



# Primera evidencia molecular de borreliosis y leptospirosis en un humano de Sinaloa, México

Luis Tinoco-Gracia<sup>1</sup> · Pedro Rodríguez-Peñuelas<sup>2</sup> · Sawako Hori-Oshima<sup>1</sup> · Gerardo E. Medina-Basulto<sup>1</sup> · Gilberto López-Valencia<sup>1</sup> · Alma Rossana Tamayo-Sosa<sup>1</sup> · Alberto Barreras-Serrano<sup>1</sup> · Tomás B. Rentería-Evangelista<sup>1</sup> · Tonatiuh Melgarejo<sup>3</sup> · Jorge Field-Cortazares<sup>4</sup>

## RESUMEN

La borreliosis, conocida como enfermedad de Lyme, es una zoonosis de distribución mundial transmitida por garrapatas y producida por los diversos genotipos del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato. La leptospirosis es la enfermedad zoonótica más ampliamente distribuida en el mundo, es producida por diversas serovariedades de *Leptospira interrogans* y ocasiona más de un millón de casos por año. Este trabajo tiene como objetivo la detección y demostración molecular, por medio de PCR, del agente etiológico (*B. burgdorferi* y *L. interrogans*) en una muestra sanguínea de un humano positivo a espiroquetosis (por microscopía de campo oscuro), residente de Culiacán, Sinaloa, México. En este estudio se incluyó una muestra sanguínea de una paciente con manifestaciones clínicas compatibles a leptospirosis y borreliosis. La muestra analizada por PCR resultó positiva para *B. burgdorferi* y *L. interrogans*; se detectó una fracción del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu lato y otra del gen *ligA* de *L. interrogans*. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados para la

## ABSTRACT

Borreliosis, known as Lyme disease, is a zoonosis caused by the various genotypes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex; Its distribution is worldwide and is transmitted by ticks. Leptospirosis is the most widely distributed zoonotic disease in the world, is caused by various *Leptospira interrogans* serovars and causes more than a million cases per year. The objective of this work is the molecular detection and demonstration, by means of PCR, of the etiological agent (*B. burgdorferi* and *L. interrogans*) in a blood sample from a human positive to spiroketosis (by dark field microscopy), resident of Culiacán, Sinaloa, Mexico. A blood sample from a patient with clinical manifestations compatible with leptospirosis and borreliosis was included in this study. The sample analyzed by PCR was positive for *B. burgdorferi* and *L. interrogans*; a fraction of the *fla* gene of *B. burgdorferi* sensu lato and another of the *ligA* gene of *L. interrogans* were detected. The obtained PCR products were sequenced for confirmation of the molecular diagnosis of both spirochetosis: borre-

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, B.C., México.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>3</sup>Translational Medicine & Antimicrobial Resistance, College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences.

<sup>4</sup>Departamento de Pediatría e Infectología, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California.

\* Correspondencia: Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Carretera San Felipe Km. 3.5 s/n, Fraccionamiento Campestre • C.P. 21386, Mexicali, Baja California. México.  
Teléfono: +52 (686) 563-6906 • e-mail: tinoco.luis@uabc.edu.mx

confirmación del diagnóstico molecular de ambas espiroquetosis: borreliosis y leptospirosis. La secuenciación de los productos de *fla* obtenidos por PCR mostró 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto y para *ligA* fue de 99% con *L. interrogans*. Los resultados de este estudio indican la necesidad de confirmar el resultado de microscopia de campo oscuro con métodos más confiables; la PCR mostró ser eficaz para detectar *B. burgdorferi* sensu stricto y *L. interrogans*, a partir de una muestra sanguínea.

## PALABRAS CLAVE

Borreliosis, enfermedad de Lyme, leptospirosis, reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

liosis and leptospirosis. The sequencing of the *fla* products obtained by PCR showed 99% homology with *B. burgdorferi* sensu stricto and for *ligA* it was 99% with *L. interrogans*. The results of this study indicate the need to confirm the result of dark field microscopy with more reliable methods; PCR proved to be effective in detecting both *B. burgdorferi* sensu stricto and *L. interrogans* from a blood sample.

## KEY WORDS

Borreliosis, Lyme disease, leptospirosis, polymerase chain reaction, PCR.

