

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

BORRELIOSIS DE LYME: ESTUDIO DE POSIBLES
VECTORES IXÓDIDOS Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

AMANDA ESTRELLA NAVARRO GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7 de Mayo de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Enrique Hernández Giménez
- D. Javier Hernández Haba
- Dña. Olivia Gironés Puñet
- D. José Guillermo Esteban Sanchis
- D. Rafael Borrás Salvador

Va ser dirigida per:

D. Carlos Muñoz Collado

Dña. Teresa Fraile Fariñas

©Copyright: Servei de Publicacions
Ramón Gómez - Ferrer Sapiña

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6214-4

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I
ECOLOGIA**

**Borreliosis de Lyme:
estudio de posibles vectores ixódidos y
evaluación de métodos de diagnóstico microbiológico.**

Tesis Doctoral

Amanda Estrella Navarro García

Valencia, octubre de 2003

A mi querido esposo, por su gran paciencia y colaboración.

A mis hijos y a mis padres.

A mis hermanos y amigos...

Agradecimientos

A los profesores Dra. María Teresa Fraile Fariñas y Dr. Carlos Muñoz Collado, mi más sincero agradecimiento por haber hecho posible la conclusión de esta tesis, que hasta no hace mucho tiempo sólo era un sueño por realizar. Su orientación científica y consejos fueron de gran valor para el desarrollo del presente trabajo.

Al profesor Dr. Rafael Borrás Salvador, que como director de la Sección de Medicina del Departamento de Microbiología y Ecología, me aceptó como doctoranda y animó mis investigaciones en los momentos de dificultad con su buen criterio y sentido del humor.

Al profesor y posteriormente amigo Dr. José Guillermo Esteban Sanchís, por la formación en Parasitología que de él recibí.

Mi más sincero aprecio a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han colaborado para que este trabajo llegara a buen término, especialmente mis compañeros de trabajo en el Hospital General de Valencia: Dr. Rafael Torregrosa, presidente de la comisión de docencia M.I.R. (por darme la idea de aprovechar el tiempo). Rosario Lucían, Jefa de la Unidad de Microbiología, por sus consejos y por prestarme la infraestructura del laboratorio durante las guardias y libradas de las mismas. Dr. Salvador Donderis. Dra. Goixane Marcaida. Dra. Mercedes Chanzá. Enrique Chirivella (biólogo gran proveedor de garrapatas). Carmen Martí (enfermera y artista). América Máñez (por compartir secretos). Pilar Timoneda (mi "residente mayor"). Al inconformista Julián Coso, Elisa Aznar, Paco Aguirre, Teresa Valls, Vicenta Coso, Amparo Salvador...

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia que colaboraron y facilitaron las diferentes tareas que allí realicé, por su cálida acogida y el trato familiar dispensado, y especialmente a la Dra. María Rosa Navarro, Dra. Victoria Domínguez y a Remedios Guna, compañeras de fatigas investigadoras. A la anatomopatóloga Carmen Cardá por su excelente ayuda.

1.-Índice

1.-	Introducción	12
1.1.-	Características microbiológicas de <i>Borrelia</i> spp	14
1.1.1.-	Clasificación y nomenclatura	14
1.1.2.-	Estructura bacteriana de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	17
1.1.3.-	Características fisiológicas y de cultivo	19
1.1.4.-	Determinantes patogénicos	20
1.2.-	Borreliosis de Lyme	22
1.2.1.-	Patogenia	22
1.2.2.-	Vectores implicados en la transmisión	25
1.2.2.1.-	Clasificación de vectores ixódidos	27
1.2.2.2.-	Ciclo biológico de ixódidos	29
1.2.2.3.-	Hábitats y reservorios de ixódidos	31
1.2.3.-	Características epidemiológicas de la borreliosis de Lyme	33
1.2.4.-	Manifestaciones clínicas	35
1.2.4.1.-	Borreliosis localizada precoz	36
1.2.4.2.-	Infección diseminada precoz	38
1.2.4.3.-	Infección diseminada tardía	41
1.3.-	Diagnóstico microbiológico de la borreliosis de Lyme	44
1.3.1.-	Métodos directos	44
1.3.1.1.-	Observación microscópica	45
1.3.1.2.-	Cultivo de muestras clínicas	35
1.3.1.3.-	Detección de antígenos específicos	47
1.3.1.4.-	Amplificación de ADN mediante reacción de la polimerasa (PCR) y sondas de ADN	48
1.3.1.5.-	Inoculación animal	41
1.3.2.-	Métodos indirectos	52
1.3.2.1.-	Inmunofluorescencia indirecta	53
1.3.2.2.-	Enzimoimmunoanálisis (EIA)	54
1.3.2.3.-	Inmunotransferencia o Western blot	55
1.3.2.4.-	Otros métodos serológicos	58
1.4.-	Criterios de diagnóstico clínico	59
1.5.-	Profilaxis y tratamiento	60
1.5.1.-	Profilaxis antimicrobiana y vacunación	61
1.5.2.-	Tratamiento de la borreliosis	63

2.-	Objetivos	64
3.-	Material y Métodos	67
3.1.-	Estudio de población de ixódidos	68
3.1.1.-	Periodo de estudio y áreas analizadas	68
3.1.2.-	Obtención de garrapatas	71
3.1.3.-	Caracterización y clasificación de ixódidos	71
3.1.4.-	Detección de <i>Borrelia burgdorferi sl.</i>	77
3.1.4.1.-	Macerado y disección de garrapatas	77
3.1.4.2.-	Examen microscópico de macerados y disecciones	78
3.1.4.3.-	Cultivo en medio BSK II	79
3.1.4.4.-	Amplificación de ADN específico (nested PCR)	80
3.1.4.4.1.-	Obtención de ácidos nucleicos	81
3.1.4.4.2.-	Amplificación y detección de ADN de <i>Borrelia Burgdorferi sl.</i>	82 75
3.2.-	Diagnóstico de borreliosis en muestras clínicas	87
3.2.1.-	Periodo de estudio y muestras analizadas	81
3.2.2.-	Criterios de selección de muestras clínicas	88
3.2.3.-	Diagnóstico serológico	89
3.2.3.1.-	Enzimoinmunoanálisis	89
3.2.3.2.-	Estudio de reactividad cruzada	90
3.2.3.2.1.-	Serología luética	90
3.2.3.2.1.1.-	Rapid Plasma Reagin Card Test	90
3.2.3.2.1.2.-	Microhemaglutinación treponémica ..	91
3.2.3.2.1.3.-	Inmunofluorescencia indirecta	92
3.2.3.2.2.-	Análisis de Fiebre Q	93
3.2.3.2.3.-	Análisis de Fiebre Botonosa Mediterránea	93
3.2.3.2.4.-	Análisis de Brucellosis	94
3.2.3.2.5.-	Análisis de Citomegalovirus	94
3.2.3.2.6.-	Análisis de virus Epstein-Barr	95
3.2.3.2.7.-	Análisis de virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH)	95
3.2.3.3.-	Inmunofluorescencia indirecta	95
3.2.3.4.-	Inmunotransferencia (Western blot)	96
4.-	Resultados	99
4.1.-	Detección de <i>Borrelia burgdorferi sl.</i> en vectores ixódidos	100
4.1.1.-	Población de ixódidos obtenidos	100

4.1.2.-	Evaluación microscópica de macerados y disecciones	104
4.1.3.-	Evaluación del cultivo en medio BSK II	106
4.1.4.-	Evaluación de la amplificación de ADN específico (nested PCR)	107
4.2.-	Diagnóstico de borreliosis en muestras clínicas	112
4.2.1.-	Muestras clínicas analizadas	112
4.2.2.-	Muestras reactivas seleccionadas	113
4.2.3.-	Resultados del estudio de reactividad cruzada	118
4.2.4.-	Resultados de la inmunofluorescencia indirecta frente a <i>B. burgdorferi</i>	119
4.2.5.-	Resultados de la inmunotransferencia (Western blot)	123
4.2.5.1.-	Resultados de la inmunotransferencia con antígenos de <i>Borrelia burgdorferi</i>	123
4.2.5.2.-	Resultados de la inmunotransferencia con antígenos de <i>Borrelia garinii</i>	131
4.2.5.3.-	Resultados serológicos en el grupo control	136
4.2.5.4.-	Comparación de los resultados de la inmunotransferencia para <i>Bb.</i> y <i>Bg.</i>	137
3.2.5.5.-	Correlación entre enzimoanálisis e inmunotransferencia	143
3.2.5.6.-	Correlación entre los resultados de la inmunofluorescencia e inmunotransferencia	145
4.3.-	Análisis de variables clínicas	148
4.3.1.-	Descripción de los pacientes de estudio	148
4.4.-	Correlaciones de variables clínicas y de laboratorio	154
5.-	Discusión	161
5.1.-	Sobre la presencia de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> en las garrapatas estudiadas	162
5.2.-	Respecto al diagnóstico microbiológico de borreliosis de Lyme	165
5.3.-	Sobre el perfil clínico de los pacientes estudiados	171
6.-	Conclusiones	176
7.-	Bibliografía	179

Índice de figuras.

Figura 3.1a.-	Área de salud número 5, con las poblaciones de Riba-roja	70
Figura 3.1b.-	Área de salud número 6, con las poblaciones de Chiva	70
Figura 3.1c.-	Área de salud número 7, con las poblaciones de Requena y Utiel	71
Figura 3.1d.-	Área de salud número 8, con las poblaciones de Torrent y Monserrat	71
Figura 3.2.-	Algoritmo con las características principales de género de las garrapatas ixódidas	72
Figura 3.3.-	Algoritmo con las características diferenciales de especies del género <i>Dermacentor</i>	74
Figura 3.4.-	Algoritmo con las características diferenciales de especies del género <i>Rhipicephalus</i>	75
Figura 3.5.-	Algoritmo con las características principales de especies del género <i>Haemaphysalis</i>	75
Figura 3.6.-	Algoritmo con las características diferenciales de especies del género <i>Hyalomma</i>	76
Figura 3.7.-	Procedimiento de cultivo de fracciones de garrapatas en medio BSK II ..	80
Figura 4.1.-	Distribución de especies de garrapatas en las poblaciones estudiadas	103
Figura 4.2.-	Observación microscópica (100X) de un macerado de ixódido tras su tinción de Gram	105
Figura 4.3.-	Observación microscopía (1000X) tras disección de ixódido y su tinción mediante Giemsa	107
Figura 4.4.-	Resultados de la amplificación de la secuencia del gen de la lipoproteína de membrana OspA	110
Figura 4.5.-	Resultado de la amplificación de la secuencia del gen de la flagelina (fla)	111
Figura 4.6.-	Porcentaje de muestras reactivas mediante EIA VIDAS en cada año del periodo de estudio	112
Figura 4.7.-	Porcentaje de títulos de IFI IgG, en las muestras seleccionadas	122
Figura 4.8.-	Correlación de EIA VIDAS positivo y dudoso con la inmunofluorescencia para <i>B. burgdorferi</i> IgM	123

Figura 4.9.-	Resultados de la inmunotransferencia con resultado positivo para la IgM de <i>B. burgdorferi</i>	126
Figura 4.10.-	Distribución de bandas observadas en las muestras con resultado negativo mediante Wb para IgM frente a <i>B. burgdorferi</i> IgG	126
Figura 4.11.-	Wb para IgM frente a <i>B. burgdorferi</i>	127
Figura 4.12.-	Distribución de bandas reactivas para la inmunotransferencia de <i>B. burgdorferi</i> IgG	129
Figura 4.13.-	Frecuencia de reactividad frente a las proteínas de <i>B. burgdorferi</i> por anticuerpos IgG	130
Figura 4.14.-	Wb para IgG frente a <i>B. burgdorferi</i>	131
Figura 4.15.-	Wb para IgM frente a <i>B. garinii</i>	133
Figura 4.16.-	Wb para IgG frente a <i>B. garinii</i>	134
Figura 4.17.-	Distribución de bandas reactivas para inmunotransferencia IgM IgG con antígenos de <i>B. burgdorferi</i> en sueros de controles sanos	137
Figura 4.18.-	Resultados de la inmunotransferencia de <i>B. Burgdorferi</i> y <i>B. Garinii</i> Para IgM	140
Figura 4.19.-	Correlación EIA VIDAS positivo y dudoso con la inmunotransferencia para <i>B. burgdorferi</i> IgG.	144
Figura 4.20.-	Correlación VIDAS positivo y dudoso con la inmunotransferencia para <i>B. garinii</i> IgG.	145
Figura 4.21.-	Distribución y frecuencia de la población de pacientes según procedencia por servicios	148
Figura 4.22.-	Distribución de la toda población de pacientes según edad y sexo	149

Índice de tablas.

Tabla 3.1.-	Secuencia del gen OspA de <i>B. burgdorferi</i> y localización de oligonucleótidos cebadores	83
Tabla 3.2.-	Condiciones de la amplificación de la secuencia del gen de OspA	85
Tabla 3.3.-	Condiciones de las reacciones de amplificación de la secuencia del gen de la flagelina	86
Tabla 3.4.-	Secuencia del gen de la flagelina de <i>B. burgdorferi</i> y localización de oligonucleótidos cebadores utilizados	87
Tabla 4.1.-	Distribución de especies de ixódidos caracterizadas	100
Tabla 4.2.-	Distribución de garrapatas obtenidas en cada población	105
Tabla 4.3.-	Distribución de especies empleadas para examen microscópico	104
Tabla 4.4.-	Distribución de especies empleadas tras macerado o disección en el cultivo en medio BSK II	107
Tabla 4.5.-	Distribución de especies empleadas en el estudio nested PCR	108
Tabla 4.6.-	Lotes analizados y resultados de la nested PCR para el gen OspA y para el gen Fla	117
Tabla 4.7.-	Distribución anual de muestras clínicas y pacientes analizados	112
Tabla 4.8.-	Distribución anual de muestras y de pacientes, con resultado de VIDAS positivo o dudoso, respecto a sus totales	113
Tabla 4.9.-	Distribución de pacientes seleccionados por su reactividad en la pruebas de EIA VIDAS según año, servicio y sexo	114
Tabla 4.10.-	Muestras con resultado EIA VIDAS positivo o dudoso y resultado luético positivo	118
Tabla 4.11.-	Resultado de EIA VIDAS y su correlación con IFI IgM e IgG	120
Tabla 4.12.-	Bandas reactivas e interpretación del Wb con antígenos de <i>B. burgdorferi</i> para IgM	124
Tabla 4.13.-	Bandas reactivas e interpretación del Wb con antígenos de <i>B. burgdorferi</i> para IgG	128
Tabla 4.14.-	Resultados de la inmunotransferencia de <i>B. garinii</i> para IgM	132
Tabla 4.15.-	Resultados de la inmunotransferencia de <i>B. garinii</i> para IgG	135
Tabla 4.16.-	Resultados de las muestras analizadas mediante ambos métodos de inmunotransferencia para IgM	138
Tabla 4.17.-	Resultados de muestras analizadas mediante ambos métodos de inmunotransferencia para IgG	141
Tabla 4.18.-	Correlación de resultados mediante VIDAS y Wb IgM	143

Tabla 4.19.- Correlación de resultados mediante VIDAS y Wb IgG	137
Tabla 4.20.- Correlación entre los resultados para anticuerpos IgG mediante IFI y Wb <i>B. burgdorferi</i>	146
Tabla 4.21.- Correlación entre los resultados para anticuerpos IgG mediante IFI y Wb <i>B. garinii</i>	147
Tabla 4.22.- Distribución de síntomas y signos relevantes entre los pacientes estudiados	150
Tabla 4.23.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico neurológico y resultados de Wb mediante <i>B. burgdorferi</i>	155
Tabla 4.24.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico neurológico y resultados de Wb mediante <i>B. garinii</i>	157
Tabla 4.25.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico general-articular y resultados de Wb mediante <i>B. burgdorferi</i>	158
Tabla 4.26.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico general-articular y resultados de Wb mediante <i>B. garinii</i>	159
Tabla 4.27.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico cutáneo y resultados de Wb mediante <i>B. Burgdorferi</i> y <i>B. Garinii</i>	160

1.-Introducción

La borreliosis de Lyme (BL) es una zoonosis multisistémica, con expresión clínica y repercusiones muy variables, relacionada con la transmisión accidental a través de garrapatas, principalmente del género *Ixodes*, e infectadas por microorganismos bacterianos del género *Borrelia*. Después de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es la enfermedad infecciosa que más gasto deriva en investigación (Spapach *et al.*, 1993).

Esta enfermedad infecciosa adquirió un interés relevante en la década de los años setenta, en concreto tras los estudios realizados por Steere y colaboradores en 1977, en una población de niños y sus familiares, afectos de una artritis inexplicable de carácter epidémico en las comunidades de Lyme, Old Lyme y East Haddam en el estado de Connecticut, al noroeste de los Estados Unidos.

En Europa, sin embargo, el conocimiento y descripción de cuadros nosológicos similares es anterior a esa fecha, aunque fueron asociados posteriormente a diversas especies del género *Borrelia* spp. Así, en el siglo XIX, Buchwald *et al.* (1893) describieron un cuadro cutáneo crónico similar al que posteriormente Hauser *et al.* (1955) denominaron acrodermatitis crónica atrófica (ACA) y a principios del siglo XX, Afzelius, reconoció el eritema crónico *migrans* como una nueva identidad (Afzelius *et al.*, 1910). Posteriormente en 1918, Lipschütz y colaboradores describieron una afección cutánea (eritema *migrans* de Lipschütz) como entidad única o asociada a manifestaciones neurológicas (Lipschütz *et al.*, 1918). También en Francia y Austria se describieron numerosos cuadros neurológicos en relación con la picadura de la garrapata del género *Ixodes* (Garin-Bujadoux, 1922; Bannwarth *et al.*, 1944).

El conocimiento etiológico de las afecciones descritas se inició en 1948, con la observación de espiroquetas en las lesiones cutáneas mediante métodos de impregnación argéntica, demostrándose el carácter infeccioso tras la inoculación experimental de tejido obtenido de la periferia de un eritema crónico *migrans* (Sonck *et al.*, 1965). De manera concluyente, el papel etiológico bacteriano quedó definido por la adecuada respuesta observada entre pacientes afectos de lesiones cutáneas o cuadros neurológicos tras la indicación de tratamiento mediante penicilina (Weber *et al.*, 1974).

Pese a los antecedentes conocidos en Europa, no es hasta la descripción del brote de artritis en 1975 entre la población de Lyme, que se inicia y desarrolla una investigación profunda y sistemática de los diferentes cuadros clínicos asociados a *Borrelia* spp. En gran medida, la naturaleza y características del brote epidémico determinó el interés por esta patología, al presentarse asociados los diferentes cuadros sindrómicos referidos y otras manifestaciones que nunca antes habían sido claramente definidas. Permitió establecer diferentes referencias que sirvieron, y sirven en la actualidad, para el estudio de esta enfermedad, como son el predominio de artritis agudas monoarticulares y oligoarticulares de corta duración, el agrupamiento familiar de los casos o la incidencia similar en todas las edades, y especialmente la existencia de un antecedente de picadura por garrapatas con o sin aparición de lesiones cutáneas.

La denominación de enfermedad de Lyme, consensuada en 1978, reconoce la asociación de múltiples expresiones clínicas más amplias que la única presencia de artritis. En 1985, se propuso la denominación de borreliosis de Lyme, si bien posteriormente diversos autores han sugerido la diferenciación entre borreliosis de Lyme y borreliosis europea debido a las particulares características clínicas de cada uno de los cuadros (Morel, 1988; Dammin, 1989).

1.1.- Características microbiológicas de *Borrelia* spp.

En 1982, Burgdorfer y colaboradores, obtuvieron el primer aislamiento del agente responsable de la borreliosis de Lyme en una garrapata ixódida (*Ixodes daminii*, ahora denominada *Ixodes scapularis*) recogida en el estado de Nueva York, que tras su identificación como una nueva especie del género *Borrelia* se denominó *Borrelia burgdorferi*.

1.1.1.- Clasificación y nomenclatura.

Las borrelias son un grupo de espiroquetas patógenas transmitidas por artrópodos vectores. Son estructuras unicelulares que pertenecen al Reino *Procaryotae*, División *Gracilicutes*, Clase *Scotobacteria*, Orden *Spirochaetales*, familia *Spirochetae*, género *Borrelia*. El Orden *Spirochaetales* se divide en dos familias:

Leptospiraceae y *Spirochaetaceae*. La familia *Leptospiraceae* comprende los géneros *Leptospira*, *Leptonema* y *Turneria* y la familia *Spirochaetaceae*, comprende los géneros saprófitos denominados *Spirochaeta* y *Cristospira*, el género *Treponema* que comprende especies saprofitas y patógenas, el género *Serpulinas* (en la actualidad separado de *Treponema*) y el género *Borrelia*.

Existen más de veinte especies diferentes de borrelias, inicialmente clasificadas sobre la base del artrópodo vector implicado en la transmisión o en dos categorías según su relación con cuadros febriles o enfermedad de Lyme, pero en la actualidad se tiende a una clasificación taxonómica según criterios genéticos o moleculares. Así, diferentes métodos y criterios de clasificación se han empleado para agrupar las especies patógenas: análisis de ARNr (Wallich *et al.*, 1992) estudio de proteínas de la superficie externa OspA (Boerlin *et al.*, 1992) y análisis mediante anticuerpos monoclonales e hibridación recíproca (Wilske *et al.*, 1993a).

En la actualidad, se han aislado un elevado número de cepas de *B. burgdorferi*, procedentes de distintas áreas geográficas y fuentes biológicas, que son fenotípica y genéticamente diferentes, reconociéndose once especies o subespecies distintas de *Borrelia burgdorferi* que han sido clasificadas en tres grupos genómicos dentro de un complejo denominado *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Baranton *et al.*, 1992 y Canica *et al.*, 1993) de las cuales cuatro (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, y *Borrelia valaisiana*) han sido identificadas como agentes causales de la borreliosis de Lyme y aisladas en *I. ricinus* (Picken *et al.*, 1997a; Baranton *et al.*, 1989). Las restantes especies no han sido aisladas en pacientes con borreliosis de Lyme, aunque sí en animales salvajes y garrapatas.

Así, las once especies de borrelias consideradas en la actualidad son las siguientes:

- 1.- *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (cepa B-31, Johnson *et al.*, 1984). Es la especie aislada principalmente en Estados Unidos y Canadá, y con menor frecuencia Europa (Baranton *et al.*, 1992). No se ha descrito en Rusia ni en Asia. Se asocia con mayor frecuencia a artritis.

2.- *Borrelia garinii* (cepas 20047 y NT29, Baranton *et al.*, 1992). Recibe este nombre en honor a Garin y Boujadox, que describieron la afección neurológica en Europa en 1922. Es la especie aislada con mayor frecuencia en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con neuroborreliosis.

3.- *Borrelia afzelii* (cepa VS641, Canica *et al.*, 1993). Denominada en honor al investigador sueco Afzelius, quien describió el primer caso de eritema *migrans*. Esta especie se encuentra en Europa (principalmente Europa central y Escandinavia) y Asia, particularmente en pacientes con lesiones cutáneas tardías del tipo de la acrodermatitis crónica atrófica.

4.- *Borrelia lusitaniae* (cepas PotiB2 y PotiB3). Sólo se ha aislado de modo excepcional en garrapatas obtenidas en Portugal y Europa central (Le Fleche *et al.*, 1997).

5.- Especies VS196. Aisladas en ixódidos de diversos países europeos como son, Reino Unido, Irlanda, Alemania, Holanda, Suiza.

6.- *Borrelia japonica* (cepas H014 y F63b, Kawabata *et al.*, 1993). Especie de *Borrelia*, únicamente descrita en Japón.

7.- *Borrelia andersoni* (cepas 21123 y 19857, Marconi *et al.*, 1995). Descrita en Estados Unidos, exclusivamente en garrapatas, y en Europa, donde se ha relacionado con casos de linfocitoma (Picken *et al.*, 1997b).

8.- *Borrelia. valaisiana* (cepas VS116 y M19, Wang *et al.*, 1999 y 2000; Fraenkel *et al.*, 2002). Ampliamente distribuida en Eurasia. Se ha sugerido un posible papel patogénico para el hombre al detectarse en cuadros de eritema *migrans* y acrodermitis crónica atrófica, mediante amplificación de ADN específico (PCR) aunque no ha podido cultivarse desde estas lesiones.

9.- *Borrelia. bissettii* (cepas 25015 y DN127, Assous *et al.*, 1993 y Postic *et al.*, 1998). Descrita en Estados Unidos, principalmente en el área de California.

10.-*Borrelia. tanukii* (cepa HK501, Masuzawa *et al.*, 1996). Aislada en ixódidos procedentes de Japón.

11.- *Borrelia. turdi* (cepa Ya501, Masuzawa *et al.*, 1996). Como la anterior, aislada en garrapatas obtenidas en Japón.

Otras especies de *Borrelia* responsables de patología en el hombre, se asocian a cuadros de fiebre recurrente en distintas áreas geográficas, y son principalmente vehiculadas por *Pediculus humanus* (Raoult *et al.*, 1999) y *Ornithodoros* spp. (Azad *et al.*, 1998; Dworkin *et al.*, 2002)

1.1.2.- Estructura bacteriana de *B. burgdorferi sensu lato*.

Las borrelias son espiroquetas y comparten una morfología común con *Leptospiras* y *Treponemas*, pero presentan características individuales y una variable expresión de proteínas como resultado de modificaciones metabólicas asociadas al tipo de hospedador. Además, se han referido variaciones morfológicas, antigénicas y genómicas entre los distintos aislados de *Borrelia burgdorferi* procedentes de Europa y Norteamericana.

De modo general, se presentan como bacilos finos y largos (0,2 - 0,5 μm de ancho y 10 – 30 μm de largo) de forma helicoidal dextrógira, con un número de 6 a 7 espiras. Los miembros del género *Borrelia* son las espiroquetas más largas, siendo *Borrelia burgdorferi* la más larga de todas las especies incluidas en el mismo. Son microorganismos móviles presentando un número variable de flagelos periplásmicos (entre 7 y 11). Poseen una membrana externa compuesta de glicoproteínas, que es observable en aislados de biopsias tisulares pero no en aislados procedentes de cultivos. Su pared celular se estructura de modo similar a los microorganismos Gram negativos.

A diferencia de otras bacterias, el material genómico (con un tamaño molecular medio de 935 a 955-1444 kbp) y alto contenido de adenina-timina, se dispone de forma lineal distribuido a lo largo de toda la parte interna de la membrana citoplasmática, lo que determina un particular modo de replicación de su ADN durante la división celular. El cromosoma bacteriano está formado por un conjunto de 858

genes, muchos de los cuales son responsables de la formación del aparato flagelar, y de proteínas transportadoras y diversas lipoproteínas de función aún no determinada. Por el contrario, no se han identificado genes responsables de la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos o enzimas que actúen como cofactores. Su pequeño tamaño ha sugerido un estado genético primitivo con relación a otras formas bacterianas. Además, todas las cepas de *Borrelia burgdorferi* examinadas poseen de 4 a 21 piezas de ADN extracromosómico (Barbourg *et al.*, 1988; Kitten *et al.*, 1992) estructurados en la forma superespirilar típica y en un tipo inusual de plásmido lineal, que no ha sido observado en otros microorganismos procariontes, de 16 a 175 kbp. (Casjens *et al.*, 1995). Los plásmidos representan alrededor de 400 genes adicionales y son responsables de la síntesis de lipoproteínas de membrana.

En relación a la estructura proteica de la envoltura externa, destacamos la presencia de dos lipoproteínas externas de superficie, denominadas OspA y OspB (29-31 kDa y 34 kDa respectivamente) codificadas por genes localizados en el plásmido lineal (Barbour *et al.*, 1984). La lipoproteína OspA se expresa exclusivamente en aislados procedentes de garrapatas, antes de producirse la alimentación hemática. Graft *et al.* (1984) y Dattwyler *et al.* (1989) describieron la presencia de otra lipoproteína externa de superficie, denominada OspC (22-25 kDa) que se expresa durante el proceso de transferencia desde el vector invertebrado al mamífero hospedador, se trata de una población heterogénea, de manera que durante la alimentación aumentaría la replicación o amplificación de manera selectiva de los alelos de *VlsE* ya presentes previamente. Según confirmaron Fung *et al.* (1994) la lipoproteína OspC está presente en la mayoría de las cepas europeas y sólo raramente en las cepas norteamericanas.

Así muchas poblaciones de borrelias, producen OspA y OspC cuando están los intestinos medios de la garrapata cebada, otras producen lipoproteína externa de un solo tipo y algunas no la producen; durante su permanencia en las glándulas salivares por un tiempo mayor de 54 horas, disminuye el OspA (Ohnishi *et al.*, 2001).

La obtención de anticuerpos específicos frente a las variedades de lipoproteína OspA, ha permitido establecer diferentes serotipos con utilidad epidemiológica, ya que se correlacionan con las distintas especies definidas. Los aislados del serotipo 1 se corresponden con las cepas de *B. burgdorferi sensu lato* procedentes de Europa y

Norteamérica; los aislados del serotipo 2, se corresponden con las cepas de *B. afzelii* aisladas en Europa y Japón; y los aislados de los serotipos 3 a 7, con las cepas de *B. garinii* de Europa y Japón, aunque en este último país se han definido además otros serotipos.

Otras proteínas han sido caracterizadas, habiéndose analizado su diversidad y variable expresión, así como su potencial inmunológico como base para el desarrollo de vacunas. De ellas destacamos las proteínas de 58 kDa, 66 kDa y 77 kDa, relacionadas entre sí y relacionadas con el shock por calor (Luft *et al.*, 1991) las proteínas de 10-18 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 37 kDa, 39 kDa y 43-45 kDa (Hansen *et al.*, 1988; Luft *et al.*, 1991) y particularmente la proteína denominada flagelina de 41 kDa (Graft *et al.*, 1986).

1.1.3.- Características fisiológicas y de cultivo.

En relación a las características metabólicas de *Borrelia* spp, comúnmente se acepta que son microaerófilas, pero existe evidencia de que también pueden crecer en anaerobiosis (Preac-Mursic *et al.*, 1991). Su temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre los 33 y 37°C, siendo el tiempo de duplicación de 24 horas (rango entre 12 y 48 horas).

Posee superóxido dismutasa y ausencia de peroxidasa y catalasa. Utiliza la glucosa como principal fuente de energía, siendo su principal metabolito el ácido láctico. Requiere una fuente orgánica de hierro, N-acetil-glucosamina (NAG) y una amplia variedad de azúcares y sales.

El cultivo se realiza de modo preferente en medios líquidos complejos muy enriquecidos con aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, N-acetil-glucosamina, albúmina sérica y suero de conejo, siendo el más utilizado el medio de Barbour-Stoenner-Kelly modificado, medio BSK II (Burgdorfer *et al.*, 1982). En medios sólidos se desarrollan colonias no superficiales, invertidas en el agar (Preac-Mursic *et al.*, 1991).

1.1.4. -Determinantes patogénicos.

No se han definido determinantes de virulencia principales, por lo cual se relaciona el papel patogénico de *B. burgdorferi* con la elevada capacidad de modificar su morfología y estructura antigénica como mecanismo de adaptación al huésped y de evasión frente a la respuesta inmune del hospedador.

Sin embargo, diversos estudios han demostrado una variedad de mecanismos capaces de desencadenar una acción patógena, estableciéndose conexión entre la dotación plasmídica y la infectividad del microorganismo (Purser *et al.*, 2000). Posee enzimas capaces de disolver proteínas, lípidos y colágeno, que permiten la penetración y diseminación tisular, así como inducir y activar metalopeptidasas y enzimas fibrinolíticos responsables de la destrucción de la matriz celular (Kamradt *et al.*, 2002). Activa el plasminógeno sanguíneo con gran poder quimiotáctico sobre distintas células inflamatorias que ayudan a iniciar la cascada de otras reacciones enzimáticas, como el fibrinógeno, la elastasa, la colagenasa y la laminasa, responsables de la destrucción de tendones, tejido conectivo y membranas celulares. En definitiva, es capaz de utilizar los sistemas enzimáticos del hospedador para su supervivencia, lo que le permite acantonarse en los tendones y en el cerebro, donde las células de nuestro sistema inmune tienen dificultada la entrada. No se ha demostrado la producción de toxinas propias II *Borrelia burgdorferi* no produce componentes tóxicos (Barbour *et al.*, 1986).

Se reconoce la ausencia de especificidad en la adherencia a superficies celulares (hay evidencia de la participación de un receptor de manosa en la adhesión de *Borrelia burgdorferi* a las células de sistema monocito-macrófago) o matrices extracelulares, lo que le permite colonizar una amplia variedad de tejidos. Sin embargo, como se ha señalado, las distintas especies patógenas presentan un tropismo tisular diferente, expresándose en la variabilidad clínica de las infecciones. Esta variabilidad vendría determinada por una predilección por estructuras con elevada composición de tejido conectivo, células cerebrales y células endoteliales, posiblemente por la existencia de un receptor para N-acetil-glucosamina (NAG) en la bacteria (Pachner *et al.*, 1998).

Se considera que la existencia de un flagelo, que le confiere la capacidad de girar sobre sí misma *dando saltos*, moviéndose mejor en los tejidos que en la corriente

sanguínea, constituye un elemento de diseminación favorecida y explicaría la afectación multiorgánica que se encuentra en muchos casos de borreliosis de Lyme.

Se produce una respuesta inmunitaria específica por parte de los linfocitos B con la formación de anticuerpos contra los determinantes antigénicos de la bacteria. Sin embargo, la producción de antígenos muy similares (epítomos redundantes) como consecuencia de su pobreza genética, provoca que esta respuesta sea escasamente específica y débil.

Las proteínas OspA y OspB son inmunológica y genéticamente variables, (Wilske *et al.*, 1993b) siendo en la fase avanzada de la enfermedad cuando se forman anticuerpos específicos frente a ellas. Barbour *et al.* (1986) y Coleman *et al.* (1987) refieren otros antígenos importantes como la proteína de 41 kDa (flagelina) frente a la cual se producen los primeros anticuerpos específicos y un antígeno de 60 kDa, denominado antígeno común, que pertenece al grupo de las proteínas del shock por calor. Ninguno de estos antígenos tiene especificidad de especie (Longwoth *et al.*, 1990) ya que el antígeno flagelar es común a otras espiroquetas, tanto saprofitas de la cavidad oral como patógenas incluyendo a especies del género *Leptospira*.

Pese a esta limitada composición estructural, recientemente se han revelado regiones variables en algunas de estas proteínas, como en el dominio central de la proteína de superficie VlsE (Eicken *et al.*, 2002; McDowell *et al.*, 2002). Además, mediante modelos experimentales se ha demostrado una diferente expresión antigénica entre aislados obtenidos a nivel de sistema nervioso central y otros tejidos o localizaciones como sangre periférica.

Se reconoce la capacidad de activar o inhibir moléculas asociadas a la respuesta mediada por anticuerpos, en ausencia de mecanismos líticos del complemento. Habicht *et al.* (1985) y Defosse *et al.* (1992) confirmaron *in vitro* la potente inducción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de la interleuquina 1 β (IL-1) por las células mononucleares en sangre periférica (Widhe *et al.*, 2002). Se han descrito elementos que actuarían como superantígenos, estimulando de forma policlonal a un gran número de linfocitos T no antígeno-específico, produciendo la liberación de varias citoquinas.

Borrelia burgdorferi puede suprimir la respuesta inmune local, disminuyendo la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) en las células de Langerhans, como se demuestra en la acrodermatitis crónica atrófica (Silberer *et al.*, 2000) mientras que en experimentos con ratas Lewis, se demuestra que el aumento de la adhesión molecular en células nerviosas. Incremento de la expresión de los antígenos HLA de clase II, en las células endoteliales y sinoviales, como se demuestra en estudios mediante biopsias de pacientes con artritis (Duray *et al.*, 1992). También se mostraron incrementos de VCAM-1 e ICAM en cultivos estimulados con *Borrelia burgdorferi* que aumentan la migración y adhesión de PMN interaccionando con CD11/CD18 (Sellati *et al.*, 1995); cambios similares en la expresión de ICAM y VCAM, se producen en las células endoteliales cerebrales (Simon *et al.*, 1993); pero no se incrementa la expresión del HLA en las células neuronales, tras la exposición a *Borrelia burgdorferi* (Benach *et al.*, 1992). Las citoquinas no resultan tóxicas para el microorganismo y no modifican la expresión de sus proteínas de superficie (Sigal *et al.*, 1998). En cocultivos con tejido sinovial de rata se mantiene la patogenicidad tras muchos subcultivos siendo mas resistente a la acción lítica del complemento (Guner *et al.*, 1996) presenta mayor avidéz para HUVEC (Guner and Sigal) que cuando es cultivada en BSK II. Se ha demostrado la producción de una artritis inducida tras la inyección intrasinovial de una pequeña cantidad del complejo 94 Kda OspA de *B. burgdorferi*. (Gondolf *et al.*, 1994) sirviendo como foco de inflamación enviando antígenos a distancia, produciendo homólogos a las proteínas productoras del shock por calor y con presencia en el líquido sinovial de anticuerpos que posibilitan que la *Borrelia burgdorferi* actuara como poderoso adyuvante-inductor de artritis (Mensi *et al.*, 1990).

1.2.- Borreliosis de Lyme.

1.2.1.- Patogenia.

Tras la inoculación cutánea de la borrelia por la garrapata, con una carga que puede variar entre unos cientos a unos miles de microorganismos y de modo independiente a la carga bacteriana contenida en el vector, el microorganismo penetra en el interior de las células epiteliales por mecanismos de adherencia inespecífica (Cristensen *et al.*, 1985). Se ha determinado que basta un pequeño número de los mismos para producir la infección (Steere *et al.*, 1988; Amouriaux *et al.*, 1993). Se

produce una respuesta inflamatoria con fagocitosis de los microorganismos por células polimorfonucleares y monocitos. Georgilis *et al.* (1991) demostraron *in vitro*, que las cepas virulentas de *Borrelia* sp., pueden resistir la eliminación por parte de las células fagocitarias, evadiendo así la primera línea del sistema de defensa del huésped contra la infección, siendo capaces de penetrar en los leucocitos polimorfonucleares y salir de ellos sin ser destruidos por sus enzimas lisosomiales. En este proceso, adquieren parte de la membrana de la célula inflamatoria, que actúa como camuflaje evitando el ataque por parte de los anticuerpos, enzimas, macrófagos y linfocitos T.

En el lugar de inoculación se producen fenómenos inflamatorios que dan lugar a la lesión denominada eritema *migrans*, ya que se produce la expansión del microorganismo mediante un movimiento centrífugo del mismo a través de las células cutáneas adyacentes.

A continuación, se produce una fase corta de espiroquetemia, que suele durar unos catorce días, con rápida dispersión del microorganismo y colonización de distintos órganos y tejidos, en especial el SNC, piel, articulaciones y sistema de conducción cardíaco (Steere *et al.*, 1989; Luft *et al.*, 1992). En estas localizaciones puede persistir acantonado durante toda la vida del paciente en ausencia de tratamiento, desconociéndose los mecanismos que permiten la prolongada supervivencia de *Borrelia burgdorferi* en dichas áreas. También se ha demostrado una fase de espiroqueturia asintomática y prolongada, incluso de meses, que ha servido como base para la preparación de diferentes métodos de detección de antígenos específicos en orina (Burgdorfer *et al.*, 1989).

Los primeros anticuerpos en aparecer son de clase IgM dirigidos contra el antígeno flagelar, alcanzando un máximo entre la tercera-cuarta semana y persistiendo en el suero varios meses (Barbourg *et al.*, 1983a; Coleman *et al.*, 1987) o incluso 15 ó 20 años, sin que ello indique la existencia de infección activa (Kalish *et al.*, 2001). La respuesta mediante anticuerpos de clase IgG (particularmente de las subclases IgG1 e IgG3) está dirigida contra los diversos componentes proteicos de *B. burgdorferi* siendo el tipo e intensidad de la misma variable de unos sujetos a otros (Grozicki *et al.*, 1988). También se ha referido un aumento de la inmunoglobulina de la clase IgE (Benach *et al.*, 1988) pero en conjunto la respuesta humoral es insuficiente para erradicar al microorganismo, además de no conferir protección frente

a la reinfección, habiéndose demostrado la posibilidad de desarrollar complicaciones con igual intensidad, particularmente neurológicas, tras una nueva picadura en pacientes con borreliosis previa (Golde *et al.*, 1998; Nowakowski *et al.*, 2001).

La respuesta celular se produce a los pocos días de la picadura, con la estimulación de los linfocitos T en sangre, líquido cefalorraquídeo y líquido articular (Steere *et al.*, 1989). Las células natural killer (NK) suelen estar inhibidas en pacientes con borreliosis (Dattwyler *et al.*, 1986).

Las lesiones que acompañan a la colonización tisular, obedecen a distintos procesos patogénicos. Por un lado, los fenómenos de vasculitis debidos a una endarteritis obliterante, similar a los hallazgos observados en las infecciones por *T. pallidum*, han podido ser identificados en los nervios periféricos (Camponovo *et al.*, 1986) en sistema nervioso central (Benach *et al.*, 1992) y en el tejido sinovial (Johnston *et al.*, 1985). Este mecanismo es el responsable de las lesiones parenquimatosas observadas en las fases tardías.

Se han postulado mecanismos de autoinmunidad para explicar la progresión de la enfermedad, aún con un tratamiento antibiótico adecuado, el daño neurológico y sinovial. En el suero de pacientes con alteraciones neurológicas de larga evolución, se han encontrado anticuerpos de clase IgM anti-axón, que no están presentes en los pacientes afectados de enfermedad de Lyme sin daño neurológico de larga evolución, ni en los controles sanos (Sigal *et al.*, 1988). Se ha sugerido que la neuritis se produciría por la acción de anticuerpos anti-axón, produciendo una disfunción axonal con ausencia de producción de mielina, sin encontrar daños histológicos. Mediante la absorción sérica con un preparado flagelar de *B. burgdorferi*, se ha identificado una proteína axonal (HSP60) que reacciona cruzadamente con epítomos del anticuerpo monoclonal flagelar (H9724) y con la flagelina (Gajdusek *et al.*, 1985; Sigal *et al.*, 1988; Dai *et al.*, 1993; Fikrig *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1997) considerándose un modelo para explicar la neuropatía crónica en estos pacientes. Además, los anticuerpos presentes en el LCR son capaces de reaccionar con la proteína básica de la mielina, induciendo la producción *in vitro* de IFN-gamma (Wang *et al.*, 1996).

García-Moncó *et al.* (1993 y 1995) han detectado en estos pacientes anticuerpos anti-cardiolipina, frente diversos gangliósidos y frente a la mielina, que

pueden explicar alguna de las lesiones que acompañan a la enfermedad, implicando la importancia de los fenómenos autoinmunes.

Algunos estudios han relacionado determinados genotipos de HLA de clase II (DR2 y DR4) con la presencia de artritis refractaria (Steere *et al.*, 1990). Además, la presencia de anticuerpos frente a la proteína OspA se correlaciona con la duración de la artritis (Kalish *et al.*, 1995) lo que sugiere que la respuesta frente a OspA pudiera estar implicada en su patogenia. Así, determinados clones de células T en estos pacientes reconocerían una región de la proteína OspA, situada entre los residuos 84-113, que actuaría estimulando a células reactivas y contribuiría a la persistencia de una inflamación local (Kamradt *et al.*, 1995). Por otro lado, se pueden detectar inmunocomplejos formados por anticuerpos OspA en estadios iniciales de la enfermedad, que al depositarse en las paredes celulares, servirían de foco inductor de la artritis (Coyle *et al.*, 1990; Brunner *et al.*, 1998). Similar mecanismo patogénico se ha asociado a otras alteraciones tisulares, al encontrarse con frecuencia crioaglutininas e inmunocomplejos en el suero de estos pacientes (Schutzer *et al.*, 1990).

1.2.2. - Vectores implicados en la transmisión.

Excepto para *Borrelia recurrentis* y *Borrelia duttonii*, todas las especies de *Borrelia* son mantenidas en la naturaleza por un amplio número de animales que actúan como reservorio. Las dos especies anteriormente mencionadas sólo infectan a humanos siendo transmitidas por el piojo humano del cuerpo y la garrapata del género *Ornithodoros moubata* respectivamente.

La adquisición de la borreliosis de Lyme se relaciona con la inoculación de *B. burgdorferi* sl. por un vector ixódido, infectado tras la ingestión del microorganismo en un animal reservorio en fase de espiroquetemia. El mecanismo de transmisión más importante es la inoculación directa a través de la saliva durante la alimentación del vector por las regurgitaciones que se producen desde el intestino medio. Burgdorfer *et al.* (1989) confirmaron que las microvellosidades de borde en cepillo y los espacios intercelulares del epitelio de la mucosa intestinal, son el lugar habitual de acantonamiento en la garrapata y sólo ocasionalmente se localiza en el intestino posterior y ampolla rectal. El periodo que permanece la garrapata adherida a la piel del animal, es determinante para la transmisión, considerándose necesario un tiempo

mínimo igual ó superior a las 48 horas, siendo el riesgo aproximado al 100% cuando permanece adherida 72 horas ó más (Piesman *et al.*, 1987).

Se ha observado que en vectores con parasitaciones muy elevadas, con mayor frecuencia en *Ixodes pacificus*, las borrelias pueden atravesar la pared intestinal y alcanzar el hemocele, y desde allí colonizar distintos órganos, en particular el ganglio central y los ovarios, pudiéndose transmitir transováricamente a su descendencia sin que medie ningún animal como fuente de infección (Burgdorfer *et al.*, 1982 y 1985; Magnarelli *et al.*, 1988). También ha sido demostrada la coalimentación entre garrapatas infectadas y no infectadas como mecanismo de transmisión entre vectores y en ausencia de infección sistémica del hospedador, al alimentarse simultáneamente incluso con una separación física de un centímetro, ya que el microorganismo permanece en el lugar de su inoculación durante cierto tiempo antes de producirse la diseminación (Randolph *et al.*, 1996).

Otro mecanismo de transmisión no descartado es la inoculación mecánica del microorganismo a través de fomités contaminados con las heces infectadas del ácaro, si bien se considera epidemiológicamente menos relevante.

Respecto a las especies del complejo *Borrelia burgdorferi* *sl.* y los vectores reconocidos con la distribución de la borreliosis de Lyme, Wilske *et al.* (2002) proponen el siguiente esquema:

Especie	Vector	Distribución geográfica
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Ixodes scapularis</i>	EE.UU.
	<i>Ixodes pacíficus</i>	Norteamérica
	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
	<i>Ixodes persulcatus</i>	Asia
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	Europa
		Japón
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i>	Europa
		Japón

Como se ha referido el vector principal implicado en la transmisión de borreliosis de Lyme en Europa son garrapatas del complejo *Ixodes ricinus*. Las diferentes especies descritas presentan una amplia y variable distribución. Así, de las garrapatas incluidas en este complejo son *Ixodes ricinus* (recibe este nombre por alcanzar el tamaño de la semilla del ricino) se encuentra en EE.UU. y en toda Europa excepto en su zona norte; *Ixodes scapularis* (*I. dammini*) se encuentra en gran parte de Estados Unidos (centro y este); *Ixodes persulcatus*, se describe en el este de Europa (Rusia) y Asia (China, Japón y Corea); por último *Ixodes pacificus* se ha identificado en el oeste de Estados Unidos y Canadá.

Excepto para la garrapata *I. persulcatus*, en la que el estadio principalmente implicado para la transmisión de la enfermedad es la forma de garrapata adulta, en todas la demás especies son los estadios de ninfa y de garrapata adulta, los comúnmente implicados (Gray *et al.*, 1999).

Otros vectores han sido relacionados con menor frecuencia en la transmisión de *Borrelia* spp: mosquitos y moscas del ganado o herbívoros salvajes (Hard *et al.*, 1966; Magnarelli *et al.*, 1988; Millner *et al.*, 1989 y Lugar *et al.*, 1990; Kosik-Bogacka *et al.*, 2002); garrapatas ixódidas de los géneros *Amblyoma* (Schutze *et al.*, 1984); *Dermacentor* (Anderson *et al.*, 1989; Liebisch *et al.*, 1998) y *Rhipicephalus* (Estrada-Peña *et al.*, 1991); *Hyalomma* (De Michelis *et al.* 2000) y *Haemaphysalis* (Oteo *et al.* 1995, Takada *et al.*, 1998; Barral *et al.*, 2002) todos ellos caracterizados por el corto periodo de supervivencia del microorganismo en su interior, y por lo tanto considerados epidemiológicamente menos importantes.

1.2.2.1.-Clasificación de vectores ixódidos.

Las garrapatas pertenecen al *Phylum Arthropoda*, Clase *Arácnida*, Subclase *Acari*, Orden *Parasitiformes*, Suborden *Ixódida*, Superfamilia *Ixódida*, con tres familias diferenciadas. Son los ácaros de mayor tamaño, parásitos hematófagos de mamíferos, aves y reptiles. Son ácaros del tipo metastigmata, por tener los estigmas respiratorios en posición posterior, tras el cuarto par de patas (los estigmas respiratorios son aperturas traquéales y su número y localización posee un valor taxonómico de primer orden).

1.- Familia *Ixodidae* , con 650 especies agrupadas en dos líneas filogenéticas *Prostriata* y *Metastriata* y cuyas características se definen a continuación.

1.1- *Prostriata*, presentan un escudo anal que rodea al ano por delante. Incluye un sólo género (*Ixodes*) con 245 especies. Se caracterizan por la presencia de escudo dorsal, por las piezas bucales dorsales y visibles desde arriba y por los estigmas respiratorios situados tras la cuarta coxa. Los detalles morfológicos de la parte anterior (gnatosoma e hipostoma) y de la parte posterior (ideosoma) de género *Ixodes* son los siguientes:

Las piezas bucales son largas (longirrosto) y se componen de dos partes, gnatosoma o *capituli basi* que es móvil y de localización anterior y de unas piezas bucales formadas por el hipostoma, dos quelíceros y dos palpos. El hipostoma, sirve de anclaje a su hospedador, ayudado por la secreción de una sustancia cementante que comienza a segregarse en las primeras horas de su alimentación. Estas piezas forman un órgano perforador provisto de varias hileras de dientes recurvados para su anclaje. Los quelíceros, poseen en su extremo un dedo articulado provisto de dientes y los palpos son rígidos (protectores) con cuatro segmentos. El ideosoma: presenta 4 pares de patas, compuestas por los artejos coxa, trocánter, fémur, genu, tibia, tarso y apotele o pretarso que suele terminar en una uña como adaptación al medio. Los estigmas respiratorios están situados tras la coxa cuatro, presentan el órgano sensorial de Haller (congregaciones de pelos llamados setas que forman campos sensitivos y se hallan en el tarso primero con capacidad para responder ante determinados olores y a la temperatura) ano, ideosoma sin festones, surco anal en "U" invertida a modo de herradura. En su parte dorsal presentan un escudo sin ornamentos, siendo corto en la hembra y completo en el macho. En el macho se observan placas ventrales amplias y planas, separadas por finas suturas centrales (pregenital, mediana y anal) y dos pares de placas laterales (epimerales y adanales).

1.2.- *Metastriata*, incluye doce géneros con 426 especies y presentan las placas anales de localización posterior como son los géneros *Boophilus*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Haemaphysalis*.

En la familia *Ixodidae* las larvas y las ninfas presentan un escudo dorsal y no tienen sexo.

2.- Familia *Argastidae* en la cual los palpos son sensoriales y pertenecen a este grupo 5 géneros. En esta familia se encuentran las garrapatas transmisoras de la fiebre recurrente (producida por una garrapata *Argasida* del género *Ornithodoros*). Sus principales características morfológicas son la ausencia de un escudo dorsal, la disposición ventral de las piezas bucales, siendo invisibles desde arriba, y la situación de los estigmas respiratorios entre las coxas tercera y cuarta.

3.- Familia *Mutalliellidae*, con un sólo género y frecuentemente encontradas en África, presentan características morfológicas intermedias entre las dos familias descritas anteriormente.

1.2.2.2.- Ciclo biológico de ixódidos.

Ixodes es un parásito no permanente, pudiendo localizarse hasta en tres hospedadores distintos. Es atraído por el movimiento, la temperatura y el dióxido de carbono. Durante la ingesta y engorde, la hembra puede aumentar su tamaño hasta veinte veces, por el almacenamiento de la sangre ingerida en los ciegos intestinales, eliminándose la mayor parte del contenido acuoso mediante la formación de orina y saliva hipoosmótica.

La cópula, en el género *Ixodes* se realiza sobre el hospedador o en el suelo. La hembra presenta un sólo ciclo gonotrófico, con una oviposición única de cientos de huevos tras la cual muere. El tiempo de eclosión de los mismos depende de las condiciones de temperatura y humedad, siendo 35°C la temperatura óptima para la garrapata del complejo *I. ricinus*, variando entre dos semanas y varios meses. Tras la eclosión, se producen larvas hexápodas y sin sexo, que carecen de sistema traqueal y espiráculo, realizándose la ingesta de agua a través de su cutícula, lo que le permite sobrevivir largos periodo en lugares húmedos, en espera de un hospedador que le permita su alimentación y convertirse en garrapata adulta. Las garrapatas hembras precisan una nueva ingesta de sangre para el engorde y la oviposición, mientras que los adultos macho suelen alimentarse del néctar de las plantas sin precisar la picadura de un mamífero para su supervivencia.

