL					
Incubación tampón lisis	3h/55°C 10'/100°C	Toda la noche/56°C		2h/56°C		2h/56°C					
Purificación	Purificación con:		fenol-cloroformo (1:1)	fenol-cloroformo (1:1)			fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1)				
	Lavado con:		cloroformo	cloroformo			cloroformo- alcohol isoamílico (24:1)				
Precipitación	Precipitación	Et-OH	200 µL	800 µL			800 µL				
		NaAc 3M	10 µL	40 µL			40 µL				
	Incubación de precipitación		15'- 20'/hielo	30'/-20°C			30'/-20°C		Toda la noche/-20°C		
	Lavar ADN con Et-OH 70%		1 mL	400 µL			400 µL				
	Resuspensión ADN en TE 1X		20 µL	30 µL	50 µL	30 µL	50 µL	50 µL	30 µL	50 µL	30 µL

### **Extracción por el método de acetato de potasio**

Se realizó según el protocolo propuesto por Gaillard y Strauss en 1990 (Gaillard y Strauss, 1990). Se introdujeron modificaciones que se muestran en la tabla 3-2, aunque a continuación se detallan las mismas.

*Extracción de ácidos nucleicos:* Se maceraron las garrapatas de forma individual con ayuda de nitrógeno líquido. Se adicionó 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis [Tris-HCl 0,1 M (pH 8,25), EDTA 0,05 M, sacarosa 0,2 M, SDS 0,5%] con y sin proteinasa K (10 mg/mL). Las suspensiones sin proteinasa K se incubaron a 65°C durante 10 min y las que la contenían, a 56°C durante 1 h.

*Purificación de ácidos nucleicos:* A las mezclas anteriores se les adicionó 120  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 5 M, se colocaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 12 000 rpm por otros 10 min para recuperar los sobrenadantes.

*Precipitación de ácidos nucleicos:* A los sobrenadantes se les añadió 35  $\mu\text{L}$  de una mezcla de acetato de sodio 4 M - acrilamida 0,25%, más 1 mL de etanol absoluto y se incubaron 10 min a temperatura ambiente o 10 min a -20°C. Se centrifugaron a 12 000 rpm durante 20 min y los sedimentos obtenidos se lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a 12 000 rpm durante 10 min; éstos se dejaron secar a temperatura ambiente, se resuspendieron en 25  $\mu\text{L}$  de tampón TE 1X y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 3-2. Protocolos evaluados para la extracción de ADN a partir de garrapatas utilizando el método de acetato de potasio.

Método Acetato de potasio		Gaillard y Strauss, 1990				
		Sin modificar	Modificado 1	Modificado 2	Modificado 3	
Extracción	Tampón lisis	Tris-HCl	0,1 M			
		EDTA	0,05 M			
		Sacarosa	0,2 M			
		SDS	0,5%			
		Proteinasa K	-	10 mg/mL		
	Volumen tampón lisis	500 µL				
Incubación tampón lisis	10'/65°C		1h/56°C			
Purificación	Purificación con:		120 µL de acetato de potasio 5 M			
	Incubación:		10'/Hielo			
Precipitación	Precipita ción	Et-OH	1 000 µL			
		NaAc 4M Acrilamida 0,25%	35 µL			
	Incubación de precipitación		10'/Tamb	10'/-20°C	10'/Tamb	10'/-20°C
	Lavar ADN con Et-OH 70%		500 µL			
	Resuspensión ADN en TE 1X		25 µL			

### Extracción por el método de hidróxido de amonio y calor

Se realizó según el protocolo propuesto por Guy y Stanek en 1991, Rijpkema *et al.* en 1996 y con las ulteriores modificaciones sugeridas por Humair *et al.* en el 2007 (Guy y Stanek, 1991; Rijpkema *et al.*, 1996; Humair *et al.*, 2007). A continuación se detalla el protocolo.

*Extracción de ácidos nucleicos:* Las garrapatas se sumergieron de forma individual en viales conteniendo 100 µL de una solución fresca de NH<sub>4</sub>OH 0,7 M y se incubaron a 100°C en un bloque térmico (Bioblock Scientific, EUA) durante 15 min. Se dejaron enfriar por 1 min y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 seg para eliminar la condensación en las tapas. Los

viales se abrieron y se colocaron durante 15 min en el bloque térmico a 100°C hasta reducir el volumen a aproximadamente 40 µL. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 1-2 min y se conservaron a -20°C hasta su uso.

### **3.2.1.2b Evaluación de la eficacia de los métodos de extracción de ácidos nucleicos**

La eficacia de los diferentes protocolos utilizados para la extracción de ácidos nucleicos se evaluó a través de una electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8% y la amplificación por PCR de un fragmento de 320 pb, del gen de la subunidad 16S del ARN mitocondrial de las garrapatas.

#### **Electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8%**

Se tomaron 10 µL de los extractos de ácidos nucleicos obtenidos a través de cada uno de los protocolos utilizados, se les añadieron 2 µL de tampón de corrida electroforética (Loading Buffer 6X, Promega, EUA) y se aplicaron en un gel de agarosa para ácidos nucleicos al 0,8% (Pharmacia NA, Suecia) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio.

La corrida electroforética se realizó con tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X en una cámara de electroforesis (Pharmacia Biotech, Suecia) acoplada a una fuente de electroforesis (Amersham Biosciences, Reino Unido) durante 30 min a 110 V / 90 mA.

Los resultados se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta (LKB 2011, Suecia).

#### **PCR – subunidad 16S del ARN mitocondrial de garrapata.**

Se realizó según el protocolo propuesto por Halos *et al.* en el 2004 (Halos *et al.*, 2004), en el que se introdujeron modificaciones en la composición de la mezcla de reacción.

*Cebadores:* Se utilizaron los cebadores que a continuación se describen, sintetizados por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba. Los mismos permiten la amplificación de un fragmento de 320 pb.

TQ 16S+1F: 5' CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG 3'

TQ 16S-2R: 5' ACG CTG TTA TCC CTA GAG 3'

*Mezcla de reacción:* Para preparar esta mezcla (Vf=50 µL) se probaron dos volúmenes (5 µL y 10 µL) de los extractos de ácidos nucleicos, y se añadieron 5 µL de tampón PCR 10X (0,5 M KCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8,25; 25 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 2 mM de cada dNTP; 2 mg/mL

BSA); 5  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M); 0,3  $\mu$ L de *Taq* polimerasa (5 U/ $\mu$ L) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y agua bidestilada estéril hasta completar.

El control negativo de cada ensayo lo constituyó una mezcla de reacción a la que no se añadió extracto de ácidos nucleicos.

*Amplificación del ADN:* Se realizó en un termociclador "Mastercycler personal" (Eppendorf, Alemania). Las condiciones del proceso fueron: una desnaturalización inicial a 94°C durante 8 min, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 92°C por 1 min, hibridación a 48°C por 1 min y extensión a 72°C por 1,5 min; le continuaron otros 35 ciclos de desnaturalización a 92°C por 1 min, hibridación a 54°C por 1 min y extensión a 72°C por 1,5 min, con una extensión final a 70°C durante 10 min.

*Análisis de los productos amplificados:* Se realizó por electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio, en el que se aplicaron 10  $\mu$ L de cada uno de los productos y 2  $\mu$ L de tampón de corrida electroforética. La electroforesis se realizó en tampón TBE 0,5X durante 30 min utilizando las condiciones: 110 V / 90 mA.

### **3.2.1.3 Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de *B. burgdorferi* sensu lato**

Esta investigación se llevó a cabo en el periodo de agosto a diciembre de 2007. Se evaluaron dos juegos de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN de *B. burgdorferi* sensu lato ubicados en la región espaciadora entre los genes que codifican para las subunidades 5S y 23S del ARN ribosomal (ARNr) (PCR - 5S-23S) y en el gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr (PCR - 16S).

Se utilizaron muestras de ADN genómico obtenido de *B. burgdorferi* sensu stricto B31; *B. afzelii* NE632; *B. garinii* NE11 y *B. lusitaniae* Poti-B1, donadas por el Laboratorio de Ecoepidemiología de la Universidad de Neuchatel, Suiza.

#### **3.2.1.3a Evaluación de la PCR - 5S-23S**

Se evaluó la PCR descrita por Postic *et al.* en 1994 (Postic *et al.*, 1994) con algunas modificaciones en la composición de la mezcla de reacción que se describen a continuación.

*Cebadores:* Se utilizaron los cebadores que se detallan a continuación, sintetizados por Microsynth, Balgach, Suiza y donados por el Laboratorio de Ecoepidemiología de la Universidad de Neuchatel del mismo país. Estos permiten obtener amplicones con una talla de 226-256 pb según la genomaespecie o cepa de borrelia.

P1: 5' CTG CGA GTT CGC GGG AGA 3'

P2: 5' TCC TAG GCA TTC ACC ATA 3'

*Mezcla de reacción:* La misma se preparó con 5 µL de tampón PCR 10X, 5 µL de cada cebador (1 µM), 0,3 µL de *Taq* polimerasa (5 U/µL) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), 10 µL de la muestra de ADN a una concentración de 2,1 ng/µL y agua bidestilada estéril hasta completar 50 µL como volumen final.

El control negativo empleado en el ensayo lo constituyó una mezcla de reacción a la que no se añadió ADN molde.

*Amplificación del ADN:* Se realizó en el termociclador “Mastercycler personal” con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 94°C por 0,5 min, hibridación a 53°C por 0,5 min y extensión a 72°C por 0,5 min con una extensión final a 72°C durante 10 min.

*Análisis de los productos amplificados:* Se procedió de igual forma a lo descrito en el acápite 3.2.1.2b.

### **3.2.1.3b Evaluación de la PCR - 16S**

Se evaluó la PCR descrita por Marconi y Garon (Marconi y Garon, 1992) con modificaciones en la composición de la mezcla de reacción y en el programa de amplificación.

*Cebadores:* Se utilizaron cebadores sintetizados por el CIGB de La Habana, Cuba, que permiten la amplificación de fragmentos de 357 pb. Estos fueron:

LD1: 5' ATG CAC ACT TGG TGT TAA CTA 3'

LD2: 5' GAC TTA TCA CCG GCA GTC TTA 3'

*Mezcla de reacción:* Se preparó de la misma forma que en el acápite 3.2.1.3a, excepto que los cebadores se emplearon a una concentración inicial de 10 µM.

*Amplificación del ADN:* La amplificación del ADN se realizó en el termociclador "Mastercycler personal", modificando el programa original indicado para la misma, en aras de reducir el tiempo de la reacción de amplificación. Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 (en lugar de 44) ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 47°C por 0,5 min (en lugar de 1 min) y extensión a 72°C por 1,5 min (en lugar de 2 min), y una extensión final a 72°C durante 5 min.

*Análisis de los productos amplificados:* Se procedió de igual forma a lo descrito en el acápite 3.2.1.2b.

### **3.2.1.3c Estudio del límite de detección o sensibilidad analítica de las PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de *B. burgdorferi* sensu lato**

Se utilizaron los ADN de las cepas *B. burgdorferi* sensu stricto B31 y *B. garinii* NE11, a partir de los cuales se realizaron diluciones decimales y seriadas, comenzando por una concentración de 2,1 ng/μL y hasta una concentración final de 2,1 fg/μL.

Para la amplificación de los fragmentos deseados por ambas PCR se prepararon las mezclas de reacción partiendo de 10 μL de cada una de las diluciones de los ADN de referencia. Se consideró entonces como límite de detección la menor cantidad de ADN con las que se logró la visualización del amplicón en el gel de agarosa al 2%.

El límite de detección de la PCR-16S también se evaluó a través del programa original para la amplificación del ADN.

## **3.2.2 Diagnóstico microbiológico de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas**

### **3.2.2.1 Estudio de serie de casos 1**

Se realizó durante el periodo 1998-2002.

Se estudiaron 14 muestras de sueros conservadas en el LNE-IPK desde 1997. Las muestras procedían de igual número de individuos, todos habitantes de la comunidad "Las Terrazas", ubicada en Sierra del Rosario, provincia Artemisa, los que presentaron sospechas clínico-epidemiológicas de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato.

*Método de pesquisa:* Para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti-*B. burgdorferi* sensu lato se utilizó el ELISA Enzignost Borreliosis (Behring, Margurg, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema utiliza como antígeno un extracto de *B. afzelii* PKo.

*Método confirmatorio:* Las muestras que resultaron positivas o con valores cercanos al valor de corte se estudiaron en el Laboratorio de Espiroquetas de la Universidad de Trieste, Italia, a través de un Western blot para la detección de IgM e IgG, en el que se empleó como antígeno el perfil proteico obtenido a partir de células completas de *B. afzelii* PKo. Se consideró positiva a IgM aquella muestra que mostrara al menos una banda de las correspondientes a las proteínas de 41 (con intensidad fuerte), 39, 23 y 17 kDa, y a IgG si se observaban al menos dos bandas correspondientes a las proteínas de 83/100, 58, 43, 39, 30, 23, 21, 17 y 14 kDa (Hauser *et al.*, 1997).

Con el propósito de descartar posibles reacciones cruzadas con anticuerpos producidos contra otras espiroquetas de interés clínico, se realizó la Hemaglutinación Pasiva para leptospirosis, según se describe en el Manual de Operaciones y Procedimientos (MOP) de Leptospirosis del LNE-IPK, la prueba de detección de reaginas plasmáticas (RPR, de sus siglas en inglés Rapid Plasma Reagin) [Quimefa, Cuba] y la Hemaglutinación de *Treponema pallidum* (HATP) [Oxoid, Reino Unido] para sífilis, siguiendo las instrucciones de sus fabricantes.

### 3.2.2.2 Estudio de serie de casos 2

Esta investigación se realizó durante el periodo 2003-2010 con colaboración del Laboratorio de Microbiología de La Chaux de Fonds, Suiza.

Se estudiaron 27 muestras de suero, 11 LCR, un plasma y una sangre periférica de 30 individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de esta borreliosis (Anexo 3), procedentes de diferentes provincias del país, y recepcionadas en el LNE-IPK.

*Métodos de pesquisa:* Las muestras de sueros, LCR y plasma se estudiaron utilizando los siguientes ensayos inmunoenzimáticos: ELISA IgM/IgG VIDAS (BioMérieux, Francia), ELISA-IgM de captura (IDEIA<sup>TM</sup> Borrelia IgM) (Dako Cytomation, EUA) y ELISA IgM/IgG-C6 (C6 Lyme ELISA<sup>TM</sup>) (Immunitics, EUA). En todos se procedió siguiendo las instrucciones de los productores.

*Métodos confirmatorios:* Para las muestras de sueros, LCR y plasma se emplearon los ensayos inmunoenzimáticos: Western blot-IgM [Ag: *B. garinii* (NE83)], Western blot-IgG (Ag: *B. burgdorferi* sensu stricto (B31)] y Western blot-IgG (Ag: *B. garinii* (NE83)], los que se realizaron según los PNO en el Laboratorio de Microbiología de La Chaux de Fonds (Anexo 2). Para la detección de IgG en suero se utilizó además un estuche comercial de Western blot (Bioline Diagnostic, Italia), siguiendo las instrucciones del productor, que emplea como antígeno las proteínas de *B. afzelii*.

Las muestras clínicas fueron estudiadas por los métodos serológicos disponibles en el momento en que se realizó el diagnóstico microbiológico, y en dependencia del volumen de la muestra recepcionada.

Desde diciembre de 2006 la metodología de Western blot-IgG con el perfil proteico de la cepa B31 fue transferida al LNE-IPK, así como el ELISA IgM/IgG-C6 desde diciembre de 2008, las que se han estado realizando gracias al intercambio científico con el laboratorio suizo.

La muestra de sangre periférica se sembró (tres gotas) en los medios de cultivo BSK-H y BSK modificado, se incubaron en condiciones de microaerofilia a 35°C durante 15 días, y se realizaron exámenes macro y microscópicos en búsqueda de espiroquetas. Se continuó con la realización de subcultivos en iguales condiciones por otros 10 días y se examinaron nuevamente para buscar las espiroquetas. Paralelamente se tomó una alícuota de 1 mL de cada subcultivo para extracción de ADN por el método de shock osmótico y térmico (colecta, lavado y resuspensión de las células en agua destilada, calentamiento a 100°C / 15 min y colocación inmediata a -20°C) para ser empleado en la PCR - 5S-23S descrita anteriormente.

Todas las muestras de suero positivas por ELISA o Western blot se estudiaron por las pruebas de Microaglutinación y HATP (Centis, Cuba) para la búsqueda de reacciones cruzadas con anticuerpos contra *Leptospira interrogans* sensu lato y *Treponema pallidum*, siguiendo el MOP de Leptospirosis del LNE-IPK y las instrucciones del productor, respectivamente.

### **3.2.3 Prevalencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* sensu stricto en una población expuesta a mordeduras por garrapatas**

Este estudio fue conducido durante el periodo de enero a mayo de 2006 en la comunidad “Las Terrazas”; área rural geográficamente pequeña (enclavada en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario que tiene una extensión total de 250,70 km<sup>2</sup>), con una temperatura media multianual de 24,4°C, y una media anual de lluvias de 2 013,9 mm (Herrera y García, 1995; Hicuba, 2010), condiciones climatológicas favorables para la sobrevivencia de diferentes especies de garrapatas. La población que en ella habita, compuesta por 980 personas, se consideró de riesgo porque históricamente la zona ha presentado una alta tasa de infestación de garrapatas, fundamentalmente *A. cajennense* (ixódido de tres hospederos) y porque se han reportado pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato.

A través de un muestreo simple aleatorio se seleccionaron 247 individuos de la población en estudio. El tamaño de la muestra se definió teniendo en cuenta una frecuencia esperada de anticuerpos del 3%, peor resultado aceptable 1% y un nivel de confianza de 95% al aplicar el programa Statcalc de EpiInfo Version 6.

Se colectó un suero por cada individuo y se transportó al LNE-IPK, y posteriormente al Laboratorio de Microbiología de La Chaux de Fonds, Suiza, para su análisis.

A cada una de las muestras se les realizó el Western blot para la detección de anticuerpos IgG utilizando como antígenos el perfil proteico de la cepa B31 de *B. burgdorferi* sensu stricto, según se describe en el Anexo 2. Se emplearon sueros controles internos (positivo y negativo), elaborados y ensayados en el propio laboratorio, para validar cada ensayo.

Para clasificar a una muestra como positiva se utilizaron tres criterios diferentes:

- a) Criterio del Laboratorio de Microbiología de La Chaux de Fonds, Suiza: sistema de puntuación descrito en Anexo 2.
- b) Criterio del CDC: de acuerdo con el cual una muestra se considera positiva si al menos se revelan cinco de las siguientes 10 bandas de proteínas: 90/93, 65/66, 58, 45, 41, 39, 30, 28/29, 22/24 (OspC) y 18/20 kDa (CDC, 1995).

- c) Criterio del CDC con la inclusión de las proteínas OspA (31kDa) y OspB (34kDa) (Hilton *et al.*, 1996).

Los sueros clasificados como positivos se estudiaron por Microaglutinación y HATP (Centis, Cuba) en búsqueda de reacciones cruzadas con agentes de otras espiroquetosis.

### 3.2.4 Detección molecular de *B. burgdorferi sensu lato* en garrapatas

Para esta investigación se realizaron dos estudios observacionales, en los que se colectaron garrapatas de diferentes reservorios mediante un muestreo intencional u opinático. El primero de ellos se realizó en colaboración con el Laboratorio de Ecoepidemiología del Instituto de Biología de la Universidad de Neuchatel, Suiza.

#### 3.2.4.1 Estudio observacional 1

Se estudiaron 98 garrapatas que se colectaron a partir de animales domésticos (95 de equinos y tres de bovinos) en la comunidad “Las Terrazas” durante el mes de junio de 2005. Para la colecta se empleó el método de extracción manual, cuidando no estropear las estructuras bucales y se conservaron en alcohol al 70% hasta su identificación taxonómica y posterior extracción del material genético.

*Identificación taxonómica:* Se realizó hasta el taxón de especie, según las claves reportadas en la región Neotropical y se clasificaron en dependencia de su estadio de vida y sexo (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

*Extracción del material genético:* Se realizó utilizando el método de hidróxido de amonio y calor descrito en el acápite 3.2.1.2a.

*Detección de ADN de *B. burgdorferi sensu lato*:* Se realizó utilizando la combinación de la amplificación por PCR y visualización de los productos por Hibridación en Línea Reversa (RLB, de sus siglas en inglés Reverse Line Blot).

Para la amplificación por PCR se emplearon los siguientes cebadores sintetizados por Microsynth, Balgach, Suiza:

B5S-Bor [gen diana=ARNr 5S (*rrfA*): 5'-biotina-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT-3'

23S-Bor [gen diana=ARNr 23S (*rrlB*): 5'-TCAGGGTACTTAGATGGTTCACCTT-3' (Alekseev *et al.*, 2001)

Mezcla de reacción: Se prepararon mezclas de reacción para volúmenes finales de 50 µL, según reportaron Schouls *et al.*, 1999 y Alekseev *et al.*, 2001, conteniendo 5 µL de tampón PCR 10X (con 15 mM de MgCl<sub>2</sub>) (Qiagen, Alemania), 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de cada cebador (10 µM), 0,15 µL de *Taq* polimerasa (5U/µL) (Qiagen, Alemania), 31,85 µL de agua y 10 µL del extracto de ADN de la garrapata a estudiar (Schouls *et al.*, 1999; Alekseev *et al.*, 2001).

Se utilizó agua como control negativo en cada ensayo, en lugar de extracto de ácidos nucleicos.

Amplificación del ADN: Las amplificaciones se lograron en un termociclador Biometra<sup>®</sup>, T Gradient (Biolabo, Scientific Instruments, Alemania), aplicando una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 9 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, hibridación en la que se hizo disminuir la temperatura 1°C por ciclo de 60°C a 52°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg; le continuaron otros 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, hibridación a 52°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg, con una extensión final a 72°C durante 7 min.

Los productos amplificados por PCR se hibridaron por RLB con diferentes sondas de oligonucleótidos, que permiten identificar el gen espaciador entre las subunidades 5S y 23S del ARN ribosomal de cada una de las genomaespecies del grupo en cuestión [*B. burgdorferi* sensu lato (SL), *B. burgdorferi* sensu stricto (SS), *B. afzelii* (AF), *B. garinii* (GA, GANE), *B. valaisiana* (VSNE) y *B. lusitaniae* (LusiNE)], sintetizadas también por Microsynth. A continuación se relacionan las sondas utilizadas:

SL	5'-amino-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA-3'	(Rijpkema <i>et al.</i> , 1995; Alekseev <i>et al.</i> , 2001)
SS	5'-amino-AACACCAATATTTAAAAACATAA-3'	(Rijpkema <i>et al.</i> , 1995)
AF	5'-amino-AACATTTAAAAATAAATTCAAGG-3'	(Rijpkema <i>et al.</i> , 1995)
GA	5'-amino-AACATGAACATCTAAAAACATAAA-3'	(Rijpkema <i>et al.</i> , 1995)
GANE	5'-amino-CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA-3'	(Poupon <i>et al.</i> , 2006)
VSNE	5'-amino-TATATCTTTTGTTCATCCATGT-3'	(Poupon <i>et al.</i> , 2006)

LusiNE 5'-amino-TCAAGATTTGAAGTATAAAATAAAA-3' (Poupon *et al.*, 2006)

Brevemente, se tomaron 10 µL de cada uno de los productos de la PCR, se diluyeron en 150 µL de SSPE 2X (de sus siglas en inglés Standard Saline Phosphate / EDTA) (Invitrogen, Basilea, Suiza) y 0,1% de SDS, se desnaturalizaron durante 10 min a 99°C y se colocaron inmediatamente en hielo.