## Introducción

La borreliosis, conocida como enfermedad de Lyme, es una zoonosis de distribución mundial transmitida por garrapatas y producida por los diversos genotipos del complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato.<sup>1-5</sup> *B. burgdorferi* (Figura 1) es capaz de infectar a roedores, ciervos, perros, gatos, vacas, caballos, reptiles, aves y a varias especies de garrapatas, además del humano.<sup>6-7</sup> En los Centros para Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Atlanta, Georgia, se han reportado 157 410 casos de borreliosis en humanos entre 1990 y 2001. En 2002 se reportaron 23 763 solo en Estados Unidos.<sup>8</sup> Un estudio analizó 2 346 sueros sanguíneos (mediante ELISA y confirmados con Western blot) para el diagnóstico de *B. burgdorferi* en residentes de la Ciudad de México y el noreste de la República Mexicana, y se encontró una prevalencia de 3.4% y 6.2%, respectivamente.<sup>9</sup> Además, cuatro pacientes residentes de la Ciudad de México que fueron mordidos por garrapatas —tras haber visitado parques forestales (tres en la Ciudad de México y uno en Quintana Roo)— resultaron positivos por PCR, a partir de biopsias de piel, a *B. burgdorferi*; se utilizaron iniciadores para el gen de flagelina, uno de los cuales resultó también positivo por secuenciación al gen *ospA*.<sup>10</sup> Algunos casos sugestivos de enfermedad de Lyme fueron descritos a principios de la década de 1990 en los estados de Sinaloa y Nuevo León; sin embargo, no se ha logrado la confirmación etiológica.<sup>11</sup>

La leptospirosis es la enfermedad zoonótica más ampliamente distribuida en el mundo, con más de un millón de casos por año.<sup>12-13</sup> El humano puede infectarse, por contacto directo o indirecto, con la orina de animales infectados por *Leptospira interrogans* patógenas, ya sea de granja, de compañía o fauna silvestre;<sup>13</sup> los roedores son los principales vectores de esta enfermedad.<sup>14</sup> La leptospirosis se caracteriza por fiebre aguda (fase de leptospirémica), con tendencia a la progresión, y causa daño severo y multisistémico, como falla renal, disfunción hepática, síndrome hemorrágico pulmonar, miocarditis y meningoencefalitis. Además, las leptospiras pueden persistir en lugares inmunoprivilegiados, como la cámara anterior y el cuerpo vítreo del ojo, así como los túbulos renales, y causar daño.<sup>13-15</sup> Existe evidencia serológica de la enfermedad en Sinaloa, Jalisco, Ciudad de México, Chiapas, Puebla y Chihuahua, pero no evidencia molecular. En 2012, la Secretaría de Salud, por medio de la Dirección General de Epidemiología (DGE), confirmó 481 casos positivos de leptospirosis humana; Tabasco resultó el estado más afectado, con 255 pacientes.<sup>16</sup> La microscopía de campo oscuro (Figura 2) es un medio ampliamente utilizado para el diagnóstico de borreliosis y leptospirosis, aunque su baja sensibilidad y especificidad requiere la confirmación por otros métodos (inmunofluorescencia, aglutinación microscópica y PCR).<sup>15,17-19</sup>

Este trabajo tiene como objetivo reportar la detección molecular, mediante PCR, de *B. burgdorferi* y *L. interrogans*, en una



Figura 1. *B. burgdorferi*, causante de la enfermedad de Lyme.

muestra sanguínea de un humano positivo a espiroquetosis por microscopía de campo oscuro, de Culiacán, Sinaloa, México.

## Materiales y métodos

En este estudio se incluyó una muestra sanguínea de una paciente procedente de Culiacán, Sinaloa, México, con manifestaciones clínicas compatibles con leptospirosis. La muestra fue colectada por personal calificado, bajo la supervisión del Dr. Pedro Rodríguez Peñuelas (docente e investigador de la Universidad Autónoma de Sinaloa). La extracción del ADN y la PCR se realizaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

La paciente, de 23 años, fue portadora de síndrome migrañoso de cinco años de evolución, con diagnóstico inicial de leptospirosis (por microscopía de campo oscuro) en septiembre de 2008. En abril de 2009 presentó síndrome de Well y se confirmó la presencia de múltiples espiroquetas en sangre. En 2012, presentó recaída con datos de pancreatitis, neumonitis y neuritis óptica (confirmados por TAC tóraco-abdominal, ultrasonido abdominal y colangiografía magnética). En 2013 ocurrió un nuevo episodio de pancreatitis clínica (lipasemia: 6 240 UI) y se descartó patología autoinmune. En todos los eventos clínicos, la paciente se sometió a tratamiento antimicrobiano con