Su ciclo vital consta de los estadios de larva, ninfa y garrapata adulta, siendo viable de dos a tres años con un rango de dos a seis (Oteo, 1990a). Las garrapatas *Ixodes ricinus* atacan al hombre con frecuencia, a diferencia de otras garrapatas que no lo hacen o sólo de forma ocasional. Cada fase se alimenta durante unos días al año, usualmente en primavera, permaneciendo el resto de su ciclo vital quiescente y digiriendo, *Ixodes ricinus* hiberna durante los meses fríos, siendo su periodo de actividad de mayo a octubre, máxima en julio (Schmid, 1985) pero sí el invierno es benévolo puede estar activa todo el año, siendo capaz de transmitir la enfermedad.

Existen dos subpoblaciones, una suele alimentarse en primavera y principios del verano y la segunda población se alimenta a finales del verano y comienzos del otoño. Las larvas parasitan pequeños roedores (el ratón probablemente constituya su reservorio, ya que frecuentemente está parasitado por miles de larvas); reptiles y pájaros migratorios, siendo estos últimos de gran importancia para la difusión de *Borrelia* spp a zonas no endémicas, tras su primera toma de sangre, sufre una muda convirtiéndose en ninfa que morfológicamente ya es octópoda y presenta sistema traqueal y espiráculo por lo que es más susceptible a la desecación. Por último, las formas adultas, que parasitan vacas y ovejas (Oteo *et al.*, 1995) maduran y se alimentan para convertir su último y abundante ágape en miles de huevos. La garrapata adquiere la infección durante un ciclo completo vertebrado-hospedador.

El hombre entra a formar parte de este ciclo de manera accidental, no transmitiéndose la enfermedad de persona a persona, siendo siempre necesaria la participación de un vector presente en la vegetación o en un animal reservorio. La garrapata detecta la presencia de un posible hospedador mediante el órgano sensorial de Haller y se adhiere firmemente al hospedador para alimentarse, segregando unas sustancias con capacidad anticoagulante (Francischetti *et al.*, 2002). La garrapata del género *Ixodes* puede parasitar a los humanos en cualquiera de sus tres estadios evolutivos, pero son las ninfas las que se encuentran relacionadas con más frecuencia (Bosler *et al.*, 1983 y Burgdorfer *et al.*, 1985). Como se ha referido previamente, mediante estudios experimentales se ha demostrado que la transmisión de las *Borrelias* es muy reducida durante las primeras 24 horas y máxima entre las 48 y 72 horas, derivándose la importancia de una eliminación precoz de las mismas (des Vignes *et al.*, 2001).

1.2.2.3.- Hábitats y reservorios de ixódidos.

Su hábitat natural son las zonas boscosas y de matorral, hierba o arboleda, donde permanece la mayor parte del tiempo. Todas las garrapatas son hidrófilas, precisando para su ciclo vital un clima templado y con cierto grado de humedad para mantener su balance hídrico estable debido a su susceptibilidad a la sequedad ambiental, sobre todo en las fases de desarrollo.

En Norteamérica la garrapata del género *Ixodes dammini* es el vector principalmente implicado en el nordeste y en el medio oeste, estando alrededor del 20% de las garrapatas infectadas por *Borrelia burgdorferi*, lo que determina el mayor número de casos registrados de borreliosis de los Estados Unidos. Su ciclo vital se completa en dos y tres años, apareciendo las larvas seis meses tras la puesta (en la primavera siguiente) transformándose en ninfas durante ese verano y principios del otoño. Las formas adultas desarrolladas durante el verano siguiente, vuelven a alimentarse sobre distintos hospedadores mamíferos, produciéndose la fecundación de la hembra. En el sur y oeste de los Estados Unidos, predominan las especies *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* respectivamente. Masuzawa *et al.* (1991) y Fukunaga *et al.* (1993) aseguran que la especie *I. persulcatus* es el predominante en Asia y Australia.

Ixodes ricinus, denominada garrapata de la oveja aunque se conoce que su reservorio es mucho mas amplio, es el vector principal de la enfermedad en Europa occidental, y como tal en la península Ibérica (Barbour *et al.*, 1984; Oteo *et al.*, 1990b; Estrada-Peña *et al.*, 1991) si bien su distribución no es homogénea, predominando en las cuencas de los ríos Tajo y Guadalquivir (Cordero del Castillo *et al.*, 1980). El porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia burgdorferi* varía de unas regiones a otras, siendo las formas adultas y las ninfas las mas frecuentemente infectadas. Según un estudio realizado en la Comunidad de la Rioja, el porcentaje de vectores infectados varía entre 11 y 28%, similar a las zonas de alta endemicidad de centroeuropa (Oteo *et al.*, 1990c).

En Europa, además de *I. ricinus*, otras 15 especies de garrapatas e insectos se han reconocido infectados por *B. burgdorferi*, sin estar claramente determinado su

papel como vectores de la enfermedad en el hombre o en el mantenimiento de la infección en animales reservorio en la naturaleza.

Es importante destacar que la variabilidad observada en un mismo área se atribuye a factores tales como el momento de recogida de vectores, las características climáticas en la región, la prevalencia del vector, etc. De modo general, en Europa la prevalencia de garrapatas infectadas oscila entre 13% en Holanda y el 63% descrito en Alemania (Liebisch *et al.*, 1998). Respecto a las especies de garrapatas ixódidas portadoras de *B. burgdorferi* en Europa, se refiere a *I. ricinus* como especie más frecuentemente infectada, pero se encuentran también *Dermacentor reticulatus* (Liebisch *et al.*, 1996) y *Hyalomma marginatum* (De Michelis *et al.*, 2000).

En Francia, Doby *et al.* (1989) estudiando alrededor de 2.300 garrapatas, detectaron un 14,5% de garrapatas hembras adultas infectadas y un 7,5% de las larvas (los mismos autores, en un estudio llevado a cabo en Alsacia y con 2.200 garrapatas estudiadas, encontraron un 4,5% para las larvas; 11,5% en las ninfas y un 7,5% en las formas adultas).

En relación a los diferentes reservorios, cabe señalar que las dos formas inmaduras parasitan gran variedad de vertebrados entre los que se incluyen pequeños roedores, como el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) (Pfister *et al.*, 1994) o el ratón de campo (*Apodemus agrarius*). Estos ratones no se encuentran habitualmente en España, por lo que, sigue siendo desconocido cual es el principal reservorio en nuestra península. Anderson *et al.* (1986, 1989) y Habicht *et al.* (1987) han implicado muy diferentes especies animales como posibles reservorios, incluyendo reptiles y aves. Pájaros como el *Phasianus colchicus* y *Turdus merula*, actúan como reservorio competente, y albergan garrapatas infectadas con *Borrelia garinii* y borrelias del grupo VS116. La existencia de distintas especies de aves migratorias confiere gran importancia a la diseminación de la enfermedad en lugares donde no existen mamíferos (Humair, 2002). Curran *et al.* (1989) han implicado a perros y gatos de compañía, encontrando con alta frecuencia seropositividades entre los animales domésticos residentes en áreas endémicas.

Respecto a la distribución de otras garrapatas ixódidas, cabe señalar que para el género *Amblyomma*, con numerosas especies reconocidas, se define una

distribución mundial, constituyendo las garrapatas que más comúnmente afectan al hombre en los estados del centro y sur de Norteamérica, habiéndose encontrado en conejos, perros y grandes mamíferos en todas sus fases.

El género *Hyalomma*, compuesto por duras y resistentes especies de garrapatas, se encuentra ampliamente distribuido en el Viejo Mundo. Pueden sobrevivir en las cálidas y áridas regiones donde otros géneros no son viables. En sus primeras fases se alimentan en aves y roedores, localizándose en su fase adulta principalmente en grandes mamíferos.

Respecto al género *Rhipicephalus*, destacamos que la mayoría de sus 46 especies se localizan en África, encontrándose algunas especies en Europa meridional y Asia. De ellas, *R. sanguineus* puede considerarse cosmopolita por ser el perro el huésped mas común, y aunque es responsable de la transmisión de la fiebre botonosa en el área mediterránea, rara vez afecta al hombre.

El género *Haemaphysalis*, cuyos miembros son especialmente abundantes en Asia y Madagascar, son de modo especial parásitos de mamíferos y aves. Por último, las tres especies del género *Boophilus*, son garrapatas con un huésped único que se alimentan fundamentalmente del ganado vacuno y con menos frecuencia de otros herbívoros de gran tamaño; y las garrapatas del género *Dermacentor*, afectan a roedores en las fases larvaria y ninfal y a conejos y grandes mamíferos en las fases adultas.

1.2.3.- Características epidemiológicas de la borreliosis de Lyme.

Se trata de la enfermedad más frecuentemente transmitida por un artrópodo vector en el mundo industrializado (Doby *et al.*, 1991). La borreliosis de Lyme es una enfermedad emergente, en progresión en EE.UU. y en Europa. La distribución de la borreliosis está condicionada por la distribución geográfica natural de los distintos vectores, particularmente de *I. ricinus*, si bien ha sido descrita en todos los continentes con la excepción de la Antártida, presentando una mayor frecuencia en el hemisferio norte (Ruel *et al.*, 1988; Carlberg *et al.*, 1991). Se acepta una distribución heterogénea por la diversidad de cepas implicadas en los diferentes cuadros de borreliosis de Lyme.

Con una incidencia de 10.000 casos declarados/año en los EE.UU (el 90% proceden de los condados del noreste del país) y una prevalencia de 100.000 casos registrados en el periodo comprendido entre 1982-1996 (Chow *et al.*, 2003). En Europa, donde la enfermedad es declarada tan sólo en algunos países, la incidencia en zona endémica varía entre el 16 y 140 casos /100.000 habitantes/año, siendo variable en función de la presencia de garrapatas infectadas. Estudios realizados por diversos autores indican tal variación: muy baja en Inglaterra y Gales con 0,32 casos /100.000/año (Smith *et al.*, 2000); 111 casos /100.000 habitantes/año en Alemania (Huppertz *et al.*, 1999); 300-350 casos /100.000/año habitantes en Austria y en Francia del orden de 16,5 casos /100.000 habitantes/año (Lipsker *et al.*, 2001).

La distribución de *Borrelia* spp en España presenta un patrón norte-sur, con aislamiento de *B. burgdorferi sensu lato* en la mitad norte y especies asociadas a fiebres recurrentes en la mitad sur, en relación con la distribución de los distintos vectores asociados. Los datos disponibles hasta la fecha sobre distribución de especies en nuestro país, muestran una mayor frecuencia de aislamientos de *B. garinii*, seguido de *B. burgdorferi*. No ha habido hasta la fecha notificación de cepas de *B. afzelii*, aunque hay sospechas de su participación en casos de ACA, manifestación clínica generalmente asociada con esta especie.

Diversos autores coinciden en afirmar que la distribución de la enfermedad de Lyme en España no es uniforme, existiendo distintos focos de endemia localizados en las cuencas del Tajo y Guadalquivir por la presencia de *I. ricinus*. Se considera entre 0,3 y 14,8 casos /100.000 habitantes/año (Cordero del Castillo *et al.*, 1980; López Prieto *et al.*, 1989; Oteo *et al.*, 1990b y 1994; Tamayo *et al.*, 1990; García-Moncó *et al.*, 1991; Castiella *et al.*, 1992; Guerrero-Espéjo *et al.*, 1993; Caride *et al.*, 1995; Saz *et al.*, 1995).

En Asturias (Villaviciosa) en 1977, fue diagnosticado serológicamente el primer caso de borreliosis en un paciente que presentaba un eritema *migrans* (Uruñuela y Díaz, 1977) y García-Moncó *et al.* (1992) aislaron la primera cepa de *Borrelia burgdorferi* (cepa Esp 1) de la península ibérica en la Rioja a partir de una garrapata *Ixodes ricinus*. El primer aislamiento de *Borrelia garinii* (cepa 20047) en una muestra clínica fue realizado por Oteo *et al.*, (1998). En la actualidad, se ha determinado la presencia de, al menos tres especies de *B. burgdorferi sensu lato* en vectores, pero

únicamente *B. garinii* ha sido aislada en las muestras clínicas, definiéndose 5 tipos diferentes mediante métodos de caracterización genotípica (Escudero *et al.*, 2000).

A pesar de la evidencia de esta patología en distintas localizaciones geográficas, en la mayoría de ellas se desconoce cuál es la verdadera importancia de la enfermedad, ya que se han realizado escasos estudios poblacionales para conocer su prevalencia. Las encuestas epidemiológicas realizadas hasta el momento ofrecen cifras muy variables. Así, en la Rioja, Benito-Urvina *et al.* (1990) encuentran una prevalencia del 2,9%, mientras que Oteo *et al.* (1992b) en diferentes grupos poblacionales, demuestran cifras que oscilan entre el 5,8% y el 31,3%. Para la provincia de Soria, área colindante a la anterior, se ha comunicado una prevalencia global del 13,1%, con un amplio espectro en función de las diferentes áreas de salud. En Asturias, Martínez *et al.* (1993) y Asensi *et al.* (1993) describieron una prevalencia variable entre el 8% y superior al 23% según la población analizada. Tamayo *et al.* (1990) demuestran que más del 10% de una población de riesgo en Valladolid evidencia una respuesta seropositiva frente a *Borrelia burgdorferi*. Estudios realizados en Canarias, Sevilla y Barcelona, confirman prevalencias bajas del 4% (Carrasco *et al.*, 1992; López-Prieto *et al.*, 1989).

La enfermedad se presenta en todas las edades, pero con una mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes en relación a las actividades en áreas de recreo y excursiones al campo siguiendo una distribución bimodal entre los 5-9 años de edad y en mayores de 30 años (Nadelman *et al.*, 1998). No hay diferencia en cuanto al sexo (Campbell *et al.*, 1998) pero en determinadas profesiones, predomina en los varones, probablemente por su vinculación a tareas relacionadas con la agricultura o las actividades forestales (Ciceroni *et al.*, 1998).

1.2.4.- Manifestaciones clínicas.

La enfermedad puede manifestarse con una gran variedad de síntomas y signos, habiendo sido denominada " el último imitador" (Burdash *et al.*, 1991). Esta variedad clínica no sólo afecta de manera individual a cada paciente, sino que presenta un distinto componente geográfico, existiendo importantes diferencias entre las manifestaciones clínicas de los casos diagnosticados en Estados Unidos y los identificados en Europa, considerándose, como se ha referido, que estas diferencias

están relacionadas con la diversidad antigénica de las cepas y con las nuevas especies descritas.

Hay evidencia de que ciertas cepas de *Borrelia burgdorferi sensu lato* en Europa, pueden estar asociadas a manifestaciones clínicas específicas, así *Borrelia garinii* se ha implicado en las formas neurológicas en un 64%, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* en las formas articulares (71%) y *Borrelia afzelii* en las formas cutáneas tardías (80%) (van Dam *et al.*, 1993) mientras que para las cepas americanas no se ha demostrado dicha variabilidad (Lavrich *et al.*, 1994).

La borreliosis es una afectación inflamatoria crónica, multisistémica que cursa con exacerbaciones y remisiones y que afecta con predilección a la piel, sistema nervioso central y periférico, articulaciones y corazón. Tras un periodo de incubación medio de 10 días (rango de 1 día a 3 meses, Asbrint *et al.*, 1985) aparece en el lugar de la picadura una lesión primaria denominada eritema *migrans* (EM) que es patognomónica y clave diagnóstica precoz de la enfermedad. Desde esta lesión inicial, se produce una diseminación por vía hematológica al resto del organismo (fase de espiroquetemia) dando lugar según el territorio afecto, a una gran variedad de manifestaciones clínicas.

Clásicamente, la evolución de la enfermedad se ha dividido en tres estadios clínicos, perfilando un curso crónico-recurrente. Sin embargo, las manifestaciones asociadas a cada uno de ellos pueden presentarse simultáneamente, bien presentarse de manera aislada sin la existencia de otros signos y síntomas característicos de estadios previos o bien éstos pueden haber pasado inadvertidos (Reik *et al.*, 1986).

1.2.4.1.- Borreliosis localizada precoz.

Este estadio de la enfermedad se caracteriza por la aparición de una lesión cutánea inicial y un cuadro pseudogripal. La lesión cutánea EM es considerada signo cardinal patognomónico de la enfermedad y consiste en una lesión máculo-papular-eritematosa que aparece en el lugar de la picadura, principalmente en la espalda, cara interna de los muslos y piernas, correspondiendo con el chancro de inoculación (Steere, 1989; Abele, 1990).

Aunque la lesión puede adoptar diversas morfologías y tonalidades, comúnmente se observa como una lesión única redondeada, con un diámetro medio de 15 cm, aunque se han descrito lesiones de 40 a 70 cm (Strle *et al.*, 1996). Se expande centrífugamente, presentando un borde activo rojo-vinoso, que delimita una zona central más clara con curación y posterior descamación. Esta claridad central se pensó que era condición *sine qua non* del eritema *migrans* pero Nadelman (1998) demostró que su aparición está en función de la duración de la lesión previa al tratamiento. Sólo la tercera parte de los pacientes experimentan quemazón o ligero prurito.

En un elevado porcentaje de pacientes está ausente (20-35%) o pasa desapercibido por estar situada en zonas corporales no visibles y ser indolora. A veces, su centro se torna eritematoso, pudiendo estar indurado o necrótico. Histológicamente no existen hallazgos específicos, observándose un infiltrado perivascular linfocitario, en ocasiones con células plasmáticas. Desaparece espontáneamente alrededor de los 28 días, variando entre un día y catorce meses, siendo de mayor duración en los casos producidos por *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (52 días) y menor por otras *Borrelias* (14 días). Con tratamiento adecuado desaparece más precozmente y cuando persiste más de cuatro semanas se denomina eritema crónico migratorio. En ocasiones, tras su curación permanecen áreas hipopigmentadas residuales (Lipschütz *et al.*, 1918).

El 10% de los enfermos que no reciben tratamiento adecuado presentan recurrencias en la misma localización. Su diagnóstico es fundamentalmente clínico ya que en esta fase de la enfermedad las pruebas serológicas tienen escaso valor y debe interpretarse en el contexto epidemiológico de la enfermedad (Nowakowsk *et al.*, 2001; Edlow *et al.*, 2002).

El eritema *migrans* puede acompañarse de un síndrome pseudogripal con astenia, cefalea y artralgias (Berguer *et al.*, 1989). La presencia de una linfadenopatía regional en el lugar de la picadura, puede servir como marcador clínico de borreliosis de Lyme (Lesniak *et al.*, 1995). Pueden desarrollarse lesiones cutáneas secundarias en lugares diferentes al de la picadura, asintomáticas y que hay que distinguir de las reacciones locales a la picadura de insectos o arañas, de lesiones micóticas o de diversas dermatitis. Estas lesiones aparecen antes de la diseminación hemática del microorganismo. Durante este estadio precoz, pueden aparecer síntomas generales

más expresivos como son fatiga (54%) mialgia (44%) artralgias (44%) cefalea (42%) fiebre y escalofríos (39%) siendo los signos más frecuentes la linfadenopatía regional (23%) y la fiebre (16%) (Nadelman *et al.*, 1998) más comunes en pacientes americanos, posiblemente por asociarse a especies más virulentas.

1.2.4.2.- Infección diseminada precoz.

Tras varias semanas o meses del inicio de la enfermedad, se presenta un conjunto de signos y síntomas asociados a la diseminación hemática de la infección, especialmente derivados de afectación cutánea, cardíaca y neurológica, que persistirán de manera indefinida si el paciente no es tratado. La traducción clínica durante la diseminación hemática es una grave alteración del estado general, siendo el síntoma más frecuente la fatiga, casi constante. El cuadro clínico más común es la neuroborreliosis precoz, particularmente la meningoradiculitis linfocitaria.

En la piel, aparecen eritemas anulares crónicos secundarios, asintomáticos y en número variable (2 a 30) en cualquier localización cutánea aunque respeta las palmas, plantas y mucosas (Berguer *et al.*, 1989). Se producen por la diseminación hemática y son más frecuentes en pacientes americanos que en los europeos. Otra manifestación cutánea es la aparición de un linfocitoma cutáneo benigno (LCB) también llamado linfocitoma borreliano (Grosshans, 1980). Es una forma poco común de borreliosis diseminada precoz. Consiste en una lesión única, plana o nodular, de coloración eritematosa o violácea, indolora, que mide 1 ó 2 centímetros de diámetro, localizada en la mitad superior del organismo, siendo su lugar preferente el lóbulo de la oreja en los niños y en la areola mamaria o en el escroto, en los adultos. Su examen histológico muestra un denso infiltrado linfocitario en la dermis aunque también están presentes macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas, pero anatomopatológicamente no es exclusivo y puede ser difícil de diferenciar de los linfomas malignos. Estas manifestaciones cutáneas son menos frecuentes que el eritema *migrans* y sobre todo se observa en los pacientes europeos Su etiopatogenia no es unívoca, pero se ha demostrado su etiología borreliana en diversas ocasiones mediante aislados de la lesión (Hovmark *et al.*, 1986) y amplificación de ADN específico (PCR) (Abele *et al.*, 1990; Gissler *et al.*, 2002).

En esta fase de la enfermedad se observan artromialgias, cefalea y astenia marcadas, sin pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo, síntomas ya descritos en la literatura europea clásica. (Garín-Bujadoux *et al.*, 1922 y por Bannwarth *et al.*, 1944).

Las alteraciones cardiacas se dan entre el 4 y 8% de los pacientes y su intensidad es muy variable, desde palpitaciones a pancarditis fatal. Su curso suele ser recidivante, durando los episodios días o semanas. Lo más frecuente y característico presentándose hasta en el 50% de los pacientes, son los bloqueos aurículo-ventriculares de carácter transitorio y de grado variable. Se acompaña de signos electrocardiográficos y radiológicos de afectación difusa. Lo habitual es que no tengan mucha trascendencia clínica, aunque se han descrito casos de bloqueo irreversible que obligan a la colocación de un marcapasos permanente (Steere *et al.*, 1989). Otras posibles manifestaciones cardiacas son la pericarditis aguda (Artigao, 1991) miocarditis aguda e incluso pancarditis y angina por insuficiencia ventricular izquierda (Berguer *et al.*, 1987). Los episodios recidivantes pueden derivar en una cardiopatía crónica, expresión de la importante afectación cardiaca por *Borrelia burgdorferi*, habiéndose demostrado la presencia del microorganismo en biopsias cardiacas de los pacientes afectados (Pinto *et al.*, 2002).

Las alteraciones neurológicas en la borreliosis, son muy diversas y están presentes en todos los estadios. Son las que han recibido mayor atención en los últimos años, pues su espectro clínico se ha ampliado notablemente. Las alteraciones en el sistema nervioso periférico se manifiestan como polineuritis o mononeuritis múltiple, de tipo desmielinizante (Serman *et al.*, 1982) o de tipo axonal (Halperin *et al.*, 1986). La observación más frecuente es la presencia de radiculoneuritis unilaterales o bilaterales, que afectan al dermatomo correspondiente al lugar de la picadura. Cursa con dolores intensos, lancinantes, aunque a veces su predominio es motor. El trastorno disautonómico es frecuente en este tipo de neuropatía. Estudios electrofisiológicos demuestran un involucramiento proximal y distal del axón. Así mismo estudios neuropatológicos sugieren que la vasculitis puede ser uno de los mecanismos fisiopatológicos primarios (Deltombe *et al.*, 1996). Ha sido demostrado que los anticuerpos contra el antígeno flagelar se une a los axones normales y a clones de linfocitos T del líquido cefalorraquídeo (Sigal *et al.*, 1988) pudiendo reaccionar con un conjunto de autoanticuerpos que incluyen la proteína básica de la mielina, la mielina periférica, la cardiolipina y los galactocerebrósidos. Ryskova y colaboradores (2002)

encontraron que en el 31% de pacientes, sobre todo en mujeres jóvenes, con serología positiva para *B. afzelii*, presentaron anticuerpos frente a la proteína básica de la mielina.

Destaca en el estadio precoz, la meningitis linfocitaria, siendo más frecuente en pacientes europeos. Generalmente debuta como una radiculopatía hiperálgica, seguida de pleocitosis moderada a partir de linfocitos en el líquido cefalorraquídeo (con más de 100 células/ml y aumento de anticuerpos de clase IgM) pero los signos meníngeos o encefálicos son raros, y cuando están presentes son de tipo funcional como náusea, cefalea y fotofobia (Stiernstedt *et al.*, 1988). En el 20% de los casos se observan signos centrales como alteración de la concentración, de la memoria y el sueño. Jaulhac *et al.* (1991) refieren la posibilidad del hallazgo y cultivo de espiroquetas a partir de líquido cefalorraquídeo.

La afectación de pares craneales, con parálisis facial unilateral o bilateral, es una manifestación clínica neurológica frecuente en los pacientes infectados (50%) (Pachner *et al.*, 1985; Peltomaa *et al.*, 2002) seguido por la neuritis retrobulbar, siendo la afectación de otros pares craneales menos frecuente y de modo muy variable (Mason *et al.*, 1987). Han sido referidas como expresión de esta afectación periférica, alteraciones como la pupila de Argyll-Robertson, en la que no hay respuesta pupilar a la luz pero si acomodación, la diplopia, ageusia e hipoacusia. (Bruce-Chwath *et al.*, 1980). En distintos pacientes infectados se identificó la presencia de una parálisis recurrente unilateral y una triada típica que consta de meningitis crónica linfocitaria, neuritis craneal y radiculoneuritis, asociadas o no a otras manifestaciones clínicas muy variables (Neuschaefer-Ruber *et al.*, 1995) como son una radiculopatía sensitiva o motora (Pachner *et al.*, 1985) la presencia de corea (Köler *et al.*, 1986 y Russeau *et al.*, 1986) o el desarrollo de un cuadro de mielitis con ataxia (Pohl-Koppe *et al.*, 1999) y ataxia cerebelosa (Arav-Boger, *et al.*, 2002).

En Europa, Garin-Bujadoux *et al.* (1922) y Bannwath *et al.* (1944) describieron el síndrome de Bannwarth-Garin-Bujadoux, consistente en una meningitis crónica linfocitaria a la que se puede superponer la afectación de pares craneales y del sistema nervioso periférico. Los signos meníngeos son prominentes, y el líquido cefalorraquídeo presenta una pleocitosis moderada (hasta 5000 células/ml) de predominio linfoplasmocitario, siendo la presencia de células plasmáticas, para muchos autores,

sugestiva de la enfermedad. Hay una elevación variable de las proteínas y la glucorraquia es normal. Se determina una elevación de gammaglobulinas con producción local de inmunoglobulinas de clases IgM e IgG, persistiendo esta última a lo largo del tiempo (Henriksson *et al.*, 1986). La presencia de anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo es útil para establecer el diagnóstico definitivo de neuroborreliosis. Aunque su ausencia no descarta necesariamente este diagnóstico, especialmente si su examen se realiza en un estadio precoz de la enfermedad (Issakainen *et al.*, 1996).

También es frecuente encontrar en este estadio de la enfermedad, artralgias erráticas en una o más articulaciones sin hinchazón articular y que cuando es de carácter simétrico, conviene realizar un diagnóstico diferencial con la artritis reumatoide. Longwoth *et al.* (1990) describieron alteraciones de la función hepática, con carácter transitorio y recurrente. En el 10% de los casos aparece hepatitis anictérica (Steere *et al.*, 1983).

1.2.4.3.- Infección diseminada tardía.

Este estadio de la enfermedad se caracteriza por la aparición de neuroborreliosis tardía, lesiones cutáneas tardías y artritis franca.

Las manifestaciones neurológicas generalmente aparecen meses o años después del comienzo de la enfermedad, como expresión de los mecanismos patogénicos directos e indirectos inducidos por la infección borreliana, si bien pueden ser manifestaciones principales de un cuadro de presentación inicial (Pachner *et al.*, 1985). En esta fase se desarrollan frecuentemente cuadros neuropsiquiátricos clínicamente inespecíficos, con cambios de personalidad, disfunción intelectual de intensidad muy variable, anorexia nerviosa y la fatiga, que es constante y predominante durante todo el curso de la enfermedad (Halperin *et al.*, 1986; Reik *et al.*, 1986; Baumhackl *et al.*, 1987). En estos pacientes se han descrito lesiones focales desmielinizantes del sistema nervioso central (Ackerman, *et al.*, 1985; Bending *et al.*, 1987; García-Moncó *et al.*, 1989) que constituyen la base del cuadro de neuroborreliosis o encefalomielitis por borrelia. Es un cuadro clínico muy heterogéneo, con alteraciones sensitivas, disartria, disfunción urinaria, crisis epilépticas, y trastornos psicológicos en diferentes combinaciones. Estas alteraciones plantean un importante problema de diagnóstico diferencial con la esclerosis múltiple (Midgard *et*

al., 1987). En un alto porcentaje de los casos (87 al 100%) se observan bandas oligoclonales de inmunoglobulinas del tipo IgM ó IgG en el líquido cefalorraquídeo, que son específicas contra los componentes de *Borrelia burgdorferi* (Ackermann R *et al.*, 1984). Otras manifestaciones neurológicas han sido asociadas a la infección: meningitis crónica; mielitis transversa (Rousseau *et al.*, 1986); vasculitis del sistema nervioso central (Midgard *et al.*, 1987); alteraciones del sistema nervioso autónomo (Steere *et al.*, 1983; Reik *et al.*, 1986; Duray *et al.*, 1987 y Didier *et al.*, 1989).

En los últimos años, una lesión cutánea denominada morfea ha sido considerada de interés al hallarse casos de pacientes con dicha alteración y títulos elevados de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (Aberer, 1985; Hercogova, 2002). Por otra parte, diversos autores incluyen entre las causas de esclerodermia localizada, la etiología infecciosa al responder favorablemente al tratamiento con penicilina. Los mismos autores, fueron capaces de detectar espiroquetas a partir de cortes histológicos de lesiones cutáneas y mediante técnicas de inmunoperoxidasa (Aberer *et al.*, 1987).

En el estadio tardío de la enfermedad, pueden aparecer manifestaciones cutáneas tardías como la acrodermatitis crónica atrófica (ACA) siendo frecuente en Europa y excepcional en EE.UU, al asociarse exclusivamente a infección por *Borrelia afzelii* (Eberst *et al.*, 1977). Es más común en mujeres de edad avanzada y su localización es diferente al eritema *migrans* (Asbrink *et al.*, 1991) iniciándose como una inflamación azulada en el pie (edema unilateral de talón) o la pierna, siendo menos frecuente en muslo o miembros superiores, y que progresivamente produce una atrofia cutánea en papel de cigarrillo, con adenopatía regional y manifestaciones sensitivas y dolorosas en el 20% de los casos. Se ha podido aislar microorganismos viables a partir de esta lesión incluso tras más de 10 años de la infección inicial (Hausman *et al.*, 1987). Algunos autores, afirman que se produce como consecuencia de una respuesta inmunitaria de linfocitos T frente a *B. burgdorferi*, caracterizándose histológicamente por la presencia de teleangiectasias e infiltrado linfocitario y de células plasmáticas en la dermis y tejido celular subcutáneo. Su examen puede ser un buen soporte diagnóstico pero no suficientemente exclusivo de acrodermatitis crónica atrófica (Buechner *et al.*, 1993).

En los últimos años, y con el desarrollo de los métodos serológicos de diagnóstico, se observa una constante descripción de nuevas manifestaciones clínicas de la enfermedad, sustentadas en los hallazgos clínicos observados en pacientes con resultado positivo, lo que resulta finalmente un criterio débil y que produce un muy amplio espectro clínico asociado a la enfermedad. No obstante, estudios bien documentados permiten la descripción de nuevas manifestaciones clínicas, en general con baja frecuencia, como la aparición de erupciones máculo-papulares y urticariales (Asbrink *et al.*, 1991) o el incremento de pacientes afectados de porfiria cutánea respecto a la población general (Halkier-Sorenren *et al.*, 1989).

Las manifestaciones articulares tardías, como la artritis franca, aparecen tras varios meses incluso años del inicio de la enfermedad, siendo frecuente en pacientes que no recibieron tratamiento inicial o este fue incorrecto, aunque también ha sido observada en pacientes que recibieron tratamiento antibiótico (Kalis *et al.*, 1995) probablemente por continuar la respuesta inmune en ausencia del antígeno. (Steere *et al.*, 1988). Observándose principalmente en Norteamérica como cuadros clínicos intermitentes de artritis oligoarticular, localizados con mayor frecuencia en rodilla y cadera, de duración variable (semanas o meses) y que tras su remisión recidivan en la misma articulación.

En algunos casos, se observan afectaciones poliarticulares y simétricas, simulando cuadros de artritis reumatoide seronegativa. En el 10% de los casos se observa una evolución a una forma de artritis crónica persistente con erosión cartilaginosa y ósea, mas frecuentemente (60%) en pacientes con marcador HLA-DR4 y HLA-DR2 (Majsky *et al.*, 1987; Steere *et al.*, 1988). El análisis del líquido sinovial revela una leve elevación proteica y un aumento del recuento celular, principalmente de leucocitos polimorfonucleares.

Otras múltiples manifestaciones menos comunes han sido descritas por diversos autores, entre las que cabe destacar la presencia de queratitis, poliadenitis (Winwardke *et al.*, 1989) fibromialgias (Abele *et al.*, 1990; Moscatello *et al.*, 1991; Dinerman *et al.*, 1992) dermatomiositis (Hoffmann *et al.*, 1995) polimialgia reumática en ancianos (Paparone *et al.*, 1995) diversas formas de afectación hepática (Chavanet *et al.*, 1987; Goellner *et al.*, 1988; Saz *et al.*, 1995) y agranulocitosis por lesión en médula ósea (Neuschaefer-Rube *et al.*, 1995).

Finalmente, se ha demostrado que la infección por *Borrelia burgdorferi* sl., durante el embarazo produce la afectación del feto, y particularmente durante el primer trimestre da lugar a anomalías congénitas (sindactilia) enfermedad perinatal (cardiopatía, prematuridad, calcificaciones cerebrales) e incluso muerte fetal (Markowitz *et al.*, 1986; Edly *et al.*, 1990; Elsukova *et al.*, 1994; Mac Donald *et al.*, 1998) habiéndose aislado el microorganismo en distintos órganos fetales (Elliot *et al.*, 2001) y observado mediante tinciones argénticas en muestras de placenta (Mac Donald *et al.*, 1989).

1.3.- Diagnóstico microbiológico de la borreliosis de Lyme.

Como se ha referido previamente, el diagnóstico de la borreliosis de Lyme es principalmente clínico, señalándose que un elevado número de enfermos no recuerdan el antecedente de la picadura de garrapata, y hasta en un 50 % de los afectados tampoco aparece la lesión cutánea característica. Los métodos microbiológicos coadyudan en la adecuada orientación de las formas clínicas complejas, y muy particularmente en las infecciones crónicas o diseminadas, aceptándose que, de modo general, los procedimientos disponibles en la actualidad presentan importantes limitaciones que reducen su común aplicación y utilidad clínica. No hay hallazgos específicos en sangre periférica. La velocidad de sedimentación puede ser normal o estar ligeramente elevada, al igual que el recuento de células blancas. Sin embargo en las fases tempranas de neuroborreliosis, el LCR muestra una pleocitosis linfocitaria moderada y proteínas elevadas con niveles normales de glucosa. La presencia de bandas oligoclonales específicas en LCR es un hecho común y apoya el diagnóstico. Sólo en casos de neuropatías periféricas, el LCR puede ser normal.

1.3.1.- Métodos directos.

La observación y/o aislamiento de microorganismos en las muestras clínicas comúnmente empleadas para el diagnóstico de borreliosis (biopsia cutánea, líquido sinovial, sangre) representan procedimientos escasamente sensibles por diferentes causas aunque constituyen los únicos métodos de confirmación precisa en la actualidad.

1.3.1.1.- Observación microscópica.

No es posible su visualización en fresco con microscopía óptica convencional, siendo necesaria la microscopía de campo oscuro o microscopía de contraste de fase. Dado que el número de microorganismos en las muestras clínicas suele ser bajo, no está indicada para el diagnóstico, pero sí para el control del crecimiento en los cultivos (Preac-Mursic *et al.*, 1991).

A diferencia de otras espiroquetas, se puede teñir fácilmente con anilina ácida, u otros colorantes ácidos, pero los aislados no pueden ser distinguidos entre sí, por sus características morfológicas. También puede visualizarse con las tinciones de Gram, May-Grundwald Giemsa, Giemsa y Wright, y mediante técnicas fluorescentes con naranja de acridina. Las tinciones argénticas (Dekoning *et al.*, 1988; Duray *et al.*, 1987) son empleadas con frecuencia, si bien presenta el inconveniente del elevado número de falsos positivos determinados por la naturaleza de las estructuras fibrilares presentes en las muestras de biopsia. De modo general, el bajo número de espiroquetas en las lesiones clínicas y muestras biológicas, limita la utilidad de la detección directa de este microorganismo.

1.3.1.2.- Cultivo de muestras clínicas.

El aislamiento en cultivo, considerado como prueba diagnóstica de referencia, juega un papel muy secundario y no se realiza de manera rutinaria en los laboratorios clínicos, ya que si bien presenta un aceptable rendimiento en muestras de biopsia procedentes de la lesión eritematosa, es muy inferior en otras muestras tisulares (Benach *et al.*, 1983; Asbrink *et al.*, 1985; Snyderman *et al.*, 1986). Por ello, y por la relativa complejidad de los medios requeridos, el cultivo se realiza en laboratorios especializados en los casos en los que es preciso clarificar una borreliosis seronegativa o en pacientes afectados de inmunodeficiencias (Wilske *et al.*, 1993b).

Diferentes medios, sólidos y líquidos, se han propuesto para el aislamiento de este patógeno. Entre los primeros destacamos el medio de agar Barbour-Stoenner-Kelly (agar BSK) descrito por Burgdorfer *et al.* (1982) y otros modificados del mismo (agar BSK II y agar BSK H); y el medio de agar PMR desarrollado por Preac-Mursic *et al.* (1991). Otras propuestas más recientes incluyen los medios sólidos denominados

agar SCM por Bahrmand *et al.* (1996) y agar MPM (Phillips *et al.*, 1998) caracterizados por obtener un crecimiento rápido de los microorganismos en 1 a 3 días, tras su inoculación. Entre los medios líquidos, sigue siendo el medio clásico BSK II modificado el empleado mayoritariamente en los diferentes laboratorios (Pollack *et al.*, 1993). En la actualidad, se considera como medio de elección el denominado medio de Barbour-Stoenner-Kelly modificado (BSK II) por supresión de la glutamina (Junttila *et al.*, 1999; Durden *et al.*, 2001). Todos los medios que se han empleado contienen L-cisteína, dititotreitól y distintos antimicrobianos (Anderson, 1989). Las condiciones de incubación óptimas se producen con temperaturas entre 33 y 37°C, con una atmósfera anaeróbica o microaerofílica, debiendo permanecer durante un periodo máximo de 30-60 días. Para el cultivo de muestras clínicas, se considera una temperatura óptima de multiplicación ligeramente inferior (30-34°C) debiendo suplementar los medios tras 4-6 días de incubación. Se considera también un medio adecuado para la recuperación del microorganismo a partir de garrapatas infectadas.

En general, el cultivo presenta una baja sensibilidad debido al reducido número de organismos infectantes. Este problema es mayor cuando se trata de aislar el microorganismo a partir de líquidos corporales, donde los microorganismos están libres muy poco tiempo por la rapidez con que se adhieren a cualquier tejido. Además, los distintos medios disponibles presentan un rendimiento muy variable dependiendo del tipo de muestra, siendo positivos para muestras de eritema *migrans* entre un 40% al 70% (Strle *et al.*, 1986; Nowakowsk *et al.*, 2001) y relativamente bajo (entre el 5-10%) en muestras procedentes de lesiones de acrodermatitis crónica atrófica y muestras de LCR. Los resultados son prácticamente nulos en muestras de sangre o líquido sinovial (Benach *et al.*, 1983; Asbrink *et al.*, 1985; Snyderman *et al.*, 1986; Persing *et al.*, 1994). Las biópsias sinoviales proporcionan un resultado positivo similar a las muestras de eritema, superando al cultivo de líquidos sinoviales. En todos los casos, se considera que un cultivo negativo no excluye la presencia de *B. burgdorferi*.

Junto a la variable rentabilidad del cultivo del microorganismo, se ha evidenciado la limitación en el estudio patogénico del mismo por el efecto que se produce en los aislados tras sucesivos subcultivos en dichos medios, aunque se ha demostrado que se mantiene su capacidad infectiva (Sigal *et al.*, 1998).

Debemos señalar que el lento crecimiento y las dificultades de cultivo no permiten en la actualidad la realización de estudios de sensibilidad con significación clínica.

1.3.1.3.- Detección de antígenos específicos.

Las limitaciones de los diferentes procedimientos de diagnóstico disponibles, ha conducido al desarrollo de métodos más sencillos y específicos, como la detección de antígenos de *B. burgdorferi* expresados en las distintas fases de la enfermedad, resultando útiles para el diagnóstico en los casos de enfermedad reciente o persistente. Así la detección de la proteína OspA mediante anticuerpos monoclonales ha permitido el diagnóstico en pacientes seronegativos (Brunner, 2001).

También han sido desarrollados dos métodos para la detección de antígenos en orina, uno mediante inmunotransferencia inversa (Western blot reverso) y otro de enzimoimmunoanálisis sobre membrana (Dot blot) utilizando anticuerpos específicos de conejo frente a un amplio número de antígenos, entre los que se incluyen las proteínas OspA, OspB y OspC, y otras proteínas de peso molecular comprendido entre los 39 kDa y 93 kDa) definiéndose un límite de detección de 12,5 ng/ml. Otros métodos de detección como la inmunofluorescencia directa (IFD) han mostrado su utilidad en tejido cerebral, pero no son habitualmente empleados en los laboratorios de Microbiología clínica (MacDonald *et al.*, 1986 y 1987).

Los principales inconvenientes de los antígenos derivan de dos problemas, su codificación genética en plásmidos lo que les confiere una importante variabilidad y su falta de especificidad, ya que muchos epítomos están presentes en otros microorganismos (espiroquetas, enterobacterias, etc.) o tejidos humanos (Luft, 1991). La proteína de 41 kDa, que puede desencadenar muchas de las alteraciones clínicas de la neuroborreliosis, ha sido encontrado de forma más frecuente en diversas series, lo que puede ser por tratarse de uno de los antígenos más inmunógeno y, a la vez, inespecífico.

Se han estudiado específicamente otras proteínas para conocer su rentabilidad diagnóstica. Así, la detección de la lipoproteína de 39 kDa, es sensible y específica como marcador de estadio tardío de la enfermedad de Lyme aún cuando algunos autores encuentran falsos positivos en casos de sífilis, la proteína de 93 kDa es, igualmente, específica de estadios tardíos mientras que, por el contrario, las proteínas de 21-25 kDa y la de 34 kDa son altamente específicas de estadios tempranos (Dressler, 1993b). Recientemente (Schwan, 1996) se ha identificado el antígeno GlpQ como un epítipo específico presente en enfermos con borreliosis recurrente. Este hecho es de gran interés clínico, ya que su incorporación en las pruebas puede excluir falsas serologías positivas en el diagnóstico de la borreliosis de Lyme.

1.3.1.4.- Amplificación de ADN mediante reacción de la polimerasa (PCR) y sondas de ADN.

Respecto a los métodos de diagnóstico molecular, se ha desarrollado procedimientos muy diferentes, con amplificación de secuencias génicas que codifican distintas lipoproteínas de la membrana externa como OspA , OspB y OspC, o proteínas de grupo como la flagelina. El método de amplificación más empleado es la nested PCR para OspA (Wallich *et al.*, 1990; Picken, 1992) habiéndose igualmente desarrollados para la identificación de *Borrelia* spp. en garrapatas (Lebech *et al.*, 1993). Los métodos de amplificación de ADN presentan una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo la persistencia de un resultado positivo no permite distinguir entre infección activa o resolución de la misma, debido a la permanencia de genomas no viables (Nadelman *et al.*, 1998).

En la actualidad, se subrayan como principales ventajas sobre otros métodos directos o indirectos, la posibilidad de establecer un diagnóstico precoz sin necesidad de esperar la seroconversión del paciente; el adecuado diagnóstico en pacientes que presentan una sintomatología infrecuente o evolucionan hacia un cuadro crónico; y la correcta monitorización del tratamiento, ya que los métodos serológicos no permiten evidenciar una respuesta eficaz por persistencia de anticuerpos de clase IgG por años.

Aceptando la variable inoculación de espiroquetas en cada caso, en general se estima la presencia de un bajo número de genomas en las muestras clínicas, obligando a métodos de obtención de ADN muy sencillos para evitar su pérdida. Las técnicas de amplificación del genoma son de especial eficacia, pero tienen el problema de que una constante en esta enfermedad es el bajo número de organismos infectantes.

La carga de espiroquetas transmitidas por el vector en el momento de la infección puede oscilar de unos cientos hasta 5.000 y el número de genomas en líquidos corporales puede ser menor de 50/ mL. En estas circunstancias es necesario, en primer lugar, disponer de técnicas de extracción y purificación de ADN que eviten al máximo la pérdida de material durante el procesamiento de la muestra.

Para este objetivo, se han descrito una gran variedad de métodos dependiendo de la muestra a tratar. Los métodos tradicionales incluyen una disrupción de las células, inactivación de ARNasas y/o ADNasas con sales caotrópicas, degradación de proteínas con proteinasa K, extracción del ADN con fenol-cloroformo y precipitación con alcoholes (etanol o isopropanol).

Dado el número de genomas en las muestras, se han ensayado métodos alternativos que aumentan la sensibilidad. Entre ellos, la extracción con tiocianato de guanidina permite la extracción y precipitación sin cambiar de tubo, evitando la pérdida de material en los trasvases que se realizan en los métodos tradicionales.

Otros métodos más simples aplicables a muestras líquidas realizan una centrifugación y posterior tratamiento por ebullición del sedimento, sin extracción posterior. En cualquier caso se recomienda la adición de "carriers" (glicógeno, ADN de *leptospiras*, etc.) que ayudan a precipitar pequeñas cantidades de ADN. También existen en el mercado procedimientos basados en matrices de resina que captan el ADN que será eluído a través de columnas desechables.

El rendimiento de estos procedimientos puede ser muy elevado, considerándose que en muestras cutáneas de pacientes con eritema *migrans* o acrodermitis crónica atrófica se asemeja al cultivo. Mediante nested-PCR con iniciadores para la secuencia que codifica OspA se han obtenido entre un 70-80% de resultados positivos en casos de eritema *migrans*.

En pacientes con neuroborreliosis se informan resultados positivos muy variables (del 25% al 100% de los casos) presentándose resultados más homogéneos en las muestras de líquido sinovial en pacientes con artritis de Lyme (entre el 70% y el 90%) que contrastan con el bajo número de resultados positivos en el cultivo de este tipo de muestra. Para muestras séricas o de sangre total, su rentabilidad es muy baja y, en general, no son muestras recomendadas, de modo similar a su escasa utilidad en el cultivo bacteriano (Wilske *et al.*, 2002). Los resultados en orina son más difícilmente interpretables (Lebech *et al.*, 2000) y no se ha establecido una pauta diagnóstica, ya que se han detectado resultados PCR positivos en pacientes sanos con anticuerpos anti-borreliosis en suero.

Algunos autores (Hyde *et al.*, 1989; Lebech *et al.*, 2000) han destacado la variabilidad de resultados positivos en relación al estadio evolutivo de la enfermedad, resultando particularmente útil en los cuadros con afectación neurológica, ya que se ha demostrado la permanencia de los microorganismos en los nervios periféricos (Maimone *et al.*, 1997).

La técnica de amplificación también es vital a la hora de obtener una buena sensibilidad. Un test de PCR anidado, ("nested" o "semi-nested") donde se realizan dos amplificaciones consecutivas mediante el uso del producto de la primera amplificación como diana para la segunda, proporciona un gran rendimiento. El procedimiento de detección de los amplificados también ayuda a mejorar la sensibilidad. Un método de detección ampliamente utilizado, con una gran sensibilidad y especificidad comprobadas por diferentes grupos, es el llamado "Reverse Line Blotting", donde los productos de amplificación, marcados con biotina (mediante el uso de uno de los iniciadores marcados) se hibridan sobre una membrana de nylon en la que se han aplicado sondas específicas de diferentes especies.

De esta manera, se obtiene un resultado positivo/negativo además de la especie del organismo causal. La variabilidad en los genes elegidos para su amplificación es uno de los factores que introducen problemas de normalización en este tipo de pruebas. La elección tiene que pasar obligatoriamente, por el empleo de regiones del genoma con poco grado de variabilidad. Se han descrito casi tantos métodos como genes específicos tiene el microorganismo. Los más utilizados son los que amplifican diversas regiones de OspA (en su zona menos variable) regiones de fla (flagelina) p93 (gen cromosómico con poca variabilidad) y los espacios intergénicos entre las unidades 5S y 23S del ADN ribosómico. En cualquier caso, OspA es, con diferencia, el gen más empleado y el que permite obtener resultados con una mayor sensibilidad.

La detección directa de secuencias de ADN específicas mediante PCR puede ser una técnica prometedora que complementa las pruebas serológicas, si bien no está exenta de problemas. La causa de error más frecuente es la aparición de falsos positivos como consecuencia de la amplificación de un ADN distinto en la muestra analizada y la dificultad surgida, a veces, en la hibridación de los iniciadores al ADN diana debido a la gran variabilidad genómica en *B. burgdorferi*. Los falsos negativos se deben, sobre todo, a la existencia de una pequeña cantidad de ADN diana y a la presencia de inhibidores de la *Taq polimerasa*. La aparición de estos inhibidores depende del tipo de muestra siendo poco frecuentes en LCR y más en muestras de orina, biopsias de tejidos y sangre. En líquido sinovial parece más conveniente la amplificación del gen OspA (Nocton, 1996) aún cuando su utilización en nuestro medio está dificultada por presentar una homología con las cepas europeas de sólo el 80%. De esta forma, las infecciones por *B. garinii* no serían detectadas utilizando los mencionados iniciadores.

En la artritis de Lyme, la investigación de ADN en orina es menos sensible que los métodos serológicos, posiblemente al bajo número de microorganismos y a su aparición en forma intermitente. En los casos de neuroborreliosis, la PCR pudiera ser una técnica a tener en cuenta dada la dificultad del diagnóstico por cultivo en muestra de LCR. No obstante, las últimas aportaciones son poco alentadoras, con tasas de positividad del 25% (Nocton, 1996).

Por tanto, la PCR es un método sensible y específico, pero con el inconveniente de no haber encontrado la diana idónea, bien por falta de expresión (ADNr 16S) o bien por variabilidad en la secuencia (OspA). En este momento, no sustituye a la evaluación clínica y a la serología, aunque si completa el diagnóstico en aquellos casos en los que se puede obtener un resultado positivo (Schabereiter *et al.*, 2003). Un resultado negativo no excluye la existencia de enfermedad.

1.3.1.5.- Inoculación animal.

Las dificultades del crecimiento de *B. burgdorferi* en medios artificiales y en medios celulares, han llevado a ensayar distintos modelos de inoculación animal. Así, Barthold *et al.* (1990) propusieron la inoculación de muestras clínicas en ratones C3H/He, consiguiendo un crecimiento más rápido (15 días) que el cultivo en BSK II, conservándose la virulencia de los microorganismos.

Por otro lado, estos ensayos resuelven el problema de la contaminación que se produce en los medios *in vitro*, evitándose la adición de antibióticos que puedan contribuir negativamente a la viabilidad de los mismos.

Mediante este tipo de aislamiento, el grupo de trabajo de borreliosis en España, fue capaz de reproducir un cuadro de artritis similar al encontrado en la enfermedad de Lyme y evidenciar lesiones cutáneas alejadas del punto de inyección en ratones C3H/He, empleando el material de una biopsia cutánea de un paciente conteniendo *B. garinii* (Oteo *et al.*, 1998).

1.3.2.- Métodos indirectos.

Aceptándose que diagnóstico de borreliosis de Lyme es esencialmente clínico, las pruebas serológicas representan una ayuda relevante, si bien no existe una prueba definitiva y universalmente considerada, en gran medida debido a la variabilidad de los aislados que intervienen en las diferentes áreas endémicas.

Se considera que la detección de anticuerpos específicos son más eficaces en los estadios finales de la enfermedad, donde globalmente alcanzan una especificidad entre el 84% y 93% (Fahrer *et al.*, 1991) mientras que disminuye hasta un 70-80% en la fase diseminada precoz y son escasamente específicos en el primer estadio (20-25%).

Aunque se han propuesto diversos métodos de detección de la respuesta inmunitaria específica en los casos de enfermedad, se acepta en la actualidad que los métodos de enzoinmunoanálisis (EIA) y de inmunotransferencia (Western blot) constituyen los más adecuados para este diagnóstico indirecto.

1.3.2.1.-Inmunofluorescencia indirecta.