Las sondas se diluyeron a concentraciones de 12,5 a 100 pmol/150 µL en 500 mM de NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,4) y se unieron covalentemente a membranas de Biodina C (Pall Biosupport, Portsmouth, Reino Unido) activadas con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), en un patrón de líneas utilizando un Miniblotter 45 (Immunitics, Cambridge, EUA). Las membranas se lavaron con SSPE 2X y 0,1% de SDS a 60°C durante 5 min y se colocaron nuevamente en el miniblotter con las líneas de los oligonucleótidos perpendiculares a las ranuras de éste, que se llenaron con los productos de PCR desnaturalizados para desarrollar la hibridación durante 60 min a 42°C en una superficie horizontal.

La membrana se removió del miniblotter, se lavó dos veces durante 10 minutos en SSPE 2X y 0,5% de SDS a 51°C y se incubó durante 30-60 min a 42°C con el conjugado de estreptavidina marcado con peroxidasa (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza), diluido 1:4 000 en SSPE 2X y 0,5% de SDS. Por último se lavó dos veces con SSPE 2X y 0,5% de SDS durante 10 minutos a 42°C y dos veces con SSPE 2X durante 5 min a temperatura ambiente.

Las hibridaciones se visualizaron al incubar las membranas con el líquido quimioluminiscente ECL (de sus siglas en inglés Enhancer ChimioLuminiscent) (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza) y se expusieron a filmes de rayos X (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Otelfingen, Suiza).

#### 3.2.4.2 Estudio observacional 2

Se estudiaron 155 garrapatas que se colectaron durante el periodo de diciembre de 2008 a mayo de 2009 a partir de diferentes reservorios como se detalla a continuación.

No. de garrapatas	Reservorio	Procedencia
57	Bovino	Mariel, Artemisa
24	Canino	La Lisa, La Habana

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

44	Canino	Arroyo Naranjo, La Habana
21	Canino	La Lisa, La Habana
8	Canino	Guanabacoa, La Habana
1	Vivienda	La Lisa, La Habana

Para la colecta e identificación taxonómica se siguieron los procedimientos descritos en el Estudio observacional 1.

*Extracción del material genético:* Las garrapatas que no se encontraban en estado de ingurgitación fueron aglomeradas en grupos de dos a cuatro organismos por tubo, según especie y procedencia, y se les realizó la extracción utilizando el método de hidróxido de amonio y calor descrito en el acápite 3.2.1.2a. Las garrapatas ingurgitadas se procesaron individualmente o en pares, en dependencia de la especie, procedencia y tamaño, por el método de acetato de potasio (modificado 1) descrito en el mismo acápite.

*Comprobación interna de la extracción:* A cada extracto se le realizó la PCR para la amplificación del fragmento del gen de la subunidad 16S del ARN mitocondrial de garrapata según se describió en 3.2.1.2b.

*Detección de ADN de B. burgdorferi sensu lato:* Se realizó a partir de la amplificación por la PCR - 5S-23S descrita en el acápite 2.2.1.3a.

### 3.3 Aseguramiento de la calidad

El Laboratorio Nacional de Espiroquetas integra el Laboratorio Nacional de Referencia en Microbiología con sede en el IPK, nombrado por el Ministerio de Economía y Planificación a solicitud del Ministerio de Salud Pública (Anexo 4). Este cumple con los requisitos (en proceso de certificación) de las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico (BPLC) según la Regulación No. 3/2009 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), puesta en vigor a partir del 1º de enero de 2010 mediante la Resolución No. 82/2009 del Director del CECMED (CECMED, 2009a; CECMED, 2009b).

El Laboratorio ADMed de Microbiología de La Chaux de Fonds, de Suiza, está acreditado por el Servicio de Acreditación Suizo como “Laboratorio de análisis para microbiología médica”, según la ISO/IEC 17025 (Anexo 5); y junto al Instituto de Biología de la Universidad de

Neuchâtel conforman el Centro Nacional de Referencia para las enfermedades transmitidas por garrapatas (CNRT, de sus siglas en francés Centre National de Référence pour les maladies transmises par les tiques; ver en: <http://www2.unine.ch.cnrt>).

### 3.4 Análisis estadístico

La información de las diferentes investigaciones se introdujo en Bases de Datos diseñadas al efecto empleando el programa Excel (Microsoft Office). Para el análisis de la información se utilizó el paquete estadístico EPIDAT 3.1.

Se utilizaron medidas de Estadística Descriptiva e Inferencial como se describe a continuación.

Se empleó la media y la desviación estándar como medidas de tendencia central y de dispersión, respectivamente, para describir el crecimiento de las cepas de *B. burgdorferi* sensu lato en los diferentes medios de cultivo empleados. Se realizó el cálculo del porcentaje de positividad serológica de las muestras clínicas, de los individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato, según las pruebas de laboratorio utilizadas.

Se calculó la prevalencia de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu stricto, según cada criterio de interpretación, en la muestra de la población de riesgo seleccionada (como se describió en el acápite 3.2.3), con sus respectivos intervalos de confianza (nivel de confiabilidad de 95%), para finalmente estimar la prevalencia de anticuerpos en la población. Se calcularon también las frecuencias relativas del número de bandas de proteínas y de la reactividad e intensidad de las mismas revelada en el Western blot con los sueros estudiados.

El porcentaje de las garrapatas según especie, estadio de vida, sexo y procedencia fue otra de las variables comprobadas.

### 3.5 Aspectos éticos

Los protocolos de esta investigación fueron aprobados por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de la Investigación del IPK como Proyectos Ramales del Ministerio de Salud Pública.

Se cumplieron las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de microorganismos según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006 (CITMA, 2006).

La información fue conservada con carácter confidencial. No se reveló la identidad de los individuos de los que se recibieron muestras clínicas para su estudio. Los resultados de las pruebas de laboratorio se enviaron exclusivamente a los médicos de asistencia que solicitaron los análisis, y se utilizaron por el equipo de investigación con fines científicos.

Se obtuvo el consentimiento informado de los individuos para participar de manera voluntaria y gratuita en el estudio correspondiente a la encuesta serológica, previa explicación en un lenguaje sencillo y claro de cómo se realizaría el mismo, su importancia y los beneficios que proporcionará al conocimiento de la enfermedad de Lyme. Los datos de los participantes fueron mantenidos bajo estricta confidencialidad, solo accesibles al investigador principal del estudio.

Durante la recolección de garrapatas se garantizó la conservación y protección de la fauna. Las actividades desarrolladas no provocaron daños en los ecosistemas ni alteraron las características funcionales de los nichos ecológicos de las especies que se relacionan en este estudio. Los riesgos se redujeron al mínimo mediante la participación de personal experimentado en la recolección de las muestras.

Toda la información relacionada con esta investigación se encuentra conservada y protegida en el LNE-IPK.

No existen conflictos de intereses entre los grupos de investigadores cubanos y suizos.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de métodos microbiológicos para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato

#### 4.1.1 Evaluación de un medio de cultivo modificado para *B. burgdorferi* sensu lato

En la evaluación cualitativa del crecimiento de las cepas de borrelia en los medios de cultivo, comercial y modificado, se constató el cambio de coloración de los mismos de rosado a naranja (Figura 4-1), debido a una disminución del pH como consecuencia de la aparición e incremento de la concentración de los productos finales de la fermentación en los medios, favorecido por la multiplicación celular (Fraser *et al.*, 1997). Desde el punto de vista microscópico se observó la presencia de espiroquetas uniformemente refráctiles y móviles en ambos medios, aunque subjetivamente las concentraciones de células eran ligeramente superiores en el medio BSK-H.

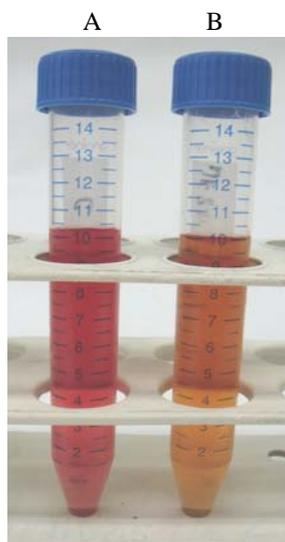
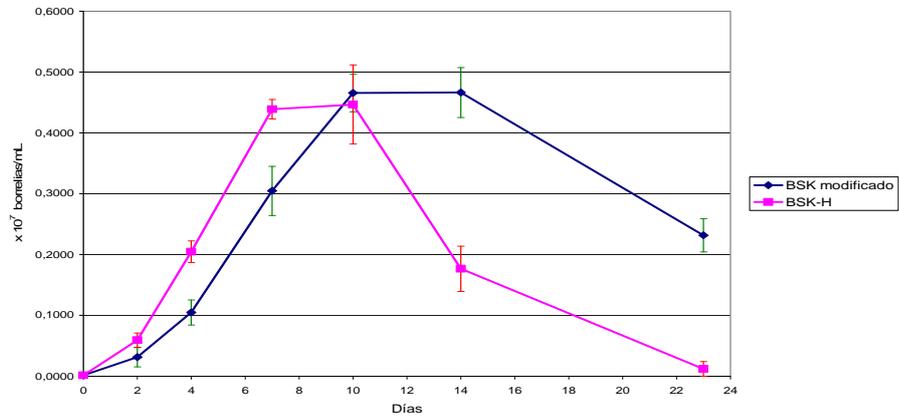


Figura 4-1. Cambio de coloración del medio de cultivo BSK modificado producto de la multiplicación de *B. garinii* (A: medio de cultivo sin inocular, B: medio de cultivo con crecimiento de *B. garinii*).

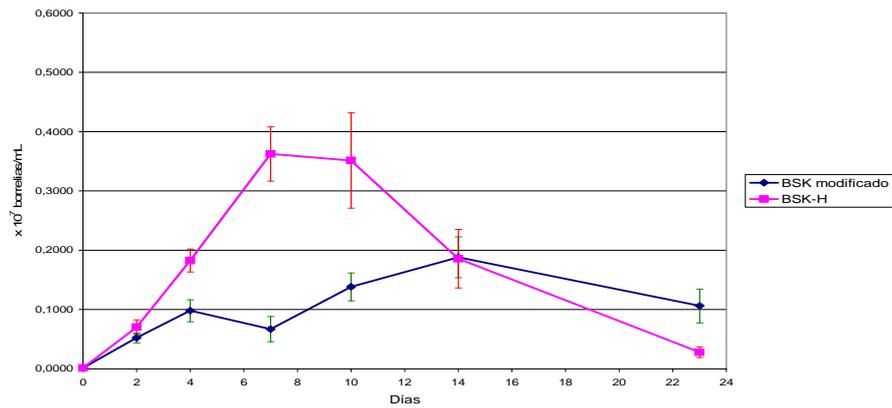
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación cuantitativa permitió obtener las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura 4-2.

### *B. burgdorferi* sensu stricto (NE 4502)



### *B. garinii* (NE 4546)



### *B. afzelii* (NE 4505)

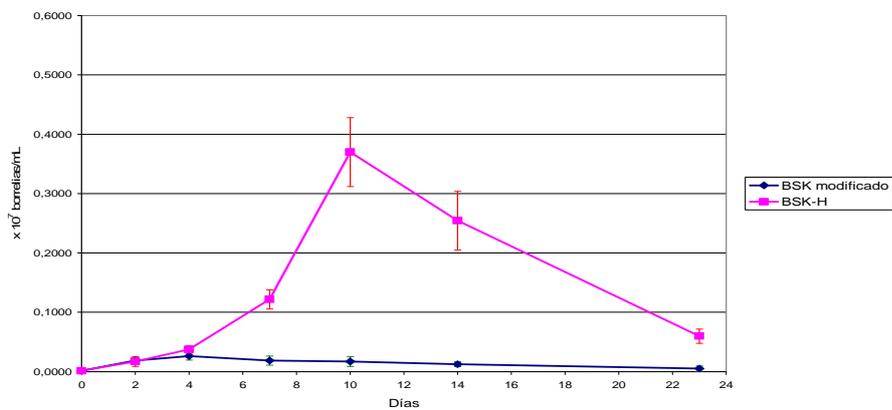


Figura 4-2. Curvas de crecimiento de cepas de *B. burgdorferi* sensu lato en diferentes medios de cultivo.

Como se puede observar la fase logarítmica de crecimiento para *B. burgdorferi* sensu stricto en el medio modificado fue más lenta que en el medio comercial, pero las concentraciones de espiroquetas durante la fase estacionaria fueron similares en ambos medios. En cambio, en la fase de declinación el número de borrelias fue superior en el medio modificado.

Los resultados difirieron para las otras especies ensayadas. En el medio modificado el número de células de *B. garinii* fue inferior hasta el día 14, respecto al medio comercial; la fase logarítmica fue muy lenta, mientras que la estacionaria no se observó claramente y la de declinación fue similar en ambos medios. La multiplicación de la cepa de *B. afzelii* en el medio modificado no fue posible, sólo se observaron algunas borrelias y con movilidad reducida. No obstante, el crecimiento de las cepas no sólo difirió en el medio modificado, sino también en el medio comercial.

Está descrito que cepas de diferentes especies de *Borrelia* crecen de forma desigual, lo que puede estar relacionado con la naturaleza exigente desde el punto de vista nutricional de las mismas y los cambios que se producen en la bacteria a causa del proceso de adaptación durante la transición al medio artificial (Callister *et al.*, 1990; Ruzic-Sabljić y Strle, 2004). Por otra parte, es importante recordar que las cepas empleadas en esta evaluación sólo habían recibido dos subcultivos a partir del aislamiento primario, lo que sugiere que aún no estaban adaptadas a las nuevas condiciones.

Dado el carácter riguroso de las borrelias para crecer en medios químicamente definidos, también los cambios de lotes o de la suministradora de los constituyentes influyen en sus respuestas para crecer (Callister *et al.*, 1990). Los ingredientes del medio, otros factores como la temperatura de incubación, el pH y las propias características de las borrelias influyen en el crecimiento (Ruzic-Sabljić y Strle, 2004).

En este estudio sólo se modificó la composición química del medio de cultivo a partir del cambio de CMRL 1066 por medio 199. Entre ellos no se encuentran diferencias grandes en relación a la composición de sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas, aunque la concentración de aminoácidos en el medio 199 es mayor (Anexo 6).

El análisis del perfil proteico de la cepa NE83 de *B. garinii* crecida en estos medios y de las propiedades antigénicas de sus proteínas (ver figura 4-3), permitió constatar la expresión de las principales proteínas, tanto específicas como no específicas, y que un gran número de éstas

eran antigénicas, independientemente del medio utilizado. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en la región de las proteínas de 20-25 kDa (presumiblemente OspC).

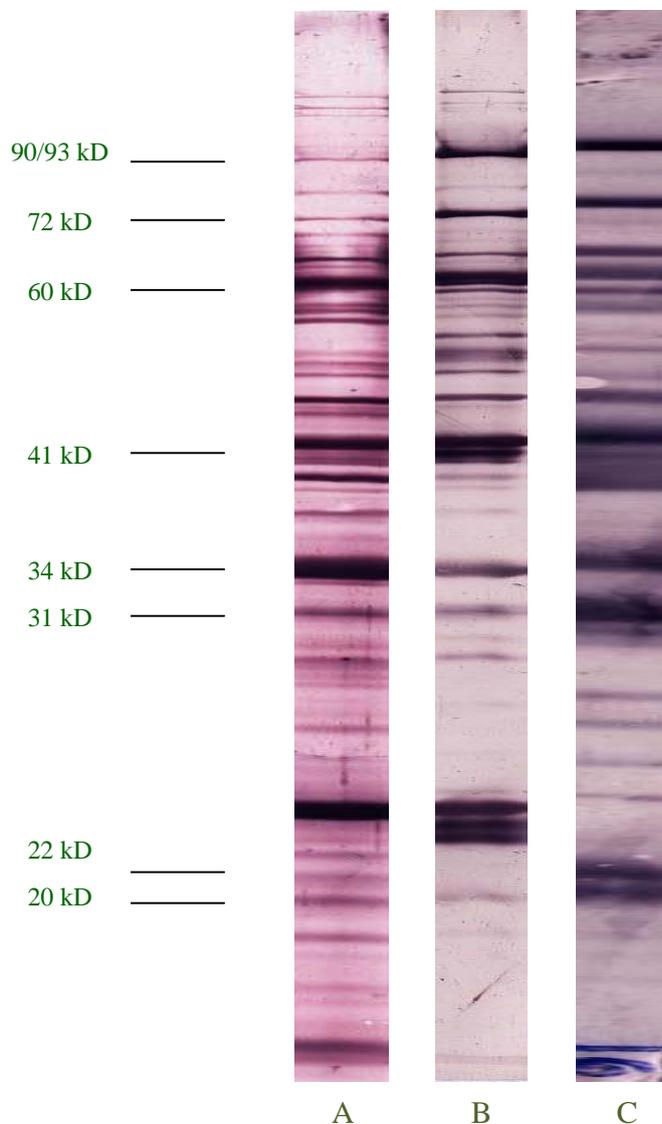


Figura 4-3. Lisados de células completas de *B. garinii* (NE 83) obtenidas de diferentes medios de cultivo. A: Lisado a partir de medio modificado teñido con oro coloidal; B: Western blot del lisado obtenido del medio modificado; C: Western blot del lisado obtenido del medio BSK-H.

Para las cepas de *Borrelia* se han documentado variaciones antigénicas considerables; cada cepa tiene su propio potencial para expresar una proteína particular, independientemente de los mecanismos de adaptación de las espiroquetas que pueden influenciar sobre la expresión de proteínas (Wilske *et al.*, 1996, Ruzic-Sabljić *et al.*, 2001).

Entre los requisitos para que el medio de cultivo sea útil para propósitos de laboratorio se encuentra su estabilidad, disponibilidad y eficacia en lograr el crecimiento de todas las cepas de *Borrelia* patógenas al hombre (Ruzic-Sabljić y Strle, 2004), incluyendo *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* y *B. spielmani*; por lo que se propone ampliar la evaluación con otras genomaespecies y cepas de *B. afzelii*.

Los resultados obtenidos permiten plantear que el medio modificado evaluado puede ser utilizado como una alternativa para el cultivo de cepas de borrelias en países con pocos recursos, teniendo en cuenta sus limitaciones para la multiplicación de determinadas cepas.

### **4.1.2 Evaluación de la eficacia de métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de garrapatas duras**

#### **Evaluación mediante la electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8%**

Al aplicar en las garrapatas el protocolo del método de fenol-cloroformo reportado por Weng *et al.*, 2002 para la extracción de ácidos nucleicos y evaluar la eficacia del mismo a partir de la electroforesis submarina de los extractos obtenidos en gel de agarosa al 0,8%, sólo se visualizó ARN en el gel cuando el material de extracción procedía de garrapatas adultas, y no se observó ADN genómico en los extractos de garrapatas de los diferentes estadios de vida y sexo, lo que sugiere que este protocolo no extrae cantidades suficientes de ADN.

En la evaluación del protocolo de fenol-cloroformo de Halos *et al.*, 2004, con las modificaciones realizadas, se observó en la electroforesis submarina la presencia de ADN genómico en los extractos que provenían de garrapatas adultas, cuando éstos se resuspendieron en menor volumen de tampón TE, independientemente de las condiciones de incubación del macerado de garrapatas con el tampón de lisis. Como se puede apreciar en la Figura 4-4, las bandas que identifican la presencia de ADN genómico no se observan de forma nítida, lo que está influenciado por la concentración de ADN en el extracto final.

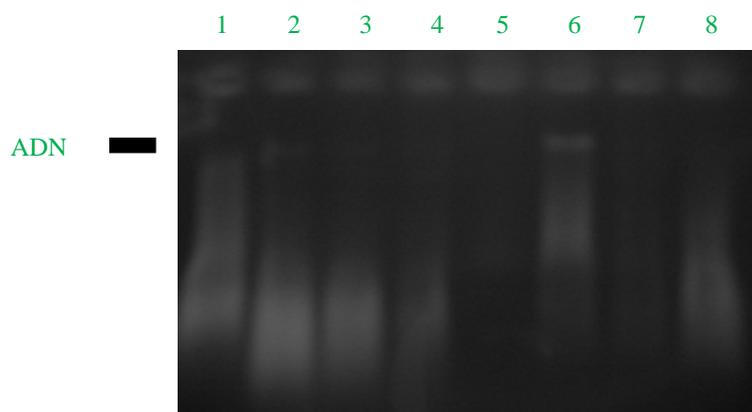


Figura 4-4. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los extractos de ácidos nucleicos de garrapatas adultas hembras obtenidos por el método de fenol-cloroformo de Halos *et al.*, 2004 y sus modificaciones. Líneas 1, 2: resultados del protocolo modificado 2; líneas 3, 4: resultados del protocolo modificado 3; líneas 5, 6: resultados del protocolo sin modificar; líneas 7, 8: resultados del protocolo modificado 1.

Por su parte, al utilizar el protocolo referenciado por Fraga *et al.*, 2004, para la extracción por el método de fenol-cloroformo, tampoco se observó la presencia de ADN en los extractos obtenidos a partir de las garrapatas en estadio de ninfas y adultos machos; aunque se logró visualizar ADN procedente de las adultas hembras, así como ARN en los diferentes estadios de vida (Figura 4-5).

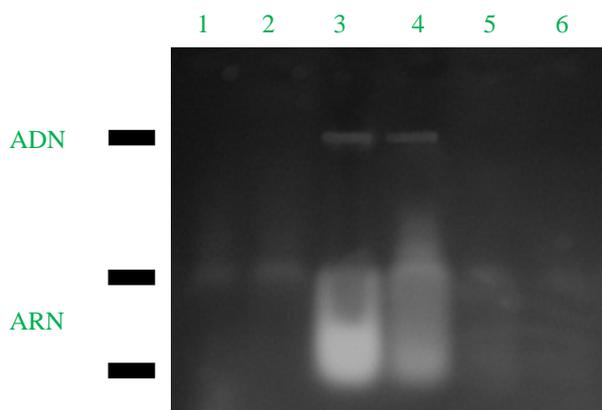


Figura 4-5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los extractos de ácidos nucleicos de garrapatas obtenidos por el método de fenol-cloroformo de Fraga *et al.*, 2004. Líneas 1, 2: extractos de ninfas; líneas 3, 4: extractos de garrapatas adultas hembras; líneas 5, 6: extractos de garrapatas adultos machos.

Los resultados en la electroforesis en gel de agarosa sugieren una dependencia de éstos en relación al estadio de vida y sexo de las garrapatas, lo que puede estar directamente relacionado con el tamaño de los organismos, ya que las adultas hembras son generalmente más grandes, y expanden su tamaño en la medida que aumenta el grado de ingurgitación, y por ende la cantidad de ADN genómico a obtener, ya sea ADN propio o del hospedero (Estrada-Peña *et al.*, 2004; Gern, 2004).