carbapenémicos, dado el antecedente de alergia a cefalosporinas y penicilinas. Tras el último esquema terapéutico con ertapenem, no se presentaron eventos clínicos activos sugerentes de enfermedad.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy® Blood&Tissue (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el diagnóstico molecular se utilizaron dos juegos de iniciadores: uno cuyo blanco fue el gen *fla* codificante de la flagelina bacteriana, para detectar *B. burgdorferi* sensu lato (iniciadores utilizados: FLA-107 [5'TTAATCGAGCTTCTGATGATGCTGC] y FLA-335 [5'ATTTCGTCTGTAAGTTGCTCTATTCAA]), con un tamaño esperado de producto de 256 pares de bases (pb) por PCR;<sup>20</sup> y otro cuyo blanco fue el gen *ligA* codificante de una inmunoglobulina leptospiral parecida, para detectar *L. interrogans* patógenas (iniciadores utilizados: LIG1 [TCAATCAAACAAGGGGCT] y LIG2 [ACTTGCATTGGAAATTGAG]), con un tamaño esperado de producto de 468 pb por PCR.<sup>21-23</sup> El protocolo de PCR, en ambos casos, inició con un calentamiento a 95 °C durante cinco minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 segundos, hibridación a 55 °C durante 40 segundos y



Figura 2. Equipo para microscopía de campo oscuro ensamblado en un microscopio invertido de fluorescencia de alta tecnología.

extensión a 72 °C durante 40 segundos, y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos.<sup>20,24</sup>

Para prevenir la contaminación de las muestras, los procesos de preparación, extracción del ADN, amplificación y detección de productos por PCR se realizaron en diferentes áreas del laboratorio.<sup>25</sup> Los productos de amplificación por PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE (tris-acetato EDTA 1X), conteniendo el colorante de ácidos nucleicos GR Safe®, en lugar de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación al Laboratorio *Eurofins MWG Operon de Huntsville*, en Alabama, EE.UU., y los resultados fueron analizados con el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

## Resultados y discusión

La muestra analizada por PCR resultó positiva tanto para *B. burgdorferi* como para *L. interrogans*. Asimismo, se detectó una fracción del gen *fla* de *B. burgdorferi* sensu stricto y otra del gen *LigA* de *L. interrogans*. Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar para la confirmación del diagnóstico molecular de ambas espiroquetosis. La secuenciación de los productos obtenidos por PCR del gen *fla* mostró 99% de homología con *B. burgdorferi* sensu stricto y 94% del gen *LigA* con *L. interrogans*. La muestra sanguínea en estudio previamente fue diagnosticada como espiroquetosis (presumiblemente leptospirosis) por microscopia de campo oscuro, debido a la apariencia morfológica general de la bacteria.

Las evidencias moleculares en este trabajo confirman la existencia de *B. burgdorferi* sensu stricto y de *L. interrogans* en una muestra sanguínea de un humano residente de Culiacán, Sinaloa, México; es la primera vez que se confirma

borreliosis y leptospirosis en humanos en esta ciudad mediante diagnóstico molecular.

Los resultados de este estudio indican la necesidad de confirmar los datos obtenidos por microscopia de campo oscuro con métodos más confiables. La PCR ha mostrado ser eficaz para detectar tanto *B. burgdorferi* sensu stricto como *L. interrogans*, a partir de una muestra sanguínea.

## Conclusiones

Este es el primer caso reportado en la literatura mexicana de una coinfección por espiroquetas; no obstante, a diferencia de lo que ocurre con la leptospirosis, cada vez se reportan más casos aislados de borreliosis —como los recientemente reportados por Field-Cortazares y cols., quienes señalan una prevalencia de borreliosis de 12.2% en Ensenada, Baja California, México—.<sup>26</sup> Por su parte, García Meléndez y cols. refieren una mayor prevalencia en el noreste de México, la cual está aumentando en nuestro país desde hace 30 años. Lo anterior, enfatiza que las coinfecciones son más comunes con cepas de especies de géneros como *Ehrlichia*, *Bartonella* y *Babesia*, y no tanto con *L. interrogans*, en pacientes con enfermedad de Lyme (particularmente en aquellos con enfermedad crónica).<sup>27</sup>

Las tasas de prevalencia e incidencia de leptospirosis humana —desde los primeros reportes en México— han sido variables, debido al empleo de diferentes pruebas y laboratorios, así como a las discrepancias en los valores y criterios en la interpretación de los resultados. Independientemente de ello, los estudios recientes sugieren que la enfermedad de Lyme es más grave y resistente al tratamiento en pacientes coinfectados, por lo que son obligatorias la detección y tratamiento concurrente de las coinfecciones, como en el caso que aquí presentamos.<sup>28-29</sup>