La observación de espiroquetas fijadas en portaobjetos mediante anticuerpos de clase IgG e IgM marcados con fluoresceína, representa una prueba rápida y simple, que ha sido propuesta como método de cribado en áreas endémicas, pero presenta como todas las inmunofluorescencias limitaciones importantes por la subjetividad del observador y, en este caso concreto, por las frecuentes reacciones cruzadas que se detectan, principalmente con *T. pallidum* y *Leptospira* spp. (Magnarelli *et al.*, 1990; Sugiyama *et al.*, 1993) y posiblemente con espiroquetas orales en pacientes con enfermedad periodontal. Se ha empleado para diagnóstico en diversas muestras biológicas como suero, LCR, líquido sinovial, con una sensibilidad superior al test de ELISA según estudios realizados por el Center for Disease Control and Prevention americano (CDC) siendo del 58,9% mediante IFI, frente al 32,7% de los métodos de EIA convencionales y una especificidad mínima frente al Wb (Dzierzecka *et al.*, 2002). Como se ha referido su principal indicación es el cribado de muestras clínicas. Los títulos considerados representativos de infección son para IgG $\geq 1/256$ y para IgM en suero $\geq 1/32$ y para IgM e IgG en LCR $\geq 1/4$ (Fraile. Tesis doctoral, 1993). Aunque algunos autores preconizan que es tan reproducible como el ELISA (Bakken, 1992) lo cierto es que es más difícil de normalizar. Es rentable en estadios tardíos de la enfermedad, pero cuando la manifestación que se presenta es el eritema migrans. Uno de los aspectos importantes sería establecer la dilución óptima para el punto de corte, ya que se han llegado a manejar valores tan dispares como 1/16, 1/128 o incluso 1/256, con lo que la interpretación es difícil y la influencia en los resultados epidemiológicos, notable (Gutiérrez, 1995).

1.3.2.2.- Enzimoimmunoanálisis.

Se han desarrollado distintos métodos según el antígeno empleado, utilizando básicamente antígeno celular sonificado, antígeno recombinantes y antígeno flagelar. En conjunto se considera una prueba más sensible y específica que la IFI ó la inhibición de la hemaglutinación (Graft *et al.*, 1984) presentando como principales ventajas la automatización de la prueba. Su indicación principal es el cribado inicial de los casos sospechosos de la enfermedad, aunque también se ha empleado en estudios epidemiológicos de poblaciones. Como todos los resultados serológicos disponibles para el diagnóstico de la borreliosis de Lyme, su interpretación debe realizarse en el contexto clínico-epidemiológico del paciente (Luyasu *et al.*, 2001; Bunikis *et al.*, 2002).

Las limitaciones son comunes a otros procesos infecciosos, ya que se observan resultados falsos negativos en las fases precoces, presenta reactividad cruzada con un número amplio de etiologías infecciosas y no infecciosas, y es difícil su interpretación en pacientes sanos residentes en áreas endémicas (Bunikis *et al.*, 2002). Recientemente, se ha manifestado la dificultad de su valoración en individuos que hayan sido vacunados.

La elección de un ELISA basado en antígenos individuales (como el ELISA-flagelo) debe ser cuidadosamente evaluada, ya que se ha descrito una variabilidad apreciable entre las cepas de las diferentes "áreas endémicas" aún dentro del mismo país; esto supone que idéntico ELISA con un determinado antígeno flagelar puede no presentar la misma sensibilidad en todas aquellas, subestimando el diagnóstico de la enfermedad especialmente en las fases tempranas de la misma.

Por estas limitaciones, se han propuesto otros métodos de EIA utilizando el antígeno VlsE, que reproduce la secuencia de la región invariable 6 del VlsE, o distintas proteínas recombinantes sin incluir la lipoproteína OspA (Gomes-Solecki *et al.*, 2002; Burkert *et al.*, 2002) encontrándose la ausencia de falsos positivos en donantes sanos y en individuos vacunados (Marques *et al.*, 2002) aunque persiste la reactividad cruzada en pacientes con sífilis, ehrlichiosis y artritis reumatoide (Magnarelli *et al.*, 2002).

1.3.2.3.- Inmunotransferencia o Western blot.

Los métodos de inmunotransferencia constituyen la prueba de referencia entre los métodos de diagnóstico serológico, permitiendo la detección de anticuerpos de clase IgM e IgG frente a una diversidad de antígenos específicos de distintas especies de *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* o *B. afzelii* (Norman *et al.*, 1996). Considerada como prueba confirmatoria por su elevada sensibilidad y especificidad, siendo necesaria su realización tras un resultado positivo o dudoso en la prueba de ELISA, permite determinar un amplio espectro de anticuerpos específicos frente a las distintas proteínas, de modo independiente a su consideración para un resultado positivo o negativo, siendo las más importantes las de 93,41,39 34 y 23. Además, se ha confirmado su utilidad para monitorizar una respuesta al tratamiento (Aberer *et al.*, 1999).

Sin embargo, en la actualidad se observan multitud de limitaciones que cuestionan la validez de este criterio. Particularmente, las diferencias epidemiológicas reconocidas entre los casos de la enfermedad en Europa y Norteamérica, plantean la necesidad de emplear lisados de aislados propios así como criterios de interpretación determinados en cada área.

Además de los problemas referidos, presenta las limitaciones propias de los métodos serológicos: resultados falsos negativos en fases precoces (Issakainen *et al.*, 1996) y equívoca significación de los resultados para anticuerpos IgM en poblaciones de bajo riesgo o en pacientes con clínica atípica (Porwancher, 1999). Presenta reactividad cruzada con otras infecciones como sífilis y mononucleosis infecciosa, o enfermedades sistémicas como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. (Humair *et al.*, 1998; van Dam *et al.*, 2001). Existe una gran variedad de técnicas comerciales disponibles, variando tanto en la especie como en la fracción antigénica utilizada, lo que conduce a grandes diferencias en sensibilidad, de entre un 50 y un 93,8%). Por lo general, un esquema que incluya un sonicado de células completas como antígeno en un ELISA indirecto va a tener una buena sensibilidad. Hay laboratorios que añaden técnicas alternativas tales como un ELISA con proteínas del flagelo obtenidas por fraccionamiento celular o con fragmentos recombinantes de los principales antígenos inmunodominantes de las especies.

Se recomienda una determinación tanto de anticuerpos IgG como IgM por separado aunque, dependiendo de la fase en la que esté el paciente, la ausencia de IgM no descarta una enfermedad activa. Aunque la variedad de los ELISA disponibles en el mercado hace muy difícil su normatización, la modificación local de los valores de corte y el esquema de confirmación por IB de todas las muestras con resultado positivo o equívoco puede obviar esas diferencias. En los casos neurológicos con afectación del SNC es necesaria la confirmación de producción intratecal de anticuerpos mediante estudio del índice de IgG/albúmina. Sin embargo y dado que en esta fase es frecuente una permeabilidad patológica de la barrera hematoencefálica un índice no significativo no descarta tampoco la enfermedad.

Se recomienda el empleo de cepas de pase bajo (con la mayoría de las proteínas intactas) y que expresen OspC (hay mucha variabilidad en este punto y OspC es una de las proteínas vitales para la interpretación de un IB). Por todos estos motivos, es difícil la definición de criterios de interpretación internacionales. En España y con los datos disponibles hasta la fecha sobre la distribución de cepas las especies que deberían emplearse en un Wb son *B. garinii* y *B. burgdorferi*. Entre las recomendaciones aceptadas hasta la fecha para la interpretación de la prueba las publicadas por centros de nuestro entorno hay grandes diferencias. En general, los criterios europeos son más laxos, lo que implica disponer de un método muy ajustado y normatizado para evitar al máximo los problemas asociados a una baja especificidad. Actualmente, dentro de los grupos de estudio en la Acción Concertada sobre la Borreliosis de Lyme de la Unión Europea (EUCALB) se está intentando definir criterios para su interpretación. La formulación de un criterio único europeo se considera poco realista dadas las diferencias en la distribución de especies y la incidencia en las zonas endémicas.

La reactividad en IgM sólo es imprescindible para los casos de fase 1 y para los casos con enfermedad diseminada temprana, al comienzo de las manifestaciones neurológicas y articulares. Más adelante en el curso de la enfermedad, sólo se detectan, generalmente, niveles altos de IgG. Así mismo, el número de bandas positivas para IgM puede decrecer con el tiempo en ausencia de tratamiento.

Núñez (1996) selecciona bandas mediante la elección de aquellas que reflejaran los anticuerpos IgG menos frecuentes en individuos que carecían de factores que

podieran interferir en la respuesta de anticuerpos y las que presentaban un comportamiento adecuado, dada su frecuencia, en un grupo con diagnóstico establecido para la borreliosis de Lyme. Posteriormente, y tras comprobar la utilidad diagnóstica con los criterios establecidos por otros autores, comprobamos cómo la presencia de anticuerpos frente a las proteínas de 93, 39, 34 y 23 kDa mostraba una mayor rentabilidad.

Para establecer el diagnóstico de la enfermedad actual o, en su defecto, de infección previa, los resultados de IgM se deben interpretar según los criterios de Engstrom (1995) y los de IgG según los de Dressler (1993) en base a los estudios de Johnson (1996) y Leude (1996). Cuando se quiera diagnosticar neuroborreliosis con métodos serológicos es necesario demostrar la producción local de anticuerpos, aunque se han descrito falsos resultados negativos en el 10% de los enfermos en fases iniciales (Haass y Treib, 1996). Los anticuerpos IgM pueden persistir durante mucho tiempo y en estos casos, se debe considerar la realización de un nuevo tratamiento si se produce un aumento significativo del título de anticuerpos acompañado de nuevos síntomas de la enfermedad (Gutiérrez, 1995; Hofman, 1996). Puede existir reactividad serológica compartida con infecciones por otras espiroquetas y falsa reactividad en las infecciones agudas por *herpes* virus, individuos infectados por el VIH, pacientes con manifestaciones neurológicas y reumatológicas, mujeres gestantes e incluso en sujetos sanos (Núñez, 1996). La causa de todos estos falsos positivos pudiera deberse a la síntesis de anticuerpos frente a estructuras antigénicas similares a *B. burgdorferi*, aún cuando no puede excluirse de forma taxativa el hecho de que estén realmente infectados por esta espiroqueta. La simple positividad de bandas en el Western blot puede indicar que estamos ante un contacto pasado con el microorganismo, una infección aguda activa, una infección persistente, síndromes post-infecciosos, reactividad cruzada con otros microorganismos, o ser fruto de una estimulación monoclonal o policlonal inespecífica de linfocitos B en el curso de infecciones por virus linfotropos.

Las reacciones cruzadas descritas para este microorganismo y las detectadas en nuestro medio se observan en pacientes con anticuerpos frente a *Micobacterium tuberculosis* y *Rickettsia conorii* pueden presentar reactividad cruzada por ELISA, pero su reactividad por IB se limita a un pequeño repertorio de bandas que no confunden un diagnóstico. Sin embargo, la reactividad en el IB de algunos casos de brucelosis

(cuya forma neurológica puede dar lugar a confusión clínica y epidemiológica) fiebre recurrente (con una sintomatología neurológica que también comparte ciertos aspectos con la BL) sífilis, fiebre Q, bartonelosis o legionelosis sí son un problema importante de interpretación del bandeado de la prueba y por tanto, ante un IB reactivo en pacientes de zonas endémicas para estas infecciones, es fundamental descartar esta reactividad cruzada antes de evaluar su resultado. La información clínica es aquí muy importante. La reactividad cruzada con el *Treponema pallidum* es la más frecuentemente descrita y sólo la negatividad serológica de las pruebas de sífilis (treponémicas y reagínicas) avalarían el diagnóstico de BL. El solo hallazgo de una prueba treponémica positiva no descarta de ninguna manera una BL, ya que se han descrito hasta un 43% de casos de borreliosis con reactividad cruzada frente a *Treponema pallidum* especialmente cuando se emplea FTA. Una estimulación oligoclonal, como las observadas en casos de infección con virus Epstein-Barr, Citomegalovirus y *Mycoplasma pneumoniae* pueden producir una reactividad frente a un gran repertorio antigénico de *B. burgdorferi*. Así mismo, las reacciones autoinmunes que aparecen en casos de lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y otros procesos con patogénias similares, pueden inducir reacciones falsas positivas, tanto por ELISA como Wb, y generalmente de la clase IgM, por lo que se debe realizar un estudio de anticuerpos autoinmunes que descarten estas entidades clínicas.

1.3.2.4.- Otros métodos serológicos.

La prueba de hemaglutinación pasiva (HM) ha sido propuesta por varios autores como método alternativo al enzoinmunoanálisis (Pavia *et. al.*, 2000) basándose en que globalmente presenta una mayor especificidad (98%) y sensibilidad (100%) que los métodos de ELISA. En fases iniciales de la enfermedad, con eritema *migrans*, encuentran una reactividad ligeramente superior (46-48% frente al 42% del ELISA) pero han sugerido su utilidad en todos los estadios de la enfermedad.

El test de fijación del complemento, propuesta por Artsob *et al.* (1990) no ha sido considerada como prueba de utilidad clínica. Prueba de estimulación de linfocitos específicos, se utiliza en pacientes con serología negativa (ELISA y Western blot negativos) para evaluar una posible borreliosis seronegativa. Los preparados antigénicos para estas pruebas incluyen lisados sonicados de células completas de *Borrelia burgdorferi*, o antígenos purificados parcialmente y antígenos recombinantes.

Los métodos inmuno-cromatográficos con antígeno purificado de *B. burgdorferi sensu stricto* para detección de anticuerpos IgM e IgG como el Rapid Scope (Microbe Scope AG) refieren una sensibilidad definida del 100% y una especificidad del 91%, correlacionándose con la prueba confirmatoria de Wb en el 99-100% de los casos analizados.

Recientemente se ha utilizado una técnica nueva, denominada *Borrelia*-specific T-cell reactivity, usando interferon-gamma ELISPOT assay (Ekerfelt *et al.*, 2001) en pacientes donantes sanos reactivos mediante las pruebas de ELISA previas. Los autores aseguran su utilidad en el diagnóstico de la borreliosis latente.

Un método aún no comercializado, basado en la propiedad de los anticuerpos de destruir las borrelias *in vivo* ha sido propuesto por Sadziene y Barbour (1995). La lectura se realiza mediante citometría de flujo.

1.4.- Criterios de diagnóstico clínico

Como hemos señalado, la borreliosis, al igual que la sífilis, se presenta como "el gran imitador" y a menudo causa problemas de diagnóstico por presentar características similares a otras muchas enfermedades. Además, con frecuencia sigue un curso crónico-recurrente con periodos de latencia entre las crisis, que complica el estudio y seguimiento de los casos, requiriéndose por todo ello un conjunto de datos clínicos, proporcionados por una adecuada sospecha clínico-epidemiológica, una anamnesis detallada, una exhaustiva exploración física y una variedad de pruebas complementarias.

El diagnóstico puede ser exclusivamente clínico cuando se evidencia la presencia de la lesión eritema *migrans*, pero en un 60% de los casos esta lesión está ausente o se encuentran otras lesiones atípicas, haciéndose necesario el estudio de antecedentes epidemiológicos y la realización de diversas pruebas de diagnóstico anatomopatológico o microbiológico. En los cuadros más evolucionados sin lesiones cutáneas o con lesiones cutáneas tardías, el diagnóstico clínico debe confirmarse mediante métodos serológicos, si bien un resultado positivo aisladamente no constituye por si solo una prueba de borreliosis (Barbour *et al.*, 1989) del mismo modo

que un resultado negativo en pacientes con una fuerte sospecha clínica no descarta el diagnóstico. Esta compleja evaluación determinó la proposición de una serie de criterios diagnósticos (Barbour *et al.*, 1989; Guerrero-Espejo *et al.*, 1994):

Borreliosis cierta: Presencia de eritema *migrans* en ausencia de resultado serológico positivo o bien, la presencia de clínica de borreliosis tardía con pruebas serológicas positivas.

Borreliosis probable: Antecedente de eritema *migrans* o de exposición en área endémica, no siendo preciso el antecedente de picadura por garrapata, junto a un signo clínico de enfermedad que esté presente en la actualidad. Las alteraciones articulares deben ser confirmadas mediante radiografía o aspiración del líquido sinovial. En los cuadros neurológicos debe existir alteración del líquido cefalorraquídeo (no siendo precisa la presencia de producción de anticuerpos locales frente a la *Borrelia burgdorferi* y además, la confirmación serológica mediante ELISA o IFI positivos, siendo el Western blot dudoso o negativo.

Borreliosis posible: Antecedente de exposición en área endémica más presencia de clínica "atípica" y serología positiva o dudosa.

Debe considerarse que los CDC, incluye como signos y síntomas clínicos principales el eritema *migrans* o manifestaciones frecuentes como artralgias, mialgias, artritis franca, palpitaciones, cefalea, parestesias, cambios visuales y síndrome de fatiga crónica (Holmes *et al.*, 1994).

Por otra parte, el grupo de trabajo para la borreliosis de Lyme en España, incluyó también, como signos clínicos diagnósticos de la enfermedad la presencia de acrodermitis crónica atrófica o de linfocitoma cutáneo benigno (Oteo *et al.*, 1995).

1.5.- Profilaxis y tratamiento.

Además de acciones terapéuticas concretas, se proponen diferentes recomendaciones de prevención dirigidas a personas con un importante factor de exposición como son los trabajadores forestales, niños que realizan excursiones al campo y turistas que viajan a zonas endémicas, orientadas fundamentalmente a evitar

la picadura del vector. Así, se recomienda el uso de calzado y ropas adecuados para estancias en zonas de bosque o matorral, el uso de insecticidas del tipo DEET (N,N-dietilmetatoluamida) para aplicación cutánea o derivados con permetrina para aplicación sobre ropas, y de manera frecuente, la inspección de áreas cutáneas particularmente pliegues y zonas pilosas para poder desprender de manera precoz las garrapatas adheridas.

Es de interés la inspección de los animales de compañía tras la realización de paseos o estancias por áreas donde se considere la existencia de garrapatas. Otras medidas encaminadas a eliminar el vector, como el rociado de los matorrales con insecticidas, además de resultar costoso, ha demostrado su ineficacia (Endris *et al.*, 2002; de Vries *et al.*, 2002).

1.5.1.- Profilaxis antimicrobiana y vacunación.

Aún en zonas endémicas, el riesgo de infección por *Borrelia burgdorferi* después de una picadura reconocida de garrapata es bajo, variando entre un 1,2 – 5% según diferentes estudios (Wilske, 2002; Jones *et al.*, 2002) por lo que no se considera indicado el tratamiento antimicrobiano profiláctico de modo rutinario. Además, no se ha demostrado diferencia significativa en la prevención de la aparición de eritema *migrans* en sujetos en los que se administra amoxicilina previamente a la picadura de una garrapata frente a los que toman un placebo (Johnson *et al.*, 1984).

Desde mediada la década de los años noventa, se han desarrollado y evaluado diferentes vacunas con el fin de proteger a personas que residen en zonas endémicas (con una incidencia >1% anual) o que viajan a éstas áreas. De ellas, únicamente la vacuna monovalente con lipoproteína de superficie OspA (Luke *et al.*, 1997) ha demostrado su efecto protector en animales y voluntarios sanos, siendo efectiva en edades comprendidas entre 15 y 65 años (Sigal, 1998).

Estudios realizados en adultos vacunados, demuestran que el 76-96% presentan un incremento en la producción de anticuerpos específicos tras dos semanas de la inoculación de la segunda dosis. Los mismos estudios sugieren la necesidad de una tercera dosis de vacuna al año de recibir la primera, ya que se incrementa su eficacia. En otro estudio realizado por Parent (1999) se afirma que tras la inoculación

de 2 dosis, se alcanzaría el 50% de protección; tras 3 dosis, el 90% y con una cuarta dosis, la protección sería del 95% o mayor. En los pacientes que presentan borreliosis de Lyme, aunque la vacunación no resuelve la infección establecida, no se incrementa el riesgo de activación de mecanismos autoinmunitarios asociados (Schoen *et al.*, 2003). Por otra parte, puede positivizar las pruebas serológicas de cribado tras la vacunación (Marques *et al.*, 2002) del mismo modo puede afectar a la interpretación del Western blot (Gomes-Solecki *et al.*, 2002).

La vacuna elaborada por los laboratorios SmithKline Beecham, denominada LYMErix, fue aprobada por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) a finales de 1998. Sólo protege frente a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* y se desconoce la protección cruzada frente a otras especies (Huebner *et al.*, 2000). Existe otra vacuna formada a partir de antígenos recombinantes (rOspA) elaborada por los laboratorios Pasteur Merieux Connaught, denominada ImuLyme (Alexopoulou *et al.*, 2002).

En Europa, debido a la mayor heterogeneidad de la lipoproteína OspA se considera necesario la preparación de otro tipo de vacuna, que fueran polivalentes, investigándose en la actualidad el potencial de las vacunas constituidas por las proteínas OspC, DbpA, p35 ó p66. En ensayos realizados con perros, las vacunas con antígenos polivalentes parecen ser efectivas (Straubinger *et al.*, 2001). Las indicaciones de la vacuna son restringidas, ya que no deben usarse en campañas de vacunación masivas, ni debe incluirse en los programas de vacunación infantil (Miller, 1999) aunque se acepta que la mejor forma de prevención en zona endémica sería la vacunación, ya que en regiones donde el riesgo de enfermedad es moderado o alto (del 0'1-1%) el uso de la vacuna en las personas que por su actividad laboral incrementen el riesgo de exposición como son los trabajadores agrícolas, los guardas forestales, constituiría un claro beneficio.

Para los turistas que viajen a una zona endémica por corto periodo de tiempo, la decisión de vacunar o no queda supeditada al criterio facultativo. Entre los inconvenientes destacan el elevado coste y la ausencia de experiencia en menores de 15 años de edad (no aprobada para niños entre 1-15 años) población particularmente susceptible en zonas endémicas (Onrust *et al.*, 2000).

1.5.2.- Tratamiento de la borreliosis.

Si bien el eritema *migrans* y las manifestaciones asociadas (mialgias, artalgias y astenia) regresan espontáneamente, el tratamiento antibiótico está indicado para acortar el periodo de evolución y prevenir las complicaciones neurológicas y articulares. El tratamiento más comúnmente empleado es el uso de antibióticos betalactámicos (amoxicilina 500 mg/8 horas) o macrólidos (eritromicina 250 mg/12 horas) en pacientes alérgicos a betalactámicos, en la primera y tercera fase de la enfermedad, y tetraciclinas (doxiciclina 100 mg/12 horas) durante la segunda fase de la enfermedad (Dattwyler *et al.*, 1990). Para la enfermedad localizada en la piel, el tratamiento durante 10 días suele ser suficiente, pero en las formas diseminadas de la enfermedad se recomiendan tratamiento prolongados de 20-30 días. En las formas con presentación neurológica, también para la carditis, se recomienda ceftriaxona, a razón de 2 gr/ día durante dos a cuatro semanas, ya que las penicilinas y tetraciclinas no atraviesan la barrera hematoencefálica (Donovan *et al.*, 2002)

En las formas clínicas de borreliosis de Lyme presentes en Europa, la resolución clínica del eritema *migrans* es rápida con tratamiento. Después de 8-14 días, el 56% de los pacientes ya no muestran lesión cutánea (Nadelman *et al.*, 1996) persistiendo la fatiga y astenia durante seis meses en un 19% de los pacientes. Este porcentaje es inferior que el observado en grupos de pacientes analizados en EE.UU., donde hasta un 35% de los mismos presentan esta clínica de larga evolución. Respecto a la aparición de complicaciones tardías de tipo neurológico o articular, en los pacientes europeos se observan en un 1% de los casos (Nadelman *et al.* 1998; Lipsker *et al.*, 2001).

Otros antimicrobianos se han propuesto para el tratamiento de las infecciones por *Borrelia burgdorferi*, macrólidos como azitromicina y claritromicina, demostrándose una eficacia similar al tratamiento referido, (Massaroti *et al.*, 1992; Dattwyler *et al.*, 1996). Y en los niños, cefuroxima axetil (20 mg/kg/d y 30 mg/kg/d durante 20 días, Eppes *et al.*, 2002).

2.-Objetivos

La borreliosis de Lyme es una infección producida por aislados de *Borrelia burgdorferi* *sl.*, un grupo de espiroquetas transmitidas por garrapatas. Se considera una enfermedad endémica en áreas con clima templado donde el principal vector, *Ixodes ricinus*, se encuentra ampliamente distribuido. Constituye la enfermedad más frecuente transmitida por un vector en los países industrializados y es el objeto de numerosos y diversos trabajos de investigación.

Fruto de esos estudios, en la actualidad se conocen distintos aspectos sobre la biología, la patogenia y la epidemiología de esta borreliosis. Sin embargo, la variedad de manifestaciones clínicas y las dificultades de un eficaz diagnóstico microbiológico determinan una compleja situación respecto al diagnóstico de certeza y el tratamiento de los pacientes afectados.

Las diferencias epidemiológicas, clínicas y serológicas entre los cuadros observados en Estados Unidos y Europa, junto a la variable detección de la enfermedad en nuestro país, sugieren la posibilidad de la participación etiológica de varias cepas de *Borrelia burgdorferi* *sl.* con distinto poder patógeno así como el posible papel de otros vectores ixódidos.

Con estas consideraciones nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Obtener y caracterizar las garrapatas ixódidas presentes en distintas áreas de la provincia de Valencia, independientemente de su relación con la población de pacientes atendidos en el HGUV.
2. Determinar la presencia de aislados de *Borrelia burgdorferi sensu lato* en las garrapatas obtenidas, mediante examen microscópico, cultivo y amplificación de ADN específico (PCR) de este microorganismo.
3. Seleccionar un grupo de muestras, remitidas a la unidad de Microbiología del servicio de Análisis Clínicos del HGUV, con resultado positivo o dudoso mediante la prueba de enzimoimmunoanálisis, utilizada para el cribado de las mismas.

4. Analizar la significación de dicho resultado positivo mediante otras pruebas específicas y confirmatorias de borreliosis Lyme, así como evaluar la presencia de reactividad cruzada con otros procesos nosológicos, a fin de obtener una población de pacientes con marcadores serológicos sugestivos de borreliosis de Lyme.
5. Estudiar las características clínicas y evolución de los pacientes seleccionados, a fin de conocer las formas posibles de presentación de la enfermedad.
6. Evaluar la significación de las pruebas utilizadas para el diagnóstico microbiológico de la borreliosis de Lyme en nuestro medio.

3.-Material y Métodos

3.1.- Estudio de poblaciones de ixódidos.

La naturaleza de los artrópodos objeto de estudio, y particularmente por su limitada viabilidad durante el periodo de meses más fríos del año, nos obligó a establecer dos periodos de recogida de los mismos con el fin de disponer de las formas adultas en un estado adecuado para su estudio. Las garrapatas obtenidas durante el primer periodo se emplearon para el estudio microscópico y de cultivo, mientras que las obtenidas durante el siguiente año, fueron utilizadas para los ensayos de detección de *B. burgdorferi* mediante amplificación de ADN específico (PCR).

3.1.1.- Periodo de estudio y áreas analizadas.

La recolección aleatoria de garrapatas se llevó a cabo durante dos periodos anuales, en las épocas de primavera, verano y otoño, debido a la mayor actividad biológica de los ácaros durante las mismas, en relación a unas temperaturas medias superiores a 20°C. Así, la primera población de garrapatas se obtuvo entre mayo y noviembre de 1997, con un mayor número de ejemplares en los meses de julio y agosto. El segundo periodo de recogida se realizó entre marzo y noviembre de 1998, siendo ligeramente más amplio este periodo que el primero por la llegada precoz del calor durante ese año.

Las poblaciones de estudio se consideraron por criterios de mejor accesibilidad, por las distintas características medioambientales presentes en los municipios de la provincia de Valencia (presencia de ganado lanar, cultivos abundantes, monte bajo de tipo mediterráneo, senderos o caminos forestales con vegetación marginal, áreas de poco tránsito rodado) etc y/o por ser poblaciones incluidas en el área de salud número 7 de la Conselleria de Sanitat i Consum, ya que representa el área de atención sanitaria del Hospital General Universitario de Valencia. Así, se obtuvieron garrapatas de las poblaciones de Requena, Utiel, Chiva con la pedanía de Calicant, Torrent, Monserrat, Riba-roja y L'eliana, cuya localización en la provincia se muestra en las figuras 3.1a, 3.1b, 3.1c y 3.1d.



Figura 3.1a.- Area de salud número 5, con las poblaciones de Ribarroja



Figura 3.1b.- Area de salud número 6, con la población de Chiva.



Figura 3.1c.- Area de salud número 7, con las poblaciones de Requena y Utiel.



Figura 3.1d.- Area de salud número 8, con las poblaciones de Torrent y Monserrat.

3.1.2.- Obtención de garrapatas.

Los artrópodos ixódidos se obtuvieron esencialmente de dos fuentes, animales y plantas. Entre los primeros se recogieron garrapatas localizadas en perros, gatos; conejos estabulados; ovejas y cabras; caballos y asnos; y aves de corral (gallinas y patos). Respecto a la vegetación relacionada con la presencia de garrapatas se hallaron en suelos herbáceos, en vegetación de tallo corto de lindes y bordes de caminos, y menos frecuentemente en matorrales característicos del monte bajo mediterráneo.

Para la recogida de garrapatas desde los animales parasitados, tras su localización preferente en pliegues y zonas de flexión (cartílagos auriculares, axilas, ingles, zonas retroauriculares e interdigitales, base de la cola) se empleó la tracción manual mediante movimientos de giro repetidos en ambas direcciones, por ser este un método menos agresivo para el artrópodo. Se desecharon aquellos ixódidos que no fueron extraídos de manera completa, dificultad particularmente observada en las hembras cebadas.

Para la obtención de ácaros de suelos y matorrales se procedió a la extensión sobre los mismos de una sábana blanca durante varias horas, para posteriormente obtener los ejemplares localizados en ella, tanto en su parte superior como en el envés de la sábana. Todas las garrapatas coleccionadas se introdujeron en viales estériles de plástico para su transporte al laboratorio, donde se seleccionaron exclusivamente las garrapatas de piel dura, por la presencia del escudo queratinoso característico. Una vez diferenciados, y manteniendo el origen y la procedencia de los mismos, se conservaron vivos a temperatura ambiente en recipientes herméticos de vidrio hasta su caracterización y procesamiento.

3.1.3.- Caracterización y clasificación de ixódidos.

Se procedió a la tipificación de las garrapatas mediante el examen microscópico de los elementos característicos, siguiendo los criterios taxonómicos de Perrier *et al.* (1964) la guía de clasificación utilizada por el museo británico (Kenneth eds., 1973) y los criterios definidos por Gil Collado *et al.* (1979).

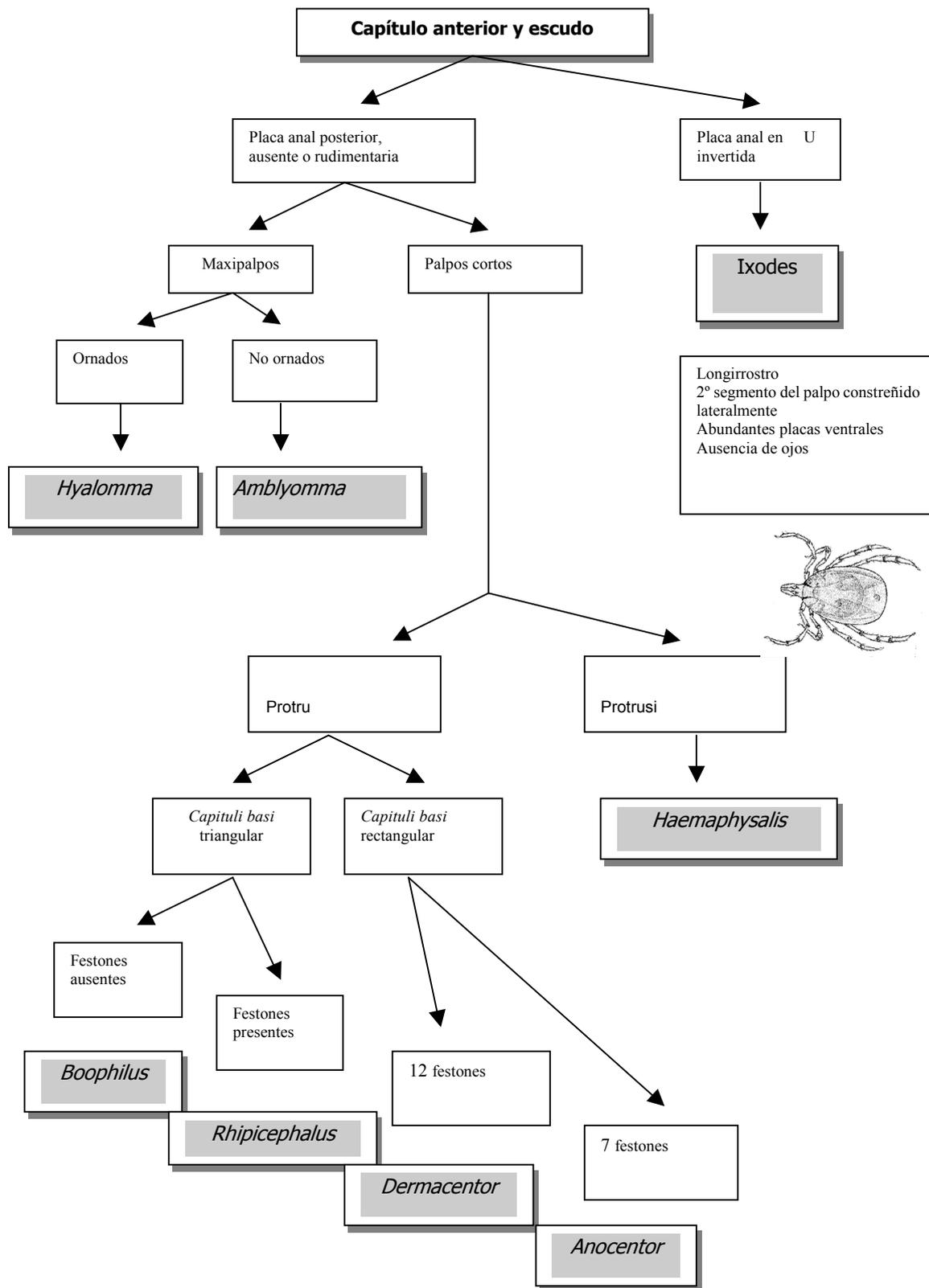


Figura 3.2.- Algoritmo con las características principales de género de las garrapatas ixódidos.

La Familia *Ixodida* se caracteriza principalmente por la presencia de un escudo dorsal fuertemente queratinizado y apéndices con escleritos (refuerzos bien marcados). Su aparato bucal presenta una pieza articulada (*capituli basi*) situada en la parte anterior del cuerpo) capítulo anterior queratinizada en su base y que le permite una inclinación de 90°C, y dos palpos maxilares rígidos y protectores que protegen los quelíceros y el hipostoma. Para la diferenciación inicial de géneros ixódidos, se consideró la presencia y morfología de la placa anal.

Las características generales empleadas para la diferenciación de los diferentes géneros se muestran en la figura 3.2, en el cual no se consideran los elementos diferenciales de especies del género *Ixodes*, por no haberse hallado ningún ejemplar de este grupo, si bien podemos señalar que las características principales del dicho género son la presencia de un surco anal en forma de herradura rodeando al ano por delante. Las placas ventrales son contiguas y están separadas entre sí por suturas estrechas, que cubren prácticamente toda la superficie ventral. El escudo dorsal no presenta surcos y el hipostoma es largo (longirrostro) y el segundo segmento del palpo presenta una constricción lateral característica. Los ojos están ausentes.

Dentro de cada una de los géneros señalados, se estableció la diferenciación de especie según los criterios recogidos en los algoritmos siguientes, señalándose los elementos morfológicos más característicos dentro de cada género y especie.

Las características principales de género *Dermacentor*, son la presencia de rostro corto con palpos en forma de maza, los ojos se muestran como simples abultamientos en la cutícula del escudo, sin marcarse una órbita alrededor. El escudo es bicolor, en tonos de marrón y negro, con surcos marcados. No se observan placas ventrales, pero sí una coxa III muy desarrollada (figura 3.3).

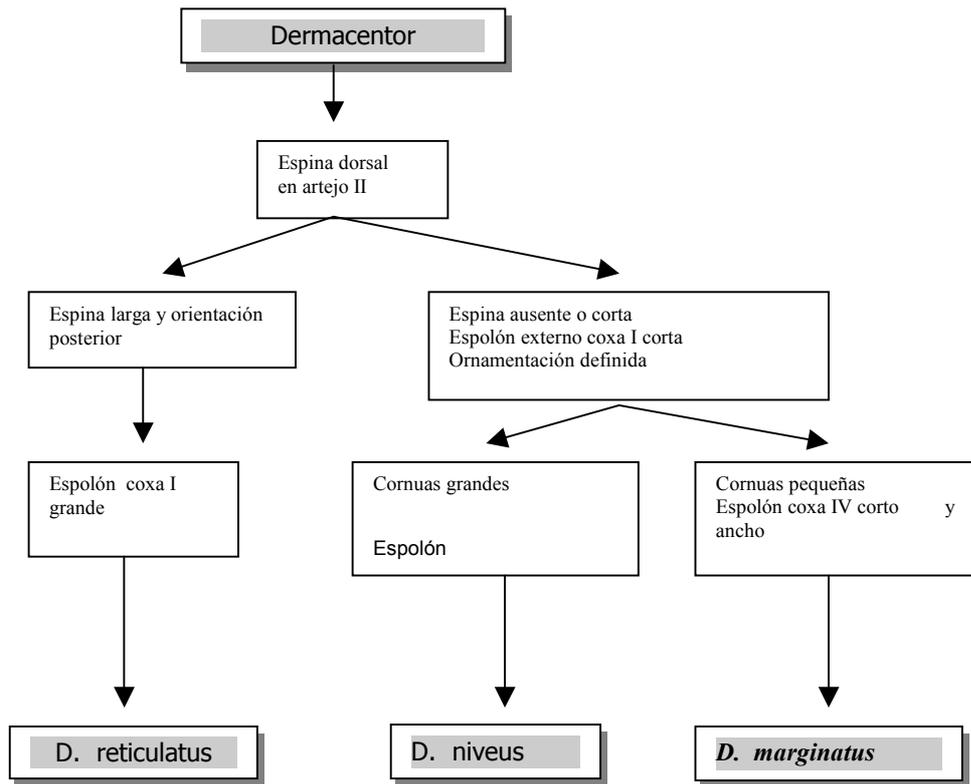


Figura 3.3.- Algoritmo con las características diferenciales de especies del género *Dermacentor*.

Las principales características de género *Rhipicephalus*, son la presencia de rostro corto (brevirrostro) con palpos triangulares de contorno liso y tamaño normal. La base del capítulo es hexagonal y el escudo dorsal unicolor presenta festones. Las placas anales son grandes, de forma triangular y borde posterior redondeado, estando las placas adanales mas o menos marcadas y la coxa I profundamente hendida. Están presentes placas ventrales. Respecto a la presencia de ojos, señalamos que en *Rhipicephalus bursa* se observan unos ojos prominentes y a cierta distancia del borde del escudo, mientras que *Rhipicephalus pusillos* presenta los ojos de pequeño tamaño y situados en el mismo borde del escudo y unos estigmas respiratorios de cola corta (figura 3.4).

Son características principales de género *Haemaphysalis* la ausencia de ojos, la presencia un escudo sin ornamentación y palpos en maza o en ángulo lateralmente. El contorno del cuerpo revela unos festones bien marcados y en la cara ventral no se visualizan placas (figura 3.5).

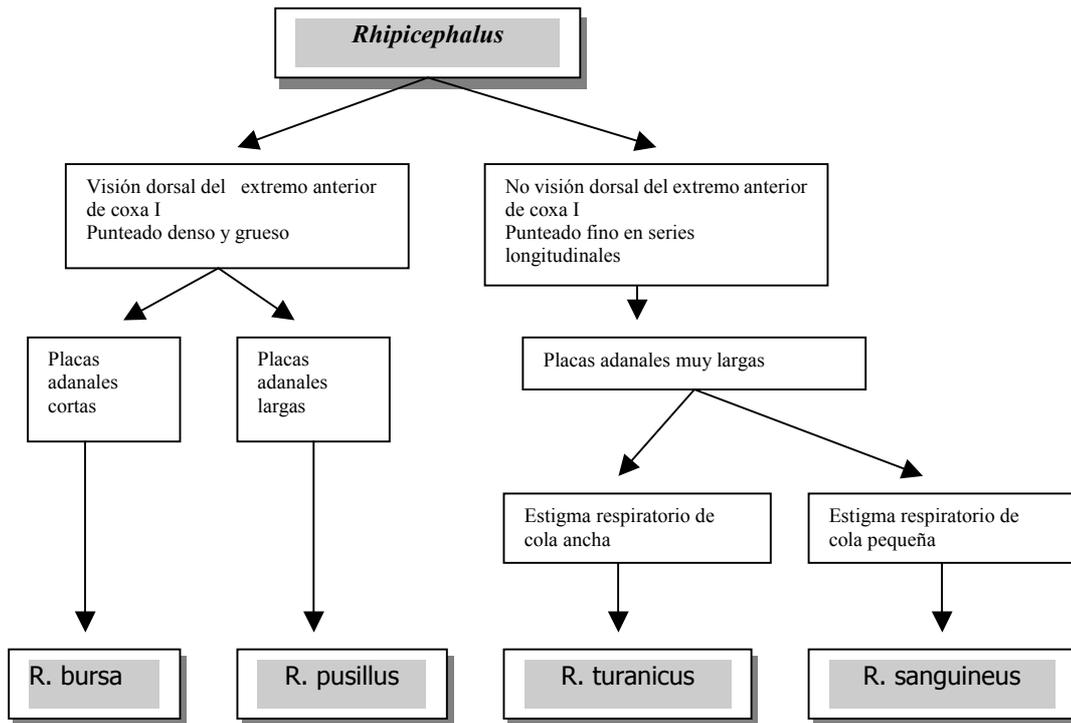
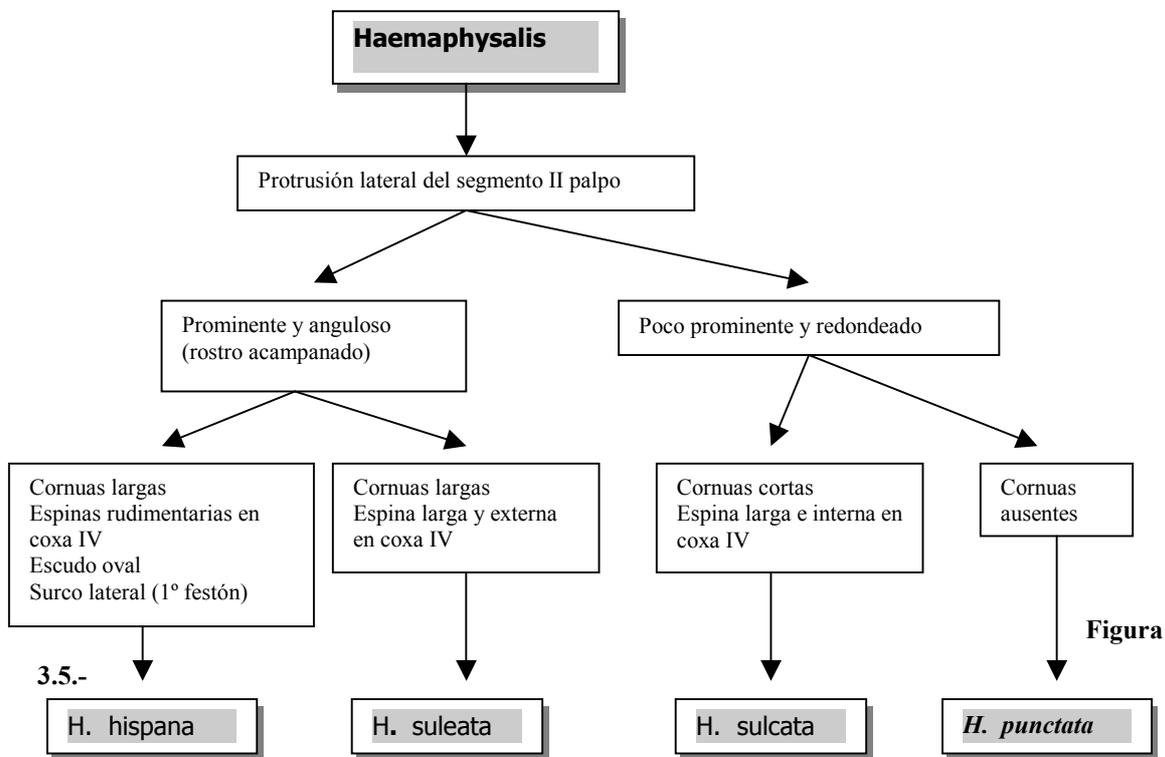


Figura 3.4.- Algoritmo con las características diferenciales de las especies del género *Rhipicephalus*.



3.5.- Algoritmo con las características principales de las especies del género *Haemaphysalis*.

Las características principales de género *Hyalomma* son la presencia de rostro largo. Los ojos son salientes como cabezas de alfiler en una pequeña depresión u órbita. En la cara ventral se muestran placas anales, adanales y postanales (figura 3.6).

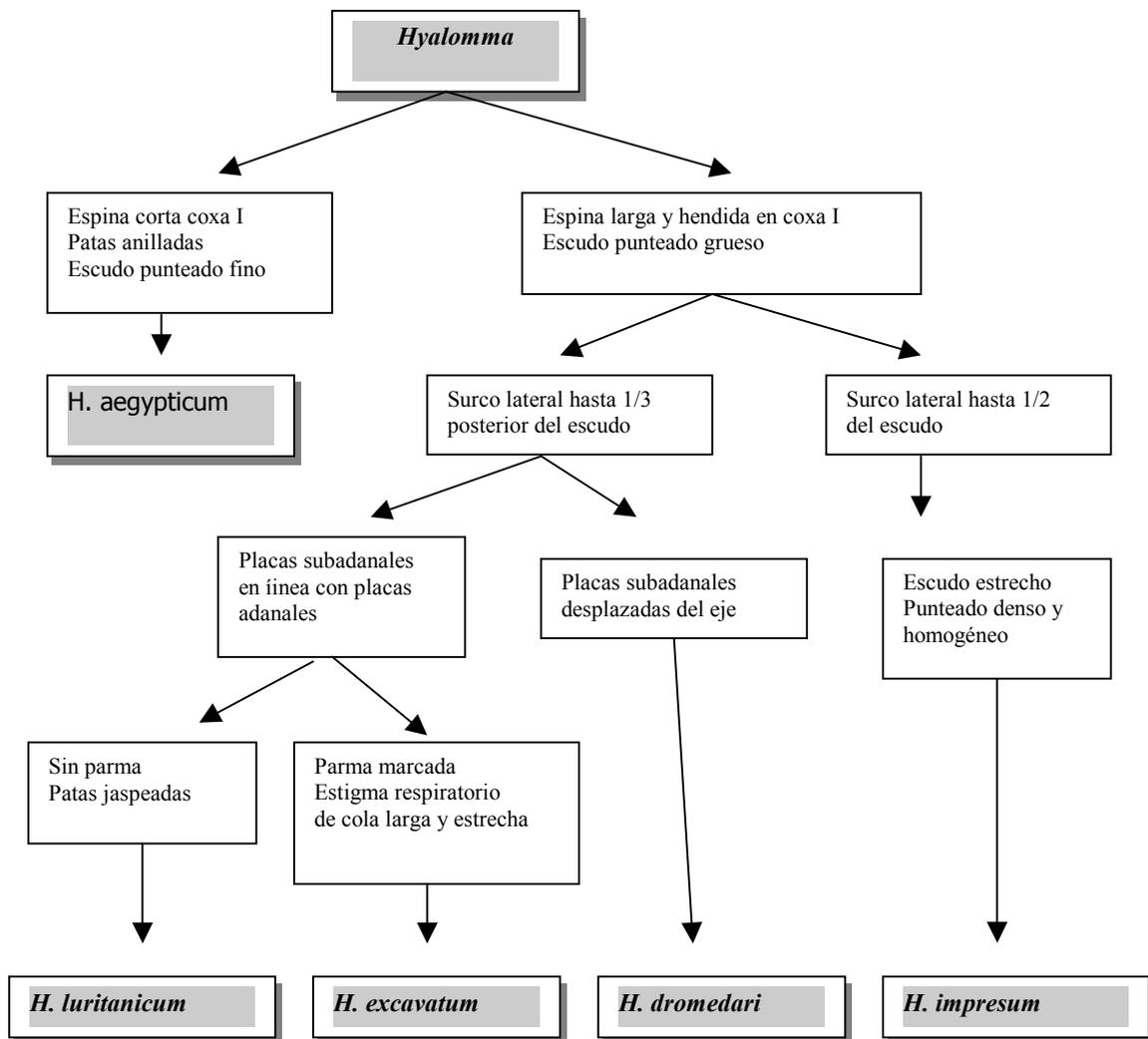


Figura 3.6.- Algoritmo de las características principales de las especies del género *Hyalomma*.

Respecto al género *Boophilus*, Gil Collado *et al.* (1979) han referido la existencia de una única especie en España (*B. Annulatus*) caracterizándose por la presencia de un rostro con palpos triangulares pequeños y mas cortos que el hipostoma, de contorno arrugado. La coxa I está ligeramente hendida y es de muy pequeño tamaño. El cuerpo muestra un escudo unicolor con placas ventrales, con ausencia de festones.

Las garrapatas finalmente caracterizadas por género y especie, fueron identificadas por sexo según la extensión del escudo y la presencia de poro genital, siendo en las hembras un escudo de menor tamaño que abarca 1/3 del cuerpo con poro genital ventral y en los machos un escudo que se extiende a lo largo de todo el dorso del cuerpo y ausencia de poro genital. Todos los ejemplares fueron agrupados por género y especie sin considerar la distinta procedencia geográfica, al considerar que los ecosistemas de las diferentes poblaciones eran muy similares y por tanto no permitía presumir diferencias significativas en relación a la capacidad o no de contener *Borrelia burgdorferi*.

3.1.4.- Detección de *Borrelia burgdorferi* sl.

El estudio de la presencia o no de *B. burgdorferi* sl. en los ixódidos obtenidos, se realizó empleando diferentes procedimientos de detección (examen microscópico, cultivo y amplificación de ADN específico mediante nested PCR) a partir de ejemplares completos o porciones de los mismos para cada una de las especies identificadas, con el fin de evaluar la utilidad de cada uno de ellos. Se realizó examen microscópico y cultivo en las garrapatas recogidas durante el primer periodo de estudio, realizándose la detección de ADN específico en las obtenidas durante éste, dadas las diferentes condiciones de trabajo necesario en cada caso.

3.1.4.1.- Macerado y disección de garrapatas.

Para la detección de *B. burgdorferi* sl. se prepararon distintos lotes, formados por un número variable de individuos de la misma especie, de modo proporcional al número total obtenido de cada una de ellas, separándose machos y hembras. El reducido número de individuos identificados como *Hyalomma* spp sólo permitió su estudio microscópico tras el macerado de los mismos (tabla 3.1).

Previamente al macerado o disección de las garrapatas diferenciadas, se procedió a la descontaminación mediante una solución alcohólica diluida en suero fisiológico estéril, introduciéndose sucesivamente y durante 1 minuto en diluciones al 95%, 70% y 35%. Posteriormente, fueron ahogadas mediante inmersión en agua destilada estéril durante cinco horas y posteriormente lavadas en tampón fosfato salino pH 8,2.

Para la obtención de **macerados**, los ejemplares fueron lisados mediante tracción mecánica en mortero estéril, debido a su dura consistencia, y el producto resultante recogido mediante lavado del mortero con 2 mL de suero fisiológico estéril. El material obtenido se recogió en tubos estériles de plástico y conservados a +4 °C hasta su procesamiento, empleándose tanto para la realización de las distintas extensiones en portaobjetos como para el cultivo en medio específico.

Para la **disección** de las garrapatas hembras, se colocaron en placa de Petri y se realizó una incisión en el contorno del escudo con bisturí o mediante aguja hipodérmica estéril, retirándose el mismo por tracción mediante unas pinzas estériles. Se obtenían dos formaciones arracimadas y blanquecinas correspondientes a las glándulas salivares, y un sistema tubular doble y negruzco identificado como los intestinos medios (Estrada-Peña, comunicación personal). Este par de estructuras dobles se emplearon para la preparación de las diferentes extensiones o para el cultivo bacteriológico, que en este caso se realizaba de modo inmediato a su obtención, debido a la labilidad de dichas estructuras.

En el caso de los individuos machos se realizó la sección de la porción anterior (base del capítulo) y medio anterior del escudo ya que contiene las glándulas salivares y los intestinos medios. Este procedimiento de corte era requerido por la extrema dificultad de una precisa disección debido al pequeño tamaño del macho y por abarcar el duro escudo todo el dorso del mismo. Las formaciones obtenidas eran inmediatamente procesadas, tanto para la realización de tinciones como para cultivos bacteriológicos.