Al evaluar la extracción de ADN por los métodos de acetato de potasio, con sus modificaciones, y de hidróxido de amonio y calor, no se apreció la presencia de ADN en el gel de agarosa, independientemente del estadio de vida y sexo de las garrapatas utilizadas, sólo se visualizó ARN en los extractos obtenidos al emplear los protocolos de acetato de potasio. La electroforesis en gel de agarosa al 0,8% no permitió evaluar la eficacia de los procesos de extracción.

### **Evaluación mediante la PCR para un fragmento del gen de la subunidad 16S del ARN mitocondrial de las garrapatas**

La amplificación por PCR del fragmento de 320 pb del gen de la subunidad 16S del ARN mitocondrial de garrapatas, aplicado a cada uno de los extractos obtenidos según los protocolos de extracción evaluados, permitió la amplificación de dicho fragmento en todos los casos, excepto para los extractos obtenidos al utilizar el método de hidróxido de amonio y calor en garrapatas hembras ingurgitadas. No se observó diferencias en la intensidad de las bandas de los amplicones al añadir 5  $\mu$ L o 10  $\mu$ L del extracto en la mezcla de reacción. Estos resultados demostraron la eficacia de cada procedimiento.

En la Figura 4-6 se presentan los resultados de la PCR-subunidad 16S del ARN mitocondrial en extractos obtenidos por los diferentes métodos y sus modificaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

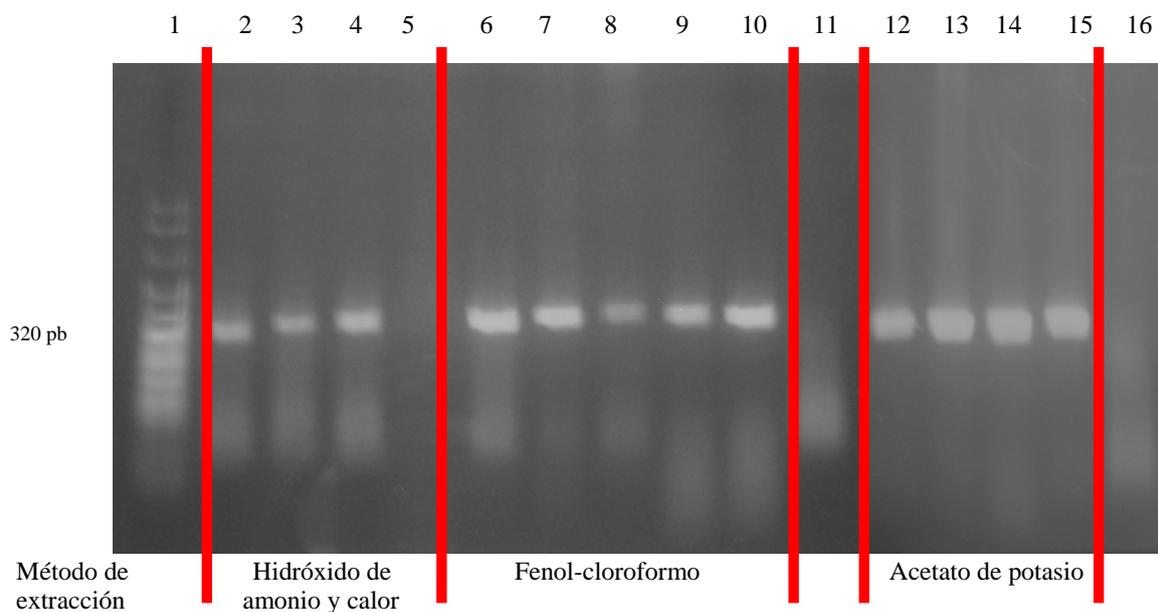


Figura 4-6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la amplificación por la PCR-subunidad 16S del ARN mitocondrial de los extractos de ADN obtenidos por cada método de extracción. Línea 1: Marcador de peso molecular (DNA MW Marker VIII, Roche); línea 2: ninfa; línea 3: adulto macho; línea 4: adulta hembra; línea 5: adulta hembra ingurgitada; líneas 6-10: adultas hembras (línea 6: protocolo sin modificar de Halos *et al.*; línea 7: protocolo modificado 1 de Halos *et al.*; línea 8: protocolo modificado 2 de Fraga *et al.*; línea 9: protocolo modificado 1 de Fraga *et al.*; línea 10: protocolo sin modificar de Fraga *et al.*; línea 12: protocolo sin modificar; línea 13: protocolo modificado 1; línea 14: protocolo modificado 2; línea 15: protocolo modificado 3; líneas 11 y 16: controles negativos (agua bidestilada estéril).

La extracción de ADN a partir de garrapatas es frecuentemente difícil. El primer inconveniente radica en la necesidad de romper el exoesqueleto quitinoso antes de proceder a la extracción, por otro lado, el ADN extraído resulta altamente susceptible a la degradación, por razones desconocidas (Hubbard *et al.*, 1995; Hill y Gutierrez, 2003); y finalmente, porque es posible encontrar en los extractos inhibidores para la *Taq* polimerasa utilizada en la PCR (Schwartz *et al.*, 1997, Sparagano *et al.*, 1999).

Aunque existe una amplia variedad de métodos para la extracción de material genético, entre ellos los comerciales, con el fin de utilizar el ADN en metodologías de biología molecular, éstos no siempre están accesibles para los laboratorios de menos recursos financieros (Mahittikorn *et al.*, 2005). De ahí la necesidad de comparar diferentes métodos de extracción para proponer los que resulten más prácticos y permitan obtener ADN con calidad compatible para la técnica de PCR.

La degradación de las proteínas por vía enzimática no es suficiente para una extracción máxima de ADN; ésta tiene que estar asociada con un paso inicial de macerado fino para destruir mecánicamente las cadenas de polisacáridos de la quitina del exoesqueleto. El macerado con ayuda de mortero es un método eficiente para la extracción de ADN; sin embargo, consume tiempo y es difícil de aplicar a muestras pequeñas como las ninfas (Halos *et al.*, 2004), por lo que es un paso crítico que debe realizarse con extremo cuidado.

El método de extracción con fenol-cloroformo es un protocolo de trabajo de larga duración y que involucra al fenol, una sustancia peligrosa para la salud, además de que se reporta como un potente inhibidor de la PCR (Saiki, 1990). El proceder requiere sucesivas extracciones que propician la pérdida de cantidades de ADN, y por otro lado, dificulta el procesamiento de un gran número de muestras. Sin embargo, es ampliamente usado en estudios que demandan ADN genómico con elevada calidad (Saiki, 1990; Sparagano *et al.*, 1999; Fraga *et al.*, 2004).

Por su parte, el método de extracción de ADN que utiliza acetato de potasio es un procedimiento en el que se emplea la acrilamida (sustancia también dañina para la salud), para la extracción de ADN genómico, cuando existe incluso en pequeñas cantidades. Ello condiciona la alta eficiencia del método; el proceso es poco consumidor de tiempo e involucra pocos pasos en su realización (Fraga *et al.*, 2004; De Armas *et al.*, 2005). Se reporta que el ADN extraído mediante este método no presenta alto grado de pureza, pero puede ser eficazmente empleado en técnicas de biología molecular como la PCR (De Armas *et al.*, 2005).

La extracción de ADN con hidróxido de amonio y calor es un método que resulta muy simple, rápido y barato. Se realiza una única etapa de extracción y no median etapas de purificación ni precipitación de los ácidos nucleicos, por lo que en ocasiones se presentan inhibidores en los extractos, principalmente de aquellos provenientes de garrapatas ingurgitadas (Schwartz *et al.*, 1997); como fue demostrado en esta investigación.

Cuando la finalidad de la extracción es la búsqueda de patógenos por PCR, se recomienda amplificar un segmento del ADN extraído, como control positivo del proceso de extracción (Hubbard *et al.*, 1995; Sparagano *et al.*, 1999; Halos *et al.*, 2004). La PCR utilizada en esta parte del estudio permitió no solo evaluar la eficacia de los métodos de extracción, sino también conocer la calidad del ADN extraído a partir de la presencia o ausencia de inhibidores

para la reacción de amplificación, entre los que se pueden encontrar restos de reactivos comúnmente usados en la purificación de ácidos nucleicos o de componentes moleculares presentes en las muestras empleadas para la extracción (Moreira, 1998; Queiroz *et al.*, 2001).

Otra variante a emplear para controlar los efectos inhibitorios sobre la eficiencia de la PCR deseada y evitar así los falsos negativos, es el uso de controles internos de amplificación (competitivos o no competitivos) en la PCR para la amplificación del fragmento génico deseado o diana (Neumaier *et al.*, 1998; de Bruin *et al.*, 2011), entre los que podrían estar los cebadores empleados en esta PCR (Bastos *et al.*, 2009).

La extracción de ADN utilizando el método de fenol-cloroformo mostró mejores resultados al emplear el protocolo referenciado por Fraga *et al.*, 2004, que permitió obtener ADN con calidad compatible para PCR y visible en el extracto de las garrapatas adultas hembras al aplicar la electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8%. En este caso, el protocolo modificado 1 redujo el tiempo de la precipitación del ADN y permitió obtener un extracto purificado más concentrado.

De los protocolos evaluados para el método de acetato de potasio, a pesar de no observar la presencia de ADN en los extractos al aplicarlos en el gel de agarosa al 0,8%, pero demostrada la calidad del mismo para PCR, se recomienda aplicar el protocolo modificado 1 en el que el tiempo de incubación con el tampón de lisis es menor pues no se utiliza proteinasa K, y se protege al ADN durante la etapa de precipitación ya que se emplea una temperatura de -20°C. La extracción de ADN según este método ha sido utilizada en triatomas y mosquitos (Fraga *et al.*, 2004; Bisset *et al.*, 2005; Kent y Norris, 2005; Fraga *et al.*, 2011), pero no se citan reportes internacionales que refieran esta metodología para extraer ADN a partir de garrapatas. Este constituye el primer reporte.

La extracción simple con hidróxido de amonio y calor, según un estudio de metaanálisis de la prevalencia de *B. burgdorferi* sensu lato en garrapatas en Europa, es el método de extracción de ADN más reportado (Rauter y Hartung, 2005). En un estudio posterior al antes mencionado se demostró que para la detección de *Borrelia*, la extracción de ADN siguiendo dicho procedimiento era más rápida, fácil y barata al realizarla directamente de la garrapata, respecto a la propuesta de cultivar primero la garrapata en medio BSK. Otra ventaja es que el extracto de ADN a partir de la misma garrapata puede ser utilizado para otros análisis como la

detección de otros patógenos o la identificación de ADN del hospedero utilizado por la garrapata (Morán-Cadenas *et al.*, 2007b). Todos estos resultados refuerzan el uso de la extracción por hidrólisis alcalina utilizando el hidróxido de amonio.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los diferentes métodos de extracción de ADN y su valor práctico, la extracción con hidróxido de amonio en garrapatas ninfas, adultos machos y hembras no ingurgitadas, constituye el método más sencillo y menos laborioso. La extracción con acetato de potasio o fenol-cloroformo, siguiendo los protocolos recomendados para la purificación del material genético y eliminación de posibles inhibidores representa la alternativa más beneficiosa en garrapatas adultas hembras ingurgitadas.

### **4.1.3 Evaluación de la sensibilidad analítica de la PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de *B. burgdorferi* sensu lato**

#### **PCR - 5S-23S**

Al evaluar la PCR - 5S-23S con los cuatro ADN de referencia, se comprobó la amplificación de los fragmentos de 226-256 pb para cada uno de ellos como se reporta en la literatura (Postic *et al.*, 1994; Masuzagua *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2008).

Los cebadores utilizados en esta PCR han sido ampliamente empleados y recomendados como una herramienta sencilla y útil para la detección e identificación de las diferentes genomaespecies de *B. burgdorferi* sensu lato, cuando es combinado este ensayo con el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, de sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) (Postic *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000; Jouda *et al.*, 2004b; Chu *et al.*, 2008).

#### **PCR - 16S**

Cuando los cebadores para la amplificación del fragmento de 357 pb del gen de la subunidad 16S del ARNr de *B. burgdorferi* sensu lato se evaluaron con los ADN de referencia, se comprobó igualmente la amplificación de los fragmentos con la talla esperada para cada uno de ellos al realizar la electroforesis submarina.

### **Determinación del límite de detección o sensibilidad analítica de las PCR para la amplificación de fragmentos de ADN de *B. burgdorferi* sensu lato.**

Al evaluar los límites de detección de las PCR utilizando los dos juegos de cebadores para cada una de las diferentes concentraciones de ADN, se obtuvo que la PCR - 5S-23S fue capaz de detectar 0,21 pg de ADN, lo que se corresponde con 84 copias del genoma según lo planteado por Marconi y Garon (5 fg de ADN genómico equivalen a 2 copias de genoma), mientras que la PCR - 16S sólo detectó 2,1 ng (8 400 copias) independientemente del programa de amplificación utilizado en esta última (Figura 4-7) (Marconi y Garon, 1992).

Los resultados de los límites de detección fueron iguales para los ADN de las dos genomaespecies de *B. burgdorferi* sensu lato utilizadas, *B. burgdorferi* sensu stricto y *B. garinii*.

La PCR - 5S-23S amplifica la región espaciadora variable entre dos estructuras conservadas, el extremo 3' del gen de la subunidad 5S del ARN ribosomal (*rrf*) y el extremo 5' del gen de la subunidad 23S del ARN ribosomal (*rrl*) conocida como región espaciadora *rrf-rrl* (Postic *et al.*, 1994), de la que existen dos copias repetidas en tándem en el genoma, mientras que la PCR -16S amplifica un fragmento del gen *rrs*, el cual existe en una sola copia y distante de los genes *rrl* y *rrf* (Fukunaga *et al.*, 1992, Schwartz *et al.*, 1992). Precisamente el número de copias de cada región en el genoma de la bacteria es una de las variables que pudo haber influido en que la sensibilidad analítica de la PCR - 5S-23S sea superior a la de la PCR -16S.

En la práctica, la sensibilidad del método depende de los detalles técnicos y de la muestra empleada para el diagnóstico. Aunque generalmente el número de espiroquetas en fluidos corporales humanos es bajo (menos de 50 organismos/mL), en algunos pacientes con artritis pueden tener hasta 10 000 espiroquetas/mL de líquido sinovial, y pacientes con eritema crónico migratorio y síntomas sistémicos hasta 4 000 organismos/mL de plasma. Por otra parte, la presencia en la muestra de ADN diferente al que se quiere amplificar, como el ADN del hospedero, puede afectar también el límite de detección de la PCR en cuestión (Schmidt, 1997).

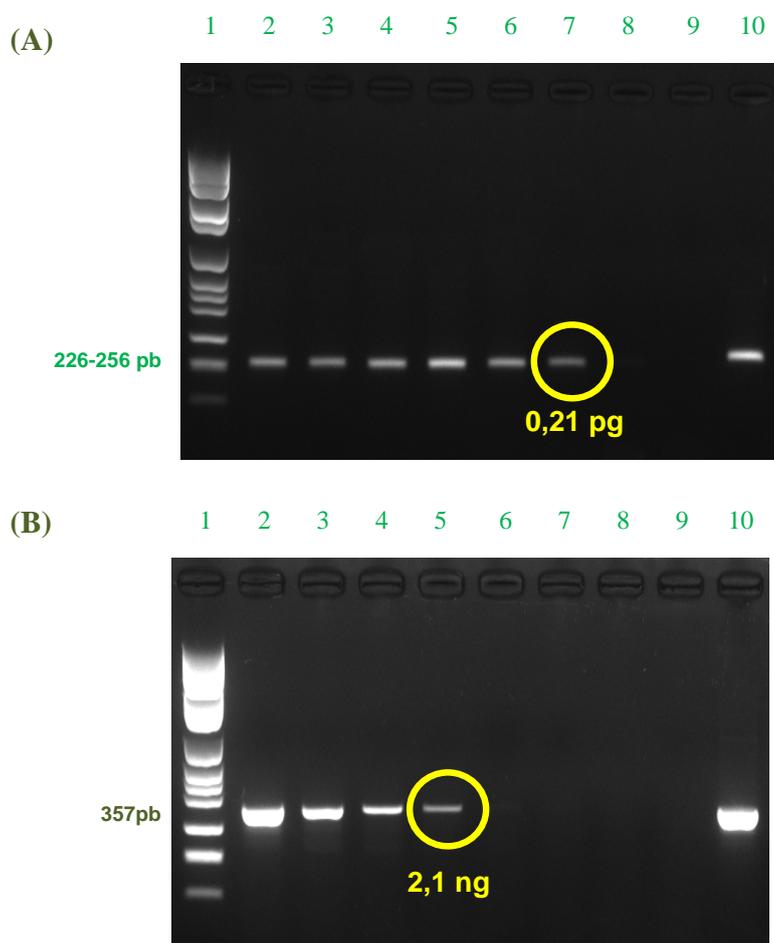


Figura 4-7. Límites de detección de la PCR - 5S-23S (A) y PCR - 16S (B) según electroforesis en gel de agarosa al 2%. Línea 1: Marcador de peso molecular (DNA MW Marker VI, Roche); Líneas 2-8: Amplificación del fragmento deseado a partir de 21 ng, 2,1 ng, 0,21 ng, 21 pg, 2,1 pg, 0,21 pg, 21 fg de ADN de *B. burgdorferi* sensu stricto, respectivamente; línea 9: control negativo (agua bidestilada estéril); línea 10: control positivo (ADN de *B. garinii*).

Entre los detalles técnicos que influyen en la sensibilidad de la PCR se encuentran los procedimientos de colección, transporte y preparación del ADN a partir de la muestra clínica; esta última también introduce variaciones en la sensibilidad pues su elección estaría sujeta a las manifestaciones clínicas del paciente (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

La eficiencia de un ensayo de PCR está determinada por varios factores, entre ellos los fundamentales son la selección del gen diana y de los cebadores apropiados. En general, se recomienda utilizar cebadores que permitan la amplificación de un amplicón de 100-300 pb,

pues ello reduce los efectos de la fragmentación del ADN durante el procesamiento de la muestra (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta estos aspectos y la sensibilidad analítica encontrada para la PCR - 5S-23S en esta investigación, se selecciona y propone la misma para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato en futuros estudios.

## **4.2 Diagnóstico microbiológico de infección por *B. burgdorferi* sensu lato en muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de la misma**

### **4.2.1 Estudio de serie de casos 1**

En el estudio de las 14 muestras de sueros utilizando el ELISA Enzignost Borreliosis se encontró que cinco de ellas presentaban valores positivos de anticuerpos IgM y una, valores límites de anticuerpos tanto del tipo IgM como IgG. Las muestras restantes resultaron negativas.

Dos de las seis muestras que mostraron reactividad, resultaron positivas a IgM cuando se estudiaron con el Western blot IgM e IgG; poniendo de manifiesto claramente las bandas correspondientes a las proteínas de 41 y 23 kDa. Sólo en uno de estos seis sueros, se demostró un título bajo de anticuerpos IgM a leptospirosis, correspondiendo a una de las muestras confirmadas por Western blot, lo que reafirma la similitud antigénica entre *Leptospira* spp. y el agente causal de la infección en dicho paciente.

Al investigar retrospectivamente uno de los casos que resultó positivo se encontró que se trataba de un paciente masculino de 16 años de edad, sin antecedentes de viaje al exterior y que a la edad de cinco años se le sospechó enfermedad de Lyme debido a un cuadro clínico caracterizado por un síndrome febril, lesiones cutáneas, dolores articulares crónicos, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, antecedentes de meningoencefalitis y dolores precordiales; además presentaba antecedentes de mordedura por garrapatas. Este caso por lo novedoso que resultaba, fue publicado nacionalmente (Grandío *et al.*, 1988).

Posteriormente presentó dolores en las articulaciones grandes como codo, rodillas y tobillos, pérdida de peso, febrícula y fiebre sin causa precisada, inflamaciones articulares, hepatomegalia y esplenomegalia. Como tratamiento, se le administró eritromicina, sales de oro y antiinflamatorios con los que mejora ligeramente su estado. A partir de 1997, cuando

comienza estudios preuniversitarios fuera de la comunidad, desaparece la fiebre pero se constataron adenopatías en diversas ocasiones, fundamentalmente en las regiones anterior y posterior del cuello, así como en la región inguinal. Fue precisamente en ese año 1997 que se obtuvo el suero que formó parte de la serie estudiada.

La respuesta de anticuerpos de tipo IgM detectada en el suero de este individuo no permite hacer inferencias acerca del estado de la infección (activa o pasada) pues se han comprobado niveles de anticuerpos IgM o IgG, detectables de 10 a 20 años después de la infección activa, en un tercio de los pacientes que presentaron enfermedad de Lyme temprana y en más del 50% de los que sufrieron la artritis (Kalish *et al.*, 2001).

En cambio, aunque no se ha definido aún un patrón para la respuesta serológica que permita diferenciar reinfección de infección primaria por *B. burgdorferi* sensu lato (Nadelman y Wormser, 2007), no haber detectado IgG (11 años después) podría interpretarse como una reinfección. No obstante, para hacer tal aseveración, es imprescindible que el cuadro clínico actual incluya el eritema migratorio (Kalish *et al.*, 2001); al respecto no se reseñó información alguna en los datos clínicos del individuo. También podría ser que el paciente recibió tratamiento con un antibiótico inadecuado durante la fase temprana, y la droga no permitió el cambio de clase de IgM a IgG (Wilske *et al.*, 2007).

Otra posible explicación a la presencia de anticuerpos del tipo IgM podría ser la de una estimulación antigénica en curso, causada por una infección persistente (Fritz y Vugia, 2001). En cualquier caso, este hallazgo serológico, en conjunto con las informaciones clínicas y epidemiológicas, sugieren la infección por *B. burgdorferi* sensu lato.

En esta primera serie de casos se pudo confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu lato en el 14,3% (2/14) de las muestras estudiadas de los individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de la infección.

Estudios similares han sido reportados en otros países de Latinoamérica. Por ejemplo, en Colombia en un estudio durante 1995-1996 de 20 muestras de suero y un LCR de pacientes que presentaban mayormente lesiones dermatológicas con una evolución superior a los tres meses, utilizando un Western blot-IgG comercial, se reportó la presencia de anticuerpos contra la cepa B31 utilizada en la prueba en tres de los pacientes (Palacios *et al.*, 1999). También en México en el periodo de 1999 a 2000, se estudiaron muestras de cuatro pacientes que

presentaban manifestaciones clínicas sugestivas de enfermedad de Lyme, empleando para el diagnóstico serológico un ELISA y Western blot comerciales, y se confirmó respuesta de anticuerpos específicos en tres de los pacientes, en uno de ellos por seroconversión después de dos meses. En ninguno se encontró reacciones cruzadas con la infección por *T. pallidum* (Gordillo-Pérez *et al.*, 2007).

### **4.2.2 Estudio de serie de casos 2**

En la tabla 4-1 se resumen los resultados obtenidos para cada una de las muestras clínicas incluidas en este estudio. Debido a que se recibieron en momentos distintos en el LNE-IPK no se utilizó en todas los mismos métodos de diagnóstico microbiológico.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla 4-1. Resultados del diagnóstico microbiológico a las muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba, pertenecientes a la serie de casos 2 (2003-2010).