## REFERENCIAS

- Escudero R, Barral M, Perez A, et al. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4026-33.
- Liveris D, Varde S, Iyer R, et al. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):565-9.
- Qiu WG, Dykhuizen DE, Acosta MS, Luft BJ. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. *Genetics* 2002;160(3):833-49.
- Thomas V, Anguita J, Barthold SW, Fikrig E. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect*

- Immun 2001;69(5):3359-71.
5. Yoshinari NH, Abrao MG, Bonoldi VL, et al. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98(3):311-8.
  6. Faul JL, Doyle RL, Kao PN, Ruoss SJ. Tick-borne pulmonary disease: update on diagnosis and management. Chest 1999;116(1):222-30.
  7. Straubinger RK. PCR-Based Quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day post-infection period. J Clin Microbiol 2000;38(6):2191-9.
  8. CDC. Lyme Disease. United States, 2001-2002. CDC 2004;53(17):365-9.
  9. Gordillo-Pérez G, Torres J, Solorzano-Santos F, et al. Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the northeast of the Mexican Republic. Salud Publica Mex 2003;45(5):351-5.
  10. Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F, et al. *Borrelia burgdorferi* infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. Emerg Infect Dis 2007;13(10):1556-8.
  11. Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F, et al. Estudio seroepidemiológico de borreliosis de Lyme en la Ciudad de México y el noreste de la República Mexicana. Salud Publica Mex 2003;45(5):351-5.
  12. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases 2003;3(12):757-71.
  13. Levett PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 2001;14(2):296-326.
  14. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature Reviews Microbiology 2009;7(10):736-47.
  15. Koizumi N, Muto MM, Akachi S, et al. Molecular and serological investigation of leptospira and leptospirosis in dogs in Japan. J Med Microbiol 2013;62(Pt-4):630-6.
  16. Flisser A, Velasco-Villa A, Martínez-Campos C, et al. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. Archives of Medical Research 2002;33(4):343-50.
  17. Salud/DGE/SINAVE. Notificación semanal de casos nuevos de enfermedad. [Internet]. 2012. [Consultado el 30 de septiembre de 2020]. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/28\\_2012\\_Manual\\_SUIVE\\_vFinal\\_24oct12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/28_2012_Manual_SUIVE_vFinal_24oct12.pdf)
  18. Benacer D, Mohd-Zain SN, Amran F, et al. Isolation and molecular characterization of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* isolates from the urban rat populations of Kuala Lumpur, Malaysia. Am J Trop Med Hyg 2013;88(4):704-9.
  19. Costa IP, Bonoldi VL, 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):631-5.
  20. Germer J, Ryckmann B, Moro M, et al. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* with a microtiter-based competitive polymerase chain reaction assay. Molecular Diagnosis 1999;4(3):185-93.
  21. Figueira CP, Croda J, Choy HA, et al. Heterologous expression of pathogen-specific genes ligA and ligB in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. BMC Microbiol 2011;11:129.
  22. Matsunaga J, Barocchi M, Croda J, et al. Pathogenic leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol 2003;49(4):929-45.
  23. McBride A, Cerqueira G, Suchard M, et al. Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. Infect Genet Evol 2009;9(2):196-205.
  24. Palaniappan R, Chang Y, Chang C, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol Cell Probes 2005;19(2):111-7.
  25. Chang YF, Novosol V, McDonough SP, et al. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to ixodid ticks. Vet Pathol 2000;37(1):68-76.
  26. Field-Cortázar J, Tinoco Gracia L, Escárcega Ávila AM, et al. Seroprevalencia de *Borrelia burgdorferi* en Ensenada, Baja California, Mexico. Rev Enferm Infec Pediatr 2019;32(130):1586-90.
  27. García-Meléndez ME, Skinner TC, Salas JC, Ocampo CJ. Enfermedad de Lyme: Actualizaciones. Gac Med Méx 2014;150(1):84-95.
  28. Torres-Castro M, Hernandez-Betancourt S, Agudelo-Florez P, et al. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Rev Med Inst Mex Seg Soc 2016;54(5):620-5.
  29. Cameron D, Gaito A, Harris N, et al. Evidence-based guidelines for the management of Lyme disease. Expert Review of Anti-infective Therapy 2004;2:S1-13.

Este artículo debe citarse como:

Tinoco-Gracia L, Rodríguez-Peñuelas P, Hori-Oshima S, Medina-Basulto GE, López-Valencia G, Tamayo-Sosa AR, Barreras-Serrano A, Rentería-Evangelista TB, Melgarejo T, Field-Cortázar J. Primera evidencia molecular de borreliosis y leptospirosis en un humano de Sinaloa, México. Rev Enferm Infec Pediatr 2020;33(133):1727-31.