3.1.4.2.- Examen microscópico de macerados y disecciones.

En cada lote y con una porción del producto diluido y homogeneizado de los macerados, se procedió a la realización de extensiones en portaobjetos (de 5 a 10) colocando una pequeña gota de la preparación en el centro del portaobjetos. Con las estructuras resultantes de las disecciones, y tras obtener una emulsión sanguinolenta del contenido de las mismas, se realizaron igual número de extensiones.

Los portaobjetos con las extensiones fueron secados a temperatura ambiente, para posteriormente realizar la fijación y tinción según los distintos métodos

empleados. Se emplearon cinco procedimientos distintos de tinción en todas las preparaciones con el fin de garantizar una adecuada observación microscópica. Los portaobjetos para tinción simple con azul de metileno y tinción de Gram fueron fijados mediante calor. Para las tinciones de Giemsa, de May-Grunwald-Giemsa y tinción de Wright, se procedió a la fijación con metanol. En todos los casos se realizó la tinción de acuerdo a los parámetros convencionales.

El examen microscópico de todas las preparaciones, se efectuó mediante microscopía óptica a 1000X (Nikkon 222322).

3.1.4.3.- Cultivo en medio BSK II.

Una parte del producto de los macerados y de las disecciones fue empleada para la realización de los cultivos bacteriológicos en medio líquido de Barbour-Stoenner-Kelly modificado (medio BSK II, Sigma B-3528).

En condiciones de esterilidad, se prepararon tubos de vidrio de tapón de rosca con 6 mL de medio BSK II, procediéndose a su inoculación con 1 mL de muestra. Tras cuatro días de incubación a 37°C en condiciones de microaerofilia en jarra de ananerobiosis (sistema BBL CampyPak Plus Becton Dickinson 4371045), los cultivos primarios fueron suplementados con suero inactivado de conejo al 6% (Sigma R-7136) para continuar su incubación en las condiciones descritas previamente. A la semana se realizaron subcultivos mediante la transferencia de 1 mL del cultivo primario a un nuevo tubo con 6 mL de medio BSK II suplementado con suero de conejo (6%) y conteniendo rifampicina (40 µg/mL); ciprofloxacino (0,4 µg/mL) y 5-fluorocitosina (230 µg/mL) (Pedro Anda, comunicación personal).

A partir de estos primeros subcultivos, se realizaron nuevos cultivos secuencialmente cada semana, en las mismas condiciones referidas, hasta completar un periodo de incubación de dos meses. Además, debido al lento crecimiento de *Borrelia* spp, el cultivo primario fue subcultivado a los 15 y 30 días, por lo que cada una de las muestras generó un total de 10 viales de cultivo (figura 3.7. Como control de crecimiento se utilizó en todos los ensayos la cepa B31 de *B. burgdorferi* (ATCC 35210). Para determinar la presencia del microorganismo en cada uno de los cultivos, se efectuó semanalmente una evaluación microscópica de una muestra

homogeneizada de los mismos mediante las tinciones diferenciales referidas previamente.

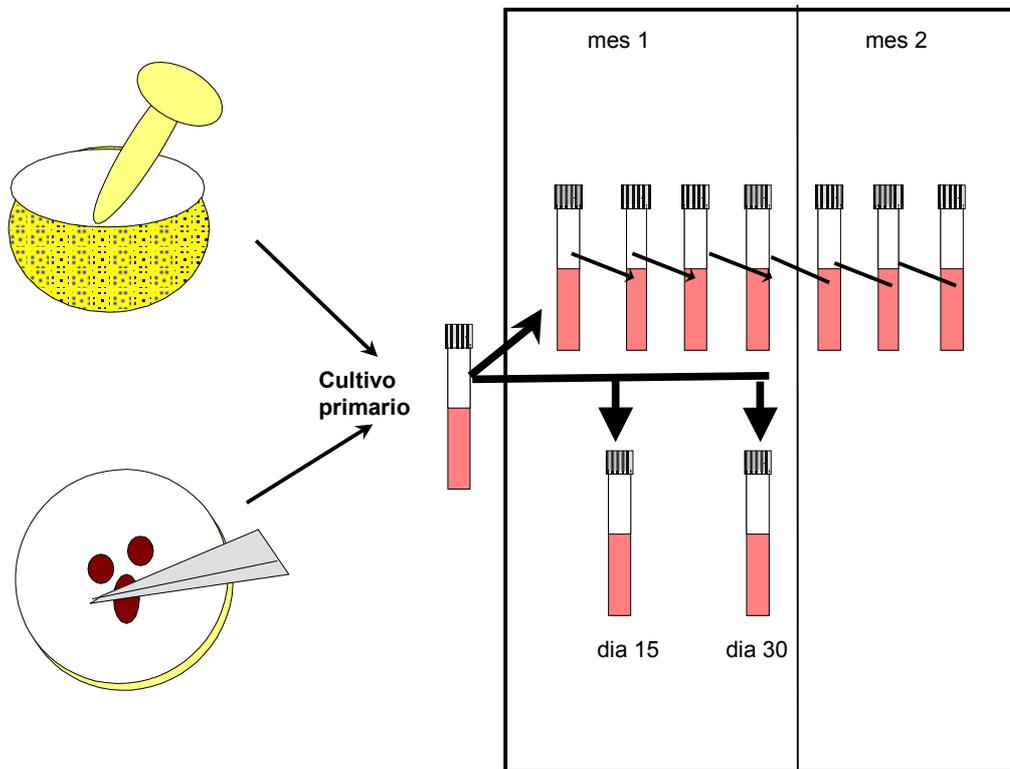


Figura 3.7.- Procedimiento de cultivo de fracciones de garrapatas en medio en BSK II.

3.1.4.4.- Amplificación de ADN específico (nested PCR).

Con el fin de analizar la presencia de ADN de *Borrelia burgdorferi sl.* en las garrapatas ixódidos, se procedió a la obtención y caracterización de nuevos individuos, en las mismas áreas analizadas durante el primer periodo de estudio, por las razones expuestas previamente que garantizaban la viabilidad de los posibles aislados.

Del total de garrapatas coleccionadas y clasificadas en el segundo periodo, se seleccionaron los individuos íntegros en el momento de realizar la extracción de ADN y que presentaban las características más favorables para el estudio (completa integridad y mayor tamaño). Se confeccionaron diferentes lotes de trabajo, diferenciando género y especies. Se realizaron lotes de un número variable de

individuos según su tamaño (lotes de 3, 4, 6, 8 y hasta 30 individuos cada uno) a fin de garantizar la presencia de ADN.

3.1.4.4.1.- Obtención de ácidos nucleicos.

Para la extracción del material genómico contenido en los distintos lotes de garrapatas, se procedió al lavado y preparación de los ejemplares mediante el procedimiento referido en el apartado 3.1.4.1.

Cada lote distribuido en tubos eppendorff fue descontaminado empleando una solución alcohólica diluida en suero fisiológico estéril, introduciéndose sucesivamente y durante 1 minuto en diluciones al 95%, 70% y 35%. Posteriormente, fueron lavados mediante inmersión en tampón fosfato salino pH 8,2, durante cinco horas, secándose a temperatura ambiente durante 15 min. Para el lisado de las garrapatas se adicionó a cada tubo eppendorff 100 μ l de tampón TE (1 mM Tris-ClH pH 8,0; 0,5 mM EDTA pH 7,5); 20 μ l de dodecil sulfato sódico (10% p/v) y 200 μ l de proteinasa K de una solución 200 μ g/mL (Boehringer Mannheim 1 964 372) procediéndose a la incubación a 56°C en baño de agua durante 24 horas.

La lisis completa de los ácaros se realizó mediante macerado en el tubo eppendorff con una pipeta Pasteur estéril, realizando movimientos repetidos de aplastado durante 10-15 minutos, a fin de romper todas las estructuras somáticas de la garrapata. Al material obtenido se adicionaron 100 μ l de TE (1 mM Tris-ClH pH 8,0; 0,5 mM EDTA pH 7,5) realizándose 2 extracciones con fenol-cloroformo-isoamilalcohol 25:24:1. Al sobrenadante recuperado, se adicionaron 125 μ l de 7,5 M acetato amónico incubándose en hielo durante 30 minutos. El ADN presente en la muestra se precipitó mediante adición de 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C e incubación a -40°C durante 1 hora, recogiendo mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 15 minutos. El precipitado fue lavado con etanol al 70% y centrifugación a 13.000 rpm durante 15 minutos, para posteriormente secar al aire durante 45-60 minutos. Tras comprobar la existencia de un sedimento en el tubo eppendorff se resuspendió en 50 μ l de TE (1 mM Tris-ClH pH 8,0; 0,5 mM EDTA pH 7,5).

Para la obtención de ADN de la cepa control de *B. burgdorferi* (ATCC 35210) se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando la masa bacteriana

obtenida en medio BSK II tras centrifugación de 10 mL de medio líquido a 5.000 rpm y lavado del sedimento con 5 mL de TE. El sedimento se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis, incubándose una hora a 37°C.

En un número de lotes de garrapatas de cada especie, se procedió a la obtención de ADN mediante un procedimiento más simple, descrito por Misonne *et al.* (1998) y Schouls *et al.* (1999) los cuales proponen la descontaminación en soluciones alcohólicas y adición de tampón de lisis de modo similar al descrito previamente, la ebullición durante 10 min y la colocación de las muestras en un baño de hielo durante otros 10 min, procediéndose a la centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min y recogida del sobrenadante con su transferencia a tubos eppendorff estériles, para posterior purificación mediante inoculación en columnas extractoras (Ultrafree-DA. Millipore Corporation Bedford, MA 0173 USA) conservándose el material obtenido hasta su uso a -40°C.

Todas las extracciones fueron evaluadas mediante electroforesis horizontal (EC 3000-90, EC Apparatus Corporation) de un volumen de 20 µl de muestra en gel de agarosa 1% (Bio-Rad Laboratories) y tampón 1X de TBE (Tris-borato-EDTA) teñidos con una solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) y visualización en transiluminador (Spectroline Transilluminator model TC-312 A, Spectronics Corporation, Westbury) con el fin de conocer la presencia y calidad del ADN obtenido.

3.1.4.4.2.- Amplificación y detección de ADN de *B. burgdorferi* sl.

Para la detección de ADN específico de *B. burgdorferi*, consideramos la utilidad de la amplificación mediante nested-PCR en los lisados de las garrapatas, por su mayor sensibilidad. Se seleccionaron dos genes diferentes para su amplificación, determinando una región específica dentro del gen que codifica la lipoproteína externa de membrana OspA y una secuencia específica del gen que codifica la proteína denominada flagelina.

Para la región del gen OspA, los iniciadores empleados fueron los descritos por Guttman *et al.* (1996) siendo para la primera amplificación los iniciadores Bb1 (23 mer **5´-AAA AAA TAT TTA TTG GGA ATA GG- 3´**) y Bb2 (29 mer **5´-GTT TTT TTG CTG TTT ACA CTA ATT GTT AA- 3´**) cuyo producto es un fragmento de 702-bp. Los

iniciadores para la segunda amplificación fueron Bb3 (16 mer **5´-GGA GTA CTT GAA GGC G- 3´**) y Bb4 (18 mer **5´-GCT TAA AGT AAC AGT TCC- 3´**) cuyo producto es un fragmento de 345-bp. En la tabla 3.1 se muestra la secuencia de bases del gen OspA y las posiciones de cada uno de los iniciadores señalados, con la región de amplificación .

Tabla 3.1. – Secuencia del gen OspA de *B. burgdorferi* y localización de oligonucleótidos cebadores.

1	TAT	GAA	AAA	ATA	TTT	ATT	GGG	AAT	AGG	TCT
31	ATA	TTA	GCC	TTA	ATA	GCA	TGT	AAG	CAA	AAT
61	GTT	AGC	AGC	CTT	GAC	GAG	AAA	AAC	AGC	GTT
91	TCA	GTA	GAT	TTG	CCT	GGT	GAA	ATG	AAA	GTT
121	CTT	GTA	AGC	AAA	GAA	AAA	AAC	AAA	GAC	GGC
151	AAG	TAC	GAT	CTA	ATT	GCA	ACA	GTA	GAC	AAG
181	CTT	GAG	CTT	AAA	GGA	ACT	TCT	GAT	AAA	AAC
211	AAT	GGA	TCT	GGA	GTA	CTT	GAA	GGC	GTA	AAA
241	GCT	GAC	AAA	AGT	AAA	GTA	AAA	TTA	ACA	TTT
271	TCT	GAC	GAT	CTA	GGT	CAA	ACC	ACA	CTT	GAA
301	GTT	TTC	AAA	GAA	GAT	GGC	AAA	ACA	CTA	GTA
331	TCA	AAA	AAA	GTA	ACT	TCC	AAA	GAC	AAG	TCA
361	TTA	ACA	GAA	GAA	AAA	TTC	AAT	GAA	AAA	GGT
391	GAA	GTA	TCT	GAA	AAA	ATA	ATA	ACA	AGG	GCA
421	GAC	GGA	ACC	AGA	CTT	GAA	TAC	ACA	GGA	ATT
451	AAA	AGC	GAT	GGA	TCT	GGA	AAA	GCT	AAA	GAG
481	GTT	TTA	AAA	GGC	TAT	GTT	CTT	GAA	GGA	ACT
511	CTA	ACT	GCT	GAA	AAA	ACA	ACA	TCG	GTG	GTT
541	AAA	GAA	GGA	ACT	GTT	ACT	TTA	AGC	AAA	AAT
571	ATT	TCA	AAA	TCT	GGG	GAA	GTT	TCA	GTT	GAA
601	CTT	AAT	CTC	ACT	GAC	AGT	AGT	GCT	GCT	ACT
631	AAA	AAA	ACT	GCA	GCT	TGG	AAT	TCA	GGC	ACT
661	TCA	ACT	TTA	ACA	ATT	AGT	GTA	AAC	ACT	AAA
691	AAA	ACT	AAG	ACC	TTG	TGT	TTA	CAA	AAG	AAA
721	ACA	CAA	TTA	CAG	TAC	AAC	AAT	ACG	ACT	CAA
751	ATG	GCA	CCA	AAT	TAG	AGG	GGT	CAG	CAG	TGT
781	AAA	TTA	CAA	AAC	TTG	ATG	AAA	TTA	AAA	ACG
811	CTT	TAA	AAT	AAR	GAG	AA				

Para la primera amplificación se determinó un volumen final de 50 µl, utilizando una mezcla de reacción para cada una de las muestras compuesta por: 15 µl de agua destilada desionizada; 5 µl del tampón 10 mM Tris-ClH pH 8,5 y 250 mM KCl2 (Boehringer Mannheim 1 647 679); 5 µl de 2,5 mM MgCl2, 1 µl de una solución 0,2 mM de dNTPs (Boehringer Mannheim 1 581 295; 1 µl del iniciador Bb1 (100 pmol) y 1

μl del iniciador Bb2 (100 pmol) (TIB MOLBIOL. Syntheselabor) añadiéndose a la mezcla 20 μl de ADN total y 0,5U (2 μl) de *Taq* polimerasa (Boehringer Mannheim 1 647 679).

Del producto de la primera amplificación se tomaron 20 μl para realizar la siguiente amplificación para un volumen final de 50 μl , utilizando una mezcla de reacción para cada una de las muestras compuesta por: 15 μl de agua destilada desionizada; 5 μl tampón de la enzima *Taq* polimerasa 10 mM Tris-ClH pH 8,5 y 250 mM KCl₂; 5 μl de 2,5 mM MgCl₂; 1 μl de una solución 0,2 mM de dNTPs; 1 μl del iniciador Bb3 (100 pmol) y 1 μl del iniciador Bb4 (100 pmol) (TIB MOLBIOL. Syntheselabor) añadiéndose a la mezcla 20 μl de ADN total y 0,5 U (2 μl) de *Taq* polimerasa. las reacciones de amplificación de las muestras y controles se realizaron en un termociclador (PROGENE-TECHNE model FPROGO2D, 83365-14).

Los parámetros empleados para dichas reacciones se muestran en la tabla 3.2. De acuerdo a lo propuesto por Lebech *et al.* (1993) y en paralelo en todas las muestras problema se realizó un control interno de amplificación, añadiendo un volumen de ADN de la cepa de *Borrelia burgdorferi* B31, de modo que a 20 μl de cada una de las mismas se adicionaron 15 μl de ADN control a una dilución 1:1000, manteniéndose el volumen final de 50 μl por sustitución del volumen de agua.

El objeto de este control interno fue la determinación del papel de posibles inhibidores presentes en los lisados de garrapatas.

Además, en todos los ensayos de amplificación se utilizó una muestra de ADN de la cepa B31 a igual dilución.

Para la electroforesis de los amplificados se emplearon geles de 2% de agarosa (Bio-Rad 162-0125) en tampón 1X TBE pH 7,5 y un voltaje de 4,5 V/cm durante la primera media hora, tras la cual se incrementó a 6 V/cm aplicados durante 60 min. Los geles fueron visualizados mediante el transiluminador referido previamente y fotografiados empleando el sistema Gelprinter (TDI)

Como marcadores de peso molecular se utilizó un patrón con 15 bandas de 8,5 a 0,35-kbp (DNA molecular weight VII Boehringer-Mannheim) y un patrón secuencial de 100 a 1000-bp (DNA molecular weight 100-bp ladder Boehringer-Mannheim).

Tabla 3.2.- Condiciones de amplificación de la secuencia del gen OspA.

Primera amplificación		
Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
96	2 min	1
94	30 seg	20
37	30 seg	
72	2 min	
72	5 min	1
Segunda amplificación		
Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
96	2 min	1
94	20 seg	10
60	30 seg	
72	1 min	
94	30 seg	
55	30 seg	
72	1 min	
94	30 seg	
50	30 seg	
72	1 min	
94	30 seg	5
45	30 seg	
72	1 min	
72	5 min	1

Para la amplificación de la secuencia génica que codifica la proteína flagelar de *B. burgdorferi* se emplearon los iniciadores descritos por Lebech *et al.* (1993). Así, en la primera amplificación se utilizaron los iniciadores F1 (21 mer) **5´-ATT AAC GCT GCT AAT CTT AGT-3´** y F3 (20 mer) **5´- GTA CTA TTC TTT ATA GAT TC-3´** que amplifican un producto de 791-bp. Para la segunda amplificación se utilizaron los iniciadores F6 (25 mer) **5´-TTC AGG GTC TCA AGC GTC TTG GAC T-3´** y F8 (25 mer) **5´-GCA TTT TCA ATT TTA GCA AGT GAT G-3´**, que produce un fragmento de 275-bp (tabla 3.3).

Para la primera amplificación se determinó un volumen final de 50 µl, utilizando una mezcla de reacción para cada una de las muestras compuesta por: 15 µl de agua

destilada desionizada; 5 μ l del tampón 10 mM Tris-ClH pH 8,5 y 250 mM KCl₂; 5 μ l de 2,5 mM MgCl₂; 1 μ l de una solución 0,2 mM de dNTPs; 1 μ l del iniciador F1 (100 pmol) y 1 μ l del iniciador F2 (100 pmol) (TIB MOLBIOL. Syntheselabor) añadiéndose a la mezcla 20 μ l de ADN total y 0,5U (2 μ l) de *Taq* polimerasa (Boehringer Mannheim 1 647 679). Del producto de la primera amplificación se tomaron 15 μ l para realizar la siguiente amplificación para un volumen final de 50 μ l, utilizando una mezcla de reacción para cada una de las muestras compuesta por: 20 μ l de agua destilada desionizada; 5 μ l tampón de la enzima *Taq* polimerasa 10 mM Tris-ClH pH 8,5 y 250 mM KCl₂; 5 μ l de 2,5 mM MgCl₂, 1 μ l de una solución 0,2 mM de dNTPs; 1 μ l del iniciador Bb3 (100 pmol) y 1 μ l del iniciador Bb4 (100 pmol) (TIB MOLBIOL. Syntheselabor) añadiéndose a la mezcla 20 μ l de ADN total y 0,5 U (2 μ l) de *Taq* polimerasa. Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador indicado y empleando los parámetros para dichas reacciones que se muestran en la tabla 3.3.

Las condiciones de electroforesis y marcadores de peso molecular empleados fueron las mismas que las referidas previamente para el estudio de la lipoproteína OspA.

Tabla 3.3.- Condiciones de las reacciones de amplificación de la secuencia del gen de la flagelina.

Primera amplificación		
Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
94	1 min	35
41	2 min	
66	3 min	
72	5 min	1
Segunda amplificación		
Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
94	1 min	35
50	1 min	
72	1 min	
72	5 min	1

Como en las amplificaciones de gen OspA, las muestras problemas fueron analizadas por duplicado, conteniendo una de ellas un control interno compuesto por ADN obtenido de la cepa de *Borrelia burgdorferi* B31, de modo que a los 20 μ l de cada

una de las muestras, se adicionaron 15 μ l de ADN control a una dilución 1:1000, manteniéndose el volumen final de 50 μ l por sustitución del volumen de agua.

Tabla 3.4. - Secuencia del gen de la flagelina de *B. burgdorferi* y localización de oligonucleótidos cebadores utilizados.

1	ATG	ATT	ATC	AAT	CAT	AAT	ACA	TCA	GCT	ATT
31	AAT	GCT	TCA	AGA	AAT	AAT	GCC	ATT	AAC	GCT
61	GCT	AAT	CTT	AGT	AAA	ACT	CAA	GAA	AAG	CTT
91	TCT	AGT	GGG	TAC	AGA	ATT	AAT	CGA	GCT	TCT
121	GAT	GAT	GCT	GCT	GGC	ATG	GGA	GTT	TCT	GGT
151	AAG	ATT	AAT	GCT	CAA	ATA	AGA	GGT	TTG	TCA
181	CAA	GCT	TCT	AGA	AAT	ACT	TCA	AAG	GCT	ATT
211	AAT	TTT	ATT	CAG	ACA	ACA	GAA	GGG	AAT	TTA
241	AAT	GAA	GTA	GAA	AAA	GTC	TTA	GTA	AGA	ATG
271	AAG	GAA	TTG	GCA	GTT	CAA	TCA	GGT	AAC	GGC
301	ACA	TAT	TCA	GAT	GCA	GAC	AGA	GGT	TCT	ATA
331	CAA	ATT	GAA	ATA	GAG	CAA	CTT	ACA	GAC	GAA
361	ATT	AAT	AGA	ATT	GCT	GAT	CAA	GCT	CAA	TAT
391	AAC	CAA	ATG	CAC	ATG	TTA	TCA	AAC	AAA	TCT
421	GCT	TCT	CAA	AAT	GTA	AGA	ACA	GCT	GAA	GAG
451	CTT	GGA	ATG	CAG	CCT	GCA	AAA	ATT	AAC	ACA
481	CCA	GCA	TCA	CTT	TCA	GGG	TCT	CAA	CGC	TCT
511	TGG	ACT	TTA	AGA	GTT	CAT	GTT	GGA	GCA	ACC
541	CAA	GAT	GAA	GCT	ATT	GCT	GTA	AAT	ATT	TAT
571	GCA	GCT	AAT	GTT	GCA	AAT	CTT	TTC	TCT	GGT
601	GAG	GGA	GCT	CAA	ACT	GCT	CAG	GCT	GCA	CCG
631	GTT	CAA	GAG	CGT	GTT	CAA	CAG	GAA	GGA	GCT
661	CAA	CAG	CCA	GCA	CCT	GCT	ACA	GCA	CCT	TCT
691	CAA	GGC	GGA	GTT	AAT	TCT	CCT	GTT	AAT	GTT
721	ACA	ACT	ACA	GTT	GAT	GCT	AAT	ACA	TCA	CTT
751	GCT	AAA	ATT	GAA	AAT	GCT	ATT	AGA	ATG	ATA
781	AGT	GAT	CAA	AGA	GCA	AAT	TTA	GGT	GCT	TTC
811	CAA	AAT	AGA	CTT	GAA	TCT	ATA	AAG	AAT	AGC
841	ACT	GAG	TAT	GCT	ATT	GAA	AAT	CTA	AAA	GCA
871	TCT	TAT	GCT	CAA	ATA	AAA	GAT	GCT	ACA	ATG
901	ACA	GAT	GAG	GTT	GTA	GCA	GCT	ACA	ACT	AAT
931	AGT	ATT	TTA	ACT	CAA	TCT	GCA	ATG	GCA	ATG
961	ATT	GCG	CAG	GCT	AAT	CAA	GTT	CCT	CAA	CAT
991	GTT	TTG	TCA	TTG	CTT	AGA	TAA			

3.2.- Diagnóstico de borreliosis en muestras clínicas.

El método de estudio empleado para establecer la presencia o no, de borreliosis en las muestras clínicas, consistió en el estudio retrospectivo de los pacientes con diagnóstico presuntivo de infección por *Borrelia burgdorferi*, atendidos en el ámbito del Hospital General Universitario de Valencia (HGUUV).

3.2.1.- Periodo de estudio y muestras analizadas.

Se seleccionaron los pacientes, y las muestras correspondientes, remitidos al servicio de Análisis Clínicos-Unidad de Microbiología de dicho hospital, para estudio de posible borreliosis de Lyme o para estudio serológico de infecciones bacterianas y/o víricas en ausencia de una sospecha clínica determinada, durante el periodo de enero de 1996 a diciembre de 1999, completándose una serie de 4 años consecutivos.

Como grupo control de todos los procedimientos de diagnóstico serológico, se seleccionaron sueros de donantes sanos procedentes del Centro de Transfusión de La Comunidad Valenciana (CTCV).

El ámbito de estudio correspondió a la población remitida desde las distintas unidades y servicios del HGUV y los centros de salud y de especialidades dependientes del mismo (centros de Juan Llorens y José María de Haro de Valencia, y los centros de Torrente y Aldaia) así como del Hospital Comarcal de Requena, dependiente del Hospital General.

3.2.2.- Criterios de selección de muestras clínicas.

Los pacientes seleccionados lo fueron por presentar reactividad serológica positiva o dudosa mediante la prueba de enzoinmunoanálisis para detección de anticuerpos específicos frente a *B. burgdorferi*, utilizada como prueba de discriminación inicial en nuestro servicio.

Se incluyeron todos los pacientes que cumplieron este criterio, sin atender a diferencias de edad o sexo. Posteriormente, se excluyeron aquellos pacientes con reactividad serológica positiva en alguna de las pruebas del estudio serológico de infección luética, por la probable reactividad cruzada existente en ambos procesos, otras posibles causas de reactividad cruzada evaluadas.

Además, en aquellos pacientes en los que dispusimos de dos o más muestras durante el periodo de estudio referido, se seleccionaron aleatoriamente dos muestras separadas por un año, con objeto de analizar la evolución serológica de los mismos.

3.2.3.- Diagnóstico serológico.

En el laboratorio se procesaron las diferentes muestras clínicas remitidas, en su mayoría sueros. Excepcionalmente, se analizaron muestras de líquido cefalorraquídeo, bien como única muestra remitida o bien en paralelo con una muestra de suero. Los sueros fueron separados en diferentes alícuotas, que se conservaron en refrigeración a 4°C si el análisis era realizado dentro de las siguientes 24-48 horas y en congelación a -20°C si era diferido por más tiempo. En todos los sueros, se conservó una fracción en congelación a -80°C para poder disponer de muestra adecuada en posteriores estudios. Las muestras de líquido cefalorraquídeo, cuando la cantidad extraída fue suficiente, se concentraron 5 ó 10 veces con filtros Minicon (Amicon Division WR) antes de su estudio.

En los pacientes que resultaron reactivos mediante el cribado inicial mediante enzimoimmunoanálisis, se procedió a la búsqueda y recogida de la información pertinente contenida en su historia clínica, recurriendo a la Unidad de Documentación Clínica del hospital.

3.2.3.1.- Enzimoimmunoanálisis.

Las muestras clínicas remitidas fueron analizadas mediante la prueba VIDAS LYT (bioMérieux 30 298) que determina simultáneamente la presencia de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi*. Esta prueba automática utiliza la técnica cualitativa ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) del sistema VIDAS.

Brevemente, se realizó una dilución 1:10 de cada una de muestras, adicionando 100 µl de la misma en los pocillos donde se disponen los antígenos inactivados de *B. burgdorferi* cepa B31. Tras su incubación se realizaron dos lavados con tampón PBS para eliminación de los componentes no fijados. Posteriormente se adicionó un volumen de anti-IgM y anti-IgG humanas conjugadas con fosfatasa alcalina procediéndose a una nueva incubación, tras la cual se realizaron dos nuevos lavados con tampón fosfato alcalino (PBS). El revelado se efectuó con el substrato 4-metil-umbeliferil fosfato suministrado en cada prueba, realizándose la lectura fluorescente a 450 nm. Para la lectura e interpretación de los resultados se consideraron los valores proporcionados por el lector automático, siendo la fluorescencia emitida proporcional a

la cantidad de anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi* de clase G ó M presente en la muestra. Cada valor fue analizado e interpretado automáticamente por el sistema, tras comparación con los valores de referencia obtenidos en los sueros controles. Así, un valor $<0,75$ fue interpretado como un resultado negativo; un valor comprendido entre $>0,75$ y $<1,00$ como resultado dudoso; y un valor $\geq 1,00$ como resultado positivo.

3.2.3.2.- Estudio de reactividad cruzada.

Debido a los problemas de especificidad de las pruebas de diagnóstico serológico para la borreliosis de Lyme y por la gran variabilidad clínica de los pacientes remitidos a estudio, se hizo necesario descartar un conjunto de cuadros clínicos que presentan comúnmente similitud con dicha borreliosis. Así, en todas las muestras con resultado positivo o dudoso proporcionado por el método de enzimoimmunoanálisis, se procedió al estudio de reactividad serológica frente a *Treponema pallidum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conori* y *Brucella mellitensis*, además de cribar la existencia de procesos de origen vírico como infección por virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus y virus de la inmunodeficiencia humana.

3.2.3.2.1.- Serología luética.

Como evaluación inicial se realizó una prueba no treponémica (Rapid Plasma Reagin Card Test, RPR) y una prueba treponémica (Microhemaglutinación treponémica, MHA-Tp). Cuando una de las dos pruebas mostró un resultado positivo, se procedió a la realización de la prueba de inmunofluorescencia indirecta FTA-abs para los anticuerpos de clase IgM e IgG.

3.2.3.2.1.1.- Rapid Plasma Reagin Card Test.

La prueba reagínica empleada en el cribado luético de las muestras fue el método de RPR Card Test (Becton Dickinson).

Para la realización de la prueba cualitativa, se depositaron 50 μ l de cada muestra problema en los círculos de la tarjeta de plástico y posteriormente se homogeneizó con 25 μ l de antígeno cardiolipina, previamente resuspendido,

colocándose la misma en un rotor horizontal a 100 rpm durante 8 minutos. La existencia o no de precipitación se valoró macroscópicamente bajo luz artificial potente. En cada tarjeta, además de los sueros problema, se incluyeron los controles positivo y negativo.

Las muestras positivas o con un resultado dudoso, se titularon mediante la realización 5 diluciones en una solución salina fisiológica. Una vez homogeneizadas las suspensiones, se añadió a cada una de ellas 25 μ l de antígeno. La agitación y la lectura se realizó de la misma forma que se describe previamente, permitiéndonos determinar el título de anticuerpos.

3.2.3.2.1.2.- Microhemaglutinación treponémica.

Como prueba treponémica confirmatoria se empleó la microhemaglutinación treponémica (MHA-Tp Sera-tek treponemal Antibody Test, Ames Diagnostica). En cada tubo se depositaron 20 μ l de muestra problema y 380 μ l de tampón fosfato pH 7,2 como diluyente, incubándose durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se colocaron 25 μ l de la primera dilución (1:20) de cada muestra y de los controles en dos pocillos de una placa de poliestireno de fondo en U, uno para las células sensibilizadas y otro para las no sensibilizadas utilizadas como control. Después se depositaron 75 μ l de cada solución de hematíes, se agitaron las placas durante 5 min y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. La lectura se realizó con ayuda de un lector de placas, considerando la reacción positiva cuando se observaba hemaglutinación en el pocillo con hematíes sensibilizados y ausencia de ésta en el pocillo de los hematíes no sensibilizados. Como control positivo la prueba suministra suero de conejo liofilizado conteniendo anticuerpos anti-*Treponema pallidum* (título 1:256) y como control negativo se empleó de suero humano liofilizado.

En los casos en los que se observó hemaglutinación con ambos tipos de células (sensibilizadas y no sensibilizadas) se consideró la existencia de una reacción inespecífica frente a los hematíes, solventándose este problema mediante la absorción de las muestras previamente con hematíes no sensibilizados.

Cuando en la prueba cualitativa se obtuvo un resultado positivo, se realizó la titulación de la muestra. Para ello se depositaron 25 μ l de absorbente de la primera

dilución (1:20) y se realizaron diluciones sucesivas, añadiéndose posteriormente en cada pocillo 75 µl de células sensibilizadas. Para las células de control (hematíes no sensibilizados) se depositaron 25 µl de la dilución 1:20 para añadirle 75 µl de células no sensibilizadas. El resto del procedimiento de agitación, incubación, lectura e interpretación, se siguió la misma pauta que en la prueba cualitativa.

3.2.3.2.1.3.- Inmunofluorescencia indirecta.

Para la realización de la prueba FTA-abs, se empleó antígeno de *Treponema pallidum* (cepa Nichols, bioMérieux 7563-1) extracto liofilizado de *Treponema Reiter* como sorbente (bioMérieux 7219-1) anti-inmunoglobulinas humanas (IgM e IgG) conjugadas con fluoresceína (bioMérieux 7569-2 y 7567-2) y suero control positivo titulado (1:1600) (bioMérieux 7219-1).

Previamente, un volumen de las muestras se descomplementó mediante incubación durante 30 minutos en un baño a 56 °C. A continuación, se tomaron 20 µl de antígeno treponémico no patógeno de Reiter rehidratado con 1 mL de agua destilada y se distribuyó en cada pocillo, para posteriormente realizar el secado de los portaobjetos en estufa a 37 °C y su fijación con acetona a 4 °C durante 10 min, con secado final al aire.

Las muestras y controles se diluyeron al 1:10 con el sorbente, depositándose en un tubo de ensayo 225 µl de diluyente y 25 µl de la muestra problema. A continuación, a los pocillos que contenían el antígeno se adicionaron 20 µl de la dilución de las muestras y controles (dos pocillos por muestra, para IgG e IgM) reservando un pocillo para el control del conjugado y otro del sorbente. Posteriormente, se colocaron los portaobjetos dentro de una cámara húmeda y en estufa de 37°C con tampón fosfato alcalino pH 7,2; realizándose dos lavados, uno durante 10 min en reposo y luego otro lavado durante 8 min en agitación. Transcurrido este tiempo se procedió a su secado al aire durante 30 min, y posteriormente cubriéndose los pocillos con 20 µl de globulina anti-humana (IgM ó IgG) fluorescente, diluída en tampón fosfato a una dilución previamente calculada para cada lote de reactivos (normalmente las diluciones que empleamos fueron para IgG al 1:40 y para IgM al 1:10). Se procedió a la incubación, lavado y secado de los portaobjetos como se ha referido previamente. Por último, se

depositó glicerina tamponada y el cubreobjetos y se realizó su lectura con un microscópio de epifluorescencia (Leitz Wezlar 63-01256).

La reacción se consideró positiva cuando se observó una fluorescencia verde intensa de las estructuras bacilares, mayor o igual a la observada en el control positivo. La reacción se consideró negativa ante la ausencia de fluorescencia o la observación de una leve coloración verde de los treponemas, en relación a lo observado en los controles negativos, en los controles del sorbente y en los controles del conjugado.

3.2.3.2.2.- Análisis de fiebre Q.

Como prueba de cribado para detección de anticuerpos frente a *Coxiella burnetii* en fase I y fase II, se utilizó una inmunofluorescencia indirecta (*Coxiella burnetii* IF test. Bios GMBH 34-403008). Para ello se procedió a realizar una dilución 1:16 de los sueros problema con tampón fosfato salino. Sobre un portaobjetos con las suspensiones antigénicas de *Coxiella burnetii* se añadieron 20 µl del suero correspondiente diluido e incubándose en cámara húmeda durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS durante 5 min, añadiéndose el conjugado fluorescente anti-humano (Pasteur 74511) diluido con PBS a razón de 2 gotas de anti-inmunoglobulina por cada 1 mL de diluyente, e incubándose en cámara húmeda durante 30 min a 37 °C, para finalmente realizar dos lavados con tampón fosfato.

Se consideró una reacción positiva la observación de estructuras bacterianas de fluorescencia verde manzana $\geq 1+$, estimándose como títulos significativos en fase I (infección crónica o convalecencia) para IgM e IgG $> 1:16$, y como títulos de anticuerpos en fase II $\geq 1:256$ (infección activa).

3.2.3.2.3.- Análisis de fiebre botonosa mediterránea.

Para el estudio de reactividad frente a *Rickettsia conori* se utilizó el método de (inmunofluorescencia indirecta *Rickettsia conori*-Spot IF bioMérieux 75901).

Se procedió a la realización de una serie diluciones entre 1:20 y 1:320 de las muestras en tampón PBS, adicionando a cada pocillo 10 µl de suero diluido y 10 µl de conjugado. Tras incubación en cámara húmeda durante 30 min a 37°C y dos lavados con PBS-Tween durante 5 min y un lavado con agua destilada, se añadieron 10 µl de conjugado diluido en PBS al 1:50 en azul de Evans al 1:10000. Finalmente se realizaron tres lavados como los referidos previamente. Se consideró un resultado positivo a partir de un título $\geq 1:40$.

3.2.3.2.4.- Análisis de brucelosis.

Para el cribado se utilizó la prueba de rosa de Bengala (bioMérieux Ref.72691) Sobre tres círculos de la placa se colocó una gota (30 µl) de suero control negativo, una gota de suero control positivo (bioMérieux Ref.72641) y suero problema respectivamente.

Se añadió en cada círculo una gota (30 µl) de la suspensión antigénica y se mezcló uniformemente seguido de agitación durante 4 minutos, tras los cuales se procedió a su lectura e interpretación. La aparición de un precipitado, indicó la presencia de anticuerpos específicos y obligó a realizar una prueba específica.

Tras la prueba de precipitación, procedimos a centrifugar un volumen de muestra a 2500 rpm durante 20 min a 4°C, desechando el sobrenadante. Se procedió a la resuspensión del sedimento en una solución salina tres veces consecutivas. Del sedimento final obtenido se depositaron 15 µl sobre un portaobjetos, añadiéndose 20 µl de suero de Coombs, tras lo cual realizamos una incubación durante 30 min en cámara húmeda y a 37 °C. La lectura de dichos portaobjetos se realizó sobre un fondo luminoso.

3.2.3.2.5.- Análisis de Citomegalovirus.

Empleamos una prueba de ELISA directo en fase sólida, con antígeno de Citomegalovirus purificado e inactivado (Behring IgM- OWMX 612 CO1, 1099 e IgG- OWMX 650 00835).

Para la detección de anticuerpos de clase IgM, realizamos una absorción previa de los sueros para el factor reumatoideo. La unión de los anticuerpos específicos se reveló con conjugados de monoclonales IgG marcados con peroxidasa, determinando la intensidad de activación del sustrato con el conjugado fijado mediante espectrofotometría a 450 nm. Se consideró un resultado negativo un valor $< 0,10 E$ y positivo $> 0,2 E$ (siendo E, la longitud de onda).

3.2.3.2.6.- Análisis de virus Epstein-Barr.

Empleamos la prueba aglutinación de Monosticón (Color Slide II Mononucleosis test. 0368936 CorMédica) como cribado inicial de pacientes para evaluar reactividad cruzada con mononucleosis infecciosa. Como prueba confirmatoria de los casos de aglutinación, utilizamos la prueba de Paul-Bunell-Davidson, para la detección de anticuerpos heterófilos de clase IgM. Previamente, se efectuó la absorción de otros anticuerpos heterófilos dirigidos contra el antígeno de Forssman, con un extracto de riñón de cobaya. Para la interpretación de la prueba consideramos un título mayor a 1:80 como resultado positivo.

3.2.3.2.7.- Análisis de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Para el estudio de reactividad cruzada con VIH, se utilizaron los métodos comerciales de ELISA disponibles en nuestro laboratorio: HIV 1/2 Abbott (Axym 3D41-2) y HIV 1/2 Sanofi Pasteur (Acces T 76162). Para la realización de dichas pruebas y la interpretación de los resultados obtenidos se siguieron las indicaciones señaladas por cada laboratorio.

3.2.3.3.- Inmunofluorescencia indirecta.

En las muestras que resultaron reactivas (positivas o dudosas) mediante la prueba enzimoimmunoanálisis, se realizó en paralelo y separadamente la detección de anticuerpos de clase IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* mediante inmunofluorescencia indirecta (Lyme-Spot IF bioMèriux 75941) que emplea portaobjetos con antígeno fijado de *Borrelia burgdorferi* cepa B31.

Se utilizó un portaobjetos por cada suero con el fin de realizar 10 diluciones en tampón fosfato pH 7,2 a partir de la dilución 1:8 en cada muestra. Se depositaron 20 µl de cada dilución en cada uno de los pocillos del portaobjetos, incubándose a 37 °C en cámara húmeda durante 30 min, tras los cuales se realizaron dos lavados de 10 min con tampón PBS en agitación, procediéndose finalmente al secado de los portaobjetos.

Una vez secados, se añadieron 20 µl de anti-IgM o de anti-IgG conjugadas con fluoresceína en cada uno de los pocillos incubándose a 37 °C en cámara húmeda por 30 min para posteriormente realizar dos lavados de modo similar al previamente descrito excepto en el último que se realizó con agua destilada estéril. Finalmente se procedió al secado completo de los portaobjetos y su montaje con glicerina tamponada y visualización al microscopio de inmunofluorescencia (Leitz Wezlar 63-01256). En todos los ensayos realizados se emplearon los controles positivo y negativo suministrados por el laboratorio.

Una reacción se consideró positiva cuando se observó una clara fluorescencia de espiroquetas, determinándose el título por la inversa de la última dilución fluorescente. Se consideró significativo el título $\geq 1:256$ en una única muestra.

3.2.3.4.- Inmunotransferencia (Western blot).

Como prueba confirmatoria se emplearon dos métodos de inmunotransferencia comerciales de dos laboratorios diferentes (MarDx Diagnostics y Gull Laboratories) que utilizan extractos antigénicos de *Borrelia burgdorferi* (cepa B31) y *Borrelia garinii* (genogrupo 2) respectivamente.

Para el primer método (MarDx Diagnostics 40-2075M y 40-2075G) seguimos el protocolo y los controles suministrados por el laboratorio, si bien se introdujeron las modificaciones siguientes:

Previamente a la realización del ensayo, los sueros fueron absorbidos como se describe en el apartado 3.2.3.2. Una vez colocadas las tiras en su canal correspondiente de la bandeja de incubación, se adicionaron 2 mL de la solución diluyente, procediéndose a su agitación durante 5 minutos, tras los cuales se añadieron 20 µl del control positivo y 20 µl del control negativo en las tiras

correspondientes a los controles, y 20 μ l de cada uno de las muestras problema, en su canal correspondiente, incubándose en agitación durante 60 minutos. Tras la incubación se realizaron dos lavados con 2 mL de solución diluyente durante 5 min en agitación. Tras eliminar el volumen en cada una de los canales, se añadieron 2 mL de conjugado anti-humano IgM ó IgG, previamente diluido en tampón fosfato alcalino, incubándose en agitación durante 30 min, tras lo cual se eliminó el volumen en cada canal para realizar dos lavados como los referidos previamente más un último lavado con 2 mL de agua bidestilada estéril en agitación durante 1 min. El revelado de la reacción se efectuó mediante la adición de 2 mL de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/tetrazolium en cada uno de los canales, incubándose en agitación hasta la visualización de la banda de 41 kDa en el control positivo bajo (aproximadamente 5-10 min) parándose el revelado mediante la realización de 3 ó 4 lavados con agua bidestilada.

Para el segundo método (Gull Laboratories) se siguió íntegramente el protocolo de la casa comercial, sin establecer ninguna modificación. El protocolo es el mismo tanto para la determinación de IgM e IgG, variando únicamente el tipo de control positivo y la solución conjugada. En resumen este procedimiento se describe a continuación:

Los sueros fueron absorbidos como se describe en el apartado 3.2.3.2. Una vez colocadas las tiras en su canal correspondiente de la bandeja de incubación, se adicionaron 2 mL de la solución diluyente, procediéndose a su agitación durante 5 minutos, tras los cuales se añadieron 2 mL del control positivo y negativo que son suministrados ya diluidos, en las tiras correspondientes a los controles, y 2 mL de cada uno de las muestras problema diluidas 1:100 en el tampón correspondiente, incubándose en agitación durante 60 minutos. Tras la incubación se realizaron tres lavados con 2 mL de solución diluyente durante 5 min en agitación. Tras eliminar el volumen en cada una de los canales, se adicionaron 2 mL de conjugado anti-humano IgM ó IgG, previamente diluido en tampón fosfato alcalino, incubándose en agitación durante 30 min, tras lo cual se eliminó el volumen en cada canal para realizar tres lavados como los referidos previamente y tres lavados con 2 mL de agua bidestilada estéril en agitación durante 3 min cada uno. El revelado de la reacción se efectuó mediante la adición de 2 mL de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/tetrazolium en cada canal, incubándose en agitación durante 8-10 min hasta la

visualización de las bandas en el control positivo, parándose el revelado mediante la realización de 3 ó 4 lavados agua bidestilada.

Para la lectura e interpretación de los resultados se siguieron los criterios definidos para cada uno de los procedimientos. Así, en los ensayos de inmunotransferencia de MarDx Diagnostics (*B. Burgdorferi*) se consideró un resultado positivo para IgM cuando se detectó la presencia de dos de las bandas de 23 kDa, 39 kDa y/o 41 kDa, y positivo para IgG la presencia de 5 bandas de entre las bandas de 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y/o 93 kDa. Se consideró como resultado negativo, tanto para IgM como para IgG, una reactividad con un menor número de bandas de las anteriormente referidas. Para la interpretación de los resultados de inmunotransferencia empleando el procedimiento de Gull Laboratories (*B. garinii*) se consideró un resultado positivo de IgM por la presencia de una o más bandas de 23 kDa y 39 kDa, y en los ensayos de IgG la presencia de 4 ó mas bandas de entre las siguientes: 21, 23, 37, 39, 41 y/o 93 kDa. Como en el caso anterior, se consideró como resultado negativo, tanto para IgM como para IgG, una reactividad menor de la anteriormente establecida.

3.2.3.4.- Inmunotransferencia (Western blot).

Como prueba confirmatoria se emplearon dos métodos de inmunotransferencia comerciales de dos laboratorios diferentes (MarDx Diagnostics y Gull Laboratories) que utilizan extractos antigénicos de *Borrelia burgdorferi* (cepa B31) y *Borrelia garinii* (genogrupo 2) respectivamente.

Para el primer método (MarDx Diagnostics 40-2075M y 40-2075G) seguimos el protocolo y los controles suministrados por el laboratorio, si bien se introdujeron las modificaciones siguientes:

Previamente a la realización del ensayo, los sueros fueron absorbidos como se describe en el apartado 3.2.3.2. Una vez colocadas las tiras en su canal correspondiente de la bandeja de incubación, se adicionaron 2 mL de la solución diluyente, procediéndose a su agitación durante 5 minutos, tras los cuales se añadieron 20 µl del control positivo y 20 µl del control negativo en las tiras correspondientes a los controles, y 20 µl de cada uno de las muestras problema, en su

canal correspondiente, incubándose en agitación durante 60 minutos. Tras la incubación se realizaron dos lavados con 2 mL de solución diluyente durante 5 min en agitación. Tras eliminar el volumen en cada una de los canales, se añadieron 2 mL de conjugado anti-humano IgM ó IgG, previamente diluido en tampón fosfato alcalino, incubándose en agitación durante 30 min, tras lo cual se eliminó el volumen en cada canal para realizar dos lavados como los referidos previamente más un último lavado con 2 mL de agua bidestilada estéril en agitación durante 1 min. El revelado de la reacción se efectuó mediante la adición de 2 mL de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/tetrazolium en cada uno de los canales, incubándose en agitación hasta la visualización de la banda de 41 kDa en el control positivo bajo (aproximadamente 5-10 min) parándose el revelado mediante la realización de 3 ó 4 lavados con agua bidestilada.

Para el segundo método (Gull Laboratories) se siguió íntegramente el protocolo de la casa comercial, sin establecer ninguna modificación. El protocolo es el mismo tanto para la determinación de IgM e IgG, variando únicamente el tipo de control positivo y la solución conjugada. En resumen este procedimiento se describe a continuación:

Los sueros fueron absorbidos como se describe en el apartado 3.2.3.2. Una vez colocadas las tiras en su canal correspondiente de la bandeja de incubación, se adicionaron 2 mL de la solución diluyente, procediéndose a su agitación durante 5 minutos, tras los cuales se añadieron 2 mL del control positivo y negativo que son suministrados ya diluidos, en las tiras correspondientes a los controles, y 2 mL de cada uno de las muestras problema diluidas 1:100 en el tampón correspondiente, incubándose en agitación durante 60 minutos. Tras la incubación se realizaron tres lavados con 2 mL de solución diluyente durante 5 min en agitación. Tras eliminar el volumen en cada una de los canales, se adicionaron 2 mL de conjugado anti-humano IgM ó IgG, previamente diluido en tampón fosfato alcalino, incubándose en agitación durante 30 min, tras lo cual se eliminó el volumen en cada canal para realizar tres lavados como los referidos previamente y tres lavados con 2 mL de agua bidestilada estéril en agitación durante 3 min cada uno. El revelado de la reacción se efectuó mediante la adición de 2 mL de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/tetrazolium en cada canal, incubándose en agitación durante 8-10 min hasta la

visualización de las bandas en el control positivo, parándose el revelado mediante la realización de 3 ó 4 lavados agua bidestilada.

Para la lectura e interpretación de los resultados se siguieron los criterios definidos para cada uno de los procedimientos. Así, en los ensayos de inmunotransferencia de MarDx Diagnostics (*B. Burgdorferi*) se consideró un resultado positivo para IgM cuando se detectó la presencia de dos de las bandas de 23 kDa, 39 kDa y/o 41 kDa, y positivo para IgG la presencia de 5 bandas de entre las bandas de 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y/o 93 kDa. Se consideró como resultado negativo, tanto para IgM como para IgG, una reactividad con un menor número de bandas de las anteriormente referidas. Para la interpretación de los resultados de inmunotransferencia empleando el procedimiento de Gull Laboratories (*B. garinii*) se consideró un resultado positivo de IgM por la presencia de una o más bandas de 23 kDa y 39 kDa, y en los ensayos de IgG la presencia de 4 ó mas bandas de entre las siguientes: 21, 23, 37, 39, 41 y/o 93 kDa. Como en el caso anterior, se consideró como resultado negativo, tanto para IgM como para IgG, una reactividad menor de la anteriormente establecida.

4.-Resultados

4.1. - Detección de *Borrelia burgdorferi* sl. en ixódidos.

4.1.1. - Población de ixódidos obtenidos.

En los dos periodos de estudio, realizados en las épocas de primavera-otoño de 1997 y 1998, se obtuvieron y analizaron 1.267 garrapatas adultas, procedentes de distintas comarcas de la provincia de Valencia, todas ellas relacionadas con áreas rurales de nueve poblaciones. Durante el primer periodo de estudio (de mayo a septiembre de 1997) se obtuvo una población de 489 garrapatas adultas y durante el siguiente periodo (de marzo a noviembre de 1998) un total de 778 garrapatas. En ambos casos, se procedió al análisis de las características morfológicas y a la tipificación de las garrapatas, siguiendo los criterios taxonómicos referidos previamente en el apartado 3.1.3, pudiéndose diferenciar cinco géneros: *Boophilus*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* y *Dermacentor*. En cada uno de los géneros *Rhipicephalus* y *Dermacentor* se distinguieron dos especies (*Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus sanguineus*; *Dermacentor reticulatus* y *Dermacentor marginatus*) existiendo una única especie en el resto de los géneros, identificadas como *Boophilus annulatus*, *Haemaphysalis punctata* y *Hyalomma impressum*). La distribución de las garrapatas obtenidas en cada periodo se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. - Distribución de especies de ixódidos caracterizadas.

Género	Especie	Primer periodo	Segundo periodo	Total
<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	96	164	260
<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	159	249	408
	<i>bursa</i>	61	97	158
<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	29	45	74
	<i>reticulatus</i>	21	32	53
<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	6	0	6
<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	117	191	308
Total		489	778	1.267

Consideramos que la diferencia numérica de las garrapatas coleccionadas en cada año, obedeció, entre otras razones, a la distinta duración del periodo de la actividad biológica de los ixódidos en relación con las características climáticas registradas en cada uno de ellos.

La distribución de las garrapatas recogidas en cada población se muestra en la tabla 4.2, en la que se pone de manifiesto un mayor número de garrapatas obtenidas en las poblaciones de Calicanto, L´eliana y Riba-roja.