No. caso	Muestra clínica	Pruebas serológicas de pesquisa			Pruebas serológicas de confirmación				Cultivo/ PCR
		ELISA-IgM de captura	ELISA IgM e IgG VIDAS	ELISA IgM/IgG C6	Western blot IgM ( <i>B. g</i> )	Western blot IgG ( <i>B. b ss</i> )	Western blot IgG ( <i>B. g</i> )	Western blot IgG ( <i>B. a</i> )	
1	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR
	LCR	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
2	suero	negativo	negativo	NR	NR	positivo	NR	infección cuestionable	NR
3	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR
4	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR
5	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	infección cuestionable	NR
6	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	infección cuestionable	NR
7	suero	positivo	positivo	NR	positivo	negativo	NR	infección cuestionable	NR
8	suero	positivo	positivo	NR	positivo	negativo	NR	NR	NR
9	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
10	suero	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
	LCR	negativo	negativo	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
11	sangre periférica	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	negativo/negativo
12	suero	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
13	suero	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	NR
	LCR	negativo	negativo	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
14	LCR	NR	negativo	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR

Leyenda: NR – No Realizado; *B. g* – *B. garinii*; *B. b ss* – *B. burgdorferi* sensu stricto; *B. a* – *B. afzelii*

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla 4-1. Resultados del diagnóstico microbiológico a las muestras clínicas de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba, pertenecientes a la serie de casos 2 (2003-2010). (Continuación)

No. caso	Muestra clínica	Pruebas serológicas de pesquisa			Pruebas serológicas de confirmación				Cultivo/ PCR
		ELISA-IgM de captura	ELISA IgM e IgG VIDAS	ELISA IgM/IgG C6	Western blot IgM ( <i>B. g</i> )	Western blot IgG ( <i>B. b ss</i> )	Western blot IgG ( <i>B. g</i> )	Western blot IgG ( <i>B. a</i> )	
15	suero	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	NR	NR	NR
	LCR	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
16	suero	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	NR
	LCR	negativo	negativo	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
17	LCR	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
18	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
	LCR	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
19	suero 1	NR	NR	equivoco	NR	negativo	NR	NR	NR
	suero 2	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
20	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
21	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
	LCR	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
22	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
	LCR	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
23	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
	plasma	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
24	LCR	NR	NR	NR	NR	negativo	NR	NR	NR
25	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
26	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
27	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
28	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
29	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR
30	suero	NR	NR	negativo	NR	negativo	NR	NR	NR

Leyenda: NR – No Realizado; *B. g* – *B. garinii*; *B. b ss* – *B. burgdorferi* sensu stricto; *B. a* – *B. afzelii*

Como se puede apreciar, anticuerpos específicos IgM contra el complejo *B. burgdorferi* sensu lato se detectaron en el 10% (3/30) de los individuos estudiados (Casos No. 7, 8 y 16), lo que confirma en éstos la presencia de la infección en etapas tempranas, donde aun no ha comenzado a ser detectable la producción de anticuerpos IgG; mientras que en el 6,6% (2/30) de los individuos (Casos No. 2 y 13) la detección de IgG específica permitió confirmar la presencia de la infección en una etapa diseminada o avanzada de la misma.

Por otra parte, pudo apreciarse una respuesta de tipo IgG anti-*B. afzelii* en otros dos individuos (Casos No. 5 y 6), los cuales fueron negativos al resto de las pruebas empleadas. El nivel de la respuesta encontrada no fue suficiente para confirmar la infección, quedando ésta como cuestionable según el criterio de interpretación dado por el productor del estuche comercial, por lo que pudo o no existir un contacto de estos individuos con la bacteria.

Cuando a las muestras con resultados positivos se les aplicaron las pruebas serológicas para la detección de infecciones causadas por otras espiroquetas, como leptospirosis y sífilis, todas resultaron negativas.

Las pruebas serológicas recomendadas para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme confirmaron en 16,6% (5/30) de los pacientes la infección por *B. burgdorferi* sensu lato, ya sea en etapas tempranas (infección localizada) o avanzadas (infección diseminada). La presencia de anticuerpos IgM e IgG en estas muestras es indicativo del contacto entre los individuos y el agente microbiano, diagnóstico que fue corroborado a través de las pruebas serológicas de confirmación según se muestra en la tabla 4-1.

La borreliosis de Lyme, como ya se ha mencionado, es una enfermedad inflamatoria multisistémica que comienza usualmente en la piel en el sitio de la mordedura de la garrapata, donde el eritema migratorio típico se desarrolla en un 60% de los casos. A partir de esta lesión primaria las espiroquetas se pueden diseminar causando múltiples eritemas migratorios o afectar otros sistemas de órganos (Wilske, 2005), como ocurrió en el caso No. 7, en el que predominaron las afectaciones dermatológicas acompañadas de ligeras alteraciones neurológicas. Teniendo en cuenta las manifestaciones clínicas, el antecedente epidemiológico de la presencia de “pulgas” en la vivienda (las que pudieron ser confundidas con garrapatas en estadio de larvas o ninfas, pues no fueron identificadas por un especialista), los resultados positivos en las pruebas serológicas, y

la evolución después del tratamiento específico, se confirma la presencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en este individuo.

En el caso No. 2 sólo se constató positividad serológica a IgG al utilizar el Western blot; el ELISA IgM/IgG VIDAS resultó negativo, pero para esta prueba se ha comprobado una sensibilidad baja en la práctica (resultados no publicados). Sin embargo, otro estudio comparativo entre diferentes sistemas ELISA reportó valores de sensibilidad y especificidad de 100% y 92%, respectivamente, para el ELISA VIDAS al emplear el Western blot como prueba de referencia (Jespersen *et al.*, 2002).

De manera general los métodos serológicos empleados para la pesquisa muestran una amplia variabilidad en los valores de sensibilidad y especificidad, lo que puede estar relacionado con la falta de estandarización en la preparación y validación de los antígenos que emplean (Goosens *et al.*, 1999). Es por eso que el CDC de Atlanta plantea que, ante una fuerte sospecha clínica o epidemiológica de la enfermedad de Lyme es recomendable aplicar las pruebas confirmatorias (CDC, 1995), a pesar de que se ha comprobado que la respuesta inmunológica en pacientes con manifestaciones tempranas de neuroborreliosis está restringida a unas pocas proteínas (Wilske, 2005), y que esto conduciría a interpretaciones erróneas de los resultados.

El caso No. 2 manifestó inicialmente lesiones en piel, que no reunían todas las características de los eritemas migratorios (Steere, 2006), pero es conocido que estos pueden presentarse de forma atípica o estar ausentes en un 20-30% de los casos (Steere *et al.*, 2004). Posteriormente presentó síntomas generales y manifestaciones a nivel del sistema nervioso (ver anexo 3) más relacionados con los que se describen en la literatura, como consecuencia de la no aplicación de un tratamiento con antibióticos durante la etapa dermatológica, pues no se sospechó de esta infección.

Durante el segundo estadio de la enfermedad (diseminación precoz) se puede presentar la neuroborreliosis temprana, que se manifiesta clínicamente por una meningitis aséptica, una radiculitis o una parálisis de los nervios craneales, generalmente en verano u otoño (Evison *et al.*, 2006b). En este caso se documentó una radiculitis, que según se describe puede estar seguida de síndromes neurológicos deficitarios, como el déficit motor asimétrico y sensitivo (Evison *et al.*, 2006b).

Para los otros tres casos que resultaron positivos a las pruebas serológicas no se obtuvo información clínica y epidemiológica (Caso No. 8) o estaba incompleta (Casos No. 13 y 16),

aunque se conoció que la sospecha clínica partió de trastornos neurológicos. Esta última fue una característica común para la mayoría de los casos estudiados, de los que se recibió información clínica, lo que no indica que esta sea la principal forma de presentación de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba.

La ausencia de respuesta inmune humoral en el resto de los pacientes no excluye totalmente el diagnóstico de enfermedad de Lyme. Cuando se utilizan como antígenos, cepas de borrelias no provenientes de la misma región geográfica en la que habita el paciente pueden observarse resultados falsos negativos (Evison *et al.*, 2006a); incluso, en casos de neuroborreliosis con síntomas típicos como parálisis facial, radiculitis, meningitis, encefalitis o mielitis, con hallazgos inflamatorios en el LCR, cuando se ensayan las muestras con una sola cepa de *B. burgdorferi* sensu lato. Ante casos así, se recomienda repetir la prueba con otras cepas que circulan en la región (Kaiser, 2000).

Otra teoría que explica la ocurrencia de resultados falsos negativos sugiere que cuando existen abundantes antígenos, éstos se unen a todos los anticuerpos disponibles y que la formación de complejos inmunes, impide la detección de anticuerpos libres en los sueros de los pacientes (Fritz y Vugia, 2001).

Así mismo se conoce que las pruebas serológicas no son sensibles durante las primeras dos semanas de la infección. La mayoría de los pacientes presentan una respuesta IgM e IgG detectable en la fase de convalecencia, al final del tratamiento con antibióticos. Por ello, se requiere de muestras tanto de la etapa aguda como convaleciente ya que la seroconversión constituye un soporte del diagnóstico (Steele *et al.*, 2004).

En el diagnóstico de dos de los cinco casos interpretados como positivos, según los resultados del Western blot, se utilizó el ELISA-C6 (IgM/IgG) como prueba de pesquisa en las muestras de suero y LCR; y éstas resultaron negativas. Sobre la sensibilidad y utilidad de este método existen disímiles criterios; mientras algunos autores lo recomiendan para la pesquisa (Mogilyansky *et al.*, 2004; Smismans *et al.*, 2006; Tjernberg *et al.*, 2007; Vermeersch *et al.*, 2009), otros lo consideran un método de sensibilidad baja para la detección de anticuerpos en LCR, al compararlo con otros sistemas que emplean antígenos recombinantes, de manera que no debe usarse para la detección de anticuerpos intratecales en pacientes con sospechas de neuroborreliosis (Vermeersch *et al.*, 2009), sobre todo si los síntomas son de corta duración (Tjernberg *et al.*, 2008).

Entre las principales genomaespecies del complejo *B. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* y *B. afzelii*) se han constatado variaciones de hasta cinco aminoácidos de los 26 que conforman el péptido, variabilidad que no ha sido explorada entre diferentes aislamientos de una misma genomaespecie, pero a las que de forma general se atribuye la sensibilidad baja del método y limita su empleo (Wormser *et al.*, 2008).

También se ha comprobado que en pacientes que presentaban infección temprana (localizada o diseminada) entre los 6 y 12 meses después de iniciado el tratamiento, disminuyen los niveles de anticuerpos contra C6 hasta hacerse no detectables (Philipp *et al.*, 2005). Esta respuesta, consecuencia de la modificación que introduce el tratamiento con antibióticos, realza la necesidad de que el modelo de solicitud de análisis, dirigido al laboratorio de microbiología, contenga toda la información clínica relevante (CECMED, 2009a).

Es interesante señalar que en ninguno de los casos estudiados con sospechas de neuroborreliosis, a partir de muestras de sueros y LCR paralelamente (8/30), se detectó síntesis intratecal de anticuerpos, independientemente de que en dos de ellos se constató la presencia de anticuerpos específicos IgM o IgG en el suero. Ello pudo deberse a que las inmunoglobulinas se encontraban en forma de inmunocomplejos o estaban asociadas a los detritos celulares catabolizados en el LCR lo que conlleva a un consumo de los efectores asociados al inmunógeno (Dorta *et al.*, 2005), o a una insuficiente respuesta inmune local contra antígenos de la forma espiroquetal dado por la conversión de las borrelias a formas císticas (Mursic *et al.*, 1996). Otra posible interpretación de estos resultados es que las manifestaciones neurológicas pudieron deberse a la coinfección con otro agente neurotrópico presumiblemente “transmitido por vectores”.

Los resultados de esta segunda serie de casos corroboran los hallazgos serológicos reportados en la anterior (serie de casos 1), y reafirman las evidencias serológicas de la presencia de esta infección por borrelias en Cuba.

### **4.3 Prevalencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* sensu stricto en individuos de una población expuesta a mordeduras por garrapatas**

En la Tabla 4-2 se muestran los resultados de la prevalencia de anticuerpos en las muestras de sueros de los individuos estudiados usando los diferentes criterios de interpretación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4-2. Valores de prevalencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi* sensu stricto en una población de riesgo.

Criterio de interpretación de:	Prevalencia (%)	IC 95% (%)
Laboratorio de Microbiología de La-Chaux-de-Fonds, Suiza	2,02	0,6 – 4,7
CDC	2,02	0,6 – 4,7
CDC con inclusión de las proteínas OspA y OspB	4,45	1,7 – 7,2

IC: Intervalo de confianza

Como se puede observar, existe solapamiento entre los intervalos de confianza encontrados para los valores de seroprevalencia según todos los criterios de interpretación empleados, por lo que se estima una seroprevalencia de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu stricto de 0,6%-7,2%, como resultado de la unión de los tres intervalos.

La presencia de anticuerpos específicos en el suero no siempre significa que la enfermedad está presente, éstos pudieran obedecer a la ocurrencia en el pasado de infecciones subclínicas o clínicas que generaron anticuerpos que persistieron en el tiempo (Wilske *et al.*, 2007). Es por ello que estos resultados sugieren que dichos individuos han estado en contacto con el agente infeccioso.

La seroprevalencia estimada para esta población es baja, aunque coincide con cifras reportadas en estudios similares realizados en otros países latinoamericanos; por ejemplo: en México, el primer estudio de seroprevalencia de anticuerpos IgG contra la cepa B31 por Western blot mostró una positividad de 0,3% (Gordillo *et al.*, 1999). Sin embargo, en un estudio posterior en dos regiones del país se reportaron valores de 3,43% y 6,2% (Gordillo-Pérez *et al.*, 2003).

Otros países no endémicos han informado valores superiores de seroprevalencia en grupos de riesgo como trabajadores de silvicultura y agricultores, demostrando así evidencias serológicas de la infección por *B. burgdorferi* (Hristea *et al.*, 2001; Tay *et al.*, 2002; Kaya *et al.*, 2008).

En los países en los que la borreliosis de Lyme es frecuente, los valores de seroprevalencia dependen de la región estudiada y de las características ocupacionales de la población. Así por ejemplo, los niveles de anticuerpos contra *B. burgdorferi* son superiores entre trabajadores agrícolas y silvicultores (7,03%) con respecto a los donantes de sangre (3,56%); pero son mucho más altos entre guardabosques (23,2%) (Cinco *et al.*, 2004; Tomao *et al.*, 2005). También entre la

población de áreas montañosas de España y Eslovaquia se registran valores altos de anticuerpos contra *B. burgdorferi* (31,3% y 12,8%, respectivamente) (Oteo *et al.*, 1992; Bazovska *et al.*, 2005).

Uno de los principales factores que influye en la sensibilidad del Western blot es la cepa de *Borrelia* utilizada como antígeno. Se ha demostrado que los resultados son mejores cuando se utilizan como antígenos aislamientos locales en comparación con los obtenidos de las cepas de referencia (Mavin *et al.*, 2007). En esta investigación se utilizó la cepa norteamericana B31, cepa tipo de *B. burgdorferi* *sensu stricto*, porque Cuba se encuentra geográficamente ubicada en los corredores de aves migratorias y muy cerca de los EUA. Hasta la fecha no se ha reportado otra genomaespecie causante de enfermedad de Lyme en el continente americano. Recientemente se ha evidenciado también la presencia de material genético de *B. burgdorferi* *sensu stricto* en garrapatas en México (Gordillo-Pérez *et al.*, 2009).

El polimorfismo de los antígenos de las borrelias inter e intraespecies es un factor que afecta el desarrollo de los Western blot, pues se han reportado diferencias en los patrones de serorreactividad de la cepa B31 en casos americanos y europeos de borreliosis de Lyme (Cinco *et al.*, 1996).

Diferentes autores han enfatizado sobre la importancia de interpretar los resultados de los Western blot, según las características de la enfermedad, en un área específica de riesgo. Los laboratorios en países con baja prevalencia de la borreliosis de Lyme prefieren utilizar criterios que permitan una alta especificidad a expensas de la sensibilidad. La enfermedad de Lyme no es la misma en todas las áreas geográficas debido a la prevalencia diferente de especies y cepas de *B. burgdorferi* *sensu lato* y a la heterogeneidad de éstas, por tanto, las recomendaciones para interpretar los resultados de los Western blot no siempre son aplicables a poblaciones en áreas geográficas diferentes de las que le dio origen (Robertson *et al.*, 2000). Es por ello que en esta investigación se consideraron también los criterios del CDC.

El método de Western blot es ampliamente utilizado en los laboratorios de diagnóstico y recomendado como método confirmatorio en el serodiagnóstico de enfermedad de Lyme. Sin embargo, existe una gran variedad de procedimientos descritos que utilizan antígenos preparados de diferentes genomaespecies de *B. burgdorferi* *sensu lato*, así como diversos protocolos de PAGE y del propio Western blot, y aunque han sido publicadas recomendaciones para la

interpretación de los patrones de bandas, no existe aún un consenso (Robertson *et al.*, 2000, Mavin *et al.*, 2011).

Cada uno de los criterios de interpretación reportados requiere de la revelación de un número diferente de bandas de proteínas para concluir un resultado como positivo. Se ha demostrado que la respuesta inmune de pacientes con enfermedad de Lyme en Europa es más restringida que en EUA, por ello los criterios del CDC no son aplicables en Europa (Hauser *et al.*, 1999; Wilske *et al.*, 2007).

En las tiras de los Western blot de las muestras de sueros se detectaron 19 bandas antigénicas, desde 14 hasta 90/93 kDa (Figura 4-8). El número promedio de bandas observadas fue  $5,3 \pm 1,9$ .

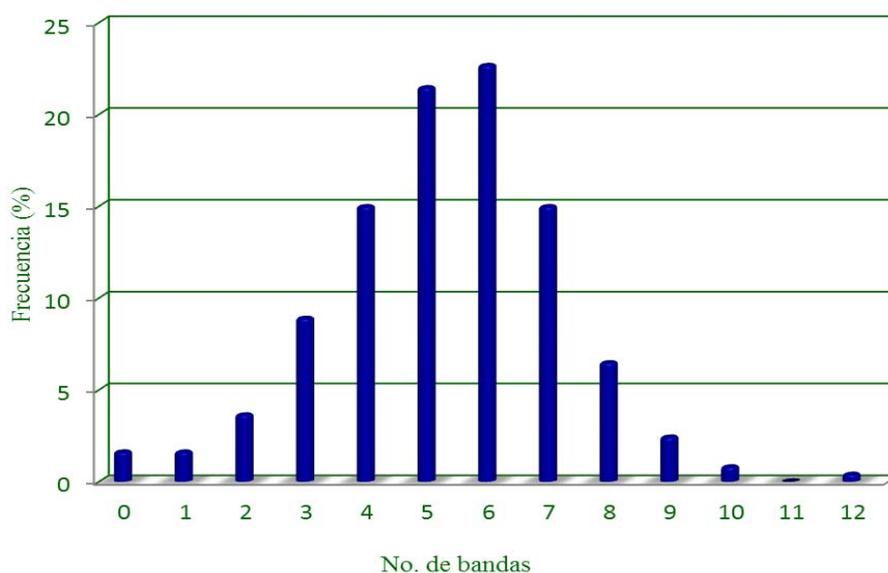


Figura 4-8. Frecuencia del número de bandas de proteínas reconocidas por Western blot en los sueros estudiados de los individuos de la población de riesgo.

El número de bandas reactivas detectadas en las muestras fue bajo respecto a las reveladas en el control positivo (hasta 21 bandas). No obstante, el promedio fue más alto que las reveladas en el control negativo (máximo de dos a tres bandas débiles), lo que significa que otras reacciones con diferentes grados de intensidad se desarrollaron. Aunque se describen anticuerpos con reactividad cruzada con otras especies bacterianas relacionadas (*Leptospira*, *Treponema*, *Borrelia* de fiebre recurrente) y no relacionadas (*Salmonella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*) (Bruckbauer *et al.*, 1992), en

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

este estudio no se observaron reacciones cruzadas con anticuerpos contra *Leptospira* y *Treponema*, y no existen reportes de otras borrelias en el país.

En otros Western blot para la detección de IgG se han reportado números promedio de bandas reactivas que van desde  $6,7 \pm 4,1$  hasta  $8,7 \pm 4,1$  en sueros de pacientes con enfermedad de Lyme temprana,  $4,1 \pm 2,6$  en donantes de sangre y  $3,7 \pm 2,3$  en pacientes con otras enfermedades (Engstrom *et al.*, 1995). Estos últimos dos valores son inferiores al número de bandas reactivas encontradas en los sueros de la población de riesgo incluida en el presente estudio.

La Figura 4-9 resume las frecuencias de reconocimiento de cada banda de proteína y sus intensidades en las muestras de sueros. Sólo las bandas de 72, 60, 47 y 41 kDa fueron reveladas en más del 50% de las muestras, aunque sus intensidades fueron interpretadas principalmente como débiles.

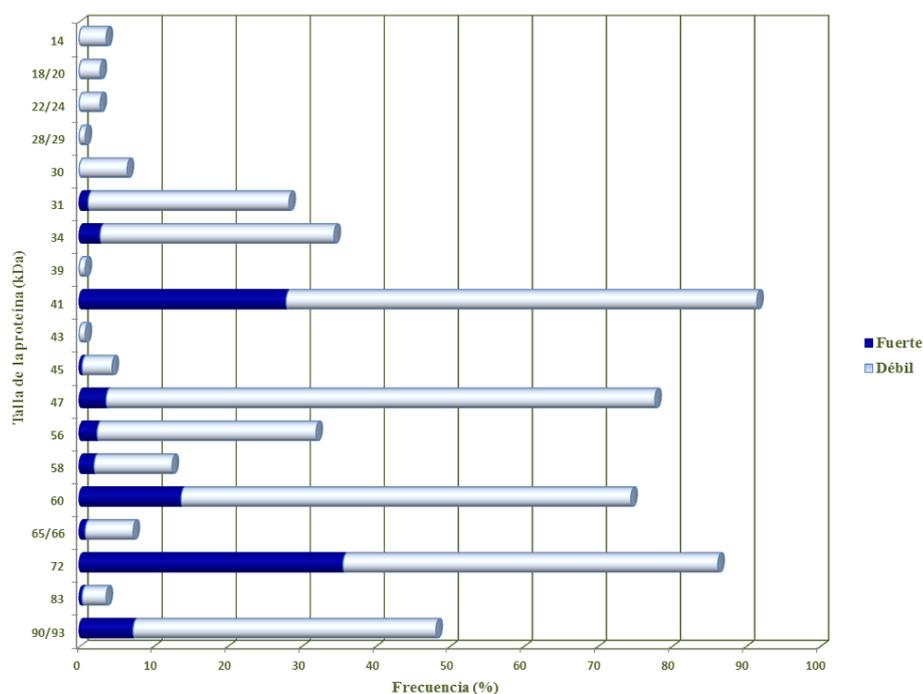


Figura 4-9. Frecuencias de reconocimiento e intensidad de las bandas de proteínas reveladas por Western blot.

En la Figura 4-10 se representa la respuesta de anticuerpos en las muestras identificadas como positivas. Se puede observar que 10 proteínas fueron significativamente reveladas, ellas fueron, en

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

orden decreciente de aparición: las proteínas de 41, 72, 90/93, 34, 47, 60, 58, 56, 65/66 y 31 kDa (las tres primeras se detectaron en todas las muestras).