Esta mayor colección se debió a la mayor colaboración de la población rural poseedora de animales. También se evidencia un predominio del género *Rhipicephalus* en todas las poblaciones estudiadas, siendo éste con diferencia el más prevalente.

En la figura 4.1 se muestra la distribución por géneros de las garrapatas ixódidas por áreas analizadas, representando *Boophilus* spp. con 260 ejemplares el 20,5%, *Rhipicephalus* spp. con 566 el 44,6%, *Dermacentor* spp. con 127 garrapatas el 10% y *Haemaphysalis* spp. con 308 el 25,3%. En ambos periodos señalados sólo se coleccionaron 6 ejemplares de *Hyalomma* spp. En las comarcas de Torrente y de Utiel-Requena, se obtuvieron una menor diversidad de especies y número de garrapatas, probablemente debido a que en el momento dedicado a la colección en estas áreas (mes de julio) ya se había realizado el esquilado de los rebaños de ovejas, así como la quema del rastrojo y matorral en prevención de los incendios forestales estivales.

Tabla 4.2.- Distribución de garrapatas obtenidas en cada población.

Población	Género	Especie	Machos	Hembras	N	Total
Calicanto	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	70	50	120	448
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	54	52	106	
		<i>bursa</i>	57	25	82	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	32	2	34	
		<i>reticulatus</i>	17	0	17	
	<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	1	4	5	
	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	61	23	84	
Chiva	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	6	10	16	52
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	12	10	22	
		<i>bursa</i>	6	5	11	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	0	2	2	
		<i>reticulatus</i>	0	0	0	
<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	1	0	1		

Tabla 4.2.- Distribución de garrapatas obtenidas en cada población (continuación).

Población	Género	Especie	Machos	Hembras	N	Total
L´eliana	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	0	0	0	296
	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	11	5	16	
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	77	13	90	
		<i>bursa</i>	20	3	23	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	15	3	18	
		<i>reticulatus</i>	10	4	14	
	<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	0	0	0	
Monserrat	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	120	15	135	126
	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	26	29	55	
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	15	39	54	
		<i>bursa</i>	6	10	16	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	0	0	0	
		<i>reticulatus</i>	0	0	0	
	<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	0	0	0	
Riba-roja	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	1	0	1	266
	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	14	5	19	
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	82	14	96	
		<i>bursa</i>	20	1	21	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	17	3	20	
		<i>reticulatus</i>	20	2	22	
<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	0	0	0		
Torrente	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	71	17	88	34
	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	7	5	12	
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	5	12	17	
		<i>bursa</i>	2	3	5	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	0	0	0	
		<i>reticulatus</i>	0	0	0	
<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	0	0	0		
Utiel - Requena	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	0	0	0	45
	<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	12	10	22	
	<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	13	10	23	
		<i>bursa</i>	0	0	0	
	<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	0	0	0	
		<i>reticulatus</i>	0	0	0	
<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	0	0	0		
	<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	0	0	0	

La diferencia encontrada entre el número de machos y hembras capturados en algunas poblaciones, como por ejemplo en la de L´eliana, donde se obtuvieron de la especie *Rhipicephalus sanguineus* 77 machos frente a 13 hembras o de la especie *Rhipicephalus bursa* con 20 machos frente a 15 hembras, se interpretó como la consecuencia del método empleado para su recogida, ya que los machos no tienen capacidad de cebado y se encuentran de modo natural en la vegetación, mientras que

la mayoría de las hembras se ceban sobre un animal hospedador. De modo que, en el conjunto de garrapatas recogidas, existió una población de 69,5% de machos y 30,5% de hembras, en relación al mayor rendimiento del método de la sábana frente a la extracción individualizada de las hembras durante su cebado. Sin embargo, mediante la extensión de la tela (a veces realizada durante sólo dos horas) se consiguió un elevado número de garrapatas, machos y hembras no cebadas, particularmente durante los meses más calurosos. Este método permitió también la recogida de ninfas, pero su número era proporcionalmente muy inferior al de adultos, que junto a las dificultades de manipulación de dichos elementos por su pequeño tamaño, nos obligó a no considerar esta fase evolutiva como objeto de nuestro estudio.

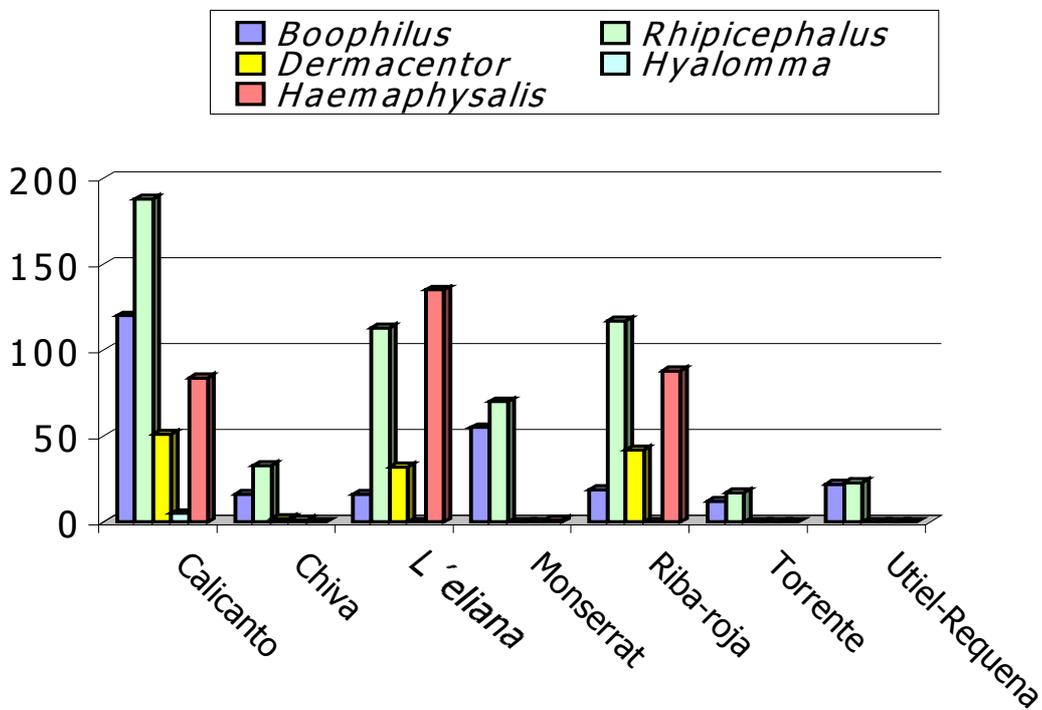


Figura 4.1.- Distribución de especies de garrapatas en las poblaciones estudiadas

En cuanto a la distribución según el hospedador, se observó que el predominio del género *Rhipicephalus* se relacionaba con su elevada frecuencia en perros y gatos así como en el matorral. Por otra parte los especímenes del género *Boophilus* en su totalidad se obtuvieron a partir de équidos, que son relativamente frecuentes en estas

poblaciones rurales, por la práctica del deporte de "arrastre y tiro caballar", bastante extendido en las zonas estudiadas.

4.1.2.- Evaluación microscópica de macerados y disecciones.

Con los ixódidos aprehendidos durante el primer periodo, se realizaron los estudios microscópicos tanto a partir de los macerados obtenidos mediante mortero como del material de las disecciones realizadas mediante bisturí o tijeras. Tras su caracterización, se seleccionaron 235 ejemplares (el 48% de las garrapatas coleccionadas) diferenciando dos grupos con un número similar, para la realización de su macerado o disección. En la tabla 4.3 se indica el número de garrapatas empleadas en cada método según las especies identificadas. Los ejemplares del género *Hyalomma* spp, se examinaron microscópicamente sólo tras su macerado, ya que no se dispuso de suficientes garrapatas para su examen tras disección.

Tabla 4.3. - Distribución de especies empleadas para examen microscópico.

Género	Especie	Macerado machos/hembras	Disección machos/hembras	Total
<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	20/20	20/20	80
<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	10/10	10/10	70
	<i>bursa</i>	7/8	10/5	30
<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	5/2	5/2	24
	<i>reticulatus</i>	5/0	5/0	10
<i>Hyalomma</i>	<i>impressum</i>	2/4	0/0	6
<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	20/5	20/10	55
Total		118 69/49	117 70/47	235 139/96

El exhaustivo estudio microscópico realizado mediante ambos procedimientos, y tras las distintas tinciones empleadas, no permitió la observación de ninguna estructura compatible con una espiroqueta en ninguno de los géneros analizados, por tanto no reveló la presencia de *Borrelia* spp en las garrapatas coleccionadas.

La evaluación de los macerados resultó extremadamente compleja con cualquiera de las tinciones, por revelarse una abundante flora bacteriana mixta, compuesta por cocos y bacilos, tanto Gram positivos como Gram negativos, que no tipificamos por no ser el objetivo de nuestro estudio. Además, se observó la presencia, en escaso número, de flora fúngica compuesta por elementos levaduriformes. La presencia de las abundantes y distintas estructuras celulares disgregadas de los ácaros, no impidieron finalmente el reconocimiento de las estructuras bacterianas presentes en las muestras (figura 4.2).

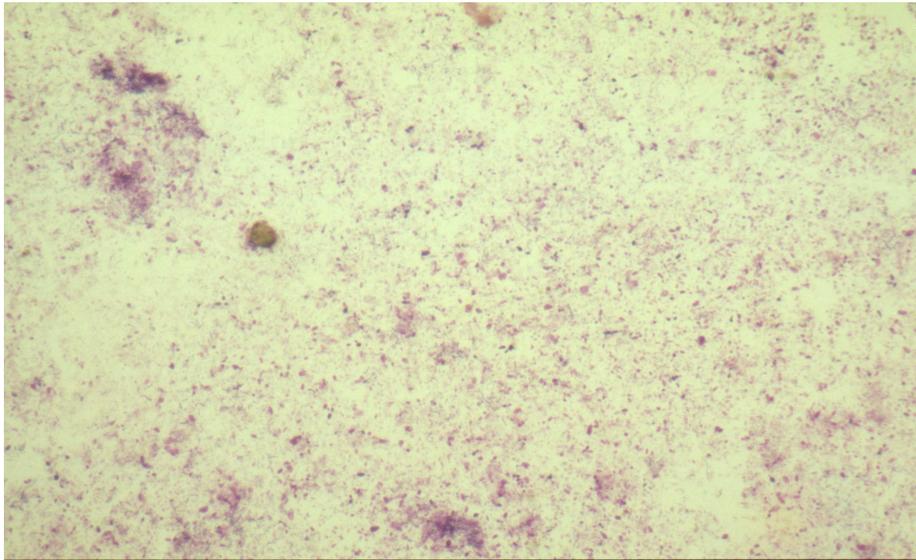


Figura 4.2.- Observación microscópica (1000X) de un macerado de ixódido tras su tinción de Gram.

Notablemente, las hembras cebadas analizadas presentaron mayor cantidad de flora microbiana que los machos y las hembras no cebadas. Sin embargo, el examen microscópico de estas hembras maceradas, reveló la presencia de elementos bacterianos y levaduriformes similares a los encontrados genéricamente, no observándose en ellas, ninguna estructura compatible con *Borrelia* spp. u otra espiroqueta.

El examen microscópico de los elementos obtenidos tras la disección de machos y hembras (figura 4.3) mostró la presencia de diferentes estructuras celulares de tipo epitelial, de morfología tubular, y de tipo glandular esférico junto a una pequeña cantidad de esquistocitos, pero en todos los casos sin presencia de flora microbiana.

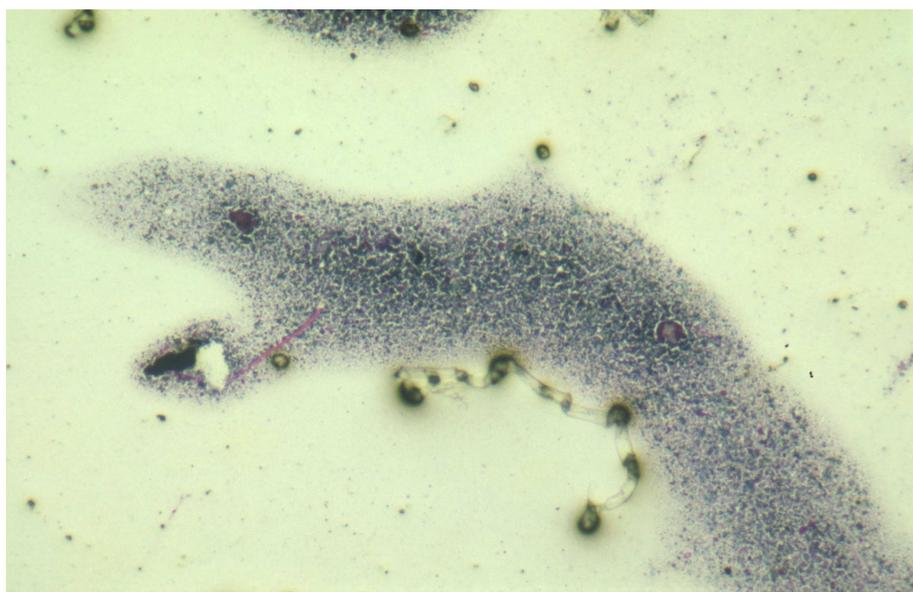


Figura 4.3.- Observación microscópica (100X) tras disección de glándulas e intestinos medios ixódido tras su tinción de Giemsa.

4.1.3.- Evaluación del cultivo en medio BSK II.

Una porción de las garrapatas sometidas a maceración (101 ejemplares) y de las garrapatas diseccionadas (104 ejemplares) se estudió mediante inoculación en medio BSK II suplementado e incubado en condiciones de microaerofilia a 37°C, no habiéndonos revelado el crecimiento de ninguna estructura compatible con *Borrelia burgdorferi* u otra espiroqueta, tras el estudio microscópico seriado de los sedimentos.

Los macerados de las garrapatas dieron lugar a cultivos primarios con muy abundante flora microbiana, correspondiéndose con la flora mixta observada microscópicamente. Del mismo modo, los macerados de las hembras cebadas proporcionaron una mayor cantidad de flora, expresada en una importante turbidez a las 96 horas de incubación. Los subcultivos posteriores en medio BSK II suplementado con antibióticos, produjeron un notable descenso de la cantidad de flora microbiana mixta, pero persistió la presencia de bacilos Gram negativos que se mantuvieron durante todos los subcultivos posteriores realizados semanalmente. Los cultivos iniciales, conservados durante los dos meses de estudio, mostraron una elevada turbidez con formación de gas y sedimento, con muy abundante flora microbiana

similar a la descrita. En la tabla 4.4. se muestra la distribución de machos y hembras empleados para su cultivo.

Tabla 4.4.- Distribución de especies empleadas tras maceración o disección en el cultivo en medio BSK II.

Género	Especie	Macerado machos/hembras	Disección machos/hembras	Total (%)
<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	4/3	5/4	16 (7,8)
<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	28/10	28/10	76 (37)
	<i>bursa</i>	7/10	4/10	31 (15)
<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	5/3	5/3	16 (7,8)
	<i>reticulatus</i>	5/0	5/0	10 (4,8)
<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	25/1	25/5	56 (27,5)
Total		101 74/27	104 72/32	205 146/59

El estudio microscópico de los cultivos realizados con los productos de las disecciones, obtenidos en machos y en hembras, mostraron la ausencia de flora microbiana, tanto en el cultivo primario como en los subcultivos realizados durante los dos meses de evaluación. Sólo en dos machos de la especie *Rhipicephalus sanguineus*, se obtuvo el crecimiento de bacilos Gram negativos y levaduras y en una hembra del mismo género el crecimiento de bacilos Gram negativos.

4.1.4.- Resultados de la amplificación de ADN específico (nested PCR).

La detección de ADN de *B. burgdorferi* en los ixódidos obtenidos en diferentes áreas de la provincia de Valencia, se realizó sobre una parte de los ejemplares coleccionados durante el año 1998 (total 778 garrapatas).

Según los criterios expresados en el apartado 3.1.4.4, se confeccionaron 55 lotes, seleccionándose los individuos íntegros en el momento de la extracción de ADN y los que presentaban las características más favorables para el estudio (completa integridad y mayor tamaño) siendo preferentemente hembras cebadas, aunque se incluyeron también machos y hembras no cebadas (tabla 4.5).

Tabla 4.5.- Distribución de especies empleadas en el estudio nested PCR.

Género	Especie	Garrapatas analizadas	Nº lotes
<i>Boophilus</i>	<i>annulatus</i>	94	14
<i>Rhipicephalus</i>	<i>sanguineus</i>	84	6
	<i>bursa</i>	48	4
<i>Dermacentor</i>	<i>marginatus</i>	43	9
	<i>reticulatus</i>	34	7
<i>Haemaphysalis</i>	<i>punctata</i>	120	15
Total		393	55

Dado el elevado número de garrapatas obtenidas durante el segundo periodo, se estudió la mitad de la población, garantizándose un número representativo de ejemplares de cada género y especie. De modo que se analizó el 22% de las garrapatas de la especie *Boophilus annulatus*; el 31% del género *Rhipicephalus* (20% de *R. sanguineus* y 11% de *R. bursa*); el 18% de los ixódidos del género *Dermacentor* (10% de *D. marginatus* y 8% de *D. reticulatus*) y el 28,4% de la especie *Haemaphysalis punctata*.

De cada especie recogida durante este periodo, se confeccionaron distintos lotes de entre 3 y 30 individuos, con el fin de obtener una cantidad de ADN variable en cada una de ellos (tabla 4.6). Todos los lotes de garrapatas analizadas mediante el procedimiento de Nested PCR para la amplificación de secuencias de los genes Osp A y Fla, resultaron negativos (figura 4.4 y 4.5) ya que no se detectaron bandas de ADN de igual tamaño a las identificadas en *Borrelia burgdorferi* en ninguno de los ensayos, siendo igualmente negativos los productos de las primeras amplificaciones como de las segundas.

Cabe señalar que el resultado negativo fue similar con los dos métodos de extracción de ADN empleados, ya que los lotes B5, B6 y B7 de *Boophilus annulatus*, R8, R9 y R10 de *Rhipicephalus sanguineus* y los lotes H5 y H6 de *Haemaphysalis punctata*, preparados mediante el método más simple de ebullición, descrito en el punto 3.1.4.4.1, no permitieron demostrar la presencia de ADN específico (figuras 4.4 y 4.5).

Tabla 4.6.- Lotes analizados y resultados de la nested PCR para el gen OspA y para el gen Fla.

Especie	Lotes	Nº lotes	Nº G./ lote	Amplificado OspA	Amplificado Fla
<i>B. annulatus</i>	B1 a B9	9	6	N	N
<i>B. annulatus</i>	B10 a B14	5	8	N	N
<i>R. sanguineus</i>	R1 a R4	4	6	N	N
<i>R. bursa</i>	R5 a R7	3	6	N	N
<i>R. sanguineus</i>	R8 y R9	2	30	N	N
<i>R. bursa</i>	R10	1	30	N	N
<i>D. marginatus</i>	D1 a D4	4	6	N	N
<i>D. reticulatus</i>	D5 a D7	3	6	N	N
<i>D. marginatus</i>	D8 a D11	4	4	N	N
<i>D. reticulatus</i>	D12 a D15	4	4	N	N
<i>D. marginatus</i>	D16	1	3	N	N
<i>H. punctata</i>	H1 a H15	15	6	N	N

Nº G/ lote: Número de garrapatas por lote.

En todos los casos los controles de amplificación preparados con ADN obtenido de la cepa control B31 (ATCC 35210) resultaron positivos al poder objetivarse en gel de agarosa, las bandas características de amplificación de 702-bp y 345-bp para la primera y segunda amplificación del gen OspA y de 791 y 275-bp respectivamente para el gen Fla (figuras 4.4 y 4.5).

En todos los lotes de cada una de las especies se introdujo un control interno, constituido por ADN de la cepa control B31, junto a las muestras de ADN de los ixódidos, siendo el resultado de la amplificación igualmente negativo, sugiriéndose la presencia de inhibidores contenidos en las estructuras queratinosas.

Respecto a la reproductibilidad de los métodos empleados en los distintos lotes de cada especie, se demostró un resultado repetidamente negativo al analizar diferentes fracciones del producto lisado mediante distintas reacciones de

amplificación. Del mismo modo, los ensayos realizados durante la optimización de las pruebas de amplificación, con lotes similares a los descritos, proporcionaron un resultado negativo.

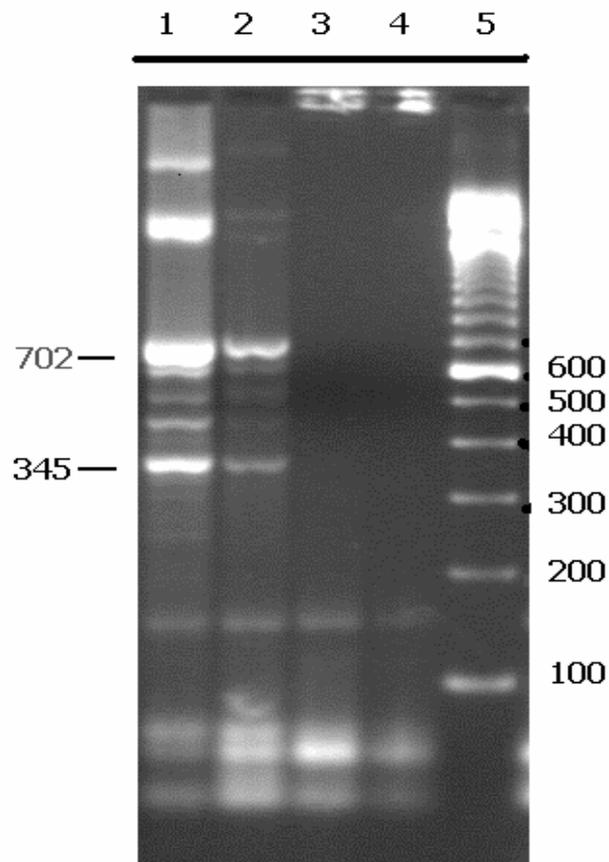


Figura 4.4.- Resultados de amplificación de la secuencia del gen de la lipoproteína de membrana OspA. Carreras 1: ADN *B. burgdorferi* dilución 1/1000; 2: ADN *B. burgdorferi* dilución 1/500; 3: Muestra *B. Annulatus*, lote B6, 4: Muestra *D. marginatus*, 5: Marcador de peso molecular en pares de base.

Como se ha referido, los resultados negativos observados en las muestras analizadas y , por el contrario, la adecuada amplificación de los controles externos incluidos en cada ensayo, nos permite deducir la presencia de inhibidores con ambos métodos de extracción de ADN, siendo especialmente llamativo la inhibición en las muestras obtenidas mediante el método con fenol extracción, que se considera útil para el estudio de muestras con elevada contaminación. Pese a la elección de un método de doble amplificación (nested PCR), la sensibilidad en las muestras analizadas debe considerarse muy limitada.

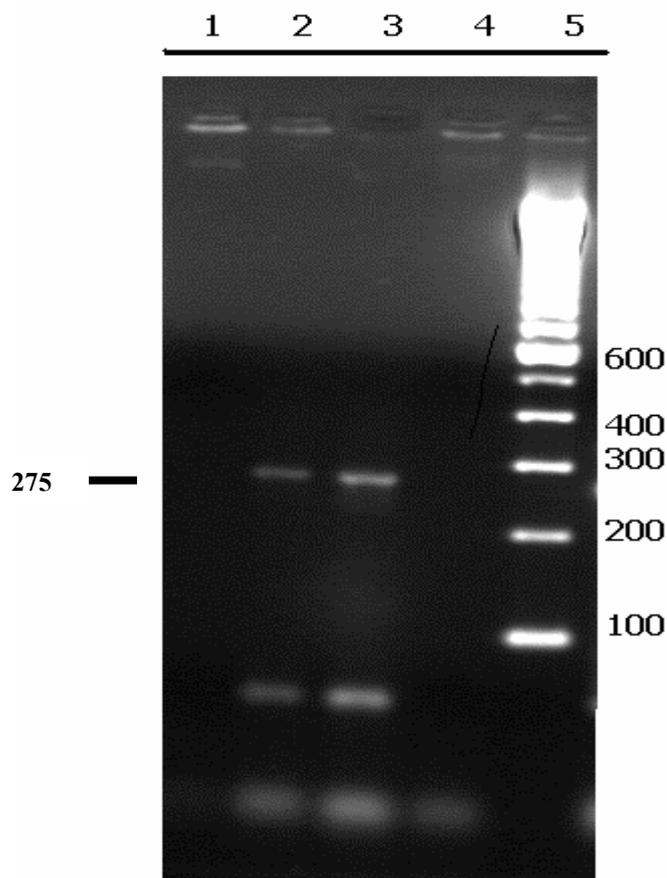


Figura 4.5.- Resultado de la amplificación de la secuencia del gen de la flagelina (Fla).

Carreras 1: Muestra *H. Punctata*, lote H6 2: ADN *B. burgdorferi* dilución 1:100; 3: ADN *B. burgdorferi* dilución 1:1000; 4:Muestra *R. sanguíneus* 5:Marcador de peso molecular en pares de base .

4.2.- Diagnóstico de borreliosis en muestras clínicas.

4.2.1.- Muestras clínicas analizadas.

En el periodo considerado para el estudio de muestras clínicas (1996-1999), se remitieron al laboratorio del Hospital General Universitario de Valencia, 1.438 muestras, correspondiéndose a 1.409 sueros y a 29 líquidos cefalorraquídeos, para estudio de reactividad frente a *B. burgdorferi*, bien debido a una sospecha clínica de borreliosis o bien por la necesidad de establecer un diagnóstico diferencial en un cuadro clínico no filiado.

Un elevado número de solicitudes precisaron de una amplia serie de pruebas de diagnóstico serológico justificadas por la situación clínica de los pacientes, particularmente aquellos con alteraciones neurológicas (protocolos de diagnóstico).

Durante ese periodo, la distribución anual de las muestras clínicas remitidas al laboratorio, desde los distintos servicios del hospital y áreas de salud dependientes, reflejó un número decreciente, tanto si se considera exclusivamente el número de las mismas como por el número de pacientes de procedencia (tabla 4.7) existiendo una reducción del 55% desde el primer al último año, siendo algo menor respecto al número de pacientes.

Tabla 4.7.- Distribución anual de muestras clínicas y pacientes analizados.

Año	Nº de muestras	Nº de pacientes
1.996	494	378
1.997	489	371
1.998	234	195
1.999	221	180
Total	1.438	1.124

4.2.2.- Muestras reactivas seleccionadas.

La determinación de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en el conjunto de muestras, realizada mediante enzimoimmunoanálisis (sistema EIA VIDAS) permitió seleccionar 80 muestras reactivas (5,5%). De ellas, 65 presentaron un resultado positivo constituyendo el 4,5% del total de las muestras remitidas y el 81,2% respecto de las seleccionadas. En 15 muestras, procedentes de 14 pacientes, se obtuvo un resultado indeterminado o dudoso (1% del total y el 18,7% de las seleccionadas). Del total de líquidos cefalorraquídeos enviados al laboratorio, sólo uno de ellos (3,4%) presentó un resultado positivo. En la tabla 4.8, se recoge la distribución anual de muestras y pacientes con resultado positivo o dudoso, y su relación con el total de muestras y pacientes estudiados cada año. El porcentaje de resultados positivos resultó uniformemente bajo durante todos los años del estudio, no superando el 7% (rango 4,5% – 6,7%) de las muestras biológicas, ni el 10% de los pacientes analizados (rango 5,5% - 8,8%). Así, en el periodo de cuatro años, se identificaron 72 pacientes, con un resultado serológico compatible con borreliosis de Lyme mediante el método de cribado, encontrándose sólo 8 pacientes con muestras reactivas en dos años distintos consecutivos, obteniéndose un grupo de 80 muestras positivas.

Tabla 4.8.- Distribución anual de muestras y de pacientes, con resultado de VIDAS positivo o dudoso, respecto a sus totales.

Año	Nº de muestras (%)	Nº de pacientes (%)
1.996	23 (4,6%)	23 (6%)
1.997	33 (6,6%)	33 (8,8%)
1.998	14 (5,9%)	14 (7,1%)
1.999	10 (4,5%)	10 (5,5%)
Total	80 (5,5%)	72 (6,4%)

De estos 72 pacientes, el 58,5% fueron remitidos por el servicio de Neurología del Hospital General Universitario de Valencia (HGUUV). El resto de pacientes procedieron de distintas consultas externas (13 pacientes; 18%) y del servicio de Dermatología (8 pacientes; 11,1%), así como de los servicios de Medicina Interna (7 pacientes; 9,7%) y del de Otorrinolaringología (2 pacientes; 2,7%). En la tabla 4.9 se

muestra la distribución de los pacientes seleccionados por su resultado positivo o dudoso mediante la prueba de EIA VIDAS, con el código de identificación (Mn) asignado. Por otra parte, se estudió serológicamente un grupo control de donantes de sangre sanos del Centro de Transfusión de La Comunidad Valenciana, de los que se obtuvieron 50 sueros a los que se les realizaron las mismas pruebas de cribado, de confirmación y de reactividad cruzada que al grupo de sueros objeto de estudio y referidas en el apartado de material y métodos.

Tabla 4.9.- Distribución de pacientes seleccionados por su reactividad en la prueba de EIA VIDAS según año, servicio clínico y sexo.

EIA VIDAS	Año	Servicio	Código	Sexo
D	1996	Neurología	M1	Hombre
D	1996	Consultas externas	M2	Hombre
P	1996	Dermatología	M3	Hombre
D	1996	Consultas externas	M4	Hombre
P	1996	Medicina Interna	M5	Hombre
D	1996	Consultas externas	M6	Mujer
D	1996	Dermatología	M7	Mujer
D	1996	Dermatología	M8	Mujer
P	1996	Neurología	M9	Mujer
P	1996	Neurología	M10	Hombre
P	1997	Neurología	M11a	Hombre
P	1998	Neurología	M11b	Hombre
D	1996	Consultas externas	M12	Hombre
D	1996	Consultas externas	M13	Hombre
P	1996	Dermatología	M14	Hombre
P	1996	Dermatología	M15	Hombre
D	1996	Medicina Interna	M16a	Mujer
D	1997	Medicina Interna	M16b	Mujer
P	1996	Consultas externas	M17	Mujer
P	1996	Dermatología	M18	Mujer
P	1996	Consultas externas	M19	Hombre

Tabla 4.9.- Distribución anual de pacientes seleccionados por su reactividad en las pruebas de EIA VIDAS según año, servicio clínico y sexo (continuación).

EIA VIDAS	Año	Servicio	Código	Sexo
P	1996	Neurología	M20	Hombre
D	1996	Dermatología	M21	Mujer
P	1997	Neurología	M22a	Mujer
P	1998	Neurología	M22b	Mujer
D	1996	Neurología	M23	Mujer
D	1996	Consultas externas	M24	Hombre
P	1996	Neurología	M25a	Hombre
P	1997	Neurología	M25b	Hombre
P	1997	Neurología	M26	Hombre
D	1997	Neurología	M27	Mujer
P	1997	Neurología	M28	Mujer
D	1997	Medicina Interna	M29	Mujer
P	1998	Neurología	M30a	Mujer
P	1999	Neurología	M30b	Mujer
P	1997	Neurología	M31	Hombre
P	1997	Neurología	M32a *	Mujer
P	1998	Neurología	M32b	Mujer
P	1997	Neurología	M33	Hombre
P	1997	Medicina Interna	M34	Mujer
P	1997	Consultas externas	M35	Hombre
P	1997	Consultas externas	M36	Hombre
P	1997	Dermatología	M37	Mujer
P	1997	Neurología	M38	Hombre
P	1997	Neurología	M39	Hombre
P	1997	Neurología	M40	Hombre
P	1997	Neurología	M41	Hombre
P	1997	Consultas externas	M42	Hombre
P	1997	Neurología	M43	Mujer
P	1997	Neurología	M44	Hombre
P	1997	Dermatología	M45a	Hombre
P	1998	Dermatología	M45b	Hombre
P	1997	Neurología	M46	Hombre
P	1997	Neurología	M47	Hombre

Tabla 4.9.- Distribución anual de pacientes seleccionados por su reactividad en las pruebas de EIA VIDAS según año, servicio clínico y sexo (continuación).

EIA VIDAS	Año	Servicio	Código	Sexo
P	1997	Neurología	M48	Hombre
P	1997	Neurología	M49	Hombre
P	1997	Medicina Interna	M50	Mujer
P	1997	Neurología	M51	Hombre
P	1997	Neurología	M52	Hombre
P	1997	Otorrinolaringología	M53	Mujer
P	1997	Neurología	M54	Hombre
P	1997	Neurología	M55	Hombre
P	1998	Consultas externas	M56	Hombre
P	1998	Neurología	M57a	Hombre
P	1999	Neurología	M57b	Hombre
P	1998	Neurología	M58	Mujer
P	1998	Neurología	M59	Hombre
P	1998	Consultas externas	M60	Mujer
P	1998	Neurología	M61	Mujer
P	1998	Neurología	M62	Mujer
P	1998	Neurología	M63	Mujer
P	1999	Neurología	M64	Hombre
P	1999	Neurología	M65	Mujer
P	1999	Neurología	M66	Hombre
P	1999	Medicina Interna	M67	Hombre
P	1999	Neurología	M68	Mujer
P	1999	Medicina Interna	M69	Hombre
P	1999	Otorrinolaringología	M70	Mujer
P	1999	Neurología	M71	Hombre
P	1998	Neurología	M72	Hombre

P: resultado positivo; **D:** resultado dudoso; *****: LCR; **a y b:** pacientes con 2 muestras y en sombreado.

Se refiere como procedencia de Consultas externas, a los pacientes atendidos en los centros de especialidades y/o hospitales comarcales dependientes del Hospital General Universitario de Valencia, cuyas muestras biológicas fueron remitidas a la unidad de Microbiología del laboratorio de Análisis Clínicos del mismo, no especificándose la especialidad médica concreta de dicha consulta.

Tomando en consideración la variable sexo en la población seleccionada, encontramos 45 pacientes varones (62,5%) y 27 pacientes mujeres (37,5%) es decir podemos observar un relativo predominio de reactividad serológica mediante la prueba de EIA VIDAS para la borreliosis de Lyme en pacientes varones. Sin embargo, igual distribución de sexos encontramos en los pacientes con un resultado dudoso la prueba EIA (7 hombres y 7 mujeres) siendo este resultado indeterminado mas frecuentemente obtenido durante el primer año de estudio. Destaca la uniformidad en el resultado, en aquellos pacientes que tenían dos muestras separadas en dos años consecutivos (tabla 4.9).

En la figura 4.6, se presenta la distribución de muestras reactivas por año de estudio, y su relación al número de muestras recibidas. Considerando las muestras positivas, el mayor número de ellas, se obtuvo en los dos primeros años (1996 y 1997).

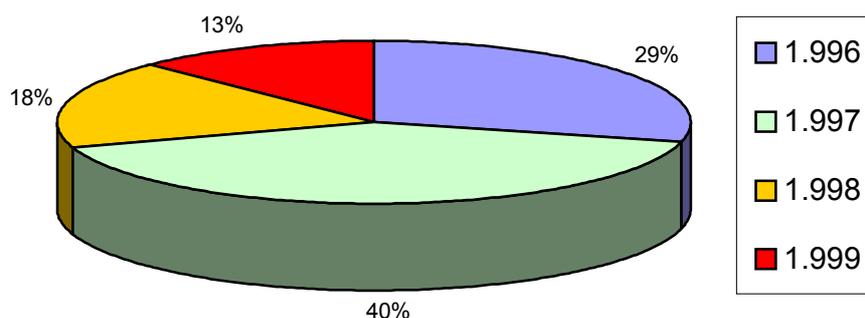


Figura 4.6.- Porcentaje de muestras reactivas mediante EIA VIDAS en cada año del periodo de estudio.

4.2.3.- Resultados del estudio de reactividad cruzada.

En todas las muestras con un resultado positivo o dudoso mediante el enzimoimmunoanálisis VIDAS, se determinó la reactividad frente a *Treponema pallidum*, independientemente de que se solicitase o no al laboratorio. Así, en las 80 muestras se estableció la existencia de lues en 12 de ellas (15%) correspondiéndose a 11 pacientes (5 mujeres y 6 varones) como se muestra en la tabla 4.10. La positividad luética, condicionó su retirada de un estudio serológico ulterior de borreliosis de Lyme, al asumirse que de modo independiente al resultado obtenido mediante VIDAS, los pacientes eran correctamente diagnosticados como afectados de sífilis. Además, se conocía que varios de estos pacientes eran cónyuges de pacientes luéticos previamente diagnosticados.

Respecto al servicio médico de procedencia de las muestras de los pacientes luéticos, 6 de ellas fueron remitidas por el servicio de Neurología, 5 por el servicio de Dermatología, dos de ellas del mismo paciente en dos años consecutivos, y una por el servicio de Medicina Interna.

Tabla 4.10.- Muestras con resultado EIA VIDAS positivo o dudoso y resultado luético positivo.

Código	VIDAS	RPR	FTA-abs	MHA-Tp
M3	P	N	P	1:320
M7	D	N	P	1: 60
M15	P	1:4	P	1:2560
M31	P	1:8	P	1:80
M40	P	1:2	P	1:640
M45a	P	P	P	ND
M45b	P	1:4	P	1:1280
M49	P	1:32	P	1:2560
M50	P	1:2	P	1:640
M55	P	1:1	P	1:320
M62	P	1: 8	P	1:160
M71	P	1:4	P	1:2560

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo;

D: resultado dudoso; **ND:** resultado no determinado.

En el resto de las 68 muestras, todas las pruebas luéticas fueron negativas, tanto las pruebas treponémicas como no treponémicas, excepto en dos muestras (M11b y M23) donde se observó reactividad reiteradamente positiva mediante la prueba FTA-abs, sin establecerse un diagnóstico definitivo de infección luética.

Respecto al resto de procesos infecciosos evaluados serológicamente, destacamos que sólo en cuatro muestras (M16a y M16b, M55 y M56) se encontraron anticuerpos de clase IgG frente a virus de Epstein Barr título de 1:32 y 1:512 para el paciente M16; 1:256 para el paciente M55 y 1:32 para el paciente M56, siendo estos casos negativos para anticuerpos de clase IgM. El resultado de las otras pruebas de estudio de reactividad cruzada resultaron negativas en las restantes 65 muestras seleccionadas correspondientes a 61 pacientes. El paciente M16, no se retiró del estudio por las altas titulaciones serológicas para Lyme y por la clínica de encefalomiелitis crónica y la ausencia de afectación hepática, poco sugestivas de mononucleosis.

4.2.4.- Resultados de la inmunofluorescencia indirecta frente a *Borrelia burgdorferi*.

Tras la selección de muestras reactivas frente a *B. burgdorferi* mediante enzimoimmunoanálisis y sin reactividad cruzada frente al *T. pallidum* y otros reconocidos agentes responsables de falsos positivos, se procedió a su estudio mediante inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos IgM e IgG (IFI IgM e IFI IgG) considerándose un resultado positivo para IgM la aparición de fluorescencia igual o mayor que el control positivo a título $\geq 1:32$ en el suero y $\geq 1:4$ en el LCR; y para IgG una fluorescencia a título $\geq 1:256$ en el suero y LCR (tabla 4.11). En el conjunto de las 67 muestras se halló un título positivo para IgG, excepto en un suero (M27) con un título IFI IgG igual a 1:64 y EIA VIDAS dudoso y otro (M70) con un título igual a 1:128 y EIA VIDAS positivo.

Además, no se pudo establecer una correlación directa entre los casos de EIA VIDAS dudoso y los títulos bajos de IFI IgG, puesto que dicho resultado indeterminado se presentó igualmente con titulaciones altas (M1, M6, M8, M16ab, M23

y M29). Así, entre los resultados de enzimoimmunoanálisis dudoso encontramos 4 muestras con título IFI IgG 1:512 y 4 muestras con 1:1204; 3 muestras con un título 1:2048; 1 muestra con un título 1:256 y la muestra señalada con un título inferior al punto de corte.

No encontramos en la serie analizada, ningún suero con EIA VIDAS dudoso y un título $\geq 1:4096$. En el resto de las 66 muestras (fueran dudosas o positivas previamente mediante EIA VIDAS) el título de IFI IgG se situó en el rango $\geq 1:256$ y $\geq 1:4096$.

Tabla 4.11.- Resultados de EIA VIDAS y su correlación con IFI IgM e IgG.

Código	VIDAS	IFI IgM	IFI IgG	Código	VIDAS	IFI IgM	IFI IgG
M1	D	M+	1:1024	M28	P	M-	1:1024
M2	D	M-	1:512	M29	D	M-	1:1024
M4	D	M+	1:512	M30a	P	M-	>1:4096
M5	P	M+	1:2048	M30b	P	M-	1:4096
M6	D	M+	1:1024	M32a	P	M-	1:256
M8	D	M-	1:1024	M32b	P	M-	1:1024
M9	P	M+	1:2048	M33	P	M-	1:512
M10	P	M-	1:256	M34	P	M-	1:512
M11a	P	M-	1:512	M35	P	M-	1:4096
M11b	P	M-	1:4096	M36	P	M+	1:2048
M12	D	M-	1:512	M37	P	M-	1:1024
M13	D	M-	1:256	M38	P	M-	1:512
M14	P	M-	1:4096	M39	P	M-	1:256
M16a	D	M-	1:2048	M41	P	M-	1:512
M16b	D	M-	1:2048	M42	P	M-	1:256
M17	P	M-	1:2048	M43	P	M-	1:1024
M18	P	M-	1:256	M44	P	M-	1:4096
M19	P	M-	1:256	M46	P	M-	1:1024
M20	P	M-	1:256	M47	P	M-	1:512
M21	D	M-	1:256	M48	P	M-	1:4096
M22a	P	M-	1:2048	M51	P	M-	1:1024
M22b	P	M-	1:512	M52	P	M-	1:512

Tabla 4.11.- Resultado de EIA VIDAS y su correlación con IFI IgG e IgM
(continuación).

Código	VIDAS	IFI IgM	IFI IgG	Código	VIDAS	IFI IgM	IFI IgG
M23	D	M-	1:2048	M53	P	M+	1:2048
M24	D	M-	1:512	M54	P	M-	1:4096
M25a	P	M-	1:512	M57a	P	M+	1:1024
M25b	P	M-	1:2048	M57b	P	M-	1:1024
M26	P	M-	1:512	M58	P	M-	1:256
M27	D	M-	1:64	M59	P	M-	1:1024
M60	P	M-	1:512	M67	P	M-	1:256
M61	P	M-	1:512	M68	P	M-	1:1024
M63	P	M-	1:2048	M69	P	M-	1:2048
M64	P	M+	1:512	M70	P	M-	1:128
M65	P	M-	1:1024	M72	P	M-	1:512
M66	P	M-	1:512				

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** resultado dudoso; **M+:** IFI IgM positivo; **M-:** IFI IgM negativo.

Como se aprecia en la figura 4.7, el título más frecuente para IFI IgG fue 1:512, con 20 muestras representando el 29,4%. Para el resto de titulaciones, y en orden de frecuencia de mayor a menor encontramos: un título 1:1024 en 15 muestras (22%); un título 1:2048 en 12 muestras (17,6%); un título $\geq 1:256$ en 11 muestras (16,1%); un título de 1:4096 en 7 muestras (10,2%); y un título $\leq 1:256$ en 2 muestras (10,2%), siendo una única muestra la que presentó un título $\geq 1:4096$. Respecto a los resultados de IFI para IgM, encontramos 9 muestras con un resultado positivo (13,4%).

Entre las 14 muestras con resultado EIA VIDAS dudoso encontramos 3 con IFI IgM positiva (21,4%), mientras que entre las muestras con EIA VIDAS positivo detectamos la presencia de IgM mediante IFI en cinco muestras (9,2%) (figura 4.8).

En cuatro pacientes con mas de una muestra en dos años consecutivos (M11, M25, M30 y M32) se observó un aumento de titulación mediante IFI IgG de dos o tres diluciones respecto a la muestra anterior, manteniéndose el resultado previo de IFI IgM y EIA VIDAS.

Sólo en un paciente (M22) se produjo el descenso en el título de IFI IgG en una dilución, sin variar el resultado de la IFI IgM y VIDAS. Dos pacientes (M16 y M57) presentaron estabilidad en los resultados de sus muestras estudiadas en su titulación de IFI IgG y de EIA VIDAS, aunque el paciente M57 negativizó su resultado para la IFI IgM.

En los pacientes que repitieron muestra, los resultados de IFI IgM y enzimoimmunoanálisis, se mantuvieron sin variación a lo largo del periodo del estudio, excepto en M57.

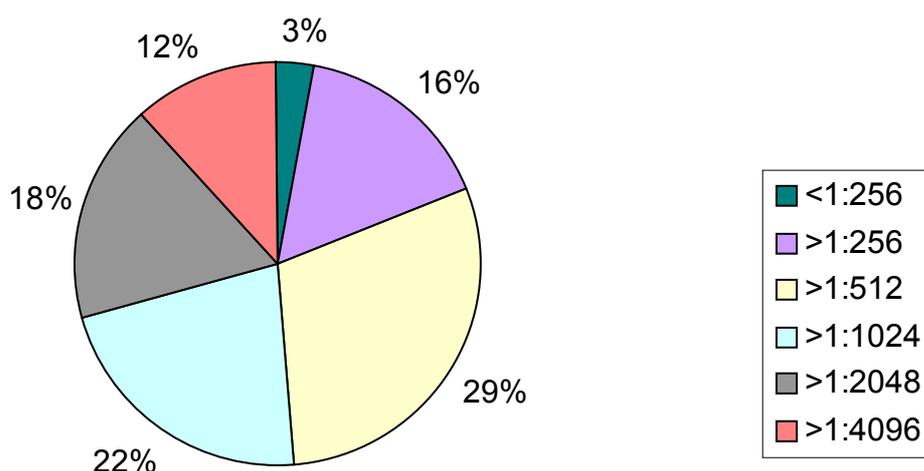


Figura 4.7.- Porcentaje de títulos de IFI IgG en las muestras seleccionadas.

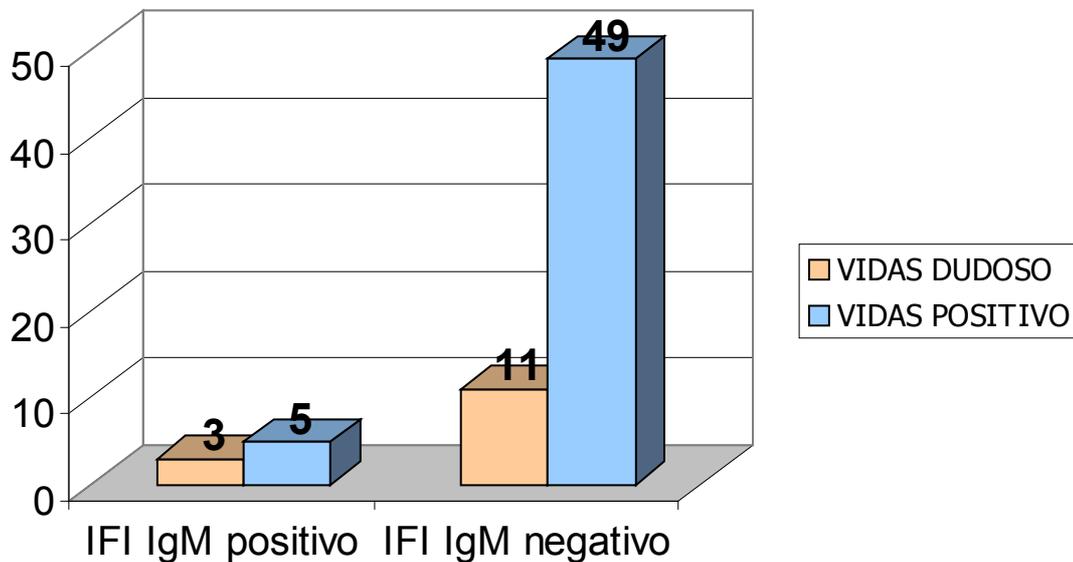


Figura 4.8.- Correlación EIA VIDAS positivo y dudoso con la inmunofluorescencia para *B. burgdorferi* IgM.

De las muestras con resultado de EIA VIDAS positivo, el título de IFI IgG mas frecuente fue similar al encontrado en el conjunto de muestras seleccionadas (1:512), siendo la distribución de frecuencias igual a la descrita previamente, no hallándose correlación entre títulos bajos con un resultado EIA VIDAS dudoso.

4.2.5.- Resultados mediante inmunotransferencia.

Para la confirmación de las muestras serológicamente reactivas, se utilizaron dos métodos de inmunotransferencia, empleando antígenos pertenecientes a las cepas de *B. burgdorferi* (B31) y *B. garinii* (genogrupo 2).

4.2.5.1.- Resultados de la inmunotransferencia con antígenos de *Borrelia burgdorferi*.

Como se refiere en el apartado 3.2.3.4 de material y métodos, la lectura e interpretación de los resultados mediante el método de MarDx Diagnostics para *B.*

burgdorferi consideró un resultado positivo en el Western blot para IgM la presencia de reactividad frente a 2 ó mas de las proteínas de 23, 39 y 41 kDa, y como resultado negativo una reactividad menor o distinta a la anteriormente establecida.

En la tabla 4.12, se muestran los resultados obtenidos en las 48 muestras analizadas frente a los antígenos contenidos en las membranas de inmunotransferencia.

Tabla 4.12.- Bandas reactivas e interpretación del Wb con antígenos de *B. burgdorferi* para IgM.

Código	Bandas	Resultado	Código	Bandas	Resultado
M2	93, 45D, 41D	N	M14	66D	N
M5	66D, 58D	N	M16a	93, 63, 45, 41D, 39, 23	P
M6	66D, 60D	N	M17	66, 58, 41D, 23	P
M8	93D, 66, 45D, 41D, 39D	P	M19	66, 58, 45D, 41D, 39D, 30D, 23	P
M9	60, 45, 41, 39, 23	P	M20	66D, 58D, 45D, 41, 39D, 31-30, 23D	P
M10	66, 58, 39	N	M21	SIN BANDAS	N
M11a	41, 39	P	M22a	66D, 23D	N
M11b	41, 39D, 23D	P	M22b	66, 23	N
M12	SIN BANDAS	N	M23	SIN BANDAS	N
M13	66, 58	N	M25b	31-30	N
M27	SIN BANDAS	N	M57b	60, 41, 34, 23	P
M28	SIN BANDAS	N	M59	93D, 41, 39D	P
M30a	58D, 45D, 41D	N	M60	SIN BANDAS	N
M30b	58, 37D, 23D	N	M61	93, 41, 23D	P
M32b	SIN BANDAS	N	M63	SIN BANDAS	N
M33	93, 66, 58, 23D, 18D	N	M64	SIN BANDAS	N

Tabla 4.12.- Bandas reactivas e interpretación del Wb con antígenos de *B. burgdorferi* para IgM (continuación).

Código	Bandas	Resultado	Código	Bandas	Resultado
M34	93, 66, 45, 34D	N	M65	SIN BANDAS	N
M44	45, 23D	N	M66	SIN BANDAS	N
M46	93, 45D, 41	N	M67	60D, 45D, 41D, 34, 30	N
M47	SIN BANDAS	N	M68	41D, 39D, 23D	P
M48	66, 58, 45D, 41, 34D	N	M69	41D	N
M51	SIN BANDAS	N	M70	SIN BANDAS	N
M53	66, 58, 23	N	M72	SIN BANDAS	N
M57a	SIN BANDAS	N			

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** intensidad débil.

Fueron 11 muestras (22,9%; 11 pacientes) de las 48 analizadas las que resultaron positivas siguiendo los criterios interpretativos del laboratorio.

El resultado que se produjo con mas frecuencia entre las muestras negativas, fue la presencia de reactividad en 19 muestras (54,2%) frente a la proteína de 66 kDa (en 11 muestras; 31,4%); frente a las proteínas de 41 kDa y 23 kDa (en 6 muestras; 17,1%). La ausencia de bandas reactivas se observó (en 16 muestras; 45,7%).

Los resultados positivos y negativos para IgM mediante inmunotransferencia frente a *B. burgdorferi*, se muestran en las figuras 4.9, y 4.10 respectivamente.

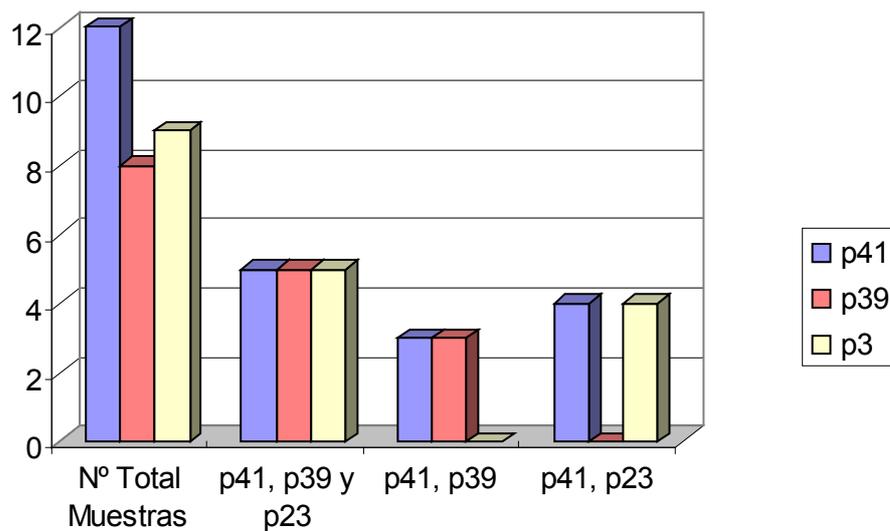


Figura 4.9.- Resultados de la inmunotransferencia con resultado positivo para la IgM de *B. burgdorferi*.