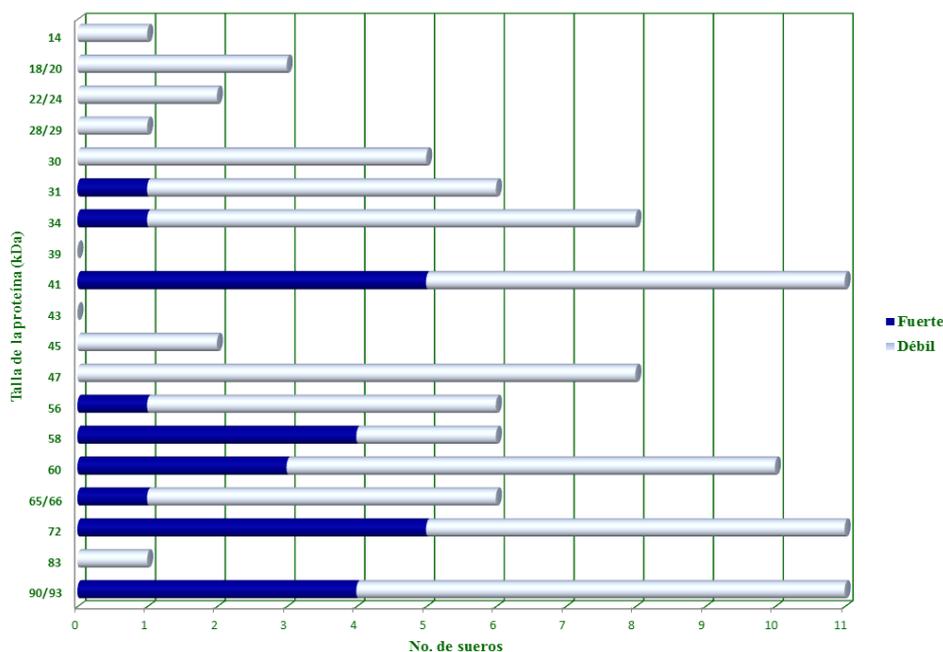


Figura 4-10. Reconocimiento e intensidad de las bandas de proteínas reveladas por los sueros de la población en riesgo y estimados como positivos por Western blot (n=11).

Los sueros positivos mostraron reacciones con ocho o más bandas de proteínas y los resultados con intensidades fuertes fueron más frecuentes, aunque la reactividad de bandas específicas para *B. burgdorferi* sensu stricto fue superior en las zonas de 90/93 kDa y 58-56 kDa.

En estos sueros se detectaron anticuerpos tanto a proteínas altamente específicas como no específicas de *B. burgdorferi* sensu lato; pero el análisis no se puede realizar de forma individual porque la detección de algunas proteínas no específicas tiene valor cuando son detectadas junto a proteínas específicas. Por ejemplo, la proteína de choque térmico de 72 kDa y la proteína flagelar de 41 kDa, principales proteínas reveladas, son no específicas para *Borrelia* por la reactividad cruzada que se les reconoce con anticuerpos producidos contra otras bacterias; sin embargo, ellas fueron observadas junto a la proteína de superficie de 90/93 kDa, una proteína altamente específica, presente en todos los sueros identificados como positivos.

Un patrón amplio de bandas entre las zonas de 60 y 90/93 kDa es soporte para el diagnóstico de enfermedad de Lyme crónica, precisamente éstas estuvieron entre las proteínas más significativas

reveladas en los sueros. La proteína de choque térmico p60 es reconocida por anticuerpos de reactividad cruzada y según un estudio de EUCALB, su inclusión en la combinación para interpretar los resultados de un Western blot conllevó a reactividades ligeramente superiores (Hauser *et al.*, 1999).

Otras proteínas altamente específicas reveladas en las tiras fueron las de 34 (OspB), 31 (OspA), 30 y 22/24 (OspC) kDa, pero el número de sueros que reaccionaron con éstas fue bajo. La respuesta inmune a OspA es rara y la reactividad a ella se detecta al comienzo de los episodios de artritis prolongada. Por su parte, OspC es el mejor marcador de la enfermedad de Lyme temprana y presumiblemente se requiere para la colonización del hospedero o resistencia a la inmunidad innata; es especialmente detectada en los Western blot para IgM. La expresión de OspC es reducida por *B. burgdorferi* en respuesta al desarrollo de anticuerpos, esta represión es importante para evitar la persistencia de la infección (Tilly *et al.*, 2008; Vojdani *et al.*, 2009).

Las bandas más importantes para la detección de anticuerpos IgG contra la cepa B31 de *B. burgdorferi* utilizando Western blot en pacientes europeos, son aquellas que representan las proteínas de 93, 39, 34 y 23 kDa (Gutiérrez *et al.*, 2000). Estas bandas se detectaron en los sueros estudiados, excepto la p39.

Por último, resultó interesante que entre los sueros clasificados como positivos se detectaron bandas de las proteínas de 18/20, 28/29 y 47 kDa, que se corresponden con las de 20, 28 y 48 kDa referidas por un estudio realizado en Scotland, Reino Unido, atendiendo a la no uniformidad que se aprecia en los reportes internacionales en la definición de las tallas de las proteínas involucradas en la respuesta contra *B. burgdorferi* sensu lato (Evans *et al.*, 2010). Estas proteínas no son interpretadas como específicas según los criterios de EUA y Europa, debido a la reactividad cruzada con otras especies bacterianas; sin embargo, en el estudio antes citado se recomienda que sean consideradas como tal pues se constataron con mayor frecuencia entre sueros positivos por Western blot.

#### **4.4 Detección molecular de *B. burgdorferi* sensu lato en garrapatas de importancia médica y veterinaria**

La identificación taxonómica y clasificación según el estado de vida y sexo de las garrapatas colectadas para el estudio observacional 1 permitió identificar tres especies. En los equinos el 60% (57/95) de las garrapatas se identificaron como *Dermacentor (Anocentor) nitens*, el 37,9% (36/95) como *A. cajennense* y el 2,1% (5/95) como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A esta última especie correspondían el 100% (3/3) de las garrapatas capturadas en bovinos. El 89,8% (88/98) de las garrapatas se encontraban en estado de adulto, de las cuales 59,1% (52/88) eran hembras y el 40,9% (36/88) machos. El 10,2% (10/98) restante eran ninfas.

La garrapata *D. nitens* fue la especie encontrada en mayor proporción en este estudio afectando a los equinos. Esto se corresponde con lo reportado en la literatura, pues para esta especie los hospederos principales son los Artiodáctilos y Perisodáctilos, entre los que se encuentran los caballos (Guglielmone *et al.*, 2003).

En el estudio observacional 2 se comprobó que bovinos y caninos estaban siendo afectados por dos especies. Se identificó a *R. microplus* y *R. sanguineus* (100% en ambos casos) como únicas especies infectantes, respectivamente. La garrapata colectada en la vivienda se clasificó como *R. sanguineus*. En este estudio no se encontraron garrapatas de la especie *A. cajennense*.

Estos hallazgos concuerdan con el conocimiento acerca de que *R. microplus* afecta fundamentalmente a los Artiodáctilos y *R. sanguineus* a los Carnívoros (Guglielmone *et al.*, 2003). De igual forma, la garrapata capturada en la vivienda pertenece a una de las especies que más afecta a los Carnívoros. Esta completa su ciclo de vida en un solo hospedero pero en ocasiones al cambiar de estadio cae del animal y en la búsqueda de un hospedero cambia incidentalmente de hábitat, de ahí que constituya un vector potencial de enfermedades zoonóticas (Estrada-Peña *et al.*, 2004).

De las garrapatas clasificadas como *R. microplus*, el 36,9% (21/57) resultaron ser adultos hembras, el 29,8% (17/57) adultos machos, el 26,3% (15/57) ninfas y el 7,0% (4/57) larvas. Entre las clasificadas como *R. sanguineus*, el 60,2% (59/98) eran adultos machos, el 23,5% (23/98) adultos hembras y el 16,3% (16/98) ninfas.

Las especies de garrapatas identificadas son consideradas de importancia médica y veterinaria, aunque *A. cajennense* por su gran antropofilia afecta más frecuentemente a los humanos (Guglielmone *et al.*, 2003).

La extracción de ADN utilizando la metodología del hidróxido de amonio y calor, no fue útil para 14 de las garrapatas analizadas en el primer estudio debido a que se encontraban en estado de ingurgitación. En estos casos, al realizar la PCR-RLB se observó que las líneas sobre la membrana donde se habían aplicado las muestras se revelaban completamente a causa de la presencia de restos de sangre, lo que no permitía observar las manchas de hibridación en caso de existir. La sangre pudo inhibir la actividad de la enzima *Taq* polimerasa en la reacción de amplificación por PCR y condicionar resultados falsos negativos (Sparagano *et al.*, 1999).

En la evaluación de la eficacia de los métodos de extracción de ADN en el segundo estudio no se evidenció la amplificación por PCR del fragmento génico deseado para dos extractos, en los que se utilizó también el método de hidróxido de amonio y calor, lo que pudo deberse a una extracción insuficiente. Sin embargo, teniendo en consideración que se trataba de grupos de dos o más garrapatas, suficiente para generar y amplificar ADN en cantidades apreciables, es más lógico pensar que durante la extracción se obtuvo material inhibitorio (sangre del hospedero) de la PCR, similar a lo ocurrido en el estudio precedente. Aunque las garrapatas utilizadas aparentemente eran no ingurgitadas, siempre presentan en su contenido intestinal sangre del animal al que estaban infestando, la que actúa como un potente inhibidor de la PCR.

El material genético de *B. burgdorferi* sensu lato no fue detectado en ninguno de los extractos examinados por los métodos moleculares empleados.

La aplicación de las tecnologías moleculares, específicamente la RLB, demuestra tener múltiples ventajas. No se requiere de la secuenciación de ADN del producto de la PCR, se pueden identificar pequeñas cantidades de material genético y permite distinguir la coinfección de una muestra por diferentes grupos genómicos (Rijpkema *et al.*, 1995; Tait y Oura, 2004).

Los equinos, bovinos y caninos pueden ser infectados por *B. burgdorferi* sensu lato y enfermar (Doby *et al.*, 1988; Andre-Fontaine *et al.*, 1995; Magnarelli *et al.*, 1997; Littman *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2008). Considerando la estrecha relación que se establece entre el hombre y estos grupos de animales, dado que generalmente los equinos y bovinos son pastoreados en lugares frecuentados por el hombre (ocasionalmente muy cerca de sus casas) y el contacto directo que se

produce entre hombre-caballo (transporte y recreación) y hombre-perro (principal mascota), es comprensible la importancia que adquiere la detección de la transmisión vectorial de zoonosis al hombre.

Las especies de garrapatas identificadas en estos estudios no se corresponden con los vectores reconocidos para enfermedad de Lyme. Sin embargo, otra especie de *Amblyomma*, *A. americanum*, a pesar de que estaba documentada su incompetencia como vector de *B. burgdorferi* (Ryder *et al.*, 1992) fue incluida en la lista de vectores a partir de la identificación en ella de *B. lonestari*, una espiroqueta reconocida actualmente como el agente etiológico de un síndrome similar a la enfermedad de Lyme en EUA y que recientemente se logró su cultivo *in vitro* (Barbour *et al.*, 1996; Varela *et al.*, 2004).

Por otra parte *A. cajennense* y *A. aureolatum*, en Brasil, han sido colectadas de animales salvajes en áreas donde se reporta un síndrome similar o síndrome imitador de enfermedad de Lyme, que causa manifestaciones clínicas de las descritas para la borreliosis de Lyme, incluyendo la lesión típica de la piel. Este síndrome es causado por una espiroqueta que no pertenece al complejo *B. burgdorferi* sensu lato (Mantovani *et al.*, 2007). Existen además reportes de eritemas migratorios y complicaciones sistémicas causadas por mordeduras accidentales de *A. cajennense*, así como casos del síndrome anteriormente mencionado asociados a esta especie de garrapata en una región geográfica donde no se han encontrado artrópodos del género *Ixodes* (Costa *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2007).

Más recientemente, durante el 2009, se reporta por primera vez la presencia de *B. burgdorferi* sensu stricto en garrapatas *A. cajennense* capturadas de animales domésticos (caninos y bovinos) y de la vegetación en México (Gordillo-Pérez *et al.*, 2009), lo que la reafirma como vector potencial de enfermedad de Lyme. Anteriormente se habían reportado casos clínicos de la enfermedad con confirmación de laboratorio, así como la presencia de anticuerpos específicos en humanos en varios estudios seroepidemiológicos realizados también en México (Gordillo-Pérez *et al.*, 2003; Gordillo-Pérez *et al.*, 2007).

Es válido señalar que a partir de otras especies de garrapatas como *D. andersoni* también se ha detectado ADN de *B. burgdorferi* sensu stricto (Gordillo-Pérez *et al.*, 2009).

Estudios similares, en los que se realizó la búsqueda por métodos moleculares o cultivo de *B. burgdorferi* en garrapatas, en países donde existen evidencias clínicas altamente sugestivas de

enfermedad de Lyme, se reportan en la literatura científica. Por ejemplo, en Chile, en una investigación a partir de ixódidos capturados sobre animales salvajes como roedores y cérvidos, se identificaron diferentes especies de *Ixodes* sp., todas negativas a la presencia de las espiroquetas en cuestión, según una PCR simple y anidada que amplifican fragmentos del gen *ospA* (Osorio, 2001). En Perú, al estudiar 120 garrapatas, se encontró que las que provenían de vizcacha (animal autóctono) eran *Haemaphysalis leponrispalustrise* e *Ixodes* sp., las de equinos *D. nitens* y las de caninos *R. sanguineus*, pero de ninguna se aislaron borrelias a partir del cultivo de los intestinos medios en BSK-II (Macedo *et al.*, 1994).

En cambio, en países donde el agente etiológico, sus vectores y reservorios son bien conocidos y donde la enfermedad es habitual, la detección de espiroquetas del complejo *B. burgdorferi* sensu lato en garrapatas es frecuente. Por ejemplo, en garrapatas *I. ricinus* colectadas de la vegetación en diferentes áreas de Suiza, se han encontrado valores de prevalencia de borrelias en las mismas de 22,4%, 47% y hasta 96% (Jouda *et al.*, 2003; Burri *et al.*, 2007; Morán-Cadenas *et al.*, 2007c), mientras que en garrapatas colectadas de aves migratorias, valores de 6% y 18,2% (Poupon *et al.*, 2006). En un estudio realizado en Rusia se reportó 38% y 67,3% de garrapatas *I. ricinus* e *I. persulcatus* de la vegetación infectadas, respectivamente (Alekseev *et al.*, 2001), alrededor de 40% de *I. ricinus* en Bulgaria (Christova *et al.*, 2003) y 10,2% en Polonia (Stanczak *et al.*, 1999). La búsqueda e identificación de las borrelias en todas las investigaciones citadas anteriormente se realizó utilizando metodologías moleculares como: PCR, PCR-RLB y PCR-RFLP.

Por su parte, en una región de EUA a partir del estudio de garrapatas *I. scapularis* colectadas de mascotas, animales salvajes y humanos durante los años 1995, 1996 y 1997 se reportaron valores de 29,5%, 35% y 23,7% de éstas infectadas con *B. burgdorferi* sensu stricto, respectivamente (Holman *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que el número de garrapatas analizadas en este estudio es limitado y no representativo del país, se hace necesario coleccionar un mayor número de éstas a partir de animales domésticos, salvajes, aves migratorias y vegetación del área de “Las Terrazas” y extender la investigación a otras regiones del país. Así mismo, se impone la búsqueda de borrelias, ya sea por cultivo o métodos moleculares, en garrapatas *A. cajennense*, por ser la única especie reportada en Cuba que necesita de tres hospederos para completar su ciclo de vida y por su alto grado de antropofilia.

Se debe mostrar también un especial interés por estudiar garrapatas de la especie *I. capromydis*, única especie del género *Ixodes* que existe en Cuba y que es autóctona, ya que parasita fundamentalmente roedores de la especie *Capromys pilorides*, conocidos popularmente como Jutía Conga (Guglielmone *et al.*, 2003).

Es importante considerar además la posibilidad de que existan otros vectores de estos microorganismos en el país como mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (Zakovska *et al.*, 2002; Kosik-Bogacka *et al.*, 2004), aunque en éstos el tiempo de sobrevivencia de las borrelias está limitado a dos semanas (Magnarelli *et al.*, 1987), y las moscas del caballo y del venado (Magnarelli y Anderson, 1988).

## **V. CONSIDERACIONES GENERALES**

## V. CONSIDERACIONES GENERALES

El presente trabajo recoge los resultados de las primeras investigaciones microbiológicas realizadas en Cuba, con el objetivo de proporcionar evidencias científicas que permitan sustentar la hipótesis sobre la presencia de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en el país.

La borreliosis de Lyme no es una enfermedad mortal pero en la medida en que la infección avanza se producen trastornos dermatológicos, neurológicos, cardíacos y musculoesqueléticos, difíciles de tratar, muchos de los cuales adquieren carácter crónico o dejan secuelas, por lo que se requiere de su diagnóstico y tratamiento temprano (Vanousová y Hercogová, 2008).

Para su estudio y control es importante un enfoque multidisciplinario y multisectorial que involucre investigaciones y acciones epidemiológicas, epizootiológicas, clínicas, entomológicas, microbiológicas y ecosistémicas, entre otras.

Iniciar los estudios microbiológicos que se recogen en este documento demandó de la capacitación de recursos humanos en el diagnóstico de laboratorio de esta entidad, en instituciones con experiencias al respecto. Por otra parte, fue necesario la replicación de esta experiencia y la evaluación e implementación en el LNE-IPK de las principales herramientas diagnósticas (convencionales y moleculares), para asumir la referencia nacional de este agente infeccioso.

Para la confirmación absoluta de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba es necesario demostrar la presencia del agente etiológico en muestras clínicas. Por consiguiente se impone la divulgación de los resultados de esta investigación a través de las autoridades nacionales de salud pública y veterinaria, impartir capacitaciones para la actualización del personal médico en relación a las diferentes manifestaciones clínicas de esta borreliosis, muestras clínicas a tomar según etapa de la enfermedad, diagnóstico microbiológico a indicar, así como el tratamiento correcto a aplicar, e insistir en el seguimiento clínico-serológico a los casos con sospechas de la infección, independientemente del resultado inicial de laboratorio.

La prevalencia baja y el grado variable de reactividad de las proteínas de *B. burgdorferi* sensu lato con los anticuerpos presentes en las muestras de sueros supone una tasa baja de infección de las garrapatas por este agente. Esta pudiera ser también la causa de la no detección de dicha espiroqueta en las garrapatas, fundamentalmente en las de la especie *A. cajennense*, las que parecen representar el vector potencial de la enfermedad en Cuba; aunque es también correcto especular acerca de la existencia de otra genomaespecie de *Borrelia* diferente a las ya descritas.

Para la demostración del agente etiológico, su vector y hospedero, y para conocer sobre su ciclo de vida en las condiciones tropicales de Cuba, se necesitan nuevas investigaciones encaminadas a examinar otras muestras clínicas, garrapatas y vectores potenciales, perfeccionar y estandarizar los métodos moleculares para la detección e identificación de estas espiroquetas, así como evaluar la capacidad del vector para transmitir la bacteria a un nuevo hospedero.

Mientras, se puede plantear que la aplicación de los diferentes métodos de diagnóstico microbiológico permitió, por primera vez en Cuba, detectar anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu lato en muestras de individuos de diferentes provincias (Artemisa, La Habana, Sancti Spiritus y Holguín), lo que sugiere la circulación de la bacteria en la región occidental, central y oriental del país. Este hallazgo correlacionó con las manifestaciones clínicas informadas en las solicitudes de análisis o resúmenes de las Historias Clínicas recibidas, donde predominaron las lesiones en piel seguidas de manifestaciones sistémicas, principalmente neurológicas. En ningún caso se refirió que el paciente en algún momento de su vida viaja fuera de Cuba, lo que supone que la infección ocurrió dentro del país.

Aunque el espectro clínico básico de la enfermedad es similar a nivel mundial, se han documentado diferencias en las manifestaciones clínicas de la enfermedad en Europa (incluso entre sus regiones) y en Norteamérica, las que se atribuyen a diferencias entre las especies que la causan en los dos continentes y a diferencias de las tasas de ocurrencia de la infección (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

En el Sur de los EUA y en Brasil se han descrito síndromes similares a los producidos por enfermedad de Lyme, los que difieren de los encontrados en Cuba, tanto en el perfil clínico

como en los resultados de laboratorio. Por ejemplo, en el síndrome reportado en EUA, causado por *B. lonestari* y transmitido por *A. americanum*, aparecen lesiones en piel que asemejan al eritema migratorio pero no se producen manifestaciones sistémicas, como se describen en los casos cubanos diagnosticados. Así mismo, hay también diferencias en los resultados alcanzados (negativos) con las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *B. burgdorferi* (Barbour *et al.*, 1996). En relación a Brasil, las diferencias radican fundamentalmente en que la enfermedad que se presenta tiene una frecuencia alta de recurrencia, especialmente en pacientes que recibieron terapia durante la fase inicial y las respuestas serológicas medidas en estos pacientes por métodos de ELISA y Western blot, empleando como antígeno una cepa de *B. burgdorferi* sensu stricto de origen norteamericano, muestran reactividad baja e incluso son negativas cuando se interpretan con los criterios del CDC (Mantovani *et al.*, 2007).

También es una evidencia altamente sugestiva de la infección por este agente en Cuba, la demostración de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu stricto, en individuos que habitan en una región del país donde históricamente se reporta infestación por garrapatas duras o ixódidos, fundamentalmente *A. cajennense* [de acuerdo con la descripción de los pobladores y avalado por los informes estadísticos anuales del Centro Nacional de Parasitología (CNP) del Instituto de Medicina Veterinaria del Ministerio de la Agricultura (CNP, 2009; CNP, 2010)]. Se sugiere entonces, ampliar la investigación a poblaciones de otras regiones donde se reporte también una frecuencia alta de infestación por garrapatas, a grupos de riesgo según su actividad ocupacional (ganaderos, veterinarios, militares, etc.) así como a poblaciones no expuestas.

## **CONCLUSIONES**

### CONCLUSIONES

- Las herramientas evaluadas para la detección de *B. burgdorferi* sensu lato fortalecen y condicionan al LNE-IPK para la realización de futuras investigaciones que demuestren, con un enfoque integral, la infección por este microorganismo en Cuba.
- El conjunto de evidencias provenientes del estudio de las muestras de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas de enfermedad de Lyme sugiere infección autóctona por *B. burgdorferi* sensu lato en Cuba.
- La presencia de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu stricto en individuos expuestos a mordeduras de ixódidos, se suma al conjunto de evidencias que apuntan hacia la posible circulación del agente infeccioso en Cuba.
- La no detección de material genético de *B. burgdorferi* sensu lato en las especies de ixódidos controladas no las señala, ni excluye, como posibles vectores de este agente.

## **RECOMENDACIONES**

### RECOMENDACIONES

- Divulgar a nivel nacional, tanto en salud pública como veterinaria, los resultados encontrados en esta investigación.
- Diseñar nuevas investigaciones orientadas a la búsqueda del agente etiológico en vectores potenciales.
- Extender los estudios de prevalencia de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sensu lato a otras poblaciones cubanas con y sin riesgo de adquirir la infección.
- Incorporar de forma sostenida el diagnóstico microbiológico de enfermedad de Lyme como servicio técnico-especializado en el LNE-IPK, asegurando la calidad del mismo mediante el cumplimiento de los requisitos de la Regulación No. 3/2009 del CECMED.