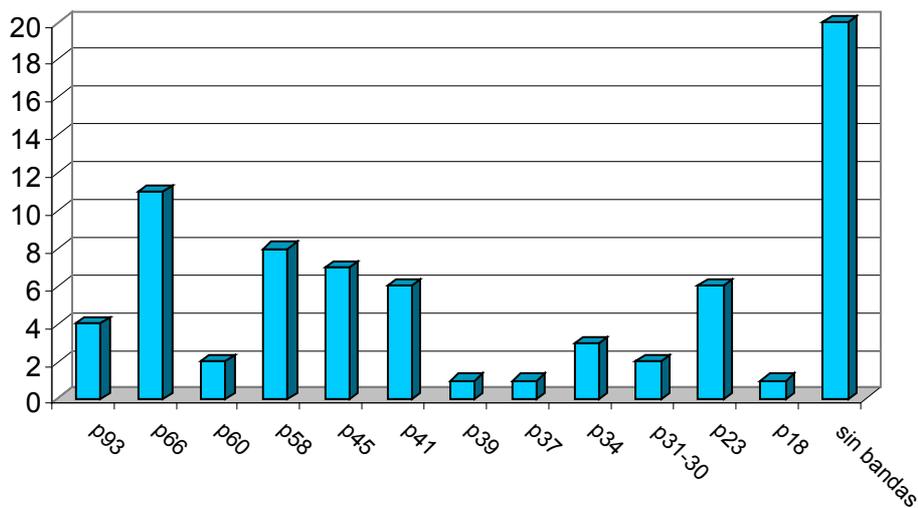


Figura 4.10.- Distribución de bandas observadas en las muestras con resultado negativo mediante Wb para IgM frente a *B. burgdorferi*.

En la figura 4.11. se muestra el resultado obtenido con algunas de las muestras analizadas para estudio de reactividad de anticuerpos de clase IgM frente a antígenos de *B. burgdorferi*. Como se observa, los sueros revelaron una diversidad de bandas de alto y bajo peso molecular, con intensidad variable, siendo lo más frecuente una

intensidad igual o menor a la observada en los sueros de control suministrados por el laboratorio fabricante.

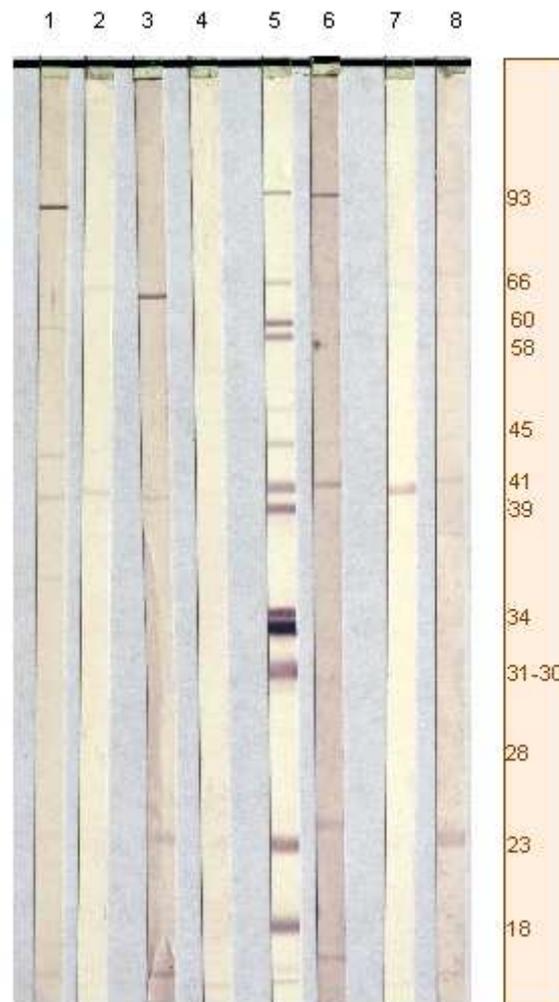


Figura 4.11.- Wb para IgM frente a *B. burgdorferi*. Bandas 2 y 7: sueros negativos; Banda 4: suero control negativo; Banda 5: control positivo alto; Banda 6: control positivo bajo; Bandas 1, 3 y 8: sueros positivos. Se indica el tamaño molecular de las banda en kDa.

De igual manera, fueron analizadas 49 muestras mediante la prueba confirmatoria para detección de anticuerpos IgG frente a antígenos de *B. burgdorferi* cuyos resultados se muestran en la tabla 4.13.

Tabla 4.13.-. Bandas reactivas e interpretación del Wb con antígenos de *B. burgdorferi* para IgG.

Código	Bandas	Resultado	Código	Bandas	Resultado
M2	93, 45	N	M23	41D, 39D, 34D	N
M5	66D, 45D, 41	N	M25b	45, 41	N
M6	41	N	M26	31-30	N
M8	58, 45D, 41, 23	N	M27	41, 39, 31-30, 23	N
M9	66D, 58D, 41D	N	M28	93D, 60D, 39	N
M10	45D, 41, 34	N	M30a	58, 45, 41N	N
M11a	66D, 45, 41	N	M30b	60,58,45D,41	N
M11b	66D, 45, 41	N	M32b	60, 58, 45D, 41	N
M12	SIN BANDAS	N	M33	45, 41	N
M14	45, 41, 34D, 31-30D	N	M34	66, 60, 45, 28	N
M16a	45, 41, 39D	N	M35	58D, 45, 41	N
M17	45, 41	N	M44	45, 41	N
M18	31-30	N	M47	45, 41, 39, 31-30D	N
M19	93, 66, 45, 41	N	M48	66D, 45D, 41D	N
M20	41, 31-30	N	M51	SIN BANDAS	N
M21	SIN BANDAS	N	M53	45, 41	N
M22a	45, 41, 34, 31-30D	N	M57a	58, 41D, 31-30D	N
M22b	66, 45, 41D	N	M57b	58, 41, 34D, 31-30D	N
M58	SIN BANDAS	N	M61	SIN BANDAS	N
M59	SIN BANDAS	N	M63	SIN BANDAS	N
M60	SIN BANDAS	N	M64	41D, 39, 23D	N
M66	SIN BANDAS	N	M69	41D, 34, 18	N
M67	SIN BANDAS	N	M70	41, 28	N
M68	41D	N	M72	45, 41, 34D, 23D	N
M65	41	N			

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** intensidad débil.

La muestra M32a no pudo estudiarse por ausencia de volumen suficiente, ya que se utilizó en el laboratorio para la determinación de otras pruebas diagnósticas previas (serológicas y bioquímicas). De las 49 muestras analizadas, ninguna resultó positiva según los criterios expresados por el laboratorio (presencia de 5 bandas de entre las bandas con peso molecular de 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 93 kDa).

Independientemente de la interpretación referida, al analizar los resultados obtenidos observamos que la reactividad frente a diversas bandas específicas en 39 muestras: una reactividad frente a cuatro bandas se produjo en 10 muestras (20,4%); con la presencia de tres bandas de forma simultánea tuvimos 16 muestras (32,6%); la presencia de reactividad frente a dos bandas en 8 muestras (16,3%); frente a una banda sólo se dio en una muestra (10,2%). En 10 muestras no hubo presencia de reactividad frente a ninguna banda (20,4%). Estos resultados se muestran en la figura 4.12.

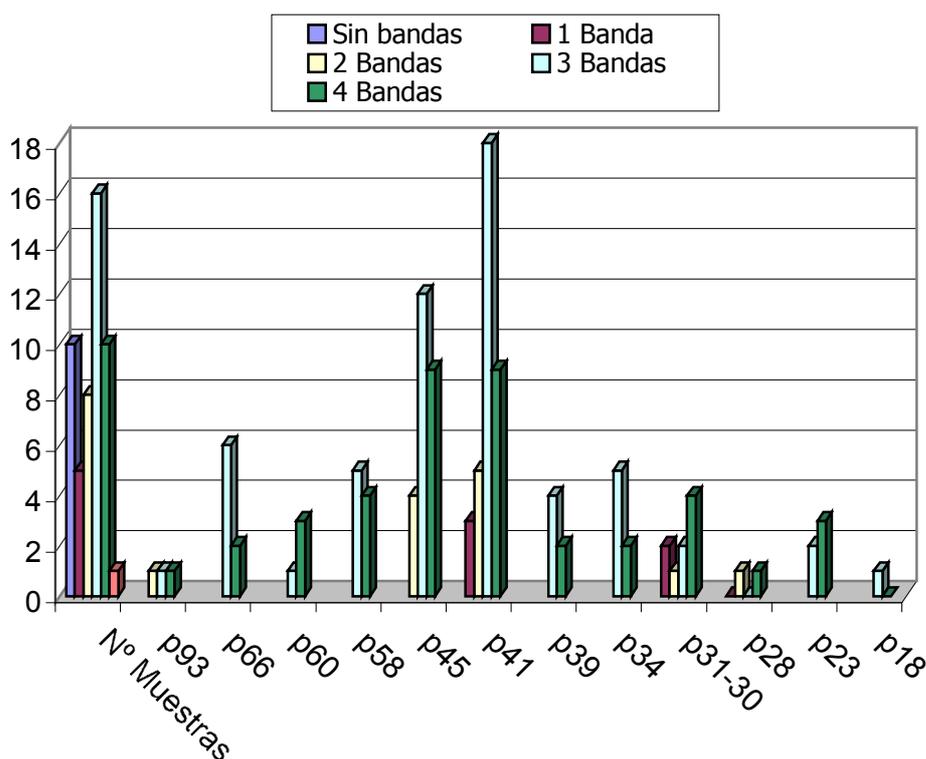


Figura 4.12.- Distribución de bandas reactivas en la inmunotransferencia para *B. burgdorferi* IgG.

Del mismo modo, fueron analizados los resultados considerando la reactividad frente a proteínas específicas. Así, la reactividad frente a la proteína de 41 kDa fue la

mas frecuentemente encontrada (35 muestras) seguido de una reactividad frente a la proteína de 45 kDa (25 muestras). Se observó reconocimiento de las proteínas de 31-30 y 58 kDa, en nueve muestras respectivamente, así como de la bandas de 66 kDa en ocho muestras.

Por último, las proteínas reveladas con menor frecuencia fueron las de 34 kDa en siete muestras; 39 kDa en seis muestras; 23 kDa en cinco; de 60 kDa en cuatro; 93 kDa en tres muestras; de 28 kDa en dos y frente a la banda de 18 kDa en una única muestra (figura 4.13). En la figura 4.14, se presenta el resultado obtenido con los ensayos realizados en algunas de las muestras séricas analizadas.

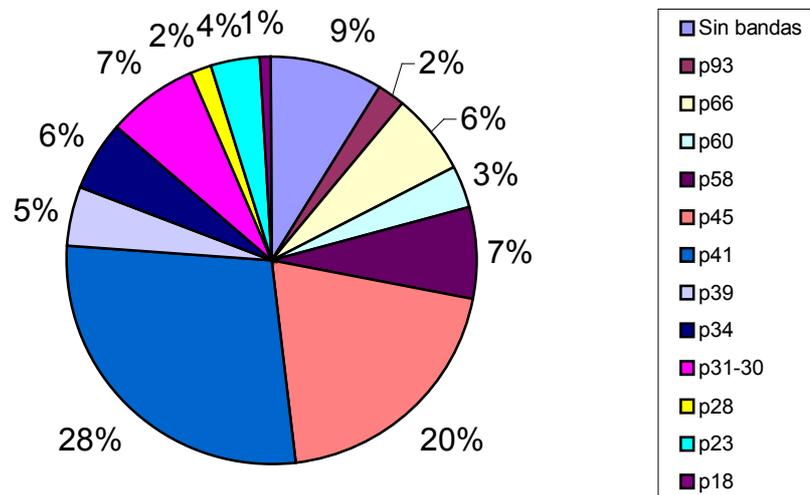


Figura 4.13.- Frecuencia de reactividad frente a las proteínas de *B. burgdorferi* por anticuerpos IgG.

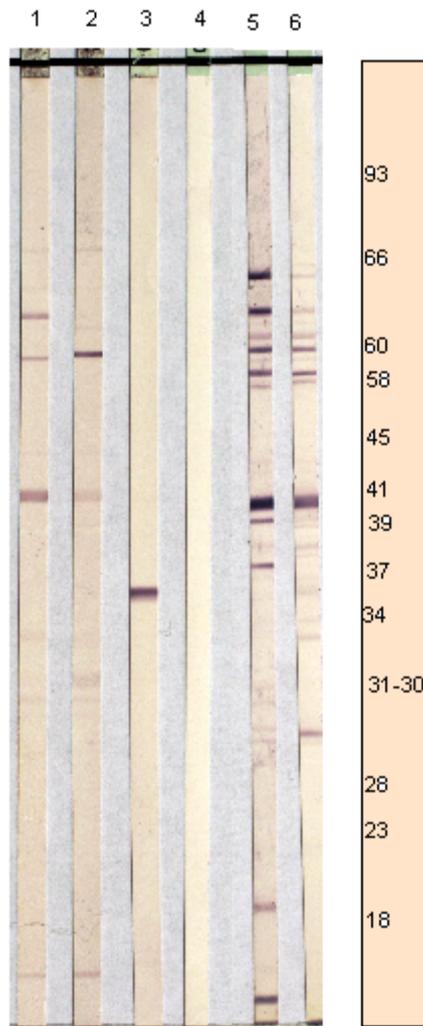


Figura 4.14 .- Wb para IgG frente a *B. burgdorferi*. Bandas 1 a 3: sueros negativos; Banda 4: control negativo; Banda 5: control positivo alto; Banda 6: control positivo bajo. Se indica el tamaño molecular de las bandas en kDa.

4.2.5.2.- Resultados de la inmunotransferencia para *Borrelia garinii*.

Los criterios de interpretación para considerar un resultado positivo en la inmunotransferencia para la IgM en el método de Gull laboratories, fue la presencia de reactividad frente a una o más proteínas de 23 y 39 kDa, siendo para la inmunotransferencia de *B. garinii* IgG, la presencia de reactividad frente a 4 ó más de las proteínas de 21, 23, 37, 39, 41 y 93 kDa. Se consideró como resultado negativo,

tanto para IgM como para IgG, una reactividad menor o distinta de la anteriormente establecida. En la tabla 4.14. se muestran los resultados obtenidos en los 38 sueros para detección de IgM específica.

Sólo 3 de las muestras analizadas resultaron positivas (7,8%) según los criterios descritos, mientras que en 29 de los sueros con resultado negativo se observó una completa ausencia de reactividad frente a las bandas de la membrana, representando un 76,3%.

Tabla 4.14.- Resultados de la inmunotransferencia de *B. garinii* para IgM.

Muestra	Bandas	Resultado	Muestra	Bandas	Resultado
M1	SIN BANDAS	N	M46	SIN BANDAS	N
M4	SIN BANDAS	N	M48	SIN BANDAS	N
M9	SIN BANDAS	N	M52	SIN BANDAS	N
M12	SIN BANDAS	N	M53	SIN BANDAS	N
M16b	SIN BANDAS	N	M54	SIN BANDAS	N
M17	SIN BANDAS	N	M57b	SIN BANDAS	N
M18	SIN BANDAS	N	M58	SIN BANDAS	N
M24	SIN BANDAS	N	M60	37	N
M26	58	N	M61	93, 41, 23	P
M27	58	N	M63	SIN BANDAS	N
M29	SIN BANDAS	N	M64	SIN BANDAS	N
M30b	60D	N	M65	SIN BANDAS	N
M33	SIN BANDAS	N	M66	SIN BANDAS	N
M36	SIN BANDAS	N	M67	60D, 45D, 41D, 34, 30	N
M37	SIN BANDAS	N	M68	41D, 39D, 23	P
M38	SIN BANDAS	N	M69	41D	N
M39	SIN BANDAS	N	M70	SIN BANDAS	N
M41	39D	P	M72	SIN BANDAS	N
M42	SIN BANDAS	N			
M43	SIN BANDAS	N			

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** intensidad débil en la reactividad.

Mediante inmunotransferencia de *B. garinii* para IgG, analizadas un total de 45 uestras, únicamente en 6 de ellas (13,3%) se determinó un resultado positivo.

De las muestras positivas, seis presentaron reactividad frente a los antígenos de 41 kDa; cinco muestras frente a 45; cuatro frente a la proteína 37 y 39 kDa respectivamente; tres con reactividad frente a 93, 75, 60, 58, 32, 31-30 y 23 kDa; dos para la proteína de 21; y la reactividad frente a 28 kDa , se produjo tan sólo en una muestra. De las muestras analizadas para los anticuerpos de clase IgG, los resultados se muestran en la tabla 4.15.

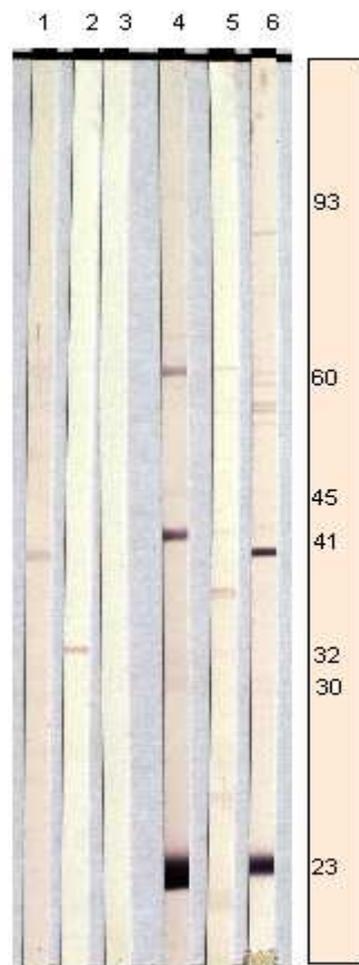


Figura 4.15.- Wb para IgM frente a *B. garinii* . Bandas 1 y 2: sueros negativos; Banda 3: control negativo; Banda 4: control positivo; Bandas 6 y 7: sueros positivos. Se indica el tamaño molecular de las bandas en kDa.

En las figura 4.15 y 4.16, se muestran ejemplos de los ensayos de inmunotransferencia realizados con membranas conteniendo antígenos de *B. garinii*, tanto para anticuerpos de clase IgM como de clase IgG.

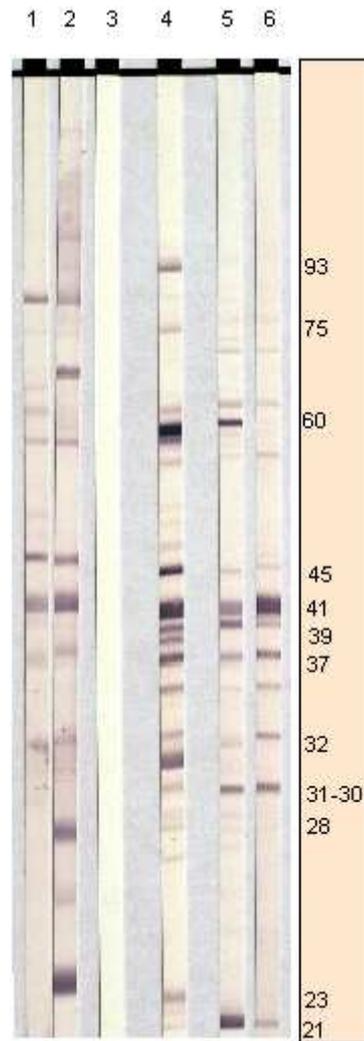


Figura 4.16.- Wb para IgG frente a *B. garinii*. Bandas 1 a 2: sueros negativos; Banda 3: control negativo; Banda 4: control positivo; Bandas 5 y 6: sueros positivos. Se indica el tamaño molecular de las bandas en kDa.

Tabla 4.15- Resultado de la inmunotransferencia de *B. garinii* para IgG.

Código	Bandas	Resultado	Código	Bandas	Resultado
M1	93, 75, 58, 45, 41D, 37D	P	M25b	SIN BANDAS	N
M4	93D, 75D, 58D, 41, 39, 37	P	M27	SIN BANDAS	N
M5	75D, 60, 58, 45, 41, 39D, 37D, 32, 21	P	M28	41, 30, 28, 23	N
M8	58, 41D, 32D	N	M29	75, 60D, 45, 41, 37D, 32D	N
M9	60D, 58D, 31- 30D, 23, 21	N	M30b	66, 58	N
M10	45D, 32	N	M32b	SIN BANDAS	N
M11a	SIN BANDAS	N	M35	58, 41D, 28, 23	N
M11b	60D	N	M36	60D, 30D	N
M14	75, 32	N	M37	75, 39D	N
M16b	58D	N	M38	SIN BANDAS	N
M18	58D, 45D, 41D, 37D, 23D, 21D	P	M39	60D, 45D, 41, 39, 37, 32	P
M19	SIN BANDAS	N	M41	58D	N
M20	58, 45	N	M42	93, 75D, 30D	N
M21	SIN BANDAS	N	M43	75D, 60, 58, 41, 32, 30D	N
M22a	93, 75, 58, 45, 32	N	M44	75, 41D, 37D, 28D, 23	N
M23	SIN BANDAS	N	M46	93, 75, 30	N
M24	SIN BANDAS	N	M47	SIN BANDAS	N

Tabla 4.15- Resultado de la inmunotransferencia de *B. garinii* para IgG (continuación).

Código	Bandas	Resultado	Código	Bandas	Resultado
M48	SIN BANDAS	N	M61	93D, 23	N
M51	66, 58D	N	M65	66D, 58	N
M52	93D, 75, 45, 41, 32D	N	M66	66, 58	N
M54	58	N	M68	75D, 58D	N
M57	75, 66, 58, 45	N	M69	60, 45D, 41, 39, 37D, 32, 28D, 23	P
M58	93D, 75D, 66, 60D	N	M72	66, 58	N

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** intensidad débil en la reactividad.

De las 39 muestras con resultado negativo, en diez no se observó reactividad frente a ninguna banda específica, encontrando en el resto un número variable entre 1 y 6 bandas. El resultado mas frecuente entre las muestras negativas fue la reactividad para bandas de 58 kDa con 12 muestras; 75 kDa en 10 muestras; 7 para la proteína 41 kDa; cinco muestras para 60, 45 y 32 kDa; cuatro para las bandas 93 y 23 kDa; tres para 66, 32 y 28 kDa; dos para 39 y 37 kDa y una única muestra reactiva frente a 23 kDa. Observando la reactividad del conjunto de muestras positivas y negativas, determinamos que las bandas proteicas mas frecuentemente reveladas fueron las de 58, 75 y 41 kDa, siendo estas bandas mas comunes en las muestras consideradas como positivas y negativas.

4.2.5.3.- Resultados serológicos en el grupo control.

En el grupo control, formado a partir de donantes de sangre sanos del Centro de Transfusión de La Comunidad Valenciana, obtuvimos mediante el sistema EIA VIDAS un 5% de resultados indeterminados o dudosos, siendo el resto de muestras negativas. Mediante la IFI de clase IgM todos los sueros de la población control resultaron negativos, y en dicha prueba para anticuerpos de clase IgG la mayoría

fueron igualmente negativos, existiendo un reducido número de muestras (15%) con una reactividad inferior al punto de corte, siendo en nuestro estudio del 10,2%. Respecto a los resultados de la inmunotransferencia IgM para antígenos de *B. burgdorferi*, se observó un resultado globalmente negativo, con presencia de diferentes bandas reactivas en todas las muestras analizadas. De ellas, las más frecuentes fueron 30-31 kDa (85,7%); de 48 y 41 kDa (82,7%) y de 62 kDa (71,4%). Separadamente, las bandas de 39 y 23 kDa, necesarias para una interpretación positiva de la prueba, estaban presentes en el 14,2% de las muestras, bien como banda única o junto a otras bandas no específicas para IgM. Del mismo modo, la prueba de inmunotransferencia para IgG mostró un resultado uniformemente negativo, existiendo presencia de bandas en el 94,4% de los sueros analizados. Las bandas más frecuentes fueron las de 39 kDa (64,7%) y 31-30 kDa (47%) (figura 4.17).

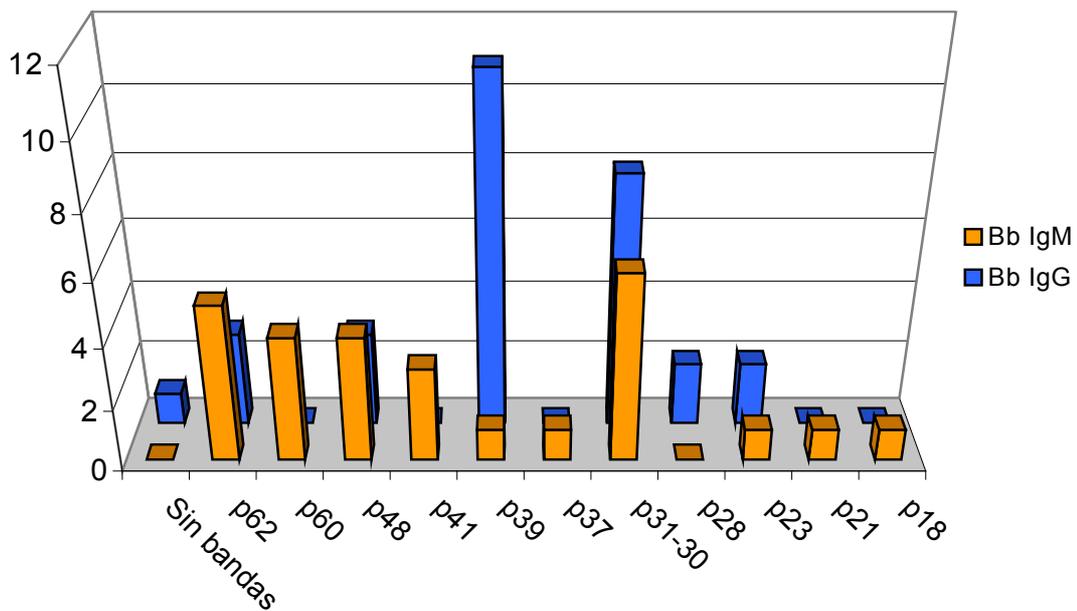


Figura 4.17.- Distribución de bandas reactivas para inmunotransferencia IgM e IgG con antígenos de *B. burgdorferi* en sueros de controles sanos

4.2.5.4.- Comparación de los resultados de la inmunotransferencia para *B. burgdorferi* y *B. garinii*.

Con el fin de conocer la variabilidad de resultados asociados a la aplicación de dos métodos diferentes de inmunotransferencia, analizamos la reactividad de 15

muestras con ambos métodos, incluyendo muestras con resultado positivo y negativo con *B. burgdorferi*. En la tabla 4.16 y 4.17 se muestran los resultados obtenidos para IgM e IgG con cada una de los sueros estudiados. En tres muestras (M12, M65 y M66) encontramos una concordancia en ambos métodos ya que resultaron negativas con ausencia de cualquier banda específica. En 3 de las 5 muestras que resultaron positivas para *B. burgdorferi* (M9, M16a y M17) encontramos ausencia de bandas mediante inmunotransferencia para *B. garinii*, y en 2 muestras positivas mediante el primer método (M61 y M68) se confirmó un resultado positivo en el Wb de *B. garinii*. Entre las muestras con resultado negativo, encontramos 5 de ellas (M33, M46, M48, M53, M57b) con presencia de bandas mediante *B. burgdorferi* y ausencia de bandas específicas mediante *B. garinii*. En una muestra (M27) hallamos la situación inversa, pues existió reconocimiento de una banda de 58 kDa mediante la inmunotransferencia de *B. garinii* y ausencia de bandas con *B. burgdorferi*. En una muestra con resultado negativo encontramos reactividad frente a proteínas diferentes (M30b).

Tabla 4.16.- Resultados de las muestras analizadas mediante ambos métodos de inmunotransferencia para IgM.

Código	Bandas <i>B. burgdorferi</i>	Resultado
	Bandas <i>B. garinii</i>	
M9	60, 45, 41, 39, 23	P
	SIN BANDAS	N
M12	SIN BANDAS	N
	SIN BANDAS	N
M16a	93, 63, 45, 41D, 39, 23	P
	SIN BANDAS	N
M17	66, 58, 41D, 23	P
	SIN BANDAS	N
M27	SIN BANDAS	N
	58	N
M30b	58,37D,23D	N
	60D	N
M33	93, 66, 58, 23D, 18D	N
	SIN BANDAS	N

Tabla 4.16.- Resultados de las muestras analizadas mediante ambos métodos de inmunotransferencia para IgM (continuación).

Código	Bandas <i>B. burgdorferi</i>	Resultado
	Bandas <i>B. garinii</i>	
M46	93, 45, 41	N
	SIN BANDAS	N
M48	66, 58, 45D, 41, 34D	N
	SIN BANDAS	N
M53	66, 58, 23	N
	SIN BANDAS	N
M57b	60, 41, 34	N
	SIN BANDAS	N
M61	93D, 41D, 23	P
	93D, 41D, 23	P
M65	SIN BANDAS	N
	SIN BANDAS	N
M66	SIN BANDAS	N
	SIN BANDAS	N
M68	41D, 39D, 23D	P
	41D, 39D, 23	P

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** intensidad débil.

Las asociaciones más frecuentes con ambos métodos, fueron la presencia de bandas reactivas para *B. burgdorferi* con resultado positivo y ausencia de éstas para *B. garinii*, y presencia de bandas para *B. burgdorferi* pero con resultado negativo y ausencia de bandas para *B. garinii* (figura 4.18).

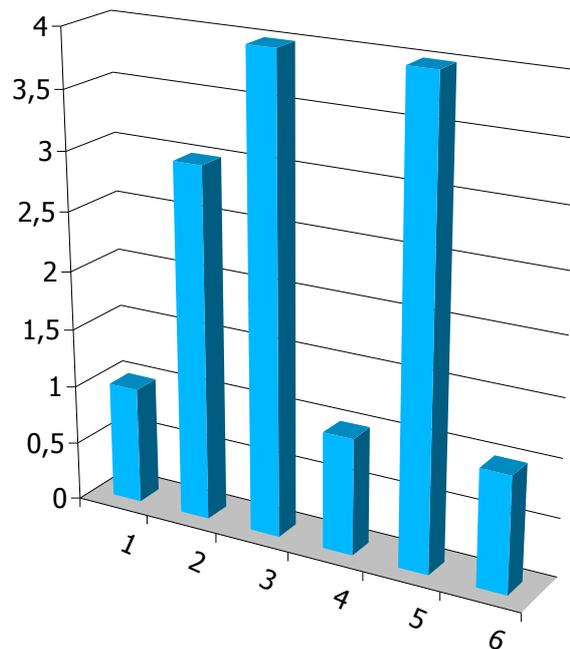


Figura 4.18.- Resultados de la inmunotransferencia de *B. burgdorferi* y *B. garinii* para IgM: 1.-Wb IgM *Bb.* sin bandas y *Bg.* con bandas; 2.-Wb IgM *Bb.* sin bandas y *Bg.* sin bandas; 3.-Wb IgM *Bb.* con bandas y *Bg.* sin bandas; 4.-Wb IgM *Bb.* con bandas y *Bg.* con bandas; 5.-Wb IgM *Bb.* positivo y *Bg.* sin bandas; 6.-Wb IgM *Bb.* positivo y *Bg.* sin bandas.

Sólo en 4 muestras (M61 y M68), se demostró correlación con ambos métodos, presentando reactividad frente a las mismas bandas de 41, 39 y 23 kDa, siendo positivo en ambos. En 4 muestras negativas se demostró reactividad frente a alguna banda con *B. burgdorferi* y ausencia de bandas con *B. garinii*, lo que sugiere una mayor sensibilidad para *B. burgdorferi*. Respecto a similar análisis comparado de resultados de la inmunotransferencia para anticuerpos de clase IgG, observamos que el hallazgo mas frecuente en las 26 muestras analizadas con ambos métodos fue un resultado negativo. Existió presencia de bandas en ambos métodos en 16 muestras, mientras que en 7 de ellas no se revelaron bandas para los antígenos de *B. garinii* pero si frente a los antígenos de *B. burgdorferi*. En 4 muestras se determinó un resultado positivo frente a *B. garinii* siendo negativas frente a *B. burgdorferi* (tabla 4.17).

Tabla 4.17 .- Resultados de muestras analizadas mediante ambos métodos de IgG.

Código	Bandas <i>B. burgdorferi</i>	Resultado
	Bandas <i>B. garinii</i>	
M5	66D, 45D, 41	N
	75D, 60, 58, 45, 41, 39D, 37D, 32, 21	P
M8	58, 45, 41, 23	N
	58, 41D, 32D	N
M9	66D, 58D, 41D	N
	60D, 58D, 31-30D, 23, 21	N
M10	45D, 41, 34	N
	45D, 32	N
M14	45D, 41, 34D, 31-30D	N
	75, 32	N
M11a	66D, 45,41	N
	SIN BANDAS	N
M11b	66D, 45,41	N
	60D	N
M18	31-30	N
	58D, 45D, 41D, 37D, 23D, 21D	P
M19	93, 66, 45, 41	N
	SIN BANDAS	N
M20	41, 31-30,	N
	58, 45	N
M21	SIN BANDAS	N
	SIN BANDAS	N
M22a	45, 41, 34, 31-30D	N
	93D, 75, 58D, 45, 32	N
M25b	45, 41	N
	SIN BANDAS	N
M27	41, 39, 31-30, 23	N

Tabla 4.17 .- Resultados de muestras analizadas mediante ambos métodos de gG (continuación).

Código	Bandas <i>B. burgdorferi</i>	Resultado
	Bandas <i>B. garinii</i>	
	SIN BANDAS	N
M28	93D, 60D, 39	N
	41, 30, 28D, 23	N
M32b	60, 58D, 45D, 41D	N
	SIN BANDAS	N
M35	58D, 45D, 41D	N
	58, 41D, 28, 23	N
M44	45, 41	N
	75, 41D, 37D, 32, 31-30 28D, 23	P
M47	45, 41, 39, 31-30D	N
	SIN BANDAS	N
M48	66D, 45D, 41	N
	SIN BANDAS	N
M51	SIN BANDAS	N
	66, 58	N
M57	58, 41D, 31-30	N
	75, 66, 58, 45	N
M61	SIN BANDAS	N
	93D, 23	N
M69	41D, 34, 18	N
	60, 45D, 41, 39, 37D, 32, 28D, 23	P
M72	45, 41, 34D, 23D	N
	66, 58	N

P: resultado positivo; **N:** resultado negativo; **D:** intensidad débil.

4.2.5.5.- Correlación entre los resultados de enzimoimmunoanálisis e inmunotransferencia.

Respecto a la correlación de los resultados obtenidos mediante los métodos empleados, encontramos que de las 9 muestras con un resultado dudoso EIA VIDAS, en 2 se determinó reactividad positiva mediante la inmunotransferencia de *B. burgdorferi* para IgM. En 4 de ellas no existió reactividad frente a ninguna de las bandas antigénicas y 3 muestras reconocieron alguna de las bandas contenidas en la tira de nitrocelulosa pero sin corresponderse a bandas específicas. Mediante el ensayo de Wb de *B. garinii* para IgM, encontramos que todas las muestras con resultado de VIDAS dudoso fueron negativas, mayoritariamente sin reactividad frente a ninguna de las bandas (tabla 4.18). En la tabla 4.19, se muestra el resultado obtenido con cada uno de los métodos empleados en el estudio.

Tabla 4.18.- Correlación de resultados mediante VIDAS y Wb IgM.

Resultado Wb IgM	VIDAS positivo	VIDAS dudoso
<i>B. burgdorferi</i> positivo	9	2
<i>B. burgdorferi</i> negativo con bandas	16	3
<i>B. burgdorferi</i> negativo sin bandas	12	4
<i>B. garinii</i> positivo	3	0
<i>B. garinii</i> negativo con bandas	5	1
<i>B. garinii</i> negativo sin bandas	23	6

Respecto a la correlación entre el método EIA VIDAS y la inmunotransferencia para IgG, encontramos que el 100% de las muestras analizadas con los antígenos de *B. burgdorferi* resultaron negativas, según los criterios del método comercial, de forma independiente al resultado previo de EIA VIDAS positivo o dudoso. Para la inmunotransferencia IgG con los antígenos de *B. garinii*, en las 9 muestras analizadas mediante Wb y con un resultado previo de EIA VIDAS dudoso, en el 77% obtuvimos un resultado negativo, mientras que con un resultado EIA VIDAS positivo el 82% de las muestras fueron negativas mediante inmunotransferencia

Tabla 4.19.- Correlación de resultados mediante VIDAS y Wb IgG.

Resultado Wb IgG	VIDAS positivo	VIDAS dudoso
<i>B. burgdorferi</i> positivo	0	0
<i>B. burgdorferi</i> negativo	41	8
<i>B. garinii</i> positivo	4	2
<i>B. garinii</i> negativo	31	8

En la figura 4.19 y 4.20, se muestra la distribución de bandas observadas en la inmunotransferencia *B. burgdorferi* y *B. garinii* IgG, en las muestras con resultado de EIA VIDAS positivo y dudoso..

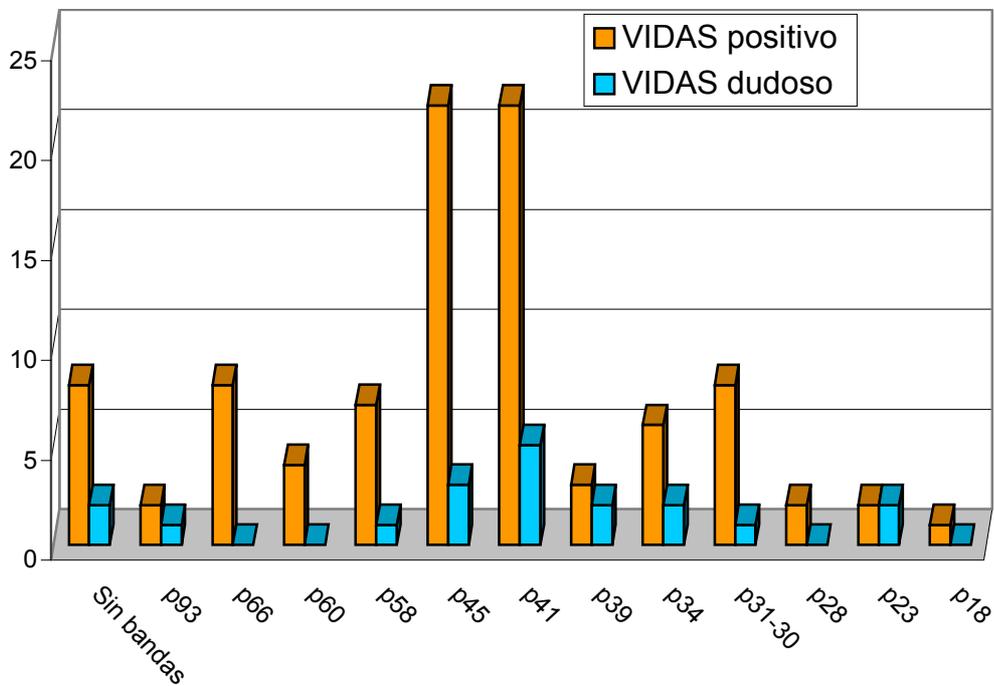


Figura 4.19.- Correlación EIA VIDAS positivo y dudoso con la inmunotransferencia para *B. burgdorferi* IgG.

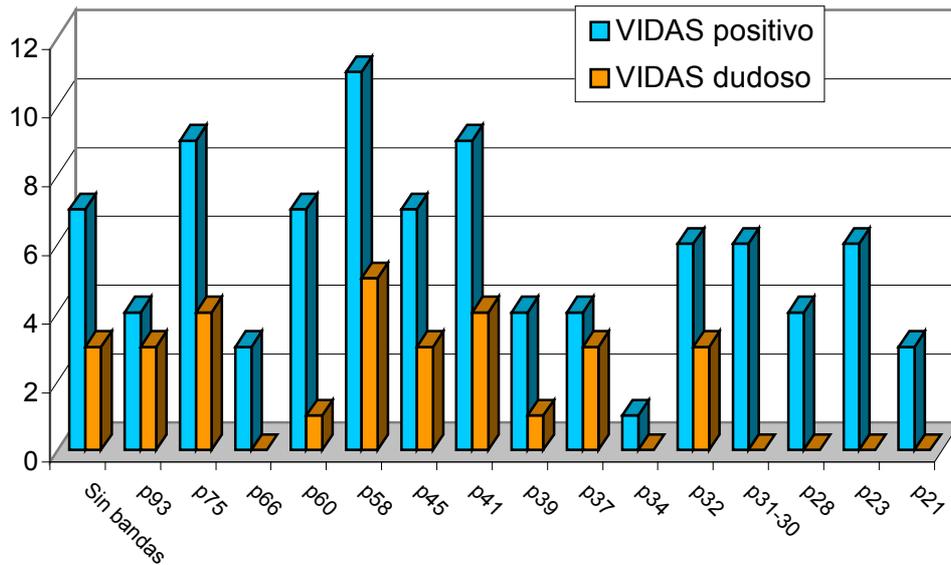


Figura 4.20.- Correlación VIDAS positivo y dudoso con la inmunotransferencia para *B. garinii* IgG.

4.2.5.6.- Correlación entre los resultados de la inmunofluorescencia e inmunotransferencia.

Respecto a la correlación de los resultados obtenidos mediante los métodos de inmunotransferencia (Wb) y la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), encontramos que de las 9 muestras que resultaron positivas mediante IFI IgM 6, fueron analizadas mediante la prueba confirmatoria con los antígenos de *B. burgdorferi* resultando sólo una positiva (M9) mientras que 3 muestras mediante los antígenos de *B. garinii* resultan negativas.

El suero M53 con resultado IFI IgM positivo fue evaluado mediante Wb frente a ambos microorganismos, resultando negativo en los dos casos, si bien presentó reactividad frente a bandas antigénicas no específicas de *B. burgdorferi* y sin bandas para *B. garinii*.

De las 42 muestras con resultado negativo mediante IFI IgM, 11 de ellas resultaron positivas mediante Wb de *B. burgdorferi* mientras que de las 26 muestras con resultado IFI IgM negativo que fueron analizadas utilizando los antígenos de *B. Garinii*, sólo en 4 sueros se observó un resultado positivo (15,3%).

Para las muestras con resultado negativo en ambas pruebas, el resultado más frecuente fue la presencia de bandas reactivas (en 17 muestras) revelando las proteínas de 66, 58, 45, 41 y 23 kDa, mientras que en 14 muestras se determinó ausencia de reactividad. Cuando se utilizaron antígenos de *B. garinii*, el resultado más frecuente entre las 22 muestras con resultado de IFI IgM negativo, fue la ausencia de reactividad (14 muestras). Entre las 6 muestras que resultaron positivas mediante la prueba de IFI IgM, la reactividad para *B. burgdorferi* frente a la banda de 66 kDa fue el resultado más frecuente (50%) seguido por las proteínas de 60, 58 y 23 kDa. Mediante el método de Wb con los antígenos de *B. garinii*, el resultado más frecuente fue la ausencia de bandas en el 100% de las muestras positivas mediante IFI IgM. Todas las muestras analizadas mediante el Western blot IgG con antígenos de *Borrelia burgdorferi* resultaron negativas, tanto si fueron IFI positivas o con un título menor al punto de corte. Sólo la muestra M70 resultó negativa mediante ambos métodos. La correlación entre la prueba de IFI IgG y Wb empleando antígenos de *B. burgdorferi* se muestra en la tabla 4.20.

Tabla 4.20.- Correlación entre los resultados para anticuerpos IgG mediante IFI y Wb *B. burgdorferi*.

título IFI	bandas antigénicas (kDa) de <i>B. burgdorferi</i>													
	sin bandas	93	66	60	58	45	41	39	37	34	31-30	28	23	18
<1:256	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0
≥1:256	3	0	1	0	0	2	3	0	0	1	2	0	2	0
≥1:512	4	4	3	1	0	6	5	1	0	1	1	1	3	1
≥1:1024	2	3	0	2	4	2	7	1	0	1	2	0	2	0
≥1:2048	1	1	2	0	1	6	9	2	0	3	1	0	5	0
≥1:4096	0	0	2	0	3	6	6	0	0	1	1	0	3	0

Para los antígenos de *Borrelia garinii*, en las 6 muestras que resultaron positivas el título de la IFI IgG se mantuvo en valores bajos en 3 de ellas (M4 título 1:512; M18 título 1:256; M39 título 1:256) mientras que en otros 3 su título fue mayor o igual a 1:1024 (M1 título 1:1024; M69 título 1:2048) (tabla 4.21).

Tabla 4.21.- Correlación entre los resultados para anticuerpos IgG mediante IFI y Wb *B. garinii*.

título IFI	bandas antigénicas (kDa) de <i>B. garinii</i>															
	sin bandas	93	75	66	60	58	45	41	39	37	34	32	31-30	28	23	18
<1/256	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
≥1/256	2	2	2	2	2	2	4	2	1	1	1	2	2	1	1	0
≥1/512	4	3	2	1	0	3	1	2	1	1	0	1	0	1	0	0
≥1/1024	2	1	6	3	2	7	3	5	1	2	0	3	3	1	1	0
≥1/2048	2	1	2	0	4	4	3	2	2	2	0	3	2	1	2	0
≥1/4096	1	0	2	1	1	3	0	2	0	1	0	1	0	2	2	0

4.3. Análisis de variables clínicas.

4.3.1.- Descripción de los pacientes de estudio

De los 72 pacientes seleccionados por su resultado serológico mediante EIA VIDAS, 12 (16,6%) fueron retirados del estudio por presentar positividad en las pruebas frente a sífilis; otros 2 pacientes (2,7%) por presentar reactividad frente a VEB, uno de los cuales también había presentado un resultado lues positivos; y 4 pacientes más en los que se desconocía la edad y el servicio de procedencia. Así finalmente, la población estudiada quedó constituida por 56 pacientes. Respecto al servicio de origen de los mismos, el grupo mas numeroso procedió de Neurología con 39 pacientes, seguido de Medicina Interna y Dermatología con 8 y 6 pacientes respectivamente, y sólo 2 pacientes procedieron de Otorrinolaringología y uno del servicio de Psiquiatría (figura 4.21). Esta población se distribuyó en 24 mujeres y 31 hombres, por lo que se estableció un ligero predominio en el varón (57,1%) con respecto a la mujer (42,8%). Del mismo modo, de todos los servicios médicos se remitió un mayor número de pacientes varones excepto en el caso de Dermatología que fueron 4 mujeres frente a dos varones.

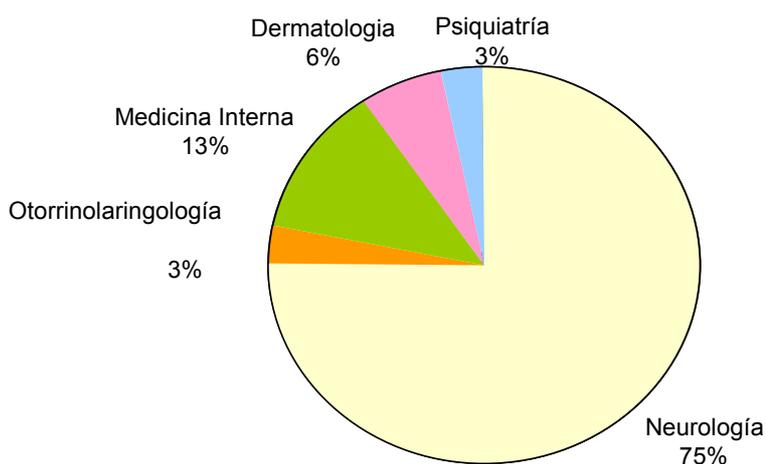


Figura 4. 21- Distribución y frecuencia de la población de pacientes según procedencia por servicios.

Respecto a la edad, se observó que el intervalo mas frecuente, tanto en hombres como en mujeres, correspondió al comprendido entre los 25-29 años con 11 pacientes (16,6%) seguido por los grupos comprendidos entre 35-39 y 40-44 con 9 pacientes respectivamente (16%). No tuvimos en nuestro estudio ningún paciente menor de 15 años (figura 4.22).

Para establecer las características clínicas más importantes de cada paciente, se procedió a la evaluación de los datos recogidos en la historia clínica, ordenando los síntomas y signos reseñados en cada caso según los mismos se correspondieran a una expresión clínica inespecífica como la existencia de cefalea o malestar general, o bien a síntomas atribuibles claramente a una alteración neurológica, articular o cutánea. En algunos casos, los datos recogidos fueron difícilmente agrupados bajo un epígrafe concreto, como en el caso de los pacientes con alteraciones psiquiátricas, donde la diversidad de dichas alteraciones no pudo ser discriminada del cuadro general.

En la tabla 4.22, se muestra la relación de síntomas y signos mas relevantes, así como el servicio de procedencia, la edad y sexo de los pacientes estudiados.

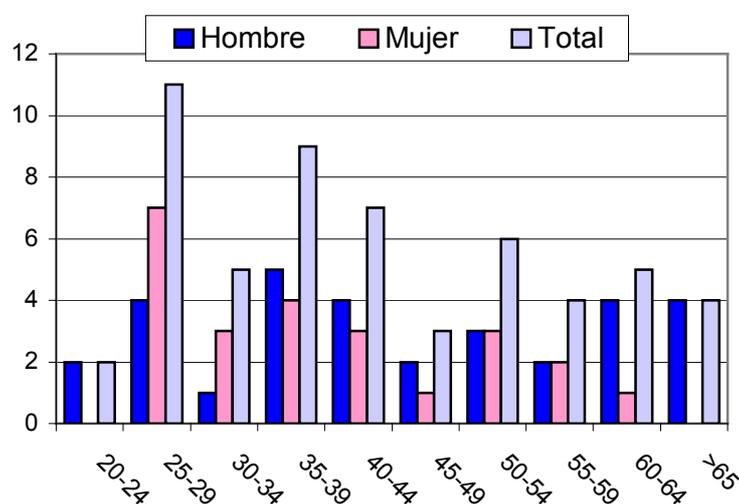


Figura 4.22 .- Distribución de la toda población de pacientes según edad y sexo.

Tabla 4.22.- Distribución de síntomas y signos relevantes entre los pacientes estudiados

Código	Sexo	Edad	Servicio	Clínica			
				General	Neurológica	Articular	Cutánea
M1	H	24	N	Cefalea Malestar	Crisis de ausencia	No	No
M2	H	38	ORL	No	Vértigo	No	No
M4	H	42	MI	Febrícula Malestar	No	Artralgias	No
M5	H	28	MI	Fiebre Malestar	No	No	Exantema
M6	M	27	N	Cefalea Depresión	Parestesias	No	No
M8	M	27	D	Astenia	No	Artralgias	Morfea L.C.B.
M9	M	48	N	Astenia Anorexia	Hemiparesia	No	No
M10	H	60	N	Irritabilidad	Encefalomieliti s crónica	No	No
M11	H	29	N	Astenia Anorexia	S. cerebeloso	No	L.C.B.
M12	H	28	N	Ansiedad Depresión	No	No	No
M14	H	40	D	Ansiedad Depresión	No	No	Eritema polimorfo
M16	M	29	MI	Cefalea Febrícula Astenia	Encefalomieliti s crónica	No	No
M17	M	29	MI	Cefalea Febrícula Astenia	No	No	No
M18	M	40	D	Astenia	No	No	Morfea Esclerosis
M19	H	38	N	Cefalea	No	No	No
M20	H	32	N	-	S. cerebeloso	No	No
M21	M	33	D	No	No	No	E.C.M.
M22	M	36	N	-	S. cerebeloso	No	No
M24	H	54	PS	Ciclotimia	No	No	No

Tabla 4.22.- Distribución de síntomas y signos relevantes entre los pacientes

Código	Sexo	Edad	Servicio	Clínica			
				General	Neurológica	Articular	Cutánea
M25	H	61	N	Psicosis	Parkinson Afasia mixta	No	No
M27	M	30	N	No	No	No	No
M28	M	60	N	-	A.C.V	Artralgias	Exantema
M29	M	33	MI	Febrícula Cefalea Depresión	Vértigo central	Artralgias	No
M30	M	40	N	Cefalea	Parestesias	No	No
M32	M	27	N	-	E.M. Parestesias	No	No
M33	H	35	N	Astenia	Parestesias	No	No
M34	M	36	MI	Astenia Fiebre Cefalea	No	Artralgias Mialgias	No
M35	H	45	D	No	No	No	Dermatitis
M36	H	35	N	Cefalea	No	No	No
M37	M	55	D	No	No	No	ACA Granuloma
M38	H	80	N	-	Demencia A.C.V.	No	No
M39	H	40	N	Cefalea	Parestesias	No	No
M41	H	70	N	-	Demencia	No	No
M42	H	60	N	No	Apraxia	No	No
M43	M	35	N	No	Parestesias	No	No
M44	H	53	N	-	E.L.A. Parestesias	Artralgias	No
M46	H	20	N	Cefalea Astenia	No	Artralgias Debilidad	No
M47	H	77	N	-	Demencia	No	No

Tabla 4.22.- Distribución de síntomas y signos relevantes entre los pacientes

Código	Sexo	Edad	Servicio	Clínica			
				General	Neurológica	Articular	Cutánea
M48	H	43	N	Cefalea	Parestesias	No	No
M51	H	75	N	-	Demencia Terroros	No	No
M52	H	48	N	-	D. central	Artralgias	No
M53	M	29	ORL	Cefalea Fiebre Leucocitosis	Vestibulopatía infecciosa	No	No
M54	H	57	N	-	A.C.V.	No	No
M57	H	61	N	-	Sd. Guillain- Barré	No	No
M58	M	53	N	Cefalea Depresión	No	No	No
M59	N	50	N	Depresión	No	No	No
M60	M	53	N	Cefalea Depresión	Parestesias	No	No
M61	M	43	N	Astenia Depresión	No	No	No
M63	M	56	N	Ansiedad Depresión	No	Artralgias	No
M64	H	51	N	Astenia Cefalea Depresión	No	No	No
M65	M	38	N	Astenia Febrícula Cefalea	Parestesias	No	No
M66	H	28	N	Astenia Cefalea Depresión	No	No	No
M67	H	40	MI	No	No	Artralgias	No
M68	M	57	N	Cefalea	Parestesias Depresión Terroros	No	No
M69	H	54	MI	Cefalea Depresión	No	Artralgias	No
M70	M	27	N	No	Vértigo	No	No
M72	H	32	N	No	Meningitis Convulsión	No	No

N: Neurología; **ORL:** Otorrinolaringología; **MI:** Medicina Interna; **D:** Dermatología; **EM:** Esclerosis múltiple; **ELA:** Esclerosis lateral amiotrófica; **ACV:** Accidente cerebrovascular; **ACA:** Acrodermatitis crónica atrófica. **LCB:** Linfocitoma cutáneo benigno; **D. central:** Desmielinización Central.