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev 2005; 18(3): 484-509.

Alekseev AN, Dubinina HV, Van de Pol I, Schouls LM. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic region of Russia. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2237-42.

Amer R, Brannan S, Forrester JV. Inflammatory choroidal neovascular membrane in presumed ocular Lyme borreliosis. Acta Ophthalmol 2009; 87(3): 346-48.

Andre-Fontaine G, Ruvoen-Clouet N, Gañere JP. La borréiose de Lyme. Point Vét 1995; 27(170): 319-23.

Arocha-Sandoval F, Amesty-Valbuena A, Urbina M, Durango AI, Vargas-Montiel H. Detección de anticuerpos a *Borrelia burgdorferi* en una muestra de la población del estado de Zulia. Invest Clin 1994; 35(2): 91-104.

Baradaran-Dilmaghani R, Stanek G. In vitro susceptibility of thirty *Borrelia* species from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. Infection 1996; 24(1): 60-3.

Baranton G, Edlinger C, Mazzonelli J, Dufresne Y. La borréiose dite de Lyme, maladie “nouvelle” identifiée depuis près de 80 ans. Méd Mal Infect 1986; 12: 747-55.

Barbour AG, Maupin GO, Teltow GJ, Carter CJ, Piesman J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. J Infect Dis 1996; 173(2): 403-09.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 1984; 57(4): 521-25.

Baril C, Richaud C, Baranton G, Saint Girons I. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. Res Microbiol 1989; 140(8): 507-16.

- Barros-Battesti DM, Ardua M, Becharra GH. Garrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: ICTTD-3/Butantan; 2006.
- Bastos AD, Arnot LF, Jacquier MD, Maree S. A host species-informative internal control for molecular assessment of African swine fever virus infection rates in the African sylvatic cycle *Ornithodoros* vector. *Med Vet Entomol* 2009;23(4): 399-409.
- Bazovska S, Machakova E, Spalekova M, Kontrosova S. Reported incidence of Lyme disease in Slovakia and antibodies to *B. burgdorferi* antigens detected in healthy population. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(8-9): 270-73.
- Bergmann AR, Schmidt BL, Derler AM, Aberer E. Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme borreliosis from urine. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4581-84.
- Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA, Rollins LO, Bryant SC, Beito EM. Evaluation of two commercial systems for the automated processing, reading and interpretation of Lyme Western blots. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2216-21.
- Bisset JA, Rodríguez M, De Armas Y. Comparación de 2 poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferente conducta de reposo. *Rev Cubana Med Trop* 2005; 57(2): 143-50.
- Bratton RL, Whiteside JW, Hovan MJ, Engle RL, Edwards FD. Diagnosis and treatment of Lyme disease. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(5):566-71.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Spirochetes and other spiral microorganisms. En: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24 ed. McGraw-Hill (Disponível em: <http://www.accesmedicine.com>); 2007.
- Bruckbauer H, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(3): 224-32.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease: a tickborne spirochetosis? *Science* 1982; 216(4552): 1317-19.
- Burri C, Morán-Cadenas F, Douet V, Moret J, Gern L. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(1): 50-58.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Callister SM, Case KL, Agger WA, Schell RF, Johnson RC, Ellingson JLE. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 1990; 28(2): 363-65.

Casjens S, Palmer N, Van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P *et al*. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 2000; 35(3): 490-516.

CECMED. Regulación No. 3/2009: Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico, 2009a. Disponible en: <http://www.cecmec.sld.cu/Pages/AmbReg-8.htm> (11/octubre/2010).

CECMED. Resolución No. 82/2009, 2009b. Disponible en: <http://www.cecmec.sld.cu/Pages/AmbReg-8.htm> (11/octubre/2010).

Centers for Disease Control and Prevention. Summary of Notifiable Diseases - United States, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010a; 57(54): 1-100.

Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease (*Borrelia burgdorferi*). 2011 Case definition. Disponible en: [http://www.cdc.gov/osels/ph\\_surveillance/mndss/print/lyme\\_disease\\_current.htm](http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/mndss/print/lyme_disease_current.htm) (22/abril/2011).

Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease diagnosis. 2010b. Disponible en: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld\\_humandisease\\_diagnosis.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.htm) (22/abril/2011).

Centers for Disease Control and Prevention. Notice to Readers: Availability of Lyme Disease Vaccine. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999; 48(2): 35-36.

Centers for Disease Control and Prevention. Notice to readers: caution regarding testing for Lyme disease. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005; 54(5): 125.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. MMWR Morbid Mortal Weekly Rep 1995; 44(31): 590-91.

Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Lyme disease – United State, 1992-2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008; 57(10): 1-9.

Centro Nacional de Parasitología. Información Estadística Oficial; 2009.

Centro Nacional de Parasitología. Información Estadística Oficial; 2010.

- Christova I, Van de Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(9): 535-42.
- Chu CY, Jiang BG, Liu W, Zhao QM, Wu XM, Zhang PH *et al.* Presence of pathogenic *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and rodents in Zhejiang, south-east China. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt8): 980-85.
- Ciceroni L, Bartoloni A, Guglielmetti P, Paradisi F, Gamboa-Barahona H, Roselli M *et al.* Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* in human settlements of the Cordillera Province, Bolivia. *J Trop Med Hyg* 1994; 97(1): 13-7.
- Cinco M, Barbone F, Grazia-Ciufolini M, Mascioli M, Anguero-Rosenfeld, Stefanel P *et al.* Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(12): 1056-61.
- Cinco M, Murgia R, Ruscio M, Andriolo B. IgM and IgG significant reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* among Italian patients affected by Lyme arthritis or neuroborreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 14(2-3): 159-66.
- CITMA. Resolución No. 38/2006: Lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas; 2006.
- Coburn J, Magoun L, Bodary SC, Leong JM. Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  mediate attachment of Lyme disease spirochetes to human cells. *Infect Immun* 1998; 66(5): 1946-52.
- Comstedt P, Asokliene L, Eliasson I, Olsen B, Wallensten A, Bunikis J *et al.* Complex Population Structure of Lyme Borreliosis Group Spirochete *Borrelia garinii* in Subarctic Eurasia. *PLoS ONE* 2009; 4(6): 1-9.
- Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Search for *Borrelia* sp. in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: a short report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(5): 631-35.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 3164-68.
- Davidson BE, MacDougall J, Saint Girons I. Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. *J Bacteriol* 1992; 174(11): 3766-74.

- De Armas Y, Rodríguez MM, Bisset JA. Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Colombiana Entomol 2005; 31(2): 203-06.
- De Bruin A, De Groot A, De Heer L, Bok J, Wielinga PR, Hamans M *et al.* Detection of *Coxiella burnetti* in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands. Appl Environ Microbiol 2011; 77(18): 6516-23.
- Derdáková, M, Lencáková D. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. Ann Agric Environ Med 2005; 12(2): 165-72.
- Dickinson F, Battle MC. Borreliosis de Lyme: un acercamiento a una enfermedad infecciosa emergente. Rev Cubana Hig Epidemiol 1997b; 35(2): 94-105.
- Dickinson F, Fuentes O, Fernández A. ¿Borreliosis de Lyme en Cuba? En: Comité Organizador, editores. Abstracts of the V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical; 1997 Mar 3-7; La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". p. 172-73.
- Doby JM, Chevrier S, Couatarmanac'h A. La spirochetose a tiques par *Borrelia burgdorferi* chez les chiens dans l'ouest de la France. Rec Med Vet 1988; 164(5): 367-74.
- Dorta AJ, Noris E, Bu-Coifiú R, Padilla B. Bases moleculares de la Neuroinmunología (II). El reibergrama y su uso en Neuroinmunología. Rev Cubana Pediatr 2005; 77(3-4): 0-0 [Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v77n3-4/ped07305.pdf>].
- Engstrom SM, Shoop E, Johnson R. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol 1995; 33(2): 419-27.
- Estrada-Peña A, Bouattur A, Camicas JL, Walter AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region. A guide for identification of species. Atalanta: The Netherlands; 2004.
- Evans R, Mavin S, McDonagh S, Chatterton JMW, Milner R, Ho-Yen DO. More specific bands in the IgG western blot in sera from Scottish patients with suspected Lyme borreliosis. J Clin Pathol 2010; 63(8): 719-21.
- Evison J, Aebi C, Francioli P, Péter O, Bassetti S, Gervaix A *et al.* Borréliose de Lyme. 1ere partie: Epidémiologie et diagnostic. Rev Med Suisse 2006a; 2(60): 919-24.
- Evison J, Aebi C, Francioli P, Péter O, Bassetti S, Gervaix A *et al.* Borréliose de Lyme. 2e partie: Clinique et traitement. Rev Med Suisse 2006b; 2(60): 925-34.

- Evison J, Aebi C, Francioli P, Péter O, Bassetti S, Gervaix A *et al.* Borréliose de Lyme. 3e partie: Prévention, grossesse, états d'immunodéficience, syndrome post-borréliose de Lyme. Rev Med Suisse 2006c; 2(60): 935-40.
- Fraga J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández-Calienes A. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. Rev Cubana Med Trop 2004; 56(3): 208-13.
- Fraga J, Rodríguez J, Fuentes O, Hernández Y, Castex M, González R *et al.* Genetic variability of *Triatoma flavida* and *Triatoma bruneri* (Hemiptera: Reduviidae) by RAPD-PCR technique. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2011; 53(1): 19-24.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R *et al.* Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997; 390(11): 580-86.
- Fritz CL, Vugia DJ. Clinical issues in Lyme borreliosis: a California perspective. Infec Dis Rev 2001; 3(3): 111-22.
- Fukunaga M, Yanagihara Y, Sohnaka M. The 23S/5S ribosomal RNA genes (*rrl/rrf*) are separate from the 16S ribosomal RNA gene (*rrs*) in *Borrelia burgdorferi*, the aetiological agent of Lyme disease. J Gen Microbiol 1992; 138(5): 871-77.
- Gaillard C, Strauss F. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. Nucleic Acids Res 1990; 18(2):378.
- Gern L. Tiques et borréliose de Lyme en Suisse occidentale. Bull Soc Neuchateloise Scie Nat 2004 ; 127(1): 5-21.
- Goosens HAT, van den Bogaard AE, Nohlmans MKE. Evaluation of fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis. Eur J Infect Dis 1999; 18(8): 551-60.
- Gordillo G, Torres J, Solorzano F, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. Arch Med Res 1999 ; 30(1): 64-8.
- Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F, De Martino S, Lipsker D, Velázquez E *et al.* *Borrelia burgdorferi* infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. Emerg Infect Dis 2007; 13(10): 1556-58.

- Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F, Garduño-Bautista V, Tapia-Conyer R, Muñoz O. Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the northeast of the Mexican Republic. *Salud Publica Mex* 2003; 45(5): 351-55.
- Gordillo-Pérez G, Vargas M, Solórzano-Santos F, Rivera A, Polaco OJ, Alvarado L *et al.* Demonstration of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto infection in ticks from the northeast of Mexico. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(5): 496-98.
- Grandío O, Fernández A, Fernández M, Valera R, Fuentes O, Pelegrino J. Informe preliminar sobre investigaciones realizadas en el poblado "Las Terrazas", Sierra del Rosario, sobre la existencia de la enfermedad de Lyme. *Rev Cubana Pediatr* 1988; 60(5): 773.
- Grubhoffer L, Golovchenko M, Vancová M, Zacharovová-Slavícková K, Rudenko N, Oliver JH. Lyme borreliosis: insights into tick-/host-borrelia relations. *Folia Parasitol* 2005; 52(4): 279-94.
- Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *APMIS* 2001; 109(5): 383-88.
- Guglielmone AA, Estrada- Peña A, Keirans JK, Robbins RG. Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region. The Netherlands: Atalanta. 2003.
- Gutiérrez J, Guerrero M, Nuñez F, Soto MJ, Piédrola G, Maroto MC. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in European populations. *J Clin Lab Anal* 2000; 14(1): 20-6.
- Guy EC, Stanek G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1991; 44(7): 610-11.
- Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, *et al.* Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res* 2004; 35(6):709-13.
- Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation criteria for standardised western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1433-44.
- Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2241-47.
- Hercogova J, Vanousova D. Syphilis and borreliosis during pregnancy. *Dermatol Therapy* 2008; 21(3): 205-09.

- Herrera M, García M. UNESCO Documento de Trabajo No. 10: Sierra del Rosario, Reserva de la Biosfera (Cuba); 1995. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0011/001139/113934so.pdf> (04/agosto/2009).
- Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, Van der Giessen J, Sprong H, Porter SR *et al.* A clear and present danger : tick-borne disease in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(1): 33-50.
- Hicuba. Las Terrazas, turismo de naturaleza en la Sierra del Rosario. Disponible en: <http://www.hicuba.com/articulos/las-terrazas.htm> (03/octubre/2011).
- Hill CA, Gutierrez JA. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Med Vet Entomol* 2003; 17(2): 224-27.
- Hilton E, Devoti J, Sood S. Recommendation to include OspA and OspB in the new immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6): 1353-54.
- Holman MS, Caporale DA, Goldberg J, Lacombe E, Lubelczyk C, Rand PW *et al.* *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis*, Southern Coastal Maine. *Emer Infect Dis* 2004; 10(4): 744-46.
- Hristea A, Hristescu S, Ciufecu C, Vasile A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Romania. *Eur J Epidemiol* 2001; 17(9): 891-96.
- Hubálek Z. Epidemiology of Lyme disease. *Curr Probl Dermatol* 2009; 37: 31-50.
- Hubbard MJ, Cann KJ, Wright DJ. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Exp Appl Acarol* 1995; 19(8): 473-78.
- Humair PF, Douet V, Morán-Cardenas F, Schouls L, Van de Pol I, Gern L. Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J Med Entomol* 2007; 44(5): 869-80.
- Jespersen DJ, Smith TF, Rosenblatt JE, Cockerill III FR. Comparison of the *Borrelia* DotBlot G, MarDx, and VIDAS enzyme immunoassays for detecting immunoglobulin G antibodies to *Borrelia burgdorferi* in human sera. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4782-84.
- Johnson AL, Divers TJ, Chang YF. Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20(3): 321-24.

- Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM. Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 1984; 57(4): 529-37.
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Espiroquetas. En: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. *Microbiología Zinsser*. 20 ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1998.p. 890-915.
- Jouda F, Crippa M, Perret JL, Gern L. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur J Epidemiol* 2003; 18(9): 907-12.
- Jouda F, Perret JL, Gern L. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne Zoon Dis* 2004b; 4(1): 23-32.
- Jouda F, Perret JL, Gern L. *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J Med Entomol* 2004a; 41(2): 162-69.
- Kaiser R. False-negative serology in patients with neuroborreliosis and the value of employing of different borrelial strains in serological assays. *J Med Microbiol* 2000; 49(10): 911-15.
- Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2001; 33(6): 780-85.
- Kaya AD, Parlak AH, Ozturk CE, Behcet M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. *New Microbiol* 2008; 31(2): 203-09.
- Kelly R. Cultivation of *Borrelia hermsii*. *Science* 1971; 173(995): 443-44.
- Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(2): 336-42.
- Killilea ME, Sweit A, Lane RS, Briggs CJ, Ostfeld RS. Spatial dynamics of Lyme disease: a review. *Ecohealth* 2008; 5(2): 167-95.
- Kirstein F, Gray JS. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(11): 4060-65.

- Kosik-Bogacka D, Kuzna-Grygiel W, Bukowska K. The prevalence of spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks *Ixodes ricinus* and mosquitoes *Aedes* spp. within a selected recreational area in the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med* 2004; 11(1): 105-08.
- Krupka M, Raska M, Belakova J, Horynova M, Novotny R, Weigl E. Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czeck Repub* 2007; 151(2): 175-86.
- Kugeler KJ, Griffith KS, Gould LH, Kochanek K, Delorey MJ, Biggerstaff BJ *et al.* A review of death certificates listing Lyme disease as a cause of death in the United States. *Clin Infect Dis* 2011; 52(3): 364-67.
- Laemeli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970; 227: 680-85.
- Lee SH, Kim BJ, Kim JH, Park KH, Yeo SJ, Kim SJ *et al.* Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from Korea by 16S rDNA sequence analysis and PCR-RFLP analysis of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50(Pt2): 857-63.
- Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Int Med* 2006; 20(2): 422-34.
- Macedo S, Cuadra AL, Arevalo J, Jove I. Borreliosis de Lyme: probables vectores implicados en la transmisión del agente etiológico. *Rev Per Med Trop* 1994; 8(1-2): 27-32.
- Magnarelli LA, Anderson JF. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1988; 26(8): 1482-86.
- Magnarelli LA, Flavell RA, Padula SJ, Anderson JF, Fikrig E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 1997; 35(1): 169-73.
- Magnarelli LA, Freier JE, Anderson JF. Experimental infection of mosquitoes with *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *J Infect Dis* 1987; 156(4): 694-95.
- Mahittikorn A, Wickert H, Sukthana Y. Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a B1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36(6): 1377-82.

- Mantovani E, Costa IP, Gauditano G, Bonoldi VLN, Higuchi ML, Yoshinari NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. It is a new tick borne disease or Lyme disease variation? *Brazilian J Med Biol Res* 2007; 40(4): 443-56.
- Marconi RT, Garon CF. Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J Clin Microbiol* 1992; 30(11): 2830-34.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B *et al.* A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(16): 5410-16.
- Marques AR. Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10(1): 13-20.
- Masuzagwa T, Fukui T, Miyake M, Oh HB, Cho MK, Chang WH *et al.* Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49(Pt4): 1409-15.
- Mavin S, McDonagh S, Evans R, Milner RM, Chatterton JMW, Ho-Yen DO. Interpretation criteria in Western blot diagnosis of Lyme borreliosis. *British J Biomed Sci* 2011; 68(1): 5-10.
- Mavin S, Milner RM, Evans R, Chatterton JM, Joss AW, Ho-Yen DO. The use of local isolates in Western blots improves serological diagnosis of Lyme disease in Scotland. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt1): 47-51.
- Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* 2008; 5(40): 1-18.
- Mogilyansky E, Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Tilton RC. Comparison of Western immunoblotting and the C6 Lyme antibody test for laboratory detection of Lyme disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(5): 924-29.
- Morán-Cadenas F, Rais O, Humair PF, Douet V, Moret J, Gern L. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J Med Entomol* 2007a; 44(6): 1109-17.
- Morán-Cadenas F, Rais O, Jouda F, Douet V, Humai PF, Moret J, Gern L. Phenology of *Ixodes ricinus* and infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North- and South-facing altitudinal gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 2007c; 44(4): 683-93.

- Morán-Cadenas F, Schneider H, Lommano E, Burri C, Moret J, Gern L. A comparison of two DNA extraction approaches in the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from live *Ixodes ricinus* ticks by PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoon Dis* 2007b; 7(4): 555-61.
- Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research* 1998; 26(13): 3309-10.
- MurgiaR, Piazzetta C, Cinco M. Cystic forms of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: induction, development, and the role of RpoS. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114(13-14): 574-79.
- Mursic V P, Wilske B, Schierz G. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1986; 263(1-2): 112-18.
- Mursic VP, Wanner G, Reinhardt S, Wilske B, BuschU, Marget W. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection* 1996; 24(3): 218-26.
- Nadelman RB, Wormser GP. Reinfection in patients with Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2007; 45(8): 1032-38.
- Neira O, Cerda C, Alvarado MA, Palma S, Abumohor P, Wainstein E *et al.* Lyme disease in Chile. Prevalence study in selected groups. *Rev Med Chil* 1996; 124(5): 537-44.
- Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 1998; 44(1): 12-26.
- Ojaimi C, Davidson BE, Saint Girons I, Old IG. Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. *Microbiol* 1994; 140(Pt11): 2931-40.
- Osorio G. Búsqueda de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* sensu lato mediante PCR en garrapatas ixoideas chilenas silvestres. *Rev Med Chil* 2001; 129(3): 270-76.
- Oteo JA, Martinez de Artola V, Casas J, Lozano A, Fernandez Calvo JL, Grandival R. Epidemiology and prevalence of seropositivity against *Borrelia burgdorferi* antigen in La Rioja, Spain. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1992; 40(2): 85-92.
- Palacios R, Osorio LE, Giraldo LE, Torres AJ, Philipp MT, Ochoa MT. Positive IgG Western blot for *Borrelia burgdorferi* in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(4): 499-503.

- Philipp MT, Wormser GP, Marques AR, Bittker S, Martin DS, Nowakowski J *et al.* A decline in C6 antibody titer occurs in successfully treated patients with culture-confirmed early localized or early disseminated Lyme Borreliosis. *Acalin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(9): 1069-74.
- Pollack RJ, Telford III SR, Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 1993; 31(5): 1251-55.
- Portnoi D, Sertour N, Ferquel E, Garnier M, Baranton G, Postic D. A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the *hbb* gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 259(1): 35-40.
- Postic D, Assous MV, Grimont PAD, Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf*(5S)-*rrl*(23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44(4): 743-52.
- Poupon MA, Lommano E, Humair PF, Douet V, Rais O, Schaad M *et al.* Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(1): 976-79.
- Preac-Mursik V, Wilske B, Schierz G. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl Bakt Hyg A* 1986; 263(1-2): 112-18.
- Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Ha'Rsi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10): 4614-18.
- Rabinowits PM, Gordon Z, Odofin L. Pet-related infections. *Am Fam Physician* 2007; 76(9): 1314-22.
- Rand PW, Lacombe EH, Smith RP, Ficker J. Participation of birds in the emergence of Lyme disease in southern Maine. *J Med Entomol* 1998; 35(3): 270-76.
- Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(11): 7203-16.
- Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: west Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res* 2003; 1(1): 5-12.

- Rijpkema SG, Golubic D, Molkenboer MJ, Verbeek-De Kruif N, Schellekens JF. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme Borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol* 1996; 20(1): 23-30.
- Rijpkema SGT, Molkenboer MJCH, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JFP. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12): 3091-95.
- Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granstrom M, et al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2097-102.
- Rodríguez RI, Domínguez JL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Biomed* 1998; 9(1): 26-37.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14<sup>th</sup>) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the Southeastern region of the United States. *J Clin Microbiol* 2009a; 47(1): 134-41.
- Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2009b; 47(12): 3875-80.
- Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. The pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol Med* 2008; 14(3-4): 205–12.
- Ruzic-Sabljić E, Arnez M, Lotric-Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Strle F. Genotypic and phenotypic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human blood. *J Med Microbiol* 2001; 50(10): 896-901.
- Ruzic-Sabljić E, Strle F. Comparison of growth of *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto in MKP and BSK-II medium. *Inter J Med Microbiol* 2004; 294(6): 407-12.
- Ryder JW, Pinger RR, Glancy T. Inability of *Ixodes cookei* and *Amblyomma americanum* nymphs (Acari: Ixodidae) to transmit *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 1992; 29(3): 525-30.
- Saiki RK. Amplification of genomic DNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press: San Diego 1990. p. 13-20.

- Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin Microbiol Rev 1997; 10(1): 185-201.
- Schouls LM, Van de Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2215-22.
- Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser G P, Fish D. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. Am J Trop Med Hyg 1997; 56(3): 339-42.
- Schwartz JJ, Gazumyan A, Schwartz I. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 1992; 174(11): 3757-65.
- Schwarzwalder A, Schneider MF, Lydecker A, Aucott JN. Sex differences in the clinical and serologic presentation of early Lyme disease: results from a retrospective review. Gender Med 2010; 7(4): 320-29.
- Shen AK, Mead PS, Beard CB. The Lyme disease vaccine - a public health perspective. Clin Infect Dis 2011; 52(Suppl3): S247-52.
- Sigal LH. Lyme disease: a world-wide borreliosis. Clin Exp Rheumatol 1988; 6(4): 411-21.
- Smismans A, Goossens VJ, Nulens E, Bruggeman CA. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. Clin Microbiol Infec 2006; 12(7): 648-55.
- Sparagano OAE, Allsopp MTEP, Mank RA, Rijpkema SGT, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. Exp Appl Acarol 1999; 23(12): 929-60.
- Stanchi NO, Balague LJ. Lyme disease: antibodies against *Borrelia burgdorferi* in farm workers in Argentina. Rev Saude Publica 1993; 27(4): 305-07.
- Stanczak J, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Lozowska W, Dabrowski J, Adamczyk A *et al.* Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. Ann Agric Environ Med 1999; 6(2): 127-32.

- Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A *et al.* Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(1): 69-79.
- Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(4): 487-93.
- Steere AC, Broderick TF, Malawista SE. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am J Epidemiol* 1978; 108(4): 312-21.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* 2004; 113(8): 1093-1101.
- Steere AC, Drouin EE, Glickstein LJ. Relationship between immunity to *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (OspA) and Lyme arthritis. *Clin Infect Dis* 2011; 52(Suppl3): S259-65.
- Steere AC, Grodzick RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W *et al.* The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 1983; 308(13): 733-40.
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, *et al.* Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Reum* 1977; 20(1): 7-17.
- Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47(2): 188-95.
- Steere AC, Sikand VK, Schoen RT, Nowakowski J. Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Infect Dis* 2003; 37(4): 528-32.
- Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, Spielman A. Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J Infect Dis* 1986; 154(2): 295-300.
- Steere AC. *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 6 ed. USA: Elsevier Inc; 2005. p. 2798-2809.
- Steere AC. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118(21-22): 625-33.
- Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 2001; 345(2): 115-25.

- Tait A, Oura C. Reverse line blotting: a new technique for the sensitive detection of tick borne pathogens. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2004; 81 (1-4): 47-50.
- Tay ST, Kamalanathan M, Rohani MY. *Borrelia burgdorferi* (strain *B. afzelii*) antibodies among Malaysian blood donors and patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33(4): 787-93.
- Terekhova D, Sartakova ML, Wormser GP, Schwartz I, Cabello FC. Erythromycin resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(11): 3637-40.
- Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22(2): 217-34.
- Tjernberg I, Kruger G, Eliasson I. C6 peptide ELISA test in the serodiagnosis of Lyme borreliosis in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(1): 37-42.
- Tjernberg I, Schon T, Ernerudh J, Wistedt AC, Forsberg P, Eliasson I. C6-peptide serology as diagnostic tool in neuroborreliosis. *APMIS* 2008; 116(5): 393-99.
- Tomao P, Ciceroni L, D'Ovidio MC, De Rosa M, Vonesch N, Iavicoli S, *et al.* Prevalence and incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* and to tick-borne encephalitis virus in agricultural and forestry workers from Tuscany, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(7): 457-63.
- Tylewska S, Chmielewski T. The isolation of *Borrelia burgdorferi* spirochetes from clinical material in cell line cultures. *Zentralbl Bakteriologie* 1997; 286(3): 363-70.
- Vanousová D, Hercogová J. Lyme borreliosis treatment. *Dermatol Therapy* 2008; 21(2): 101-09.
- Varela AS, Luttrell MP, Howerth EW, Moore VA, Davidson WR, Stallknecht DE *et al.* First culture of *Borrelia lonestari*, putative agent of southern tick-associated rash illness. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1163-69.
- Vermeersch P, Ressler S, Nackers E, Lagrou K. The C6 Lyme test has low sensitivity for antibody detection in cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64(3): 347-49.
- Vojdani A, Hebroni F, Raphael Y, Erde J, Raxlen B. Novel diagnosis of Lyme disease: potential for CAM intervention. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; 6(3): 283-96.
- Wang G, Van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 633-53.

- Weng B, Jian R, Zhang Y, Chen R. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9):3286-90.
- Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rössler D, Preac-Mursic V. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol* 1996; 184(4): 195-201.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49(1): 13-21.
- Wilske B. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann Med* 2005; 37(8): 568-79.
- Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS *et al.* The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43(1): 1089-134.
- Wormser GP, Liveris D, Hanincová K, Brisson D, Ludin S, Stracuzzi VJ *et al.* Effect of *Borrelia burgdorferi* genotype on the sensitivity of C6 and 2-tier testing in North American patients with culture-confirmed Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47(7): 910-14.
- Wormser GP, Nadelman RB, Nowakowski J, Schwartz I. Asymptomatic *Borrelia burgdorferi* infection. *Med Hypotheses* 2001; 57(4): 435-38.
- Wormser GP, O'Connell S. Treatment of infection caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(2): 245-60.
- Zakovska A, Nejedla P, Holikova A, Dendis M. Positive findings of *Borrelia burgdorferi* in *Culex (Culex) pipiens pipiens* larvae in the surrounding of Brno city determined by the PCR method. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9(2): 257-59.

**ANEXOS**

**Anexo 1. Elaboración del medio de cultivo BSK - modificado.***Acápite: 3.2.1.1a*

Se disolvió en 900 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q PLUS los siguientes compuestos:

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g)</i>
Neopeptona (Difco, EUA)	5
Albúmina bovina [fracción V] (Sigma, EUA)	50
N-2-hidroxietilpiperazina-N'-ácido etanosulfónico [HEPES] (BDH, Inglaterra)	6
Citrato de sodio tribásico dihidratado (BDH, Inglaterra)	0,7
Glucosa anhidra (BDH, Inglaterra)	5
Piruvato de sodio (BDH, Inglaterra)	0,8
N-acetil-glucosamina (Sigma, EUA)	0,4
Bicarbonato de sodio (Sigma, EUA)	2,2
Estolato de levadura (Difco, EUA)	2,53

A continuación se ajustó el pH a 7,6 con NaOH 1N, y posteriormente se añadió:

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (mL)</i>
Gelatina estéril 7%*	20
Medio 199 10X (GibcoBRL, EUA)	10
Suero de conejo estéril (inactivado 56°C/2h, centrifugado a 14 000 g y filtrado por 0,2 µm)	6.4

\*Para preparar la gelatina al 7% se disolvieron 7 g de gelatina (Disco, EUA) en 100 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q PLUS, se fundió y se autoclaveó a 121°C/20 minutos. Se guardó a 4°C y al usarla se fundió a 50°C.

El medio se esterilizó por filtración utilizando membranas de porosidad de 1,2; 0,45 y 0,22 µm, y se distribuyó en tubos con tapas de rosca (100 x 13 mm) en un volumen equivalente a ¾ partes del tubo. Se realizó control de esterilidad mediante incubación a 37°C durante 48 h.

**Anexo 2. Western blot-IgM [Ag: *B. garinii* (NE83)], Western blot-IgG (Ag: *B. burgdorferi sensu stricto* (B31)) y Western blot-IgG (Ag: *B. garinii* (NE83))**

*Acápites:* 3.2.1.1d, 3.2.2.2 y 3.2.3

Para la obtención de los antígenos y las tiras para los Western blots se realizaron subcultivos de las cepas NE83 y B31 en medio BSK-H durante 10 días a 34°C, y a partir de éstos se colectaron y lavaron las células por centrifugación (4000 rpm/12 min). Se obtuvieron las proteínas a partir de la lisis de las mismas utilizando el tampón Laemeli (Laemeli, 1970) y calentamiento por 3 min, las cuales después de su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se cortó en tiras.

Las tiras se bloquearon con leche descremada al 5% en tampón de fosfatos (PBS, de sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Solution) y se incubaron con las muestras (sueros diluidos 1:200 y LCR 1:20 en leche descremada al 1% con PBS), en agitación a 50-70 rpm durante toda la noche a temperatura de laboratorio. Se lavaron con leche descremada al 5% y 1% en PBS y se incubó durante 2 horas con los conjugados anti-IgM y anti-IgG marcados con fosfatasa alcalina (Kirkegaard & Perry Laboratories, EUA), según correspondiera, diluidos 1:500 con leche descremada al 1%. Se lavaron nuevamente las tiras empleando leche descremada al 5% en PBS, PBS y el tampón de revelación de la fosfatasa alcalina (AP, de sus siglas en inglés Alkaline Phosphatase) y se procedió a la revelación aplicando una solución de fosfato de bromo-cloro-indolil y nitroazul de tetrazolio en tampón AP, durante 5-10 min.

En cada ensayo se emplearon muestras de sueros humanos controles positivo y negativo.

Las intensidades de las bandas observadas se compararon visualmente con la intensidad de las bandas del control positivo. Se clasificaron como 0 cuando sólo se observaron trazas y de 1+ a 4+ según la intensidad de las mismas. Cero fue interpretado como resultado negativo, 1+ como débil y de 2+ a 4+ como fuertes. Los resultados se introdujeron en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Office Excel 2010) para su posterior análisis.

Se consideró positivo un resultado a IgM cuando se observaron las bandas correspondientes a las proteínas de 41 y 22/24 kDa, mientras que se consideró positivo para IgG cuando al sumar los valores asignados a cada banda según su especificidad se obtuvo un valor superior a 45 puntos (10 puntos para las bandas correspondientes a las proteínas de 90/93 y 22/24 kDa, 5 puntos para las de 72, 65/66, 58, 56, 43, 39, 34, 31, 30 y 28/29 kDa, y 1 punto para las de 83, 60, 45, 42 y 14 kDa).

**ANEXOS**

**Anexo 3. Información clínico-epidemiológica de los individuos con sospechas de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato, pertenecientes a la serie de casos 2, recibida en el LNE-IPK (2003-2010).**

*Acápite: 3.2.2.2*

No. caso	Procedencia	Edad (años)	Sexo	Raza	Cuadro clínico	Antecedentes epidemiológicos	Manejo clínico y evolución
1	La Habana	NR	F	NR	Parálisis facial periférica bilateral (primero del lado derecho y a los dos meses del lado izquierdo), acompañada de cefalea y precedida de manifestaciones dermatológicas sugestivas de eritema migratorio.	NR	NR
2	Holguín	38	M	B	Antecedentes de salud hasta mayo de 2005, que comienza a presentar lesiones maculo-eritematosas en piel, fundamentalmente en muslos y tronco, que mejoraban y reaparecían de forma espontánea. Posteriormente comienza a presentar fiebre, malestar general y dolor de garganta, por lo que ingresa en el servicio de Dermatología del Hospital Clínico-Quirúrgico “Lucía Iñiguez” donde se estudia y prescribe tratamiento con esteroides por 15 días, egresando con el diagnóstico de Eritema multiforme; 72 horas después de concluido el tratamiento reaparece la fiebre, esta vez acompañada de retención urinaria y un cuadro neurológico caracterizado por disminución de la fuerza muscular en miembros inferiores (paraplejía flácida), trastornos sensitivos con nivel dorsal (D5) y arreflexia osteotendinosa, por lo que se ingresa en el Hospital “Vladimir Ilich Lenin”, donde se le diagnostica una posible mielitis transversa, de causa idiopática, quedando parapléjico. El paciente reingresa en el Hospital Clínico-Quirúrgico “Lucía Iñiguez” para continuar estudios e investigaciones los que revelan la presencia de una cavidad siringomiélica dorsal D5-D8, con engrosamiento meníngeo y toma de nervios periféricos en miembros inferiores, llegándose al diagnóstico de una encefalomielorradiculopolineuropatía de causa no precisada. Este cuadro dejó como secuela paraplejía asociada con anemia persistente.	Ocupación: chofer. Vive en la periferia de la ciudad, manifestó la presencia de roedores alrededor de la vivienda, no recuerda haber sido picado por garrapatas u otros ácaros. No había viajado al extranjero.	Tratamiento con eritromicina durante 2 sem, evoluciona satisfactoriamente.
3	Pinar del Río	1.5	M	NR	Cuadro febril de dos meses, con eritema macular, artritis y hepatoesplenomegalia.	NR	NR
4	Mayabeque	NR	M	NR	NR	NR	NR

*Leyenda: NR-Información no recogida, F-femenino, M-masculino, B-blanca*

**ANEXOS**

No. caso	Procedencia	Edad (años)	Sexo	Raza	Cuadro clínico	Antecedentes epidemiológicos	Manejo clínico y evolución
5	Pinar del Río	NR	M	NR	Antecedentes de debilidad muscular que comenzó por los brazos a predominio proximal, progresión en 3 semanas, pequeño periodo de estabilización y regresión en aproximadamente 1 mes, se interpretó como un Síndrome de Guillain-Barré. Posteriormente comienza con debilidad proximal en los brazos que tomó las piernas, con dificultad para la marcha.	Ocupación: médico pediatra (colaborador en Venezuela).	Ingresado y tratado con Intacglobín.
6	Matanzas	NR	M	NR	NR	NR	Ingresado en UCI
7	Sancti Spíritus	12	F	B	Antecedentes de alergia y asma bronquial. Comienza con sintomatología el 1/octubre/2004, ingresando 24 días después con historia de lesión papulosa redondeada en pómulo derecho, lesión que fue incrementando de tamaño, con centro pálido y bordes bien definidos que hacían relieve, se acompañaba de dolor en esa hemicara y hemicráneo. Presentaba además múltiples adenopatías de aspecto inflamatorio en el cuello de ese mismo lado. Se interconsulta con el servicio de Dermatología y se comienza tratamiento con esteroides tópicos y orales. Se valora con el servicio de Otorrino-laringología por dolor e inflamación del oído derecho, constatándose estenosis a nivel del conducto auditivo externo, atribuyéndose dicho proceso a la lesión de la cara. Finalmente se le indicó tratamiento con eritromicina durante una semana. Días antes del ingreso había comenzado con aumento de volumen de hemicara derecha y astenia. Al examen físico se constata la presencia de un soplo sistólico II/IV a nivel del foco mitral (antecedentes de prolapsos de la válvula mitral), discreta distensión abdominal con dolor difuso a la palpación, no visceromegalia. Neurológicamente presentaba hipersensibilidad del hemicuerpo derecho, parálisis facial periférica derecha y enrojecimiento de la membrana timpánica del oído derecho. Se indicó tratamiento con ceftriaxona (1g/12horas) por 10 días. Durante su ingreso se realizaron exudados ótico, nasal y faríngeo indicando flora normal, así como urocultivo que resultó negativo. La evolución en sala fue favorable y egresó el 2 de noviembre de 2004, aunque permanecía asténica. A los 10 días del egreso fue valorada en consulta con aumento discreto de hemicara derecha y lesiones evanescentes similares a la lesión inicial de la cara pero más pequeñas, de localización sacrolumbar y en antebrazo derecho, que desaparecieron rápidamente sin dejar huellas.	NR	Tratamiento: doxiciclina (4mg/kg/día) durante 14 días. Evolución clínica satisfactoria.

*Leyenda: NR-Información no recogida, F-femenino, M-masculino, B-blanca*

**ANEXOS**

No. caso	Procedencia	Edad (años)	Sexo	Raza	Cuadro clínico	Antecedentes epidemiológicos	Manejo clínico y evolución
8	La Habana	NR	M	NR	NR	NR	NR
9	La Habana	NR	F	NR	NR	NR	Ingresada en servicio de Neurología
10	Artemisa	NR	F	NR	Fiebre, adenopatías, vasculitis cutánea durante 2 meses.	NR	NR
11	La Habana	NR	F	NR	NR	Procedente de la Escuela Latinoamericana de Medicina	NR
12	La Habana	NR	M	NR	NR	NR	NR
13	La Habana	NR	M	NR	Presenta una paraparesia espástica de 1 año de evolución.	NR	NR
14	La Habana	NR	F	NR	NR	NR	NR
15	Villa Clara	NR	F	NR	Antecedentes de polineuropatía sensitivomotora distal simétrica hace 15 años que evolucionó sin dejar secuela. Posteriormente presentó 4 episodios de parálisis facial recurrente del lado derecho. No muestra otros signos al examen clínico. No tiene antecedentes de lesiones dermatológicas sugestivas de enfermedad de Lyme.	NR	NR
16	Holguín	NR	M	NR	Presenta diplopia e imposibilidad de la mirada lateral del ojo izquierdo desde hace 3 años. Impresión diagnóstica: parálisis recurrente del VI par.	NR	NR
17	La Habana	NR	M	NR	NR	NR	NR
18	La Habana	NR	M	NR	Impresión diagnóstica de meningoencefalitis de causa no precisada y lesiones en piel.	NR	NR
19	Holguín	44	F	NR	Hace aproximadamente 3 años, estando de misión internacionalista en Honduras, comienza con síntomas y signos que se interpretan como un túnel del carpo en antebrazo derecho, posteriormente comienza dolor y calambres en hombro de ese lado, se realiza el diagnóstico de una plexitis braquial idiopática. Después comienza con atrofia de los músculos del antebrazo y de la escápula de ese lado. A la paciente se le ha realizado resonancia resultando negativa, química sanguínea negativa, estudios inmunológicos (factor reumatoideo, proteína C reactiva y células LE) negativos, electromiografía en la que se muestran cambios en la conducción y desmielinización desde C3-C7 así como fasciculaciones.	NR	NR

*Leyenda: NR-Información no recogida, F-femenino, M-masculino, B-blanca*

**ANEXOS**

No. caso	Procedencia	Edad (años)	Sexo	Raza	Cuadro clínico	Antecedentes epidemiológicos	Manejo clínico y evolución
20	La Habana	NR	F	NR	NR	NR	NR
21	La Habana	NR	M	NR	Encefalopatía subaguda desde hace 1 mes, trastornos conductuales y una crisis tónico clónica generalizada.	NR	NR
22	La Habana	NR	M	NR	Deterioro cognitivo y trastornos conductuales subagudos, inmunosupresión, lesiones de sustancia blanca cerebral bilateral que estuvo en EUA recientemente. Impresión diagnóstica: leucoencefalopatía.	NR	NR
23	La Habana	NR	F	NR	Lesiones en la zona de las mordeduras de las garrapatas y refiere dolor	Mordeduras de garrapatas	Tratamiento con gentamicina, amoxicilina y azitromicina.
24	La Habana	NR	F	NR	NR	NR	NR
25	Holguín	NR	F	NR	Parálisis facial periférica recidivante	NR	NR
26	Holguín	NR	F	NR	Parálisis del velo del paladar izquierdo. Diagnóstico clínico: mononeuritis múltiple postinfeccioso.	NR	NR
27	Ciego de Ávila	35	M	NR	Producto del primer episodio de mordedura por garrapatas, 3 años atrás, aparecieron lesiones en piel que se mantuvieron durante 1 año, y a pesar de ser tratado por el servicio de Dermatología impresionan haber curado espontáneamente. En la actualidad visita una finca de su familia en la provincia y es mordido nuevamente por garrapatas, reapareciendo lesiones similares que supuran una linfa que cuando se seca queda como un quiste, presenta cuadro febril en días alternos y adenopatías inguinales bilateral y una cervical no en plano profundo dolorosa. Las lesiones le provocan prurito y dolor.	Paciente VIH/Sida y que ha sufrido mordeduras de garrapatas en dos ocasiones.	NR
28	Holguín	NR	F	NR	Parálisis facial recurrente.	NR	NR
29	La Habana	NR	F	NR	NR	Antecedentes de estancia en México	NR

*Leyenda: NR-Información no recogida, F-femenino, M-masculino, B-blanca*

**ANEXOS**

No. caso	Procedencia	Edad (años)	Sexo	Raza	Cuadro clínico	Antecedentes epidemiológicos	Manejo clínico y evolución
30	Matanzas	57	M	NR	En horas de la noche presenta molestias a nivel del primero y segundo anejo del pie, y al revisarse detecta una garrapata y la retira del área. El paciente se mantuvo asintomático por 48 horas, entonces comienza con dolor en el área y al día siguiente aparece linfangitis flictenular que abarca hasta la raíz del muslo, asociado a fiebre, toma del estado general y polipnea. Presenta además insuficiencia renal.	Trabaja como custodio en una Empresa Genética en la que existen crías de animales (vacas, caballos, gallinas, carneros, etc.), y en su área de residencia se dedica a criar animales como cerdos, gallinas y otras aves de corral, no tiene perros pero en el vecindario existen. Aproximadamente 12 días antes realiza visita a su hija en La Habana, quien vive en un edificio y no tiene animales.	Ingresa y comienza tratamiento con antibióticos sin mejoría significativa.

*Leyenda: NR-Información no recogida, F-femenino, M-masculino, B-blanca*

**Anexo 4. Copia de la Resolución No. 88/2008 del Ministerio de Economía y Planificación de Cuba referente al objeto social del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**

*Acápites: 3.3*

RESOLUCIÓN No 88/2008

POR CUANTO: El Ministro de Salud Pública solicitó al Ministro de Economía y Planificación la modificación del objeto de las Unidades Presupuestadas denominadas Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Instituto de Neurología y Neurocirugía, Hospital Nacional de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer", Instituto de Angiología, Instituto de Endocrinología, Instituto de Gastroenterología, Instituto de Hematología e Inmunología, Instituto de Nefrología; Instituto de Oncología y Radiobiología; del Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" y Complejo Científico Ortopédico Internacional "Frank País", todas subordinadas al Ministerio de Salud Pública.

POR CUANTO: Resulta necesario añadir en el objeto de las citadas entidades brindar atención médica a extranjeros.

POR CUANTO: El objeto es el documento rector único que define las transacciones de carácter económico que la entidad económica está autorizada a realizar en el país y su aprobación se realiza por el Ministerio de Economía y Planificación, a propuesta de los Organismos de la Administración Central del Estado o los Consejos de la Administración Provincial o los Jefes de otras entidades nacionales, según la política general para los objetos de las entidades económicas aprobada por el Grupo Gubernamental de Perfeccionamiento Empresarial de 13 de junio de 2002.

POR CUANTO: Por Acuerdo de 11 de Mayo de 1995 del Consejo de Estado de la República de Cuba, fue designado el que resuelve para ocupar el cargo de Ministro de Economía y Planificación.

POR TANTO: En uso de las atribuciones que me están conferidas,

RESUELVO:

PRIMERO: Ampliar el objeto de la Unidad Presupuestada denominada Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", subordinada al Ministerio de Salud Pública, siendo en lo sucesivo el siguiente:

- Fungir como Laboratorio Nacional de Referencia en Microbiología y Parasitología.
- Fungir como Centro Nacional de Referencia para la atención y tratamiento a enfermos de SIDA.
- Brindar servicios de atención ambulatoria y hospitalización a la población referida al Instituto de Medicina Tropical.
- Participar en convocatorias libradas por los Organismos Internacionales y Organizaciones no Gubernamentales para el financiamiento de las Investigaciones.
- Ofrecer servicios de vigilancia epidemiológica en las enfermedades transmisibles y a las relaciones vacunales.
- Realizar la validación y vigilancia de candidatos vacunales cubanos, medicamentos y productos destinados al control de vectores y plagas.