En conjunto existió un claro predominio de sintomatología general (57,8%) junto a un cuadro neurológico (54,3%). En los hombres se observó un ligero predominio en la presentación de sintomatología clínica (78,9%) frente a las mujeres (68,4%).

Debemos señalar algunos datos relevantes no incluidos en la tabla. El paciente M4 presentó coxartralgias mientras que los otros pacientes con sintomatología articular presentaron un claro predominio de afectación en las pequeñas articulaciones de las manos, los pies y/o en las rodillas, si bien resaltamos que ningún paciente fue diagnosticado de artritis franca. El paciente M33 refirió un déficit neurológico transitorio, caracterizado por parestesias en hemicara, hemilengua y hemicuerpo izquierdos junto a una visión centelleante.

En el paciente M52 se evidenciaron alteraciones en la marcha y vértigo. Los pacientes M11, M22 y M52 presentaron desmielinización cerebelo-protuberancial con los déficits neurológicos derivados de este proceso. Por último, el paciente M25 fue diagnosticado de enfermedad de Parkinson juvenil idiopática. Los pacientes M10 y M16 fueron diagnosticados de borreliosis de Lyme por presentar una encefalomiелitis crónica. La localización mas frecuente de las parestesias fue en los miembros superiores e inferiores, pero en el paciente M37 fueron generalizadas; el paciente M47 presentó extrasistolia y bloqueo aurículo-ventricular de 2º grado.

El paciente M51, ingresó con un diagnóstico de demencia de etiología no filiada, presentando un comportamiento desinhibido que revirtió totalmente con las primeras dosis de ceftriaxone. Respecto a los signos cutáneos el paciente M5 presentó un exantema en hemicuerpo superior, mientras que el paciente M35 presentó una dermatitis ampollosa recidivante. Llamó la atención la existencia de 4 pacientes con lesiones de borreliosis de Lyme bien definidas en la clínica.

Por otra parte, dos pacientes fallecieron durante el periodo de estudio: el paciente M25 que presentó un ACV que lo condujo al éxitus y el paciente M44 que falleció por una neumonía aspirativa.

4.4.- Correlaciones de variables clínicas y de laboratorio.

A continuación se analiza las características del conjunto los pacientes según sus manifestaciones clínicas predominantes y las variables serológica, diferenciando tres grupos clínicos según presentasen una clínica predominantemente neurológica, o general-articular y cutánea. Del total de 52 pacientes positivos mediante la prueba de cribado EIA VIDAS, y que pudieron ser analizados mediante el Wb, encontramos que 18 resultaron positivos, representando el 34,6%. Para el total de pacientes remitidos al laboratorio durante el periodo de estudio de 3 años de duración representa el 1,5%, representando nuestra área, una zona de baja endemicidad. Respecto a los pacientes "neurológicos" (tabla 4.23) llama la atención la presencia de cuadros evolucionados como es el paciente M16, que presentó un cuadro de encefalomielitis crónica, M11 y M20 que presentaron un síndrome cerebeloso crónico y M57 afecto de un cuadro de Guillain-Barrè.

Todos ellos procesos inveterados cumplieron el criterio mayor esencial de diagnóstico clínico, recidivantes que difícilmente se justifican con la presencia de ese resultado IgM positivo en el Western blot habida cuenta de que IgG fue negativo. Si bien, es un hecho reconocido, la persistencia de anticuerpos de clase IgM en el suero, durante meses o años después de un tratamiento o la resolución espontánea de la lesión, y no se relaciona con la actividad clínica de la infección (Hilton *et al.*, 1997). Por otro lado, la presencia de anticuerpos específicos frente a *B. burgdorferi* en el suero, acompañada de pleocitosis linfocitaria en el LCR dan soporte al diagnóstico de neuroborreliosis como criterio mayor esencial de diagnóstico de laboratorio, si bien, la detección de anticuerpos intratecales resultó negativa en la mayoría de los casos analizados. La paciente M32, con clínica de esclerosis múltiple, y que presentó un resultado de VIDAS positivo en el LCR, no fue confirmado en el Wb que resultó negativo.

Tabla 4.23.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico neurológico y resultados de Wb mediante *B. burgdorferi*.

Código	Otras manifestaciones	Clínica neurológica	IFI IgM	IFI IgG	Wb Bb. IgM	Wb Bb. IgG
M2	No	Vértigo	M-	1:512	N	N
M6	Cefalea Depresión	Parestesias	M+	1:1024	N	N
M9	Astenia Anorexia,	Hemiparesia	M+	1:2048	P	N
M10	Irritabilidad	Encefalomielitis crónica	M-	1:256	N	N
M11	Astenia Anorexia L.C.B.	S. cerebeloso	M-	1:256	P	N
			M-	1:4096	P	N
M16	Cefalea Febrícula Astenia	Encefalomielitis crónica	M-	1:2048	P	N
			M-	1:2048	P	-
M20	-	S. cerebeloso	M-	1:256	P	N
M22	-	S. cerebeloso	M-	1:2048	N	N
			M-	1:512	N	N
M30	Cefalea	Parestesias	M-	1:4096	N	N
			M-	1:4096	N	N
M32	-	E.M. Parestesias	M-	1:256	-	N
			M-	1:1024	N	N
M33	Astenia	Parestesias	M-	1:512	N	N
M44	-	E.L.A. Parestesias	M-	1:4096	N	N
M47	Extrasistolia y bloqueo aurículo-ventricular de 2º grado	Demencia	M-	1:512	N	N
M48	Cefalea	Parestesias	M-	1:4096	N	N
M51	-	Demencia Terrores	M-	1:1024	N	N
M53	Cefalea Fiebre Leucocitosis	Vestibulopatía infecciosa	M+	1:2048	N	N

Tabla 4.23.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico neurológico y resultados de Wb mediante *B. burgdorferi*.

Código	Otras manifestaciones	Clínica neurológica	IFI IgM	IFI IgG	Wb <i>Bb.</i> IgM	Wb <i>Bb.</i> IgG
M57	Sd. Guillain-Barrè	M57	M+ M-	1:1024 1:1024	N P	N
M68	Cefalea	Parestesias Depresión Terrores	M-	1:1024	P	N
M70	-	Vértigo	M-	1:128	N	N
M72	-	Meningitis Convulsión	M-	1:512	N	N

Fueron 20 los pacientes los analizados mediante Wb *B. burgdorferi*, que presentaron un claro predominio neurológico en sus manifestaciones clínicas. De estos, 5 obtuvieron resultado positivo para la IgM, siendo todos ellos negativos mediante IgG.

En los 17 pacientes analizados mediante Wb *B. garinii* (tabla 4.24), en 4 casos obtuvimos un resultado positivo para esta prueba, en 2 se detectaron anticuerpos IgM M41 y M68 y en otros 2 pacientes IgG (M1 y M39). De ellos, 6 pacientes presentaron dos muestras diferentes confirmando el mismo resultado mediante el Western blot. En un paciente (M44) obtuvimos un resultado incompleto frente a los antígenos de *B. garinii*, pues no se pudo realizar la determinación de IgM, que presentó un resultado positivo para IgG, y siendo negativo frente a *B. burgdorferi*.

Del mismo modo en la tabla siguiente se analizan los resultados respecto al cuadro clínico general y articular, mediante la inmunotransferencia de *B. burgdorferi* y de *B. garinii* para anticuerpos de clases IgM e IgG, obteniendo los siguientes resultados (Tablas 4.25).

Tabla 4.24.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico neurológico y resultados de Wb mediante *B. garinii*.

Código	Otras manifestaciones	Clínica neurológica	IFI IgM	IFI IgG	Wb Bg. IgM	Wb Bg. IgG
M1	Cefalea Malestar	Crisis de ausencia	M+	1:102 4	N	P
M9	Astenia Anorexia	Hemiparesia	M+	1:204 8	N	N
M16	Cefalea Febrícula Astenia	Encefalomielitis crónica	M- M-	1:204 8 1:204 8	- N	- N
M29	Febrícula Cefalea, Depresión	Vértigo central	M-	1:102 4	N	N
M30	Cefalea	Parestesias	M- M-	1:409 6 1:409 6	N N	N N
M38	-	Demencia A.C.V.	M-	1:512	N	N
M39	Cefalea	Parestesias	M-	1:256	N	P
M41	-	Demencia	M-	1:512	P	N
M42	No	Apraxia	M-	1:256	N	N
M43	No	Parestesias	M-	1:102 4	N	N
M44	-	E.L.A. Parestesias	M-	1:409 6	-	P
M48	Cefalea	Parestesias	M-	1:409 6	N	N
M52	-	D. central	M-	1:512	N	N
M54	-	A.C.V.	M-	1:409 6	N	N

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica; **ACV:** Accidente cerebro-vascular; **D. central:** Desmielinización central.

Tabla 4.25.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico general-articular y resultados de Wb mediante *B. burgdorferi*.

Código	Clínica articular	Clínica general	IFI IgM	IFI IgG	Wb Bb. IgM	W b Bb . Ig G
M57	-	Sd. Guillain-Barrè	M+ M-	1:1024 1:1024	N N	N N
M65	Astenia Febrícula Cefalea	Parestesias	M-	1:1024	N	N
M68	Cefalea	Parestesias Depresión Terroros	M-	1:1024	P	N
M72	-	Meningitis Convulsión	M-	1:512	N	N
M12	-	Ansiedad Depresión	M-	1:512	N	N
M17	-	Cefalea Febrícula Astenia	M-	1:2048	P	N
M19	-	Cefalea	M-	1:256	P	N
M34	Artralgias Mialgias	Astenia Cefalea Fiebre	M-	1:512	N	N
M61	-	Astenia Depresión	M-	1:512	P	N
M63	Artralgias	Ansiedad Depresión	M-	1:2048	N	N
M64	-	Astenia Cefalea Depresión	M+	1:512	N	N
M66	-	Astenia Cefalea Depresión	M-	1:512	N	N
M67	Artralgias		M-	1512	N	N
M69	Artralgias	Cefalea Depresión	M-	1:2048	N	N

Seguidamente se analiza el grupo de pacientes con predominio de la clínica general y articular y los resultados de la inmunotransferencia frente a *Borrelia garinii* (Tabla 4.26). Fueron 17 los pacientes analizados mediante la prueba de Wb, del grupo que presentó clínica general y articular; obteniendo 6 un resultado positivo (3 para anticuerpos de clase IgM con antígenos de *B. burgdorferi*; uno de *B. garinii* y dos para anticuerpos IgG mediante *B. garinii*).

La sintomatología mas frecuente fue la cefalea (presente en 10 pacientes), depresión (presente en 9 pacientes) y la astenia (presente en 7 pacientes). Diez pacientes presentaron 2 ó 3 síntomas, predominando las asociaciones cefalea-depresión y cefalea-astenia-depresión. Encontramos que 7 pacientes mostraron sintomatología artalgica asociada.

Tabla 4.26.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico general- articular y resultados de Wb mediante *B. garinii*.

Código	Clínica articular	Clínica general	IFI IgM	IFI IgG	Wb <i>Bb.</i> IgM	Wb <i>Bb.</i> IgG
M4	Artralgias	Febrícula Malestar	M+	1:1024	N	P
M24	No	Ciclotimia	M-	1:512	N	N
M36	No	Cefalea	M+	1:2048	N	N
M46	Artralgias Debilidad	Cefalea Astenia	M-	1:1024	N	N
M58	No	Cefalea Depresión	M-	1:256	N	N
M61	No	Astenia Depresión	M-	1:512	P	N
M69	Artralgias	Cefalea Depresión	M-	1:2048	N	P

Del mismo modo en la tabla siguiente se analizan los resultados respecto al cuadro cutáneo en la tabla 4.27. Fueron 7 los pacientes estudiado, de ellos, sólo 2 positivizaron el resultado de la prueba Wb. El paciente M8 afecto de un L.C.B. y una morfea, presentó IgM positivo frente a los antígenos de *B. burgdorferi* y el paciente M18 afecto de morfea y esclerosis, positivizó frente a los antígenos de *B. garinii*. El paciente M21, que presentó un EM no presentó el antecedente de picadura de garrapata en la misma localización, y su prueba confirmatoria resultó negativa, fue considerado por los dermatólogos como enfermedad de Lyme por la presencia de lesión patognomónica y criterio mayor de diagnóstico clínico.

Tabla 4.27.- Pacientes con predominio de un cuadro clínico cutáneo y resultados de Wb mediante *B. burgdorferi* y *B. garinii* (muestras M18 M28).

Código	Otras manifestaciones	Otras clínicas	IFI IgM	IFI IgG	Wb IgM	Wb IgG
M5	Fiebre Malestar	Exantema	M+	1:2048	N	N
M8	Astenia	Morfea L.C.B.	M-	1:1024	P	N
M14	Ansiedad Depresión	Eritema polimorfo	M-	1:4096	N	N
M18	Astenia	Morfea Esclerosis	M-	1:256	N	P
M21	No	E.C.M.	M-	1:256	N	N
M28	A.C.V.	Exantema	M-	1:1024	N	N
M37	No		M-	1:1024	N	N

ACA: Acrodermatitis crónica atrófica. **LCB:** Linfocitoma cutáneo benigno; **ACV:** Accidente cerebro-vascular; **ECM:** Eritema crónico *migrans*. **ACA:** Acrodermatitis crónica atrófica. **LCB:** Linfocitoma cutáneo benigno; **ACV:** Accidente cerebro-vascular.

5-.Discusión

5.1.- Sobre la presencia de *Borrelia burgdorferi sensu lato* en garrapatas estudiadas.

La borreliosis de Lyme, ocurre tras la picadura de especies de garrapatas de piel dura pertenecientes al género *Ixodes*, infectadas por *Borrelia burgdorferi sl.* por contacto con diversos animales que actúan como reservorio en su fase de espiroquetemia. Los vectores pertenecen a las especies *Ixodes scapularis (I. dammini)*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ricinus*, este último el vector principal de la enfermedad en Europa occidental, se han relacionado con la infección.

La importancia de otros vectores ha sido sugerida por la ausencia de una clara correlación entre la distribución geográfica conocida de *Ixodes ricinus* y algunos casos informados de borreliosis de Lyme (Oteo *et al.*, 1995), junto a la importante variabilidad demostrada en el porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia burgdorferi* en diferentes regiones. Por otra parte, los distintos reservorios animales reconocidos no están presentes en todas las áreas donde se diagnostican casos de la enfermedad, por lo que se ha planteado la participación de otros hospedadores (LoGiudice *et al.*, 2003).

Basándonos en estos antecedentes, estimamos la posibilidad de que los artrópodos ixódidos de nuestro medio, definido como monte bajo Mediterráneo con zonas de pasto y de cultivo, pudieran actuar como intermediarios a partir de diferentes especies de mamíferos y de aves.

En las áreas geográficas de la provincia de Valencia estudiadas, no ha sido posible encontrar *Ixodes ricinus* pero sí otras especies de garrapatas ixódidas, similares a las descritas en otros países de la cuenca mediterránea (El Kammah *et al.*, 2001). En nuestro trabajo observamos que el género *Rhipicephalus* spp. fue el más común (44,6%), representando las especies de *Boophilus* spp. y *Haemaphysalis* spp. aproximadamente un 20% de las garrapatas obtenidas. La presencia de especies de los géneros *Dermacentor* spp. y *Hyalomma* spp. se determinó con menor frecuencia. Los especímenes se obtuvieron en relación con diversos tipos de matorrales y con distintas especies animales que cohabitaban dichas áreas. En la mayoría de los casos, una misma especie de garrapata se aisló en diferentes lugares excepto los ejemplares de *Boophilus annulatus* que se obtuvieron exclusivamente a partir de équidos, aunque

se hallan descrito otras especies de *Boophilus* que parasitan igualmente caballos y ovejas (Frazzon *et al.*, 2000; Battsetseg *et al.*, 2002).

Sólo cultivamos garrapatas adultas, por disponer de una mayor diversidad de ejemplares, por la facilidad para su clasificación taxonómica y por haberse descrito una mayor prevalencia de garrapatas infectadas. Aunque se conoce la presencia de *B. burgdorferi* en todos los estadios evolutivos de los ixódidos, se considera que la mayor tasa de espiroquetas en estos vectores se relaciona con la frecuencia de contactos con los animales que actúan como reservorio, siendo por ello menor en las larvas y las ninfas (Kahl *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1998; Stanczak *et al.*, 1999). Por otra parte, la transmisión transovárica de *Borrelia* spp., se ha descrito en baja frecuencia (1%) para el género *Ixodes*, no habiéndose demostrado en otros géneros ixodoideos por lo que asumimos que las probabilidades de albergar *B. burgdorferi* eran inferiores en larvas y ninfas de las especies obtenidas (Humair *et al.*, 2000). Respecto a la distinta distribución por sexos, se ha determinado una mayor prevalencia en las hembras (15%) pero sólo ligeramente superior al porcentaje de machos infectados (12%) (Stanczak *et al.*, 1999).

Respecto a los procedimientos de estudio microbiológico empleados para el hallazgo y la identificación de aislados de *B. burgdorferi* en las garrapatas, consideramos que se han desarrollado los métodos disponibles adecuados, desde la visión mediante microscopía óptica o de contraste de fase, y el cultivo en medio selectivo, hasta la detección de ADN específico mediante métodos moleculares. En algunos ejemplares, también se realizó estudio anatomo-patológico, si bien la complejidad de dicho estudio limitó su aplicación en la totalidad de la población de garrapatas. Los diferentes métodos fueron aplicados en las condiciones referidas por diversos autores, tanto para los macerados como para las muestras obtenidas tras disección (Misonne *et al.*, 1998; Dr. Anda, comunicación personal). Aunque se han sugerido otros métodos, como la inmunofluorescencia directa sobre las garrapatas, tan sensible como los métodos de amplificación de ADN (Kahl *et al.*, 1998), consideramos que la evaluación de las muestras ha sido suficientemente exhaustiva, incluyendo la detección mediante PCR. Por otra parte, algunos autores consideran que la mera observación microscópica mediante campo oscuro posee una elevada sensibilidad (Stepanova-Tresova *et al.*, 2000; Nefedova *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2002).

Somos conscientes de las numerosas limitaciones que presenta la detección de espiroquetas en los vectores. Durante los primeros cultivos realizados a partir de macerados de garrapatas, observamos una gran contaminación de las muestras, a pesar de los lavados sucesivos realizados previamente con diferentes diluciones alcohólicas. Como consecuencia, decidimos adicionar al medio de cultivo BSK II diversos antibióticos y antifúngicos tales como rifampicina, ciprofloxacino y 5-fluorocitosina (Dr. Anda, comunicación personal) consiguiendo obtener unos cultivos libres de contaminación. Por el contrario, cuando el material utilizado para la siembra procedió de las disecciones acarinas (formado por las glándulas salivares e intestinos medios), todos los cultivos se mantuvieron libres de contaminación, considerándose en la actualidad este método de elección para muchos autores. No obstante, debemos señalar que la presencia de otros microorganismos en el medio de cultivo no impidió la viabilidad de la cepa control de *B. burgdorferi* B31 que, contaminada por diferente flora microbiana, se mantuvo en todos los subcultivos realizados.

Aunque las condiciones de cultivo para este microorganismo son aún hoy controvertidas, al no demostrarse diferencias significativas en el crecimiento de *Borrelia* spp en condiciones de microaerofilia o atmósfera de CO₂, consideramos más adecuada la incubación en estufa a 37°C en atmósfera de microaerofilia, siendo estos parámetros los más frecuentemente referidos en la bibliografía (Burgdorfer *et al.*, 1982; Spielman *et al.*, 1984; Heroldova *et al.*, 1989; Dolan *et al.*, 1998).

A pesar de que Burgdorfer *et al.* (1982) no refieren que sea necesario el control del crecimiento de las siembras tras haber realizado los cultivos secundarios semanales (por presentar el máximo crecimiento a los 4-6 días) nosotros realizamos estos controles en todos los viales de cultivo de manera rigurosa, y muy a nuestro pesar, podemos asegurar una ausencia de crecimiento de estructuras compatibles con *Borrelia* spp. u otra espiroqueta relacionada en las muestras de garrapatas. Respecto al tiempo de incubación, se mantuvieron los recomendados por la mayoría de los autores, si bien se ha referido el cultivo positivo de muestras de biopsias cutáneas procedentes de animales (cérvidos) a los 160 días de cultivo en BSK II (Pichon *et al.*, 2000).

Para la realización de los estudios moleculares se emplearon los métodos de extracción de ADN referidos en la bibliografía. El método de ebullición (Misonne *et al.*,

1998), que resulta sencillo, rápido y económico, sólo fue utilizado en algunos lotes dada la importante turbidez que se obtenía, considerando muy probable la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. Respecto al método fenol-cloroformo, se introdujeron diversas modificaciones como la realización de una doble extracción y el paso por columnas de purificación de ADN, a fin de eliminar restos de material microbiano u otros inhibidores presentes en las muestras. Del mismo modo, se utilizó un número variable de garrapatas en los lotes (de 3 a 30 individuos) en función del distinto tamaño de los ejemplares, si bien se refiere rentabilidad utilizando tanto el macerado de una única garrapata (Spyridaki, 2002) como con un número superior a 10 individuos (Favia *et al.*, 2001; Stanczak *et al.*, 2002).

Para la detección de ADN específico de *B. burgdorferi* en las garrapatas se seleccionaron dos tipos de nested PCR basadas en la amplificación de secuencias concretas de los genes que codifican la lipoproteína OspA (Guttman *et al.*, 1996) y la flagelina (Lebech *et al.*, 1995). La lipoproteína externa de superficie se expresa exclusivamente en aislados procedentes de vectores, mientras que la flagelina (proteína de 41 kDa) constituye un elemento común a distintas especies de *Borrelia* y otras espiroquetas. Nuestro resultado fue constantemente negativo, independiente del método empleado y de las condiciones del ensayo. Sin embargo, para la interpretación precisa de este resultado negativo debe tenerse en cuenta que en nuestro estudio se incluyeron controles internos de ADN procedente de la cepa control B31, como proponen Lebech *et al.* (1993). El resultado de la amplificación de dichas muestras fue igualmente negativo, por lo que consideramos que, y pese a las modificaciones introducidas en los métodos de extracción de ADN, se mantuvo la presencia de inhibidores de la reacción de distinta naturaleza, probablemente restos de queratina o bilirrubina procedente de la sangre total contenida en los ejemplares lisados. La presencia de dichas inhibiciones no han sido referidas por otros autores que utilizan métodos de maceración simple.

5.2.- Respecto al diagnóstico microbiológico de borreliosis de Lyme.

Como se ha señalado, durante el periodo de estudio las solicitudes al laboratorio de diagnóstico microbiológico de la enfermedad fue progresivamente disminuyendo, pasando de 494 muestras analizadas en el año 1996 a 221 muestras en el año 1999. Sin embargo, el porcentaje relativo de muestras con resultado positivo

mediante la prueba de cribado enzimoimmunoanálisis (EIA VIDAS) se mantuvo uniforme (5,6% en los años 1996/97 y 5,2% en los años 1998/99). Desconocemos las razones de la disminución del número de muestras remitidas, pero consideramos que el similar porcentaje de resultados positivos revela una adecuada y mejor indicación de las solicitudes por los diferentes especialistas (dermatólogos, neurólogos, internistas) relacionados con las formas clínicas de presentación de la enfermedad. Consideramos que el número de peticiones efectuadas en nuestro hospital es comparable a las recibidas en otros servicios de Microbiología de la Comunidad Valenciana, variando sí el porcentaje de resultados positivos posiblemente en función del método de cribado utilizado (Dr. Muñoz, comunicación personal).

En nuestro estudio se analizaron preferentemente muestras de suero, proporcionando el método de cribado un 5,4% de resultados positivos, en el rango de frecuencias referidas en nuestro país, comprendido entre el 0,3% y 14,8% y próximos a los descritos en áreas como La Rioja, Sevilla o Guadalajara (López Prieto *et al.*, 1989; Oteo Revuelta *et al.*, 1990 y 1994; Tamayo *et al.*, 1990; Caride *et al.*, 1995; Saz *et al.*, 1995). En general, se acepta que en una población de riesgo los valores son muy superiores a los encontrados en la población general (Smith *et al.*, 1991; Oteo Revuelta *et al.*, 1994; Ferrero *et al.*, 1991; Elías *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1998; Hristea *et al.*, 2001); si bien es común la coexistencia de focos de baja y alta prevalencia en un área concreta, en relación con las distintas características ecológicas presentes en una misma zona. Respecto al porcentaje de positividad encontrado en otros lugares del mundo, encontramos que la seroprevalencia de anticuerpos específicos frente a *Borrelia burgdorferi*, se encuentra entre unos valores extremos amplios (1,8%-19,68%) siendo comúnmente superior a la nuestra (Kuiper, *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1991; Hassler *et al.*, 1992; Satanchi *et al.*, 1993; Anaud, *et al.*, 1993; Cristofolin, *et al.*, 1993; Treml *et al.*, 1994). Respecto al método de cribado mediante el sistema EIA VIDAS, descartadas las muestras con una reactividad cruzada, encontramos 14 muestras con un resultado dudoso (20,5%) y 54 muestras un resultado positivo (77,9%). En el grupo formado por los donantes sanos encontramos un resultado dudoso mediante el sistema VIDAS en un 8% y ningún resultado positivo. Otros estudios más amplios con grupos de población sana revelan un porcentaje de positividad mediante ELISA entre el 3,7% y un 16,5%, si bien la prueba de confirmación muestra un resultado positivo en menos del 0,25% de los mismos (Stamouli *et al.*, 2000). Sólo en algunos pacientes con síntomas meníngeos y centrales

dispusimos además de muestra de LCR. De los 29 líquidos cefalorraquídeos analizados mediante EIA, sólo encontramos uno con resultado positivo (3,4%) procedente de una paciente que presentaba reactividad luética cruzada mediante FTA-abs y siendo reiteradamente negativas las demás pruebas serológicas luéticas. Esta paciente no fue diagnosticada de sífilis, al ser negativo el resultado de MHA-TP siguiendo el criterio de Rath *et al.* (1994). A pesar del reducido número de sueros y LCR procedentes de un mismo paciente, confirmamos la ausencia de correlación de resultados obtenidos mediante enzimoimmunoanálisis, que se corresponde con lo descrito por otros autores (Kaiser *et al.*, 2000).

Del conjunto de muestras analizadas, sólo 9 de ellas presentaron un título positivo mediante IFI IgM, tres de ellas con un resultado de EIA VIDAS dudoso. Entendemos que el estudio de borreliosis de Lyme se solicita de modo tardío, por lo que es compatible el bajo número de muestras con resultado positivo para IgM. No obstante, en ninguno de los pacientes con IgM positiva se indicaron síntomas o signos clínicos de enfermedad precoz (Brown *et al.*, 1999; Criterios de la FDA, 1999). Entendemos que la interpretación de este resultado es extremadamente compleja ya que debe considerarse la posibilidad de reinfección (Edlow *et al.*, 2002) la persistencia de títulos positivos durante años (Aberer *et al.*, 1999) y la inespecificidad de dicho resultado dada la ausencia de correlación encontrada con la prueba confirmatoria con antígenos de *B. burgdorferi* (Dzierzecka *et al.*, 2002). Además, se ha referido que la detección de IgM específica puede tener un valor limitado en poblaciones de bajo riesgo o en pacientes con clínica atípica (Porwancher, 1999).

En nuestro estudio, encontramos que la prueba de IFI IgG mostró una buena correlación con la prueba de cribado EIA del sistema VIDAS, ya que la mayoría de las muestras con VIDAS positivo o dudoso mostraron un título positivo para dicha inmunofluorescencia, hallando sólo 2 muestras con un resultado inferior al "exigente" punto de corte establecido de 1/256. Con respecto a la determinación de este título de corte reseñar que otros autores consideran la dilución mayor o igual a 1:128 como significativa (Oteo *et al.*, 1990-1994; Rojo-Vázquez *et al.*, 1996), pero estimamos incrementar una dilución a fin de aumentar la especificidad y basándonos en un estudio previo (Fraile, 1993). En el conjunto de muestras analizadas, y aunque se observó un amplio rango de titulaciones positivas, la observación más frecuente fue un

título IFI IgG 1:512, incluso dentro del grupo de las muestras con un resultado dudoso mediante EIA, donde obtuvimos igualmente titulaciones altas y una única muestra con un título inferior al punto de corte.

Respecto a la prueba confirmatoria mediante inmunotransferencia con los antígenos de *B. burgdorferi*, debemos señalar que determinamos un resultado positivo para IgM en 12 muestras (25%). Entre las muestras negativas observamos una elevada frecuencia de ausencia de bandas reactivas (16 muestras) y una variable reactividad frente a bandas no significativas según los criterios de positividad de la prueba. Trebejo *et al.* (1999). En un estudio comparativo de dos métodos de inmunotransferencia realizado en una zona endémica americana, apuntaron la posibilidad de aumentar la sensibilidad de la misma modificando los criterios recomendados, dándole gran valor a la presencia de anticuerpos frente a proteínas de bajo peso molecular (34 kDa y 31-30 kDa) por observar que fueron pobremente expresadas en los cuadros iniciales de borreliosis. En nuestro medio, esta observación no se cumplió pues resultó menor nuestra reactividad frente a esas bandas, encontrando sólo 5 muestras reactivas frente a la proteína 34 kDa y una frente a la proteína 30-31 kDa.

Menor número de resultados IgM positivos se obtuvieron mediante la inmunotransferencia con antígenos de *B. garinii*, ya que sólo en 3 pacientes de los 31 sueros estudiados cumplieron los criterios de positividad de la prueba (8,1%). Predominó la ausencia de bandas como resultado de la misma, existiendo un reducido número de muestras con reactividad frente alguno de los antígenos. En dos muestras que resultaron positivas mediante ambos métodos de confirmación (*B. Burgdorferi* y *B. garinii*) se identificó reactividad frente a las mismas bandas.

De las 50 muestras analizadas mediante inmunotransferencia con antígenos de *B. burgdorferi* para IgG, ninguna resultó positiva según los criterios expresados por el laboratorio fabricante (la presencia de 5 bandas de entre las bandas siguientes 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 93 kDa). Estos resultados nos permiten plantear que dichos criterios puedan no tener una rentabilidad diagnóstica adecuada en nuestro medio, en base al resultado obtenido en las pruebas de EIA e IFI y las características clínicas conocidas de la población de pacientes seleccionada. No debe obviarse el estudio de reactividad cruzada realizado previamente en todas las muestras. En

nuestro estudio encontramos una alta presencia de anticuerpos IgG específicos para las proteínas de 41kDa (flagelina) y 45 kDa.

Menor número de muestras (28) fue analizada frente a *B. garinii*, encontrando que cuatro de ellas (14,2%) cumplieron los criterios de positividad expresados en el método comercial, siendo el resto negativas pero presentando un número variable entre 1 y 6 bandas reactivas, observándose con mayor frecuencia el reconocimiento de las proteínas de 75, 32 y 41 kDa.

Sobre la correlación entre las pruebas de EIA e inmunotransferencia para anticuerpos IgM y *B. burgdorferi*, estimamos como verdaderos positivos al 4% de las muestras (9/39), resultando serológicamente un 75% de falsos positivos, siendo los respectivos porcentajes con antígenos de *B. garinii* significativamente superiores (9,6% de verdaderos positivos y 90,3% de falsos positivos). En el caso de la correlación entre el resultado proporcionado por el método VIDAS y el resultado de la inmunotransferencia para IgG encontramos que el 97,6% de las muestras analizadas frente a los antígenos de *B. burgdorferi* tuvieron un resultado falso positivo. En el caso de la reactividad frente a *B. garinii*, el 10% (2/20) de las muestras fueron consideradas como verdaderos positivos.

Respecto a la correlación entre las pruebas de IFI e inmunotransferencia debemos señalar que sólo en una muestra (M9) de las 6 con un resultado positivo mediante la IFI IgM pudo considerarse como un resultado verdadero positivo por su reactividad mediante la prueba Wb IgM para los antígenos de *B. burgdorferi*. La dificultad de una adecuada interpretación queda subrayada al considerar los resultados obtenidos con dos muestras diferidas del paciente M57. Así, la muestra 57a resultó positiva para la IFI IgM con Wb IgM negativo (falso positivo), mientras que la muestra del mismo paciente M57b, siendo negativa mediante IFI IgM, proporcionó un resultado positivo mediante Wb para dicha inmunoglobulina (falso negativo). Una ausencia de correlación entre ambas pruebas se observó cuando se emplearon antígenos de *B. garinii*, ya que en 3 de las 37 muestras analizadas que se interpretó un perfil de bandas positivo ninguna tuvo un resultado previo de IFI IgM positivo (falsos negativos). Para el resultado de Wb mediante IgG con los antígenos de *B. burgdorferi* en el 98% de las muestras se determinó un perfil indefinido, por tanto considerándose falsos positivos, y sólo una muestra (M70), resultó negativa al ser analizada mediante

ambos métodos (verdaderos negativos para Wb de *Bb* IgG). Por último, con los antígenos de *B. garinii*, sólo en 4 muestras pudimos interpretar un resultado verdadero positivo.

Para definir correctamente el resultado serológico obtenido, se realizaron diferentes estudios serológicos frente a patógenos que plantean una probable reactividad cruzada. Por ello, el análisis serológico de las muestras seleccionadas incluyó sífilis (Magnarelli *et al.*, 1990); infección por VIH, fiebre Q y fiebre botonosa mediterránea (Oteo *et al.*, 1993); brucelosis; así como infección por citomegalovirus y virus de Epstein-Barr (Magnarelli *et al.*, 1987; Adler *et al.*, 1996). De las 80 muestras reactivas mediante el sistema VIDAS, se determinó reactividad luética en 12 de ellas, siendo las pruebas treponémicas y no treponémicas negativas en el resto, excepto en dos muestras (M11b y M23) donde se observó reactividad reiteradamente positiva mediante la prueba FTA-abs pero sin establecerse un diagnóstico de infección luética. Del mismo modo, 4 muestras fueron reactivas frente a virus de Epstein-Barr, por lo que dos de ellas fueron retiradas del estudio (pertenecían al grupo de muestras con reactividad luética) mientras que las otras dos muestras no se retiraron al considerarse que los resultados serológicos y las características clínicas se correspondían en mayor medida a una sospecha de borreliosis de Lyme que a una infección por dicho virus. El resto de las pruebas de reactividad cruzada mostró un resultado negativo. No se realizó un estudio de respuesta serológica frente a leptospirosis, pese a encontrarnos en una zona endémica, ya que diversos autores encuentran que la reactividad cruzada, aunque posible en teoría, en la práctica resulta mínima (Artero *et al.*, 1991; Magnarelli *et al.*, 1996). No pudimos descartar *Babesia microti*; ya que no dispusimos de los medios para la realización de extensiones y tinción de muestras de sangre total (Krause *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1996) ni los métodos serológicos pertinentes. En este sentido conocemos que títulos bajos de anticuerpos frente a *Babesia microti*, *Ehrlichiosis chaffeensis* y *Ehrlichiosis equii* se han determinado en pacientes afectados de borreliosis de Lyme pero su significado sigue siendo controvertido (Gray *et al.*, 2002). Ambas entidades pueden ser similares clínicamente, si bien las infecciones por *Babesia microti* afectan preferentemente a pacientes asplénicos, inmunodeprimidos y de edad avanzada (Krause *et al.*, 2002). Debe destacarse que algunos estudios de seroprevalencia frente a *Babesia microti* en personas con antecedente de picadura por garrapata, revelan un 5,4% de resultados positivos, siendo inferior (1,7%) en

pacientes con serología positiva para borreliosis de Lyme y en sujetos sanos (Hunfeld *et al.*, 1998 y 2002).

Sólo planteamos la realización de cultivos y nested PCR en las muestras seleccionadas, debido a la baja o nula rentabilidad de dichas pruebas en suero (Lebech *et al.* 1995).

5.3.- Sobre el perfil clínico de los pacientes estudiados.

De los 56 pacientes seleccionados, tras descartarse aquellos con un resultado positivo en las pruebas de reactividad cruzada, el grupo mas numeroso procedió del servicio de Neurología (39 pacientes; 69,6%), constituyendo, como esperábamos, más de la mitad de las muestras reactivas dado el predominio de manifestaciones neurológicas que se asocian a los cuadros borreliosis de Lyme en Europa. El resto de muestras procedieron de distintos servicios, destacando por su baja frecuencia las muestras procedentes de Dermatología (10,7%).

Clínicamente, la borreliosis de Lyme se presenta con un variable y complejo cuadro clínico. Nadelman (1998) refiere que durante un estadio precoz, pueden aparecer síntomas generales como son fatiga, mialgia, artralgias, cefalea y escalofríos; siendo los signos más frecuentes la linfadenopatía regional y la fiebre. Todos estos síntomas y signos clínicos, fueron incluidos como criterios clínicos de borreliosis por parte de los CDC en 1993, además del eritema *migrans*, las palpitaciones y parestesias, los cambios visuales y el síndrome de fatiga crónica (Holmes *et al.*, 1994). El grupo de trabajo para la borreliosis de Lyme en España (Oteo *et al.*, 1995) incluyó como signos clínicos diagnósticos de la enfermedad la presencia de acrodermitis crónica atrófica (ACA) o de linfocitoma cutáneo benigno (LCB).

Si bien se considera que la prevalencia de la enfermedad es similar en ambos sexos, presentándose a cualquier edad pero con una distribución bimodal en niños y adultos jóvenes (Nadelman *et al.*, 1998) en nuestro estudio, observamos un ligero predominio en el varón (57,1%) respecto a la mujer (42,8%) siendo el intervalo de edad mas frecuente el comprendido entre los 35-44 años, con 17 pacientes (32,6%) si bien en, nuestra población no observamos una distribución bimodal por no haberse remitido ninguna muestra pediátrica a estudio.

El eritema *migrans*, el signo mas frecuente de la enfermedad (60%) presente como única manifestación en el 40%. La radiculopatía, es la segunda manifestación mas frecuente, estando como única manifestación de borreliosis de Lyme en el 22% de los casos. LCB y ACA, fueron raros, y no se presentó ninguna carditis. Hubo una evidencia serológica en el 75% con una directa correlación en el 7.5%. Concluyen que las manifestaciones clínicas fueron similares a las encontradas en otras partes de Europa, pero difiere de la clínica encontrada en pacientes americanos. Hechos que difieren con lo presentado en nuestro estudio observar que, del total de 56 pacientes, un cuadro general se presentó en 33 muestras (58,9%) siendo la cefalea (19) la astenia (13) y la depresión (12) de claro predominio; y por el cuadro neurológico con, igual frecuencia que el anterior, predominando el cuadro central (13), y las parestesias en 11 pacientes. En los hombres se observó un ligero predominio en la presentación de sintomatología clínica (78,9%) frente a las mujeres (68,4%) siendo predominante en los varones la clínica general (18/16) y neurológica (19/14) como se describe en la bibliografía, que el cuadro clínico mas frecuentemente encontrado en Europa es el neurológico (Ackerman *et al.*, 1985; García-Moncó *et al.*, 1989), y no así para el cuadro cutáneo que con predominio en las mujeres (55,5) y el articular en el que se dio con igual frecuencia en hombres que en mujeres, (50%) ya que en 7 pacientes se presentaron artralgiyas erráticas (12,5%) resaltar el hecho de que ningún paciente fue diagnosticado de artritis franca, que resulta mas prevalente en pacientes americanos. Llama la atención, que en la paciente (M21) diagnosticada en el servicio de Dermatología, de ECM, y sin referir ninguna otra sintomatología asociada, que presentara un resultado dudoso en el test de cribado mediante el sistema VIDAS, siendo el de la prueba de IFI IgM negativa; para IgG tuvo un título bajo (1:256) para la inmunotransferencia mediante *B. burgdorferi* para IgM e IgG, no presentó bandas reactivas. Diversos autores, coinciden en afirmar que el diagnóstico del eritema *migrans*, es clínico ya que en esta fase de la enfermedad las pruebas serológicas pueden dar falsos positivos y falsos negativos, y debe interpretarse en el contexto epidemiológico de la enfermedad (Nowakowsk *et al.*, 2001; Edlow *et al.*, 2002).

La acrodermatitis crónica atrófica es una lesión cutánea tardía en el 80% de los pacientes (van Dam *et al.*, 1993) asociada exclusivamente a infección por *Borrelia afzelii* (Eberst *et al.*, 1977) siendo frecuente en Europa y excepcional en los EE.UU. La paciente M37 presentó dicha la lesión cutánea asociada a granulomas anulares, y si bien no dispusimos de métodos de diagnóstico específicos para *B. afzelii*, encontramos

un resultado positivo mediante EIA, con IFI IgM negativa y un título de 1:1024 para IFI IgG, siendo negativas las pruebas confirmatorias con antígenos *B. garinii*.

El linfocitoma cutáneo benigno o linfocitoma borreliano (Grosshans, 1980) es considerado como una forma poco común de borreliosis precoz. Se ha observado en pacientes europeos habiéndose demostrado su etiología borreliana en diversas ocasiones mediante aislamiento de la lesión (Hovmark *et al.*, 1986) y amplificación de ADN específico (PCR) (Abele *et al.*, 1990; Gissler *et al.*, 2002). También se ha relacionado la existencia de pacientes con morfea y títulos elevados de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (Hercogova, 2002). En el presente trabajo estudiamos un paciente (M8) con unas lesiones definidas como morfea asociada a linfocitoma cutáneo benigno. Con unos resultados serológicos indeterminados, pudo demostrarse una reactividad positiva mediante inmunotransferencia para anticuerpos IgM pero con escasa bandas reactivas para IgG. En los últimos años, esta lesión cutánea ha demostrado gran interés al demostrarse casos de pacientes con morfea y títulos elevados de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (Aberer, 1985).

Otro paciente con LCB presentó reiteradamente un resultado positivo mediante la prueba de FTA-abs, no siendo considerado un paciente sifilítico al encontrarse negativas el resto de pruebas luéticas. Con dos muestras diferidas un año, determinamos un título IFI IgM negativo en ambas y un título creciente para IgG (1:512 y 1:4096 respectivamente) presentando un resultado positivo en la prueba confirmatoria con antígenos de *B. burgdorferi* para IgM en ambas muestras, y negativo para IgG (proteínas de 66, 45 y 41 kDa). Excepcionalmente, se remitió una muestra de LCR al laboratorio de referencia de Majadahonda (Madrid) informándonos de un resultado positivo mediante PCR para *B. burgdorferi*.

Hemos encontrado pacientes con diversos cuadros neurológicos no filiados que respondieron a una pauta de tratamiento antibiótico. Así, un paciente diagnosticado de encefelomielitis crónica (M10) acompañado de astenia y anorexia de larga evolución, presento resultados serológicos negativos en las prueba de confirmación, tanto para IgM (bandas 66, 58 y 39 kDa) como IgG (bandas 45, 41 y 34 kDa), siendo igualmente negativa la prueba IFI IgM y determinándose un título de 1:256 mediante IFI IgG. El paciente mejoró clínicamente, tras un tratamiento antibiótico con ceftriaxona 2 gr/d durante 20 días. La paciente M16, con similar diagnóstico de encefelomielitis crónica,

con astenia, febrícula y cefalea persistentes, presentó un resultado dudoso mediante EIA en dos muestras diferidas un año, con títulos negativos para la IFI IgM, pero con igual título de 1:2048 para IFI IgG. La prueba de inmunotransferencia con antígenos de *B. burgdorferi* para anticuerpos de clase IgM resultó positiva (bandas 93, 63, 45, 41D, 39, 23 kDa) pero negativa para IgG (bandas 45, 41 y 39 débil kDa). Dispusimos de una única muestra de LCR que resultó negativa. Sin embargo, la paciente mejoró clínicamente y remitieron los títulos, tras el tratamiento durante diez días con doxiciclina (100 mgr/d) y ciprofloxacino (500 mgr/d). La paciente presentó una serología positiva para VEB con títulos positivos para IgM e IgG, pero se consideró su no retirada del estudio en base a la respuesta al tratamiento antibiótico. Si bien se ha referido que la presencia de anticuerpos específicos en LCR es necesario para establecer el diagnóstico definitivo de neuroborreliosis, su ausencia no descarta necesariamente el diagnóstico, (Issakainen *et al.*, 1996; Kaiser *et al.*, 2000). Llama la atención que en 3 muestras de pacientes con un diagnóstico clínico y bioquímico en el LCR de neuroborreliosis, resultaron negativas mediante la prueba confirmatoria para anticuerpos de clase IgG, presentando reactividad a diversos antígenos tanto de *B. burgdorferi* como de *B. garinii*. Otro paciente (M57) diagnosticado de síndrome de Guillain-Barrè, mostró un resultado positivo mediante EIA en dos muestras diferidas un año, con título positivo para IFI IgM en la primera muestra remitida y negativo en la segunda, y con igual título de 1:1024 para IFI IgG en ambas determinaciones. La prueba de confirmación con antígenos de *B. burgdorferi* presento un resultado negativo para IgM sin bandas reactivas en la primera muestra y un resultado positivo en la segunda (bandas 60, 41, 34, 23 kDa) considerándose negativas ambas muestras analizadas para anticuerpos de clase IgG pese a la presencia de diversas bandas.

Destacamos el hallazgo de un paciente de 75 años (M51) afectado de cefalea persistente y demencia acompañada de síntomas de moria, terrores nocturnos, alucinaciones visuales y delirio de confabulación paranoide de 8 años de evolución, que tras haberse descartado la existencia de un accidente cerebro-vascular, revirtió de manera espectacular con tratamiento antibiótico (ceftriaxona 2 gr/d durante 20 días). El estudio serológico reveló una IFI IgM negativa, con un título de 1:1024 para IFI IgG. La prueba de confirmación con antígenos de *B. burgdorferi* mostró un resultado tanto para anticuerpos de clase IgM (sin bandas) como IgG (bandas 66, 58, 23 kDa). Según refieren diversos autores, en la fase de neuroborreliosis se desarrollan frecuentemente

cuadros neuropsiquiátricos clínicamente inespecíficos, con cambios de personalidad, disfunción intelectual de intensidad muy variable, anorexia nerviosa y fatiga, que es constante y predominante durante todo el curso de la enfermedad (Halperin *et al.*, 1986; Reik *et al.*, 1986; García-Moreno *et al.*, 1997). Como señalan Dupuis *et al.* (1988), la demencia podría ser otra forma de presentación de una infección crónica por *Borrelia burgdorferi*, aunque este aspecto es controvertido. En 1995, Waniek *et al.* Y posteriormente McDonald *et al.* (1986) demostraron la presencia de *B. burgdorferi* en el córtex cerebral en pacientes que fallecieron por enfermedad de Alzheimer o con demencia no filiada. Por otra parte, Carlsson *et al.* (1987) han referido un caso de demencia progresiva con pleocitosis, serología positiva y respuesta a los antibióticos.

Diversos autores (Ackerman *et al.*, 1985; García-Moncó *et al.*, 1989), describen la presencia de lesiones focales desmielinizantes del sistema nervioso central que constituyen la base del cuadro de neuroborreliosis o encefalomiелitis borreliana. Se presenta de modo muy heterogéneo, con alteraciones sensitivas, disartria, disfunción urinaria, crisis epilépticas, y trastornos psicológicos en diferentes combinaciones, que plantean un importante problema de diagnóstico diferencial con la esclerosis múltiple (Midgard *et al.*, 1987). En nuestro estudio, el paciente M52 presentó una desmielinización central con artralgias erráticas en pequeñas articulaciones. Seleccionado por presentar un resultado positivo mediante EIA, la determinación de anticuerpos de clase IgM resultó negativa tanto mediante inmunofluorescencia como mediante inmunotransferencia. El título IFI IgG fue de 1:512, pero no se encontraron bandas reactivas en la prueba confirmatoria para dichos anticuerpos.

6.-Conclusiones

El análisis de los resultados anteriormente descritos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. La colección e identificación de garrapatas ixódidas procedentes de diferentes áreas de la provincia de Valencia, ha revelado la existencia de cinco géneros, con siete especies distintas. Ninguno de ellos, clasificado como *Ixodes ricinus*, reconocido principal vector de la borreliosis de Lyme.
2. En ninguna de las garrapatas estudiadas se ha identificado una espiroqueta compatible con *Borrelia burgdorferi* *s.l.* u otra especie de *Borrelia* asociada a un cuadro de borreliosis de Lyme.
3. Consideramos que el método más adecuado para el estudio microbiológico en los ixódidos, es la disección de las garrapatas con extracción de sus estructuras glandulares e intestinos medios. El uso de ejemplares macerados para detección por métodos moleculares es desaconsejado por la probable inhibición de la amplificación del ADN específico.
4. El método de enzimoimmunoanálisis como prueba de cribado, selecciona una población de pacientes con características clínicas muy variables, pero también un grupo de pacientes con manifestaciones características y con una concreta evolución clínica, que sustentan la existencia de casos probables de borreliosis de Lyme.
5. La titulación de los anticuerpos específicos de clase IgM e IgG mediante inmunofluorescencia y los criterios establecidos para la interpretación de las pruebas confirmatorias de inmunotransferencia con antígenos de *B. burgdorferi* y *B. garinii*, se muestran escasamente rentables en nuestro medio, ya que no permiten confirmar ni descartar la existencia de la enfermedad en el grupo de pacientes estudiados.

Todo lo cual nos permite considerar la necesidad de un mejor estudio epidemiológico y clínico de los casos sospechosos de borreliosis de Lyme, y particularmente el desarrollo de criterios de diagnóstico microbiológico que se adecuen al perfil de la enfermedad en nuestra área.

7.-Bibliografía

Abele DC, Anders KH. The many faces and phases of Borreliosis I. Lyme disease. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 167-186.

Abele DC, Anders KH. The many faces and phases of Borreliosis II. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 401-410.

Aberer E, Newman R, Stanek G. Is localized scleroderma a *Borrelia* infection? Lancet 1985; 2: 273.

Aberer E, Stanek G. Histological evidence for spirochetal origin of morphea and lichen sclerosus et atrophicus. Am J Dermatopathol 1987; 9: 374-379.

Aberer E, Koszik F, Silberer M. Why is chronic Lyme borreliosis chronic? Clin Infect Dis. 1997; 25: S64-570.

Aberer E, Schmidt BL, Breier F, Kinaciyan T, Luger A. Amplification of DNA of *Borrelia burgdorferi* in urine samples of patients with granuloma annulare and lichen sclerosus et atrophicus. Arch Dermatol. 1999; 135: 210-212.

Ackermann R, Horstrup P, Schmidt R. Tick-borne meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth). Yale J Biol Med. 1984; 57: 485-490.

Adler FE, Rose CD, Gibney KM, Fawcett PT. Cross reactivity of antibodies to Epstein-Barr and *Helicobacter pylori* with natural and recombinant proteins of *Borrelia burgdorferi*. 96th General Meeting of American Society for Microbiology. 1996. Paper number V77

Afzelius A. Verhandlugen der dermatologischen gesellschaft ru Stockholm on october 28, 1909. Arch Dermatol Syph 1910; 101-404.

Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. Nat Med 2002; 8: 878-884.

Amouriaux P, Assous M, Margarita D, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction with the 30-kb circular plasmid of *Borrelia burgdorferi* B31 as a target for detection of the Lyme borreliosis agents in cerebrospinal fluid. Res Microbiol 1993; 144: 211-219.

Anaud CM. Lyme disease: seroprevalence and vector survey in Southern Alberta. Canada Communicable Disease Report 1993; 19: 205-209.

Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA, Hyde FW. Culturing *Borrelia burgdorferi* from spleen and kidney tissues of wild-caught white-footed mice, *Peromyscus leucopus*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg 1986; 263: 34-39.

Anderson JF. Prevention of Lyme disease. Pheum Dis Clin North An 1989; 15: 757-766.

Artero JM, Mellado M, Martin Luengo F. Study of cross reactions using serological techniques between *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* Enferm Infecc Microbiol Clin 1991; 9: 127-128.

Arav-Boger R, Crawford T, Steere AC, Halsey NA. Cerebellar ataxia as the presenting manifestation of Lyme disease. Pediatr Infect Dis J 2002; 21: 353-356.

Artsob H, Huibner S. Complement fixation test for the diagnosis of Lyme disease. J Clin Microbiol 1990; 28: 637-638.

Artiago R, Torres G, Guerrero-Espéjo A Jimenez-Mena M, Bayas-Paredes M. Irreversible complete heart block in Lyme disease. *Am J Med* 1991; 90: 531-533.

Asbrink E, Olsson I. Clinical manifestations of *erythema crhonicum migrans* (ECM). A comparison with Lyme disease. *Acta Derm Venereol* 1985; 65: 43-53.

Asbrink E. Cutaneous manifestations of Lyme borreliosis: Clinical diferentiation and diferential diagnosis. *Scand J of Infect Dis* 1991; 77: 44-50.

Asensi JM, Martinez C, Guerrero-Espéjo A, Asensi V, Escudero R, de la Iglesia P, et al. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Lyme en Asturias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1993; 8: 420-424.

Assous MV, Postic D, Paul G, Nevot P, Baranton G. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 261-268.

Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 179-186.

Bakken LL, Case KL, Callister SM, Bourdeau NJ, Schell RF. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. *JAMA* 1992; 268: 891-895.

Bahrmand A, Nekoui H. y Ardekani A.M. Nuevo medio sólido para el crecimiento de *Borrelia persica* y *Borrelia microti*. *Rev Cubana Med Trop* 1996; 48.

Bannwath A. Zurklinik und Pathogenese der "Chronischen Lymphozytaren meningitis". *Arch Psychiat Nervenkr.* 1944; 117: 682.

Baranton G . [Classification of spirochetes infecting man]. *Rev Prat.* 1989 May 18;39:1287-1290.

Baranton G, Postic D, Saint-Girons I. Delineation Of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia Garinii sp*, and group VS 461 associated with Lyme Borreliosis. *Int Syst Bacteriol* 1992; 42: 378-388.

Barbour AG, Burdorfer W, Grunwaldt E and Steere AC. Antibodies of pstients with Lyme disease to components of the *Ixodes dammini* spirochete. *J Clin Invest* 1983a; 72: 504-515.

Barbour AG, Burgdorfer W, Hayes SF, Peter O, Aeschlimann. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol* 1983b; 8: 123-126.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 1984; 57: 521-525.

Barbour AG, Hayes SF, Heiland SA, Schrupf ME, Tessier SL. A *Borrelia*-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun* 1986; 52: 549-554.

Barbour AG. Linear DNA of *Borrelia* species and antigenic variation. *Trends Microbiol* 1988; 1: 236-239.

Barbour AG. The diagnosis of Lyme disease: rewards and perils. *Ann Intern Med* 1989. 110 :501-502.

Barker TL, Richards AL, Laksono E, Sanchez JL, Feighner BH, et al. Serosurvey of *Borrelia burgdorferi* infection among U.S. military personnel: a low risk of infection. Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 804-809.

Barral M, Garcia-Perez AL, Juste RA, Hurtado A, Escudero R, Sellek RE, Anda P. Distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. J Med Entomol 2002; 39: 177-84.

Barthold SW, Moody KD, Beck DS. Susceptibility of laboratory rats to isolates of *Borrelia burgdorferi* from different geographic areas. Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 596-600.

Battsetseg B, Lucero S, Xuan X, Claveria F, Inoue N, Alhassan A, Kanno T, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. Vet Parasitol 2002; 107: 351.

Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast LF. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. N Engl J. Med 1983; 306: 740-742.

Benach JL, Coleman JL, García-Moncó C and Seponte PC. Biological activity of *Borrelia burgdorferi* antigens. Ann NY Acad Sci 1988; 539: 115-125.

Benach J and García-Moncó JC. Aspects of the pathogenesis of neuroborreliosis, pp 1-10. En "Lyme disease: molecular and immunologic approaches 1992; 6 (Schultzer S, ed). Cold Spring Harbor, New York.

Bending JWA, Ogilvie D, Severe encephalopathy associated with Lyme disease. Lancet 1987; I: 681.

Benito-Urbino S, A. Elena, MJ. Castañares y M. Lantero. Enfermedad de Lyme en la Rioja. Med Clin 1990; 3: 95: 598.

Berguer BW. Dermatologic Manifestations of lyme disease. Rev infect Dis 1987; II, Supplemt 6. University of Chicago.

Berger BW. Dermatologic Manifestations of lyme disease. Rev Infec Diseases 1989; II, Supplement 6. University of Chicago. 0162-0886-0889/1105-1125.

Boerlin P, Peter O, Bretz AG, Postic D, Baranton G, Piffaretti JC. Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. Infect Immun 1992; 60: 1677-1683.

Bosler EM, Coleman JL, Benach JL, Massey DA, Hanrahan JP, Burgdorfer W, et al. Natural distribution of the *Ixodes Dammini* Spirochete. Science 1983; 220: 321-322.

Bruce-Chwath LJ, Pull JH. Paludisme: quarantr varietes premiers, ou pretendues. Nouv Press Med 1980; 9: 1547-1580.

Brunner M, Stein S, Mitchell PD, Sigal LH. Immunoglobulin M capture assay for serologic confirmation of early Lyme disease: analysis of immune complexes with biotinylated *Borrelia burgdorferi* sonicate enhanced with flagellin peptide epitope. J Clin Microbiol 1998; 36: 1074-1080.

Brunner. Immunol Methods 2001; 249: 185-190.

Buechner SA, Ruffli T, Erb P. Acrodermatitis chronica atroficans: a cronic T-cell. mediated immune reaction against. *Borrelia burgdorferi*. J Am Aca Dermatol 1993; 28: 399-405.

Bunikis J, Barbour AG. Laboratory testing for suspected Lyme disease. Med Clin North Am 2002; 86: 311-340.

Burdash N, Fernandes J. Lyme borreliosis: detecting the great imitator. J Am Osteopath Assoc 1991; 91: 573-578.

Burkhard C, Gleichmann M, Wilhelm H. Optic nerve lesion following neuroborreliosis: a case report. Eur J Ophthalmol 2001; 11: 203-206.

Burgdorfer W, Barbour OG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis?. Science 1982; 216: 1317-1319.

Burgdorfer W, Lane RS, Barbour AC, Gresbinck RA, Anderson JR. The wesstern blacklegged tick, *Ixodes pacificus* a vector of *Borrelia burgdorferi*. Am J Trop Med Hyg 1985; 34: 925-930.

Burgdorfer W: Vector/Host, relationships of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Rheum Dis Clin North Am 1989; 15: 775-787.

Burkert S, Rossler D, Munchhoff P, Wilske B. Development of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant borrelial antigens for serodiagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection. Med Microbiol Immunol 1996; 185: 49-57.

Campbell GL, Fritz CL, Fish D, Nowakowski J, Nadelman RB, Wormser GP. Estimation of the incidence of Lyme disease. Am J Epidemiol 1998; 148: 1018-1026.

Camponovo F, Meier C. Neuropathy of vasculitic origin in a case of Garin-Boujadoux-Bannwarth syndrome with positive *Borrelia* antibody response. J Neurol 1986; 233: 69-72.

Canica MN, Nato F, du Merle I. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia burgdorferi* sp nov associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scand J Infect Dis 1993; 25: 441.

Caride, E. Prevalencia de la borreliosis canina en Madrid. III Simposio ibérico Ixodoidea y enfermedades transmitidas. Alcalá de Henares 1995. Madrid.

Carlberg H. Naitos. Lyme borreliosis a review and situation in Japan. J Dermatol 1991; 18: 125-142.

Carlsson M, Malmvall BE. *Borrelia* infection as a cause of presenile dementia. Lancet 1987; 2: 798.

Carrasco Miserachs I, Condom Mundo MJ, Sabria Leal M, Pedro-Botet ML. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in an area of Barcelona. Enferm Infecc Microbiol Clin 1992; 10: 242.

Casjens S, Delange M, Ley HL 3rd, Rosa P, Huang WM. Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. J Bacteriol 1995;177: 2769-2780.

Castiella J, Zabala S, Hortells JL, Martinez R., Cebollero M.P., Guillèn G. Enfermedad de Lyme: cuatro casos descritos en la Comunidad de Aragón. Rev Clin Esp 1992; 191: 86-89.

Centers for Disease Control: Update of Lyme disease and cases occurring during pregnancy. MMWR 1985; 34: 376-384.

Centers for Disease Control: Lyme disease-United States, 1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994; 12: 564-572.

Chavanet P, Pillon D, Lancon JP, Waldner-Combernoux, Marigne A, Portier E. Granulomatous hepatitis associated with Lyme disease. Lancet 1987; 12: 623-624.

Chow CC, Evans AS Jr, Noonan-Toly CM, White D, Johnson GS, Marks SJ, et al. Lyme disease trends--Dutchess County, New York, 1992-2000. Mt Sinai J Med 2003; 70: 207-213.

Ciceroni L, Ciarrocchi S. Lyme disease in Italy, 1983-1996. New Microbiol 1998; 21: 407-418.

Coleman JL. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochetes: their role in early diagnosis. J Infect Dis 1987; 155: 756-765.

Cordero del Campillo M Índice catálogo de zoonosis ibérica. *Ixodes ricinus*. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad Segunda S. 1980. 476.

Corpuz M, Hilton E, Lardis P, Singer C, Zolan J. Problems in the use of serologic tests for the diagnosis of Lyme Disease. Arch Intern Med 1991; 151: 1837-1840.

Coyle PK, Schutzer SE, Belman AL, Krupp LB, Golightly MG. Cerebrospinal fluid immune complexes in patients exposed to *Borrelia burgdorferi*: detection of *Borrelia*-specific and -nonspecific complexes. Ann Neurol 1990; 28: 739-744.

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: 631-635.

Cristofolini A. Zoonoses transmitted by ticks in forest workers (tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis): preliminary results. Med Lav 1993; 84: 394-402.

Christensen GD, Simpson WA, Beachy EH. Microbial adherence in infection, pp 6-23. En: Mandel GL, Douglas RG, Bennett XX, (eds.) Principles and practices of infectious diseases 1985. Neww York. John, Wiley and sons.

Curran KL, Fish D. Increased risk of Lyme disease for cat owners. N Engl J Med 1989 19; 320: 183.

Dai Z, Lackland H, Stein S, Li Q, Radziewicz R, Williams S, Sigal LH. Molecular mimicry in Lyme disease: monoclonal antibody H9724 to *Borrelia burgdorferi* flagellin specifically detects chaperonin-HSP60. Biochim Biophe Acta 1993; 1181: 97-100.

Dammin GJ. Erythema *migrans*: a chronicle. Rev infec Dis 1989; 11: 142-151.

Dattwyler RJ, Thomas JA, Benach JL, Golightly MG. Cellular immune response in Lyme disease: the response to mitogens, live *Borrelia burgdorferi*, NK cell function and lymphocyte subsets. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg . 1986; 263: 151-159.

Dattwyler RF, Luft BL. Immunodiagnosis of Lyme Borreliosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1989; 15: 727-734.

Dattwler RJ, Volkman DJ, Conaty SM. Amoxycilin plus probenecid versus doxyciline for treatment of erythema *migrans* borreliosis. *Lancet* 1990; 336: 1404.

Dattwyler RJ, Grunwaldt E, Luft BJ. Clarithromycin in treatment of early Lyme disease: a pilot study. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 468-469.

Defosse DL, Johnson RC. In vitro and in vivo induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1992; 60: 1109-1113.

de Vries H, van Dillen S. Prevention of Lyme disease in dutch children: analysis of determinants of tick inspection by parents. *Prev Med* 2002; 35: 160.

De Koning J, Hoog. Kamp-Korstenje JAA, van der Dinde MR, Crijins HJGM. Demonstration of spirochetes in cardiac biopsies of patients with Lyme disease. *J Infect Dis* 1989; 160: 150-153.

Deltombe T, Hanson P, Boutsen Y, Aloux P, Phyes AJ, Clenn M. Lyme Borreliosis neuropathy. A case report. *Med Rehabil* 1996; 75: 314-316.

De Michelis S, Sewell HS, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Schouls LM, Benes V, Holmes EC, Kurtenbach K. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2128-2133.

des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC 3rd, Fish D. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001; 183: 773-778.

Didier R, Hechemy KE, Baranton G. Cross reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2152-2155.

Dinerman H, Steere AC. Lyme disease associated with fibromyalgia. *Ann Intern Med* 1992; 117: 281-285.

Doby JM, Covatarmanach A, Fages J, Chevrier S. Les spirochètes à tiques chez les professionnels de la forêt. Enquête sérologique chez 653 sujets de dix départements de l'ouest de la France. *Archives de Maladie Professionnel* 1989; 50: 751-757.

Doby JM, Betremieux C, Rolland C, Barrat J. Les grands mammifères forestiers, réservoirs de germe pour *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme? *Rec Med Vet* 1991; 167: 55-61.

Dolan MC, Piesman J, Mbow ML, Maupin GO, Peter O, Brossard M, Golde WT. Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 1998; 35: 465-470.

Donovan BJ, Weber DJ, Rublein JC, Raasch RH. Treatment of tick-borne diseases. *Ann Pharmacother* 2002; 36: 1590-1597.

Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993; 167: 392-400.

Dupuis MJM. Les multiples manifestations neurologiques des infections à *Borrelia burgdorferi*. *Rev Neurol* 1988; 144: 765-775.

Duray PH, Steere AC. Systems pathology by clinical-pathologic stage in human Lyme disease. International Conference on Lyme Disease and Related Disorders. New-York, September 1987. Compendium of Abstracts: 7.

Duray P. Target organs of *Borrelia burgdorferi* infections: Functional responses and histology. En: "Lyme disease: molecular and immunologic approaches. 1992; 6: 11-30. Spritng Harbor, New York.

Durden LA, Oliver JH Jr, Kinsey AA. Ticks (Acari: Ixodidae) and spirochetes (spirochaetaceae: spirochaetales) recovered from birds on a Georgia Barrier Island. J Med Entomol 2001; 38: 231-236.

Dworkin MS, Schwan TG, Anderson DE Jr. Tick-borne relapsing fever in North America. Med Clin North Am 2002; 86: 417-33.

Eberst E, Grosshans E. L'acrodermatite chronique atrophiante ou maladie de Pick. Herxheimer. Med Hyg 1977; 35: 1633-1641.

Edlow JA. Erythema *migrans*. Med Clin North Am 2002; 86: 239-60.

Edly SJ. Lyme disease during pregnancy. New Jersey Medicine 1990; 87: 557-560.

Eicken C, Sharma V, Klabunde T, Lawrenz MB, Hardham JM, Norris SJ, Sacchettini JC. Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. J Biol Chem 2002; 277: 21691-21696.

Ekerfelt C, Masreliez C, Svenvik M, Ernerudh J, Roberg M, Forsberg P. Antibodies and T-cell reactivity to *Borrelia burgdorferi* in an asymptomatic population: a study of healthy blood donors in an inland town district in the south-east of Sweden. Scand J Infect Dis 2001; 33: 806-808.

Elias, C. Estudio de las pruebas serológicas de la enfermedad de Lyme en un grupo de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. 1er. Simposio SIGET. Zaragoza, 1991.

Elsukova LB, Korenberg EI, and Kozin GA. Lyme disease pathogy of pregnancy and fetus. Med Parasitol And Parasitic Dis 1994; 4: 59-61.

Elliott DJ, Eppes SC, Klein JD. Teratogen update: Lyme disease. Teratology. 2001; 64: 276-281.

Endris RG, Cooke D, Amodie D, Sweeney DL, Katz TL. Repellency and efficacy of 65% permethrin and selamectin spot-on formulations against *Ixodes ricinus* ticks on dogs. Vet Ther 2002; 3: 64-71.

Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol. 1995; 33: 419-427.

Eppes SC, Childs JA. Comparative study of cefuroxime axetil versus amoxicillin in children with early Lyme disease. Pediatrics 2002; 109: 1173-1177.

Escudero R, Barral M, Perez A, Vitutia MM, Garcia-Perez AL, Jimenez S, Sellek RE, Anda P. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. J Clin Microbiol 2000; 38: 4026-4033.

Estrada-Peña A; Oteo JA. Vectors of Lyme disease in Spain. Research and Reviews in Parasitology 1991; 51: 101-102.

Fahrer H, van der Linden SM, Sauvain MJ, Gern L, Zhioua E, Aeschlimann A. The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. J Inf Dis 1991; 163: 305-310.

Favia G, Cancrini G, Carfi A, Grazioli D, Lillini E, Iori A. Molecular identification of *Borrelia valaisiana* and HGE-like *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* ticks sampled in north-eastern Italy: first report in Veneto region. Parassitologia 2001; 43: 143-146.

Ferrero Cáncer, M, Benito Ruesca, R, Rubio Calvo, MC. Anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi* en donantes de Huesca. SIGET 1991.

Fikrig E, Berland R, Chen M, Williams S, Sigal LH, Flavell RA. Serologic response to the *Borrelia burgdorferi* flagellin demonstrates an epitope common to a neuroblastoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 183-187.

Fraenkel CJ, Garpmo U, Berglund J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 2002; 40: 3308-3312.

Fraile T. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. 1993.

Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. Blood 2002; 99: 3602-3612.

Frazzon AP, da Silva Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol 2000; 94: 117-125.

Fukunaga M, Sohnaka M, Takahashi Y, Nakao M, and Miyamoto K. Antigenic and genetic characterization of *Borrelia* species isolated from *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan. J Clin Microbiol 1993; 31: 1388-1399.

Fung BP, McHugh GL, Leong JM, and Steere AC. Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. Infect Immun 1994; 62: 3213-3221.

Gajdusek DC. Hypothesis: interference with axonal transport of neurofilament as a common pathogenetic mechanism in certain diseases of the central nervous system. N Engl J Med 1985; 312: 714-719.

García-Moncó JC, Fernandez B, Allen JC and Benach JL. Adherence of the Lyme disease spirochetes to glial cells and cells of glial origin. J Infect Dis 1989; 160: 497-506.

García-Moncó JC. Diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Med Clin 1991; 96: 544-548.

García-Moncó JC, Benach JL, Coleman JL, Goslbe JL, Szczepanski A, Fernandez B, et al. Caracterización de una cepa española de *Borrelia burgdorferi*. Med Clin 1992; 98: 89-93.

- Garcia Monc3 JC, Wheeler CM, Benach JL, Furie RA, Lukehart SA, Stanek G, Steere AC.** Reactivity of neuroborreliosis patients (Lyme disease) to cardiolipin and gangliosides. *J Neurol Sci* 1993; 117: 206-214.
- Garcia-Monc3 JC, Seidman RJ, Benach JL.** Experimental immunization with *Borrelia burgdorferi* induces development of antibodies to gangliosides. *Infect Immun* 1995; 63: 4130-4137.
- García-Moreno JM, G. Izquierdo, J. Chac3n, S. Angulo, M.V. Borobio.** Neuroborreliosis en un paciente con par3lisis supranuclear progresiva: ¿asociaci3n o causa?. *Rev Neurol* 1997; 25:1919-21.
- Garin-Bujadoux.** Paralysis per tiques. *J Med Lyon* 1922; 71: 765.
- Georgilis K, Steere AC, Klempner MS.** Infectivity of *Borrelia burgdorferi* correlates with resistance to elimination by phagocytic cells. *J Infect Dis* 1991; 163:150.
- Gil Collado J, Guill3n Llera JL, Zapatero Ramos LM.** Claves para la identificaci3n de los *Ixodoidea* espa3oles (adultos). *Rev Iber Parasitol* 1979; 39: 107-118.
- Gissler S, Heininger U.** *Borrelia* lymphocytoma ("lymphadenosis benigna cutis"). *Arch Dis Child.* 2002; 87: 12.
- Goellner MH, Agger WA, Burgess JH.** Hepatitis due to recurrent Lyme disease. *Ann Intern Med* 1988; 108: 707-708.
- Golde WT, Robinson-Dunn B, Stobierski MG, Dykhuizen D, Wang IN, Carlson V, et al.** Culture-confirmed reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1015-1019.
- Gomes-Solecki MJ, Wormser GP, Schriefer M, Neuman G, Hannafey L, Glass JD, et al.** Recombinant assay for serodiagnosis of Lyme disease regardless of OspA vaccination status. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 193-197.
- Gondolf KB, Mihatsch M, Curschellas E, Dunn JJ, Batsford SR.** Induction of experimental allergic arthritis with outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1070-1077.
- Graft JE, Grolzicki RL, Steere AC.** Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic test. *J Infect Dis* 1984; 149: 789-795.
- Graft JE, Ficher DK, Steere AC.** Antigens of *Borrelia burgdorferi* reconized during Lyme disease: appearance of a new immunoglobulin M. response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J Clin Invest* 1986; 78: 934-939.
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O.** *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 717-729.
- Grozicki RL, Steere AC.** Comparison of immunoblotting and indirect-ELISA using different antigen preparations for diagnosis early Lyme disease. *J Infect Dis* 1988; 157: 790-797.

Grosshans F, Meyer M, Capesius C, Stoeckel E. Les infiltrations Lymphocytaires areolo-mamelonnaires. Le Lymphocytome cutané de L'aréole mammaire. Ann Dermatol Venereol 1980; 107; 153-161.

Guerrero-Espéjo A, Quereda C, Martí-Belda y Escudero R. Borrelisis de Lyme. ¿Cómo se manifiesta en España ?. Med Clin 1993; 101: 5-7.

Guerrero-Espéjo A. Borreliosis de Lyme: criterios diagnósticos. Grupo de trabajo en Borreliosis de Lyme. Enf Infect Microbiol Clin 1994; 12: 8.

Guner E. Complement evasion by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* grown in host-derived tissue co-cultures: role of fibronectin in complement resistance. Experientia 1996; 52: 364-372.

Gutierrez J, Maroto MC, De la Higuera A, Guerrero M, Padilla E, Piedrola G. Three-year study of antibody to *Borrelia burgdorferi* in southern Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14: 542-546.

Guttman D, Wang P, Wang I, Bosler E, Luft B and Dykhuizen. Multiple infections of *Ixodes scapularis* Tics by *Borrelia burgdorferi* as revealed by single-strand coformation polymorphism analysis. Clinical Microbiol 1996; 34: 652-656.

Haass A, Treib J. Neurologic manifestation and classification of borreliosis. Infection 1996; 24: 467-469.

Habicht GS, Beck G, Benach JL. Lyme disease: spirochetes induce human and murine interleukin I production. J Immunol 1985; 124: 3147.

Habicht GS, Beck G, Benach JL. Lyme disease. Sci Am. 1987; 257: 78-83.

Halkier-Sorenren L, Krgballe K, Hansen K. Antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagelum in patients with scleroderma, granuloma annulare and porphyria cutánea tarda. Acta Derm Venereol 1989; 69: 116-119.

Halpering JJ, Coylw PK, Daltwyler RJ. Lyme disease: a spirochete asociated, treatable polyneuropathy. Clin Res 1986; 34: 519A.

Hansen K, Hindersson P, Pedersen NS. measurement of antibodies of *Borrelia burgdorferi* Flagella improves serodiagnosis in Lyme disease. J Clin Microbiol 1988; 26: 338-346.

Hard S. Erythema *chronicum migrans* (Afcelli) associated with mosquito bite. Acta Dem Venered 1966; 46: 473-476.

Hauser W. Aetiologie and Pathogenese der Akrodermatitis chronica atrophicans. Hautarzt 1955; 6: 77-80.

Hauser W. [Chronic atrophic acrodermatitis] Ergeb Inn Med Kinderheilkd. 1965;22:58-89. German.

Hausman G. Acrodermatitis crónica atrófica: una borreliosis. Piel 1987; 2: 325.

Hayney MS, Grunske MM, Boh LE. Lyme disease prevention and vaccine prophylaxis. *Ann Pharmacother* 1999; 33:723-729.

Henriksson A, Link H, Cruz M, Stiernstedt G. Immunoglobulin abnormalities in cerebrospinal fluid and blood over the course of lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). *Ann Neurol* 1986; 20: 337.

Hercogova J. *Borrelia burgdorferi*: a protagonist in Lyme disease, a bystander in morphea? *Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 98-99.

Heroldova M, Nemeč M, Hubalek Z. Growth parameters of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* at various temperatures. *Zentralbl Bakteriol* 1998; 288: 451-455.

Hilton E, Tramontano A, DeVoti J, Sood S K. Temporal study of immunoglobulin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:774-776

Hoffman JC, Stichtenothi DO, Zeidler H, Follmann M, Brandis A, Stanek G, et al. Lyme disease in a 74 year old forest owner with symptoms of dermatomyositis. *Arthritis and Rheumatism* 1995; 38. 1157-1160.

Hovmark A, Asbrink E, Olsson I. The spirochetal etiology of lymphadenosis benigna cutis solitaria. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 479-484.

Holmes CE. Lyme disease-United States, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994; 43: 564-572.

Hristea A, Hristescu S, Ciufecu C, Vasile A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Romania. *Eur J Epidemiol* 2001;17: 891-896.

Huebner RC, Gray MA, Holt J, Wu XD, Mays JP. Characterization of a recombinant outer surface protein A (OspA) vaccine against Lyme disease. *Dev Biol* 2000; 103: 163-173.

Humair PF, Gern L. Relationship between *Borrelia burgdorferi sensu lato* species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* 1998; 69: 213-227.

Humair P, Gern L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect* 2000; 2: 915-922.

Humair PF. Birds and *Borrelia*. *Int J Med Microbiol* 2002; 33: 70-74.

Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2431-2436.

Huppertz HI, Bohme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme borreliosis in the Wurzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 697-703.

Hyde FW, Johnson RC, White TJ and Shelburne CE. Detection of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. *Clinical Microbiol* 1989; 27: 58-61.

Issakainen J, Gnehm HE, Lucchini GM, Zbinden R. Value of clinical symptoms, intrathecal specific antibody production and PCR in CST in the diagnosis of childhood Lyme neuroborreliosis. *Klin-Pediatr* 1996; 208: 106-109.

Jaulhac B, Nicolini P, Piemont, Monteil H. Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *N Engl J Med* 1991; 324: 1440.

Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov. : etiologic agent of Lyme disease. *Int J Sys Bacteriol* 1984; 34: 496-497.

Johnston YE, Duray PH, Steere AC, Kashgarian M, Buza J, Malawista SE, et al. Lyme arthritis. Spirochetes found in synovial microangiopathic lesions. *Am J Pathol* 1985; 118: 26-34.

Jones K, Guidry J, Wittung-Stafshede P. Characterization of surface antigen from Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 389-394.

Jones TF, Garman RL, LaFleur B, Stephan SJ, Schaffner W. Risk factors for tick exposure and suboptimal adherence to preventive recommendations. *Am J Prev Med* 2002; 23: 47-50.

Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marjamaki M, Viljanen MK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1361-135.

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: 911-915.

Kalish RA, Leong JM, Steere AC. Early and late antibody responses to full-length and truncated constructs of outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. *Infect Immun* 1995; 63: 2228-2235.

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: 780-785.

Kamradt T, Krause A, Burmester GR. A role for T cells in the pathogenesis of treatment-resistant Lyme arthritis. *Mol Med* 1995; 1: 486-490.

Kamradt T. Lyme disease and current aspects of immunization. *Arthritis Res* 2002; 4: 20-29.

Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 843-848.

Kenet GV. Smith eds. Insect and other arthropods of medical importance British Museum (Natural history). 1973.

Kitten T, Barbour AG. The relapsing fever agent *Borrelia hermsii* has multiple copies of its chromosome and linear plasmids. *Genetics* 1992;132: 311-324.

Köler J, Kasper J, Kern V, Rehse-Küpper B. *Borrelia* encephalomyelitis. *Lancet* 1986; 2: 35.

Kosik-Bogacka D, Bukowska K, Kuzna-Grygiel W. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in mosquitoes (Culicidae) in recreational areas of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9: 55-57.

Kuiper, H. de Jongh BM, Nauta AP, Houweling H, Wiessing LG, van Charante AW, Spanjaard L. Lyme borreliosis in dutch forestry workers. *J Infect* 1991; 23: 279-286.

Krause A, Brade V, Schoerner C, Solbach W, Kalden JR, Burmester GR. T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 393-402.

Krause PJ, Telford SR 3rd, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA* 1996; 275: 1657-1660.

Krause PJ. Babesiosis. *Med Clin North Am* 2002; 86: 361-373.

Lavrich SD, Callister Sm. Lim seroprotective groups of Lyme *Borreliosis Spirochetes* from North America and Europe. *J Infect Dis* 1994; 170: 115-121.

Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 921-925.

Lebech A-M, Clemmensen O, Hansen K. Comparison of *in vitro* culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. *J Med Microbiol* 1993; 38: 38-43.

Lebech AM, Hansen K, Brandrup F, Clemmensen O, Halkier-Sorensen L. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in clinical specimens from patients with erythema *migrans* and Lyme neuroborreliosis. *Mol Diagn* 2000; 5: 139-150.

Lesniak OM. Isolated lymphadenopathy as manifestation of the earli stage of Lyme Borreliosis. *Klin Med Mosk* 1995; 73: 38-39.

Liebisch G, Hoffmann L, Pfeiffer and Liebisch. The infection with *Borrelia burgdorferi* sl in the red fox (*vulpes vulpes*) and its ticks. *Parasitologia* 1996; 38:386.

Liebisch G, Sohns B and Bautsch W. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi sensu Lato* in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. *Clin Microbiol* 1998; 36: 3355-3358.

Lipschütz B. Uber eine seltene Erythemform (Erytema chronicum *migrans*). *Arch. Dermatol Syph* 1918; 118: 349-356.

Lipsker D, Hansmann Y, Limbach F, Clerc C, Tranchant C, Grunenberger F, et al. GEBLY Study Group. Study Group for Lyme Borreliosis. Disease expression of Lyme borreliosis in northeastern France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 225-230.

Longwoth DL: The challenge of Lyme disease. *Cleve Clin J Med* 1990; 57: 453-463.

López Prieto, M.D., Borobio, MV. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en la población de Sevilla. *Enf Inf Microbiol Clin* 1989; 7: 489-490.

Luft BJ, Gorevic PD, Jiang W, Muñoz P, Dattwyler RJ. Immunologic and structural characterization of the dominant 66 to 73 kDa antigens of *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 1991; 146: 2776-2782.

Luft BJ, Steinman CR, Neimark HC, Muralidhar B, Rush T, Finkel MF, et al. Invasion of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* in acute disseminated infection. JAMA 1992; 267:1364-1367.

Lugar SW: Lyme disease transmission by a biting fly. N Engl J Med 1990; 322: 1752.

Luke CJ, Carner K, Liang X, Barbour AG. An Osp A based DNA. Vaccine protects mice against infection with *Borrelia burgdorferi*. J Infect Dis 1997; 175: 91-97.

Luyasu V, Mullier S, Bauraind O, Dupuis M. An unusual case of anti-*Borrelia burgdorferi* immunoglobulin G seroconversion caused by administration of intravenous gammaglobulins. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 697-699.

Magnarelli LA, Anderson JF. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease: reactivity of subunits of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 1988; 26: 1482-1486.

Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF, Riviere GR. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. J Clin Microbiol 1990; 28: 1276-1279.

Magnarelli LA, Fikrig E, Padula SJ, Anderson JF, Flavell RA. Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 237-240.

Magnarelli LA, Ijdo JW, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. J Clin Microbiol 2000; 38:1735-1739.

Magnarelli LA, Lawrenz M, Norris SJ, Fikrig E. Comparative reactivity of human sera to recombinant VlsE and other *Borrelia burgdorferi* antigens in class-specific enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme borreliosis. J Med Microbiol 2002; 51: 649-655.

Maimone D, Villanova M, Stanta G, Bonin S, Malandrini A, Guazzi GC, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA and complement membrane attack complex deposits in the sural nerve of a patient with chronic polyneuropathy and tertiary Lyme disease. Muscle Nerve 1997; 20: 969-975.

Majsky A, Bojar M, Jirons J. Lyme disease and HLA-DR antigens. Tissue antigens 1987; 30: 188.

Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2427-2434.

Marques AR, Martin DS, Philipp MT. Evaluation of the C6 peptide enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. J Clin Microbiol 2002; 40: 2591-2593.

Markowitz LE, Steere AC, Benach JL. Lyme disease during pregnancy. JAMA 1986; 225: 3394-3396.

Martinez A, Asensi JM, Iglesia R. Seroprevalence against *B. Burgdorferi* Abstr. 6th. Congreso Europeo. Clin Microbiol Infect Dis 1993; 342: 127.

Massarotti EM, Luger SW, Rahn DW, Messner RP, Wong JB, Johnson RC, et al. Treatment of early Lyme disease. *Am J Med* 1992; 92: 396.

Masson C. Aspects neurologiques de la maladie de Lyme. *La Presse Medicale* 1987; 16: 72-75.

Masuzawa T, Okada Y, Yanagihara Y, Sato N. Antigenic properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus* in Hokkaido. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1568-1573.

Masuzawa T, Komikado T, Iwaki A, Suzuki H, Kaneda K, Yanagihara Y. Characterization of *Borrelia sp.* isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *FEMS Microbiol Letters* 1996; 142: 77-83.

May and Jabbari B. Stroke in neuroborreliosis. *Stroke* 1990; 21: 1232-1235.

McDonald AB. *Borrelia* in the brains of patients dying with dementia. *JAMA* 1986; 256: 2195-2196.

McDonald AB, Miranda JM. Concurrent neocortical borreliosis and Alzheimer disease. *Hum Pathol* 1987; 18: 759-61.

McDonald AB. Gestational Lyme borreliosis: Implications for the fetus. *Pneum Dis: Clin North Am* 1989; 15: 657-679.

McDowell JV, Sung SY, Hu LT, Marconi RT. Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with lyme disease spirochetes. *Infect Immun* 2002; 70: 4196-4203.

Mensi N, Webb DR, Turck CW, Peltz GA. Characterization of *Borrelia burgdorferi* proteins reactive with antibodies in synovial fluid of a patient with Lyme arthritis. *Infect Immun* 1990; 58: 2404-2407.

Midgard R, Mofstad H. Unusual manifestations of Nervou system *Borrelia burgdorferi* infection. *Arch Neurol* 1987; 44: 781.

Miller JL. CDC issues recommendations on use of Lyme disease vaccine. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56: 1484-1486.

Millner M, Schimek MG, Spork D, Schnizez M, Stanek G. Lyme Borreliosis in children. A controled clinical study based on ELISA. values. *Eur J Pediatr* 1989; 148: 527-530.

Misonne M, Van Impe G and Hoet P. Genetic heterogenety of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *Clin Microbiol* 1998; 36: 3352-3354.

Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 724-727.

Morel P. Lessignes cutanés de la maladie de me et de sa variante europeenne. *Rech Dermatol* 1988; 1: 426-423.

Moscattello AL, Worden DL, Nadelman RB, Wormser G. Otolaryngologic aspects of Lyme disease. *Laryngoscope* 1991; 101: 592-595.

Moter SE, Hofmann H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2980-2988.

Nadal D, Wunderli W, Briner H, Hansen K. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers and blood donors from the same region in Switzerland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 992-995.

Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Goldberg NS, Bittker S, Cooper D, et al. The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. Am J Med 1996; 100: 525-528.

Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis. Lancet 1998; 352: 557-565.

Neuschafer-Rube C, Haase G, Angerstein W, Kremer B. Unilateral recurrent nerve paralysis in suspected Lyme Borreliosis. HNO 1995; 43: 188-190.

Nefedova VV, Korenberg EI, Nesterenko LN, Gintsburg AL, Kovalevskii IuV, Gorelova NB. Comparative evaluation of the efficacy of *Borrelia* indication in ixodes ticks (Ixodidae) using dark field microscopy and polymerase chain reaction (PCR). Parazitologiya 2001; 35: 3-8.

Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ, Persing DH, Logigian EL, Schmid CH, Steere AC. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. J Infect Dis 1996; 174: 623-627.

Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii* western blots (immunoblots) J Clin Microbiol 1996; 34: 1732-1738.

Nowakowski J, Schwartz I, Liveris D, Wang G, Aguero-Rosenfeld ME, Girao G, et al. Lyme Disease Study Group. Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema *migrans*: a comparison of different techniques. Clin Infect Dis 2001; 33: 2023-2027.

Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. Piesman J, de Silva AM. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 670-675.

Onrust SV, Goa KL. Adjuvanted Lyme disease vaccine: a review of its use in the management of Lyme disease. Drugs 2000; 59: 281-299.

Oteo JA. 1990a. Tesis doctoral. Universidad de Navarra.

Oteo JA. Garrapatas: cien años como vector. Rev Clin Esp 1990b; 1: 1-2.

Oteo JA, Martinez de Artola V, Casas JM, Estrada Pena A. Enfermedad de Lyme en la Rioja. Med Clin 1990c; 96: 599 .

Oteo JA. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia Burgdorferi* en una población de riesgo. Simposium COFAL sobre enf de Lyme. Madrid. 1992a.

Oteo JA, Gómez-Cadiñanos, Martinez de artola V, Rosel L. Eritema anular tras picadura de garrapata. Enf Infecc Microbiol Clin 1992b; 10: 233-234.

Oteo JA, Martinez de Artola V, Casa J, Lozano A, Fernandez Calvo JL, et al. Epidemiology and prevalence of seropositivity against *Borrelia*, Rev Epidemiol Santé Publique 1992c; 40: 85-92.

Oteo JA, Elias Calvo C, Martinez de Artola V, Perez Surribas D. Infeccion por *Borrelia burgdorferi* en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Un problema diagnostico. Med Clin 1993; 101: 207-209

Oteo JA. Borreliosis de Lyme. Junta de Castilla y León. Imp. Heraldo de Zamora 1994. Zamora.

Oteo JA y V Martinez de Artola. Borreliosis de Lyme: aspectos epidemiológicos y etiopatogénicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13: 550-555.

Oteo JA, Backenson PB, del Mar Vitutia M, Garcia Monco JC, Rodriguez I, Escudero R, et al. Se of the C3H/He Lyme disease mouse model for the recovery of a Spanish isolate of *Borrelia garinii* from erythema *migrans* lesions. Microbiol 1998; 149: 39-46.

Pachner AR, Steere AC. The trial of neurologic manifestations of Lyme disease: Meningitis, cranial neuritis and radiculoneuritis. Neurology 1985; 35: 47.

Pachner A, Wei-fen Zang, Schaefer H, Schaefer S and O'Neill T. Detection of Active Infection in Nonhuman Primates With Lyme Neuroborreliosis: Comparison of PCR, Culture, and Bioassay. Clin Microbiol 1998; 36: 3243-3247.

Paparone PW. Polymyalgia reumatica or Lyme disease? How to avoid misdiagnosis in older patients. Postgrad-Med 1995; 97: 161-164.

Parenti D. Lyme disease vaccine-LYMERix. Conn Med. 1999; 63: 570.

Pavia CS, Wormser GP, Bittker S, Cooper D. An indirect hemagglutination antibody test to detect antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease. J Microbiol Methods 2000; 40: 163-173.

Peltomaa M, Pyykko I, Seppala I, Viljanen M. Lyme borreliosis and facial paralysis--a prospective analysis of risk factors and outcome. Am J Otolaryngol 2002; 23: 125-132.

Persing DH, Rutledge BJ, Rys PN, Podzorski DS, Mitchell PD, Reed KD, et al. Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. J Infect Dis 1994; 169: 668-672.

Pfister HW, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. Lancet 1994 343: 1013-1016.

Pichon B, Gilot B, Perez-Eid C, Bruno P, Bruno G, Claudine PE. Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. Eur J Epidemiol 2000; 16: 869-873.

Phillips SE, Mattman LH, Hulinska D, Moayad H. A proposal for the reliable culture of *Borrelia burgdorferi* from patients with chronic Lyme disease, even from those previously aggressively treated. *Infection* 1998; 26: 364-367.

Piesman J, Malther TH, Sinsky RJ. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 557-558.

Pinto DS Cardiac manifestations of Lyme disease. *Med Clin North Am* 2002 ; 86: 85-96

Picken RN. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 99-114.

Picken MM, Picken RN, Han D, Cheng Y, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, et al. A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Mol Pathol* 1997a; 50: 186-193.

Picken RN, Strle F, Ruzic-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman et al. Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates from five patients with solitary lymphocytoma. *J Invest Dermatol* 1997b; 108: 92-97.

Pohl-Koppe A, Logigian EL, Steere AC, Hafler DA. Cross-reactivity of *Borrelia burgdorferi* and myelin basic protein-specific T cells is not observed in borrelial encephalomyelitis. *Cell Immunol* 1999 25; 194: 118-123.

Pollack RJ, Telford SR 3rd, Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1251-1255.

Porwancher R. A reanalysis of IgM Western blot criteria for the diagnosis of early Lyme disease. *J Infect Dis* 1999; 179: 1021-1024.

Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G. Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3497-3504.

Preac-Mursic V, Wilske B, Reinhardt S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 1076-1079

Preac-Mursic V, Wilske B, Patsouris E, Jauris S, Will G, Soutschek E, et al. Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *Infection* 1992; 20: 342-349

Purser JE, Norris SJ. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13865-13870.

Rabb DC, Leshner JL, Chandler JR. Polymerase chain reaction confirmation of *Borrelia burgdorferi* in benign lymphocytic infiltrate of dermis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 267-268.

Rahn DW. Lyme vaccine: issues and controversies. *Infect Dis Clin North Am.* 2001; 15: 171-187.

Randolph Se, Gern LE and Nittall PA. Cofeeding Ticks : epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today* 1996; 12: 472-479.

Rath PM, Marsch WC, Brade V, Fehrenbach F. Serological distinction between syphilis and Lyme borreliosis. Zentralbl Bakteriol 1994; 280: 319-324.

Raoult D, Roux V. The body louse as a vector of reemerging human diseases. Clin Infect Dis 1999; 29: 888-911.

Reik L, Burgdorfer W, Donaldson JD. Neurologic abnormalities in Lyme disease with out erytema chronicum migrans. Am J Med 1986; 81: 73.

Rojo Vázquez J. Seroprevalencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia conorii* en la población humana y canina de la población de San Andrés de Rabanedo (León, España). Rev Esp Salud Publica 1997; 71: 173-180..

Rousseau JJ, Lust C, Zangerle P, Bigaignon G. Acute transverse myelitis as presenting neurological feature of Lyme disease. Lancet 1986; 2: 1222.

Ryffe K, Olivier Peter, Luc Binet, Eric Dayer. Interpretation of immunoblots for Lyme borreliosis using a semi-quantitative approach Infectious Diseases and Immunology, CH-1950 Sion ²Labodia, CH-1137 Yens. Clin Microbiol Infec 1998; 4: 205-212.

Ryskova O, Vyslouzil L, Honegr K, Lesna J, Horacek J, Skrabkova Z. Lyme borreliosis-incidence of serum anti-myelin antibodies Epidemiol Mikrobiol Imunol 2002; 51: 60-65.

Ruel M, Doumon E. La maladie de Lyme. Ann Med Int 1988; 139: 555-574.

Sadziene A, Barbour AG. Growth inhibition of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by antibodies. A contribution to understanding the pathogenesis and improving diagnosis of Lyme borreliosis. Wien Med Wochenschr 1995; 45: 162-165.

Saz JV, Merino FJ y Beltran M. Situación actual de la enfermedad de Lyme en España: aspectos clínicos y epidemiológicos. Rev Clín Esp 1995; 195: 44-49.

Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rolleke S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. J Microbiol Methods 2003; 52: 251-260.

Schmidt BL, Aberer E, Stockenhuber C, Wagner Ch, Klade H, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi*-DNA in urine from patients with Lyme borreliosis. J Spirochetal and Tick-Borne Diseases 1995; 2: 76-81.

Schmid GP. The global distribution of Lyme disease. Rev Infect Dis 1985; 7: 41.

Schouls L, Van de Pol I, Sjoerd G, Rijpkema T and Schot. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 1999; 37: 2215-2222.

Schoen RT, Deshefy-Longhi T, Van-Hoecke C, Buscarino C, Fikrig E. An open-label, nonrandomized, single-center, prospective extension, clinical trial of booster dose schedules to assess the safety profile and immunogenicity of recombinant outer-surface protein A (OspA) Lyme disease vaccine. Clin Ther 2003; 25: 210-224.

Schwan TG, Schrupf ME, Hinnebusch BJ, Anderson DE Jr, Konkel ME. GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2483-2492.

Schutzer SE, Coyle PK, Belman AL, Golightly MG, and Drulle J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* 1990; 335: 312-315.

Schutze TL, Bouen GS, Bosler EM. *Amblyoma*: A potential vector of Lyme disease in New Jersey. *Science* 1984; 224; 601-603.

Schwan TG, Burgdorfer W, Schrupf ME, Karstens RH. The urinary bladder, a consistent source of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J Clin Microbiol* 1988; 26: 893-895.

Sellati TJ, Burns MJ, Ficazzola MA, Furie MB. *Borrelia burgdorferi* upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils *in vitro*. *Infect Immun* 1995; 63: 4439-4447.

Sigal LH, Tatum AH. Lyme disease patients serum contains IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* that cross-react with neuronal antigens. *Neurology* 1988; 38: 1439.

Sigal LH. Lyme borreliosis (Lyme disease): interactions of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with humans (and other mammalian) host. *Bul Inst Pasteur* 1998; 96: 189-206.

Silberer M, Koszik F, Stingl G and Aberer A. Down regulation of MHC class II molecules on langerhans cells in acrodermatitis chronica atrophicans. *Br J Dermatol* 2000; 143: 786-794.

Smith, HV, Gray JS, Mckenzie G. A Lyme borreliosis human serosurvey of asymptomatic adults in Ireland. *Int J Med Microbiol* 1991; 275: 382-389.

Smith R, O'Connell S, Palmer S. Lyme disease surveillance in England and Wales, 1986-1998. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 404-407.

Simon AK, Seipelt E, Wu P, Wenzel B, Braun J, Sieper J. Analysis of cytokine profiles in synovial T cell clones from chlamydial reactive arthritis patients: predominance of the Th1 subset. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 122-126.

Snydman DR, Schenkein DP, Berandi VP, Lastavica C, Pariser K, *Borrelia burgdorferi* in joint fluid chronic Lyme arthritis. *Ann Intern Med* 1986; 104: 798-800.

Sonck CE. Erythema chronicum migrans with multiple lesions. *Acta Derm Venereol* 1965; 45: 34-36.

Spapach DH, Liles WC, Campbell GL, Quick RE, Anderson DE, Frietsche TR. Tick-Borne Disease The United States. *N Med* 1993; 329: 936-947.

Spielman A, Wilson ML, Levine JF, Piesman J. Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu Rev Entomol* 1985; 30: 439-60.

Spyridaki I, Psaroulaki A, Loukaides F, Antoniou M, Hadjichristodolou C, Tselentis Y. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 86-90.

Stamouli M, Totos G, Braun HB, Michel G, Gizaris V. Very low seroprevalence of Lyme borreliosis in young Greek males. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 495-496.

Stanczak J, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Lozowska W, Dabrowski J, Adamczyk A, Markowska M. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. *Ann Agric Environ Med* 1999; 6: 127-132.

Stanczak J, Okroy-Rysop G, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Lozowska W. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the selected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) population in Weilburg forests, Hesse, Germany. *Int J Med Microbiol* 2002; 33: 206-289.

Stedingk LV. von, Olsson I, Hanson HS, Asbrink E. Polymerase Chain Reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme Borreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 1-5.

Steere AC, Barthnngen NH, Graft. JE. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1983; 99: 76-82.

Steere AC, Feld J, Winchester R. Association of chronic Lyme arthritis with increased frequency of Dr4 and Dr3. *Arthritis Rheum* 1988; 31: S98.

Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 1989; 321: 586-596.

Steere A., Dwyer E and Winchester R. Association of treatment-resistant chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N England J Med* 1990; 323: 219-223.

Sterman AB, Nelson S, Barclay P. Demyelinating neuropathy accompanying Lyme disease. *Neurology* 1982; 32: 1302.

Stiernstedt G, Gustaffson R, Karlsson M, Svenungsson B. Clinical manifestations and diagnosis of neuroborreliosis. *Ann N Acad Sci* 1988; 539: 46-55.

Strmen P, Broskova D, Stanislavova M, Kmety E, Mateicka F. Retrobulbar neuritis associated with *Borrelia afzelii* infection. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103: 94.

Straubinger RK, Dharma Rao T, Davidson E, Summers BA, Jacobson RH, Frey AB. Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. *Vaccine* 2001 12; 20: 181-193.

Strle F, Nelson JA, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, et al. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema *migrans*. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 61-65.

Sugiyama Y, Sugiyama F, Yagami K. Comparative study on cross-reaction of leptospiral antibodies in several serological tests to detect antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs. J Vet Med Sci 1993; 55: 149-151.

Takada N, Ishiguro F, Fujita H, Wang HP, Wang Jc and Masuzawa T. Lyme disease spirochetes in ticks from Northeastern China. J Parasitol 1998; 84: 499-504.

Tamayo L, García-Moncó JC, Bratos MA. Anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en un grupo de población de Valladolid. Enf Infecc Microbiol Clin 1990; 8: 663-664.

Trejevo RT, Krause PJ, Sikand VK, Schriefer M, Ryan R, Lepore T, et al. Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. J Infect Dis 1999; 179: 931-938.

Ulvestad E, Kanestrom A, Sonstebj LJ, Jureen R, Omland T, et al. Diagnostic and biological significance of anti-p41 IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi*. Scand J Immunol 2001; 53: 416-421.

Uruñuela Bernedo J, Díaz Sosa D. Eritema crónico *migrans*. Actas Dermosifilográficas 1977; 68: 109-110.

van Dam AP, Kuiper H, VosKI. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis 1993; 17: 708-717.

van Dam AP. Recent advances in the diagnosis of Lyme disease. Expert Rev Mol Diagn. 2001; 1: 413-427.

Wallich R, Moter SE, Simon MM, Ebnet K, Heiberger A, Kramer MD. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. Infect Immun 1990; 58: 1711-1719.

Wallich R, Helmes C, Schaible UF. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of OspA, Fla HSP60, and HSP 70 gene probes. Infect Immun 1992; 60: 4856-4866.

Waniek C, Prohovnik I, Kauffman MA. Rapid progressive type dementia associated with Lyme disease and subcortical degeneration. En: Abstracts of the VII Annual International Scientific Conference on Lyme Borreliosis 1994. Hartford, Conn, Lyme Disease Foundation.

Waniek C, Prohovnik I, Kauffman MA, Dwork AJ. Rapidly progressive frontal-type dementia associated with Lyme disease. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1995; 7: 345-347

Wang WZ, Fredrikson S, Xiao BG, Sun JB, Kostulas V and Link H. Lyme neuroborreliosis: cerebrospinal fluid contains myelin protein-reactive cells secreting interferon-gamma. Eur J Neurol 1996; 3: 122-129.

Wang G, van Dam AP, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999; 12 : 633-653.

Wang G, van Dam AP, Dankert J. Two distinct ospA genes among *Borrelia valaisiana* strains. Res Microbiol 2000; 151: 325-331.

Weber K. Erythema chronicum *migrans* meningitis, a bacterial infectious disease? Munch Med Wochenschr 1974; 116: 1993-1998.

Widhe M, Grusell M, Ekerfelt C, Vrethem M, Forsberg P, Ernerudh J. Cytokines in Lyme borreliosis: lack of early tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 responses are associated with chronic neuroborreliosis. Immunology 2002; 107: 46-55.

Wilske B, Preac-Mursic V, Göbel UB. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J Clin Microbiol 1993a; 31: 340-350.

Wilske B, Preac-Mursic V Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis, pp 267-300. En: Weber K, Burgdorfer W (ed) Aspects of Lyme borreliosis. (1993b) Springer, Berlin, New York.

Wilske B. Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis. Int J Med Microbiol 2002; 33: 114-119.

Winwardke, Smith JL, Culbertson W. Ocular Borreliosis. Am J Ophthalmol 1989; 108: 651-657.

Yu Z, Tu J and Chu Yh. Confirmation of cross-reactivity between Lyme antibody H9724 and human heat shock protein 60 by a combinatorial approach. Anal Chem 1997; 69: 4515-4518.