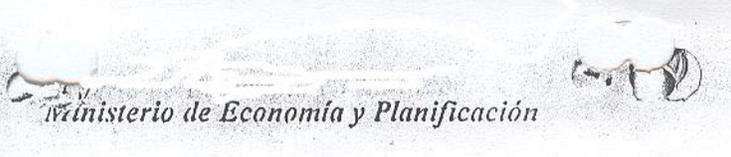


- llevar a cabo el trabajo de terreno sobre el control de enfermedades transmisibles, asesorando a los distintos niveles de salud, sobre la situación higiénico epidemiológica y la prevención de posibles brotes epidémicos.
- Actuar como Centro Colaborador de las Organizaciones Mundial de la Salud y Panamericana de la Salud para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica, Enfermedades Viricas y Tuberculosis.
  - Desarrollar actividades de investigación, asistenciales y docentes en el campo de las enfermedades infecciosas y parasitarias, a través del Hospital y Laboratorios de Referencia Nacional.
  - Brindar servicios médicos altamente calificados a pacientes nacionales y extranjeros con enfermedades transmisibles para Cuba. A éstos últimos el cobro se efectúa en pesos convertibles.
  - Desarrollar y realizar investigaciones dirigidas al rápido control de las enfermedades infecto contagiosas en beneficio de la red nacional de la salud de la región.
  - Brindar servicios de docencia, maestrías, doctorados, entrenamientos, cursos de pre y postgrado en la formación de profesionales y técnicos en el perfil de enfermedades transmisibles, así como a las brigadas médicas que cumplan misiones internacionalistas como parte integral del plan integral de salud. A los estudiantes y pasantes extranjeros se les cobra el servicio en pesos convertibles.
  - Comercializar de forma minorista medicamentos en la Farmacia del Instituto de Medicina Tropical en pesos cubanos a personas naturales cubanas y en pesos convertibles a extranjeros.
  - Crear software científicos, para uso interno y de la red nacional de Salud Pública
  - Actuar como sede de eventos científicos para la realización de Congresos, Talleres u otras modalidades con carácter nacional e internacional cobrando en pesos cubanos a participantes cubanos y en pesos convertibles a extranjeros.
  - Ofrecer servicios de alojamiento no turístico y gastronómicos asociados a extranjeros que se encuentren cursando maestrías, entrenamientos, postgrados u otras modalidades de su especialidad en pesos convertibles.
  - Brindar servicios de comedor y cafetería a sus trabajadores en pesos cubanos.
  - Ofrecer servicios de transportación a sus trabajadores en pesos cubanos.
  - Brindar servicios de atención médica a los turistas y pacientes extranjeros en pesos convertibles.

SEGUNDO: Ampliar el objeto de la Unidad Presupuestada denominada Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, subordinada al Ministerio de Salud Pública, siendo en lo sucesivo el siguiente:

- Actuar como unidad rectora de la atención médica especializada de las enfermedades y actividades correspondientes a su institución, así como constituir el centro de referencia nacional.
- Brindar asesoramiento al Ministerio de Salud Pública y a Instituciones de Salud en la especialidad.
- Brindar servicios médicos de urgencia, ambulatorios, electivos, de rehabilitación, de investigación y tratamiento de enfermedades específicas de la Institución gratuitamente a los ciudadanos cubanos como parte del Sistema Nacional de Salud.





DECIMOTERCERO: La presente Resolución surte efectos a partir de la fecha de su firma.

COMUNÍQUESE, con remisión de copia de esta Resolución, al Ministro de Salud Pública, al Comité Ejecutivo del Consejo de Ministros, a los Ministerios de Finanzas y Precios, del Comercio Interior y de Trabajo y Seguridad Social, al Banco Central de Cuba, al Registro Mercantil, a la Oficina Nacional de Estadísticas, a la Dirección de Desarrollo Social de este Ministerio y a cuantas más personas naturales o jurídicas deban conocerla.

ARCHÍVESE el original en la Dirección Jurídica de este Ministerio.

PUBLIQUESE en la Gaceta Oficial de la República.

Dada, en Ciudad de La Habana, a

*6 de febrero de 2008.*

JOSE LUIS RODRIGUEZ GARCIA  
MINISTRO  
MINISTERIO DE ECONOMÍA Y  
PLANIFICACIÓN

CERTIFICADO  
Que es copia fiel de un original  
que obra en el expediente de la  
Asesoría Jurídica del Ministerio  
de Economía y Planificación  
Asesoría Jurídica  
Lic. Nilda Llanusa Villalón

*[Handwritten signature]*

**Anexo 5. Copia del Documento oficial de la acreditación del Laboratorio ADMed de Microbiología de La-Chaux-de-Fonds, Suiza (versión en inglés).**

*Acápite: 3.3*



Based on the Accreditation and Designation Ordinance dated 17 June 1996 (as of 1 December 2007) and on the advice of the Federal Accreditation Commission, the Swiss Accreditation Service (SAS) grants to the

**ADMED Microbiologie  
Boucle de Cydalise 16  
CH-2300 La Chaux-de-Fonds**

the accreditation as

**Testing laboratory for medical microbiology**

in accordance with the Standard ISO/IEC 17025. The scope of accreditation is defined in the Official Directory of the Accredited Testing Laboratories.



Accreditation mark and number: STS 280

Date of accreditation: 24 November 2000

Date of the last renewal of accreditation: 24 November 2010

The accreditation is valid until: 23 November 2015

CH-3003 Berne-Wabern, 11 November 2010  
Swiss Accreditation Service

The Head  
Hanspeter Ischi

SAS is a signatory of the multilateral agreements of the European co-operation for Accreditation (EA) for calibration, testing, inspection and certification of products, personnel, quality and environmental management systems, of the International Accreditation Forum (IAF) for certification of products, quality and environmental management systems and of the International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) for calibration and testing.

**ANEXOS**

**Anexo 6. Composición química de los medios CMRL 1066 y 199 (Casa comercial: GibcoBRL, EUA).**

*Acápite: 4.1.1*

Componentes (mg/L)	Medio CMRL 1066		Medio 199	
	1X	10X	1X	10X
<b>Sales inorgánicas</b>				
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	200.00	2000.00	200.00	2000.00
KCL	400.00	4000.00	400.00	4000.00
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9H <sub>2</sub> O	-	-	0.72	7.20
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	200.00	2000.00	200.00	2000.00
NaCl	6799.00	67990.00	6800.00	68000.00
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	140.00	1400.00	125.00	1250.00
<b>Otros componentes</b>				
Cocarboxilasa	1.00	10.00	-	-
Coenzima A	2.50	25.00	-	-
Desoxiadenosina	10.00	100.00	-	-
Desoxitimidina	10.00	100.00	-	-
Desoxiguanosina	10.00	100.00	-	-
Nucleótido de difosfopiridina	7.00	70.00	-	-
Etanol	16.00	160.00	-	-
Flavin dinucleotido de adenina (FAD)	1.00	10.00	-	-
D - Glucosa	1000.00	10000.00	1000.00	10000.00
Glutatión (reducido)	10.00	100.00	0.05	0.50
5 – metil-desoxietidina	0.10	1.00	-	-
Rojo fenol	20.00	200.00	20.00	200.00
Acetato de sodio	83.00	830.00	50.00	500.00
Glucoronato de sodio	4.20	42.00	-	-
Timina	10.00	100.00	0.30	3.00
Nucleótido de trifosfopiridina	1.00	10.00	-	-
Tween 80	5.00	50.00	20.00	200.00
Trifosfato de uridina	1.00	10.00	-	-
Sulfato de adenina	-	-	10.00	100.00
Trifosfato de adenosina	-	-	1.00	10.00
Ácido adenilico	-	-	0.20	2.00
Desoxirribosa	-	-	0.50	5.00
Guanina	-	-	0.30	3.00
Hipoxantina	-	-	0.30	3.00
Ribosa	-	-	0.50	5.00
Uracilo	-	-	0.30	3.00
Xantina	-	-	0.30	3.00

**ANEXOS**

Componentes (mg/L)	Medio CMRL 1066		Medio 199	
	1X	10X	1X	10X
<b>Aminoácidos</b>				
L – alanina	25.00	250.00	50.00	500.00
L – arginina	70.00	700.00	70.00	700.00
Ácido L – aspártico	30.00	300.00	60.00	600.00
L – cisteína	260.00	2600.00	0.11	1.10
L – cistina	20.00	200.00	20.00	200.00
Ácido L – glutámico	75.00	750.00	150.00	1500.00
L –glutamina	-	-	100.00	1000.00
Glicina	50.00	500.00	50.00	500.00
L – histidina	20.00	200.00	21.88	210.00
L - Hidroxiprolina	10.00	100.00	10.00	100.00
L – isoleucina	20.00	200.00	40.00	400.00
L – leucina	60.00	600.00	120.00	1200.00
L – lisina	70.00	700.00	70.00	700.00
L – metionina	15.00	150.00	30.00	300.00
L - fenilalanina	25.00	250.00	50.00	500.00
L – prolina	40.00	400.00	40.00	400.00
L – serina	25.00	250.00	50.00	500.00
L – treonina	30.00	300.00	40.00	400.00
L – triptófano	10.00	100.00	20.00	200.00
L – tirosina	40.00	400.00	40.00	400.00
L – valina	25.00	250.00	50.00	500.00
<b>Vitaminas</b>				
Ácido ascórbico	50.00	500.00	0.05	0.50
Biotina	0.01	0.10	0.01	0.10
Pantotenato de calcio	0.01	0.10	0.01	0.10
Colesterol	0.20	2.00	0.20	2.00
Cloruro de colina	0.50	5.00	0.50	5.00
Ácido fólico	0.01	0.10	0.01	0.10
Inositol	0.03	0.30	0.05	0.50
Niacina	0.025	0.25	0.025	0.25
Niacinamida	0.025	0.25	0.025	0.25
Ácido para – aminobenzoico	0.05	0.50	0.05	0.50
Piridoxal	0.025	0.25	0.025	0.25
Piridoxina	0.025	0.25	0.025	0.25
Riboflavina	0.01	0.10	0.01	0.10
Tiamina	0.01	0.10	0.01	0.10
Vitamina A (acetato)	-	-	0.14	1.40
Calciferol	-	-	0.10	1.00

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA  
DEL AUTOR SOBRE EL  
TEMA DE TESIS**

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS

### PUBLICACIONES

**Rodríguez I**, Pedroso R, Fernández C, Cinco M, Fuentes O. ¿Enfermedad de Lyme en Cuba? Presentación de posibles casos. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55(1): 41-3.

**Rodríguez I**, Fernández C, Cinco M, Pedroso R, Fuentes O. Do antiborrelial antibodies suggest Lyme disease in Cuba? *Emerg Infect Dis* 2004; 10(9): 1690-1700.

**Rodríguez I**, Lienhard R, Gern L, Veuve MC, Jouda F, Siegrist HH, Fernández C, Rodríguez JE. Evaluation of a modified culture medium for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(8): 999-1002.

**Rodríguez I**, Gern L, Rais O, Fuentes O, González R, Fernández C. Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria en garrapatas capturadas sobre caballos domésticos. *Rev Cubana Med Trop* 2009; 61(1): 57-62.

**Rodríguez I**, Ortega LM, Fernández C, Rodríguez ME, Scheurer C, Lienhard R. Borreliosis de Lyme en Cuba. A propósito de nuevos casos. *Rev Panam Infectol* 2009; 11(3): 37-41.

**Rodríguez I**, Fernández C, Sánchez L, Martínez B, Siegrist HH, Lienhard R. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in humans from a Cuban village. *Braz J Infect Dis* 2011 (en prensa).

## **PRESENTACIÓN DE RESULTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS**

### **I Simposio Internacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial. Varadero, Cuba, 9/1999.**

- Enfermedad de Lyme en Cuba y *Amblyomma cajennense* su vector?

### **Biocología Habana'99. La Habana, Cuba, 11/1999.**

- Evidencias serológicas de enfermedad de Lyme en una región de Cuba.

### **5<sup>th</sup> International Conference on Ticks and Tick-borne pathogens. Neuchatel, Suiza, 29/08-2/09/2005**

- **Rodríguez I**, Fernández C, Fuentes O. Lyme disease in Cuba? Past, current and future investigations.

### **VIII Congreso Internacional Avances en Medicina, Hospitales Civiles 2006. Guadalajara, México, 2-4/02/2006**

- **Rodríguez I**. Diagnóstico de *Borrelia burgdorferi*.

### **VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. La Habana, Cuba: 4-7/12/2007**

- **Rodríguez I**, Lienhard R, Fernández C, Scheurer C, González R, Siegrist HH, Obregón AM, Martínez B, Rodríguez JE. Enfermedad de Lyme: una nueva entidad infecciosa a tomar en consideración en Cuba.

### **VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Buenos Aires, Argentina, 21-26/09/2008**

- **Rodríguez I**, Gern L, Fernández C, Fuentes O, González R, Siegrist HH, Tritten ML, Obregón AM, Rodríguez JE, Lienhard R. Advances in the study of Lyme disease in Cuba.

### **Biocología Habana 2008, La Habana, Cuba, 4-6/12/2008**

- **Rodríguez I**, Mayet M, Fernández C, Fraga J, Duarte Y, Echevarría E. Optimización de tecnologías moleculares para la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en garrapatas.

**Congreso 70 Aniversario del IPK. VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. La Habana, Cuba, 1-4/06/2009.**

- **Rodríguez I**, Mayet M, Fernández C, Fraga J, Duarte Y, Echevarría E. Optimización de tecnologías moleculares para la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en garrapatas.
- **Rodríguez I**, Lienhard R, Fernández C, Scheurer C, González R, Siegrist HH, Obregón AM, Martínez B, Rodríguez JE. Nuevos aportes al conocimiento sobre enfermedad de Lyme en Cuba.

**I Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis, “Espiroquetas, Habana 2010”, La Habana, Cuba, 5-7/05/2010.**

- **Rodríguez I**, Fernández C, Fuentes O. Enfermedad de Lyme: una borreliosis exclusiva del hemisferio Norte?

**I Congreso Internacional LABIOFAM 2010, La Habana, Cuba, 28/09-1/10/2010.**

- **Rodríguez I**, Fernández C, Fuentes O, Echevarría E, Duarte Y, Noda AA, Gern L. Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria en ixódidos cubanos.

**VII Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos, La Habana, Cuba, 30/Nov-2/Dic/2010.**

- **Rodríguez I**, Lienhard R, Gern L, Veuve MC, Jouda F, Siegrist HH, Fernández C, Rodríguez JE. Evaluación de un medio de cultivo modificado para la recuperación de cepas de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

## **RESULTADOS CIENTÍFICOS**

**Resultado Relevante Institucional / Consejo Científico del IPK. 10/2005**

- Enfermedad de Lyme. Hallazgos serológicos en una región de Cuba.

**XVI Fórum de Ciencia y Técnica (nivel base y municipal) 06/2006 y 07/2006**

- Enfermedad de Lyme. Hallazgos serológicos en una región de Cuba.

**TESIS DEFENDIDAS Y TUTOREADAS**

**Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología 1998.** Evidencias serológicas de enfermedad de Lyme en una región de Cuba. Estudio preliminar. Autor: Islay Rodríguez

**Trabajo de Diploma de Licenciatura en Microbiología 2009.** Detección molecular de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. y *Babesia* spp. en garrapatas de importancia médico-veterinaria en las provincias Habaneras. Estudio preliminar. Autora: Yanisia Duarte

**Tesis de Maestría en Bacteriología-Micología 2010.** Métodos de extracción de ácidos nucleicos en garrapatas y amplificación de ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Autora: Milagro Mayet

**PUBLICACIONES DEL AUTOR  
NO RELACIONADAS CON EL  
TEMA DE TESIS**

## PUBLICACIONES DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS

**Rodríguez I**, Obregón AM, Peña A, Rodríguez JE. Evaluación del antígeno-RPR elaborado por la Empresa de Productos Biológicos “Carlos J. Finlay”. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 51(1): 63-4.

**Rodríguez I**, Obregón AM, Rodríguez JE, Fernández C, Martínez A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2002; 40(1): 11-5.

**Rodríguez I**, Fernández C, Llerena C, Victoria B, Rodríguez JE, Obregón AM. Lepto dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54(1): 44-7.

Victoria B, Fernández C, Rodríguez J, Obregón AM, **Rodríguez I**. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54(1): 48-51.

Sánchez R, Pérez A, Obregón AM, **Rodríguez I**, Baly A, Baró M, Rodríguez J, Bermond D. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna cubana inactivada trivalente contra la leptospirosis humana según diferentes esquemas. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54(1): 37-43.

**Rodríguez I**, Álvarez EL, Fernández C. Aplicación de la Hemaglutinación de *Treponema pallidum* en el diagnóstico de la sífilis venérea. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2002; 40(2): 108-11.

**Rodríguez I**, Álvarez EL, Fernández C, Miranda A. Comparison of a recombinant – antigen enzyme immunoassay with *Treponema pallidum* hemagglutination test for serological confirmation of syphilis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(3): 347-9.

Obregón AM, Fernández C, **Rodríguez I**, Rodríguez J, Fernández N, Enrique G. Importancia de la confirmación microbiológica en un brote de leptospirosis humana en la ciudad de Villa Clara. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55(2): 96-9.

**Rodríguez I**, Rodríguez ME, Fernández C, Blanco O, Llop A. Diagnóstico serológico de sífilis en pacientes cubanos con VIH/SIDA. *Rev Cubana Med Trop* 2004; 56 (1): 67-9.

Obregón AM, Martínez G, Martínez R, Llop A, **Rodríguez I**, Rodríguez J, Fernández C. Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios cubanos vacunados con vax SPIRAL®. *Rev Cubana Med Trop* 2004; 56 (2): 148-51.

**Rodríguez I**, Álvarez EL, Fernández C. Evaluación de un ensayo inmunoenzimático recombinante como prueba confirmatoria en el diagnóstico de la sífilis. *Salud(i)Ciencia* 2004; 12 (4): 11-2.

**Rodríguez I**, Fillonneau C, Blanchet B, Suard I, Catalina P, Andre-Fontaine G. Etude de l'efficacité du vaccin Spirolept contre la leptospirose par la protection passive de rongeurs de laboratoire. *Médecine et Maladies infectieuses* 2004 ; 34 (5) : 196-200.

Martínez R, Pérez A, Quiñones MC, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, Fernández C, Menéndez J, **Rodríguez I**, Baró M, Díaz M, Rodríguez J, Sierra G, Obregón AM, Toledo ME, Fernández N. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Publica* 2004; 15 (4): 249-55.

Obregón AM, Fernández C, **Rodríguez I**, Balbis Y, Martínez B, Rodríguez J. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la leptospirosis en Cuba. *Rev Panam Salud Publica* 2004; 16 (4): 259-65.

Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, Obregón AM, **Rodríguez I**, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE, Martínez MB. *International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis*. KIT-IPK, 2004.

**Rodríguez I**, Martínez R, Zamora Y, Rodríguez JE, Fernández C, Obregón AM. Respuesta de anticuerpos IgG antileptospira en individuos inmunizados con vax-SPIRAL. *Rev Cubana Med Trop* 2005; 57 (1): 32-7.

**Rodríguez I**, Rodríguez JE, Fernández C Alcalinización de la orina humana para el aislamiento experimental de leptospiras. *Rev Cubana Med Trop* 2005; 57 (1): 55-6.

Martínez B, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, **Rodríguez I**. Lepto tek lateral flow: a method for the rapid diagnosis of human leptospirosis in Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol*

2005; 43 (1): 0-0. [Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-17512005000100010&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-17512005000100010&lng=es&nrm=iso) ISSN 0253-1751].

Obregón AM, Fernández C, Batle MC, Rodríguez J, **Rodríguez I**, Hernández I. Resultados preliminares de la evaluación del primer sistema látex en el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2005; 43(2): 0-0 [Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v43n2/hie09205.pdf>].

Rodríguez ME, Llop A, Capó V, Kourí V, Resik S, Soto Y, Muné M, **Rodríguez I**, Hengge R. Human immunodeficiency virus and other sexually transmitted diseases in Cuban women. *Clin Microbiol Infec* 2005; 11 (9): 764-67.

**Rodríguez I**, Fernández C, Martínez MB. Falsos biológicos positivos por VDRL en el diagnóstico serológico de la sífilis. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 58 (1).

Fernández C, Rodríguez J, Obregón AM, **Rodríguez I**. Vigilancia clínica y epidemiológica de la leptospirosis humana en Cuba y Honduras. Informe de Cooperación Técnica entre Países TCC. OPS/OMS-2006.

Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, Obregón AM, **Rodríguez I**, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE. *Internacional course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis*. Habana: Palcograf, 2006.

**Rodríguez I**, Fernández C, Obregón A, Zamora Y, Rodríguez J, Rodríguez N, Berdasquera D, Llop A. Confirmación microbiológica de 2 brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59 (1): 19-23.

Fernández C, Zamora Y, Rodríguez N, **Rodríguez I**, Berdasquera D, Ortega LM. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con vaginosis bacteriana. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59 (2): 108-12.

Rodríguez NM, Fernández C, **Rodríguez I**, Berdasquera D, Rivera-Tapia JA. PCR-Múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2007; 24 (2): 152-56.

Obregón AM, Fernández C, **Rodríguez I**, Rodríguez J, Zamora Y. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Tropical* 2007; 59(1): 63-7.

Berdasquera D, **Rodríguez I**, Obregón AM, Fernández C, Segura R, Bustabad EC, Sánchez CM. Brote de leptospirosis humana en la provincia Guantánamo. *Rev Cubana Med Tropical* 2007; 59(1): 24-9.

Zamora Y, Fernández C, **Rodríguez I**, Obregón AM, Rodríguez J, Rodríguez N. Método de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección temprana de *Leptospira* spp. en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59(1): 71-2.

Obregón AM, Fernández C, **Rodríguez I**, Rodríguez J. The application of monoclonal antibody methodology as a tool for serotyping leptospira isolates in Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59(1): 68-70.

Fernández-Molina C, Rodríguez-Preval N, **Rodríguez-González I**, Agnese-Latino M, Rivera-Tapia JA, Ayala-Rodríguez I. Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por amplificación del gen MgPa y el gen ARN ribosomal 16S. *Salud Pública Méx* 2008; 50 (5):358-61.

Echevarria E, Fernández C, Rodríguez NM, **Rodríguez I**, Zamora Y. Detección e identificación de micoplasmas y ureaplasmas en pacientes con síntomas uretrales. *Revista de Investigaciones Médicoquirúrgicas* 2009; 1(1):102.

**Rodríguez I**. Diagnóstico de laboratorio de sífilis venérea. En: Colectivo de autores. *Manual de técnicas diagnósticas de las infecciones del tracto reproductivo*. Ecimed: La Habana, 2009. (ISBN 978-959-212-386-1).

Verdasquera D, Ortega LM, **Rodríguez I**, Zamora Y, Rodríguez E, Campillo D, Miyar R. Diseño de un instrumento para evaluar el nivel de conocimientos, sobre leptospirosis humana, en médicos de la atención primaria de salud. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2010; 26(3): 455-66.

Verdasquera D, Ortega LM, Fernández C, Obregón AM, **Rodríguez I**, Miyar R. Enfrentamiento a brotes epidémicos de leptospirosis humana. *Rev Panam Infectol* 2011; 13(1): 28-35.

Obregón AM, Fernandez C, Martínez I, Llop A, **Rodríguez I**, Rodríguez J, Rodríguez Y, Valdés Y. Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2011; 63(3): 0-0 (Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol63\\_3\\_11/mtr07311.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol63_3_11/mtr07311.htm)).