

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO



Seropositividad contra *Borrelia burgdorferi* en una población mexicana con sintomatología sugestiva de Enfermedad de Lyme.

Por

M.C.P. CASSANDRA MICHELE SKINNER TAYLOR

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Mayo 2008

Seropositividad contra *Borrelia burgdorferi* en una población mexicana con sintomatología sugestiva de Enfermedad de Lyme.

Aprobación de la Tesis:

Dra. en C. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ
Director de Tesis

Dr. en C. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO
Co-Director de Tesis

Dr. en C. JOSE ANTONIO SALINAS MELENDEZ
Co-Director de Tesis

Dr. en C. OLIVERIO WELSH
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. ARTHUR WEINSTEIN
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. en med DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a las personas que colaboraron conmigo para la realización de esta tesis, destacadamente a la Dra en C. Maria del Socorro Flores González, Directora de tesis, por orientación científica, paciencia, entusiasmo y apoyo invaluable como maestra y amiga.

A mi maestro y padre intelectual Dr. en C. Mario Alberto Garza Elizondo, Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario, Co-Director de Tesis que siempre creyó en mi y apoyó para que este proyecto se hiciera realidad.

A mi compañero y amigo Dr. en Med. Jorge Antonio Esquivel Valerio por su generosidad, consejos y tiempo empleado para el desarrollo del trabajo.

A mi amiga y consejera Dra. Jacqueline Rodríguez Amado por sus comentarios y apoyo en todos los aspectos logísticos del trabajo.

A la Dra. Cinthia Salinas Palacios, Pasante de Medicina por contagiar su capacidad de organización en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Francisco Medina Rodríguez por su asesoría y apoyo invaluable desde la ciudad de México.

Al Dr. en C. José Antonio Salinas Meléndez por ser mi inspiración al pensar en la existencia de la enfermedad en nuestro medio así como sus aportaciones en la realización de la técnica de PCR.

Al Dr. Francisco Martínez que siempre me impulsó a perseguir mi sueño.

A los Drs. Eloy Cárdenas Estrada, y Juan Fernando Góngora Rivera, por su asesoría metodológica y estadística.

A la Licenciada en enfermería Dina Castro Mejía y el QFB Andrés Mendiola Jiménez por su invaluable apoyo con las muestras y pacientes.

A todas aquellas personas que, de una u otra forma, han colaborado para que este trabajo llegara a buen término, especialmente mis compañeras de trabajo Diana, Brenda, Chayo y Alicia, mis amigas incondicionales Liliana Solís de Bonfil y Diana Flores de la Garza.

A los Maestros y residentes del servicio de Reumatología, Dermatología, y Neurología por creer en el proyecto y aportar sus pacientes.

Y a los pacientes participantes, personas enfermas que depositan en nosotros su confianza y su esperanza, y quienes constituyen nuestra más importante razón de ser como médicos e investigadores clínicos.

DEDICATORIA

Esta tesis, como prácticamente todas mis actividades académicas y profesionales, nunca hubiera sido posible sin el indeclinable soporte de mi compañero de vida Marcos a quien dedico este trabajo.

Al mismo tiempo, también deseo dedicarlo a mis hijos Stephanie, Marcos y Franklin, a mis padres y a toda mi familia, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante.

Dios los bendiga a todos.

| | |
|---|-----------|
| 1.12 Originalidad..... | 59 |
| 1.13 Justificación..... | 60 |
| 1.14 Hipótesis..... | 62 |
| 2. OBJETIVOS..... | 63 |
| 2.1 Objetivo general..... | 63 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 63 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 64 |
| 3.1 Estrategia general..... | 65 |
| 3.2 Período y población de estudio..... | 65 |
| 3.2.1 Criterios de inclusión..... | 66 |
| 3.2.2 Criterios de exclusión..... | 69 |
| 3.3 Diagnóstico Serológico..... | 70 |
| 3.3.1 Enzimoimmunoanálisis ELISA..... | 71 |
| 3.3.1.2 ELISA C6 (Immunitics, Boston, MA, Estados Unidos)..... | 71 |
| 3.3.1.3 ELISA IgM e IgG (NOVA TEC Immundiagnóstica GmbH, Dietzenbach, Alemania)..... | 73 |
| 3.3.1.4 ELISA IgG (NOVA TEC Immundiagnóstica GmbH, Dietzenbach, Alemania)..... | 74 |
| 3.4 Inmunotransferencia WESTERN BLOT IgG (EUROIMMUN; Alemania)..... | 75 |
| 3.5 PCR (Reacción de cadena de polimerasa)..... | 77 |
| 3.6 Estudios adicionales..... | 78 |
| 3.6.1 Pruebas serológicas para hepatitis B (MONOLISA Ag HBs PLUS)..... | 78 |
| 3.6.2 Pruebas serológicas para hepatitis C..... | 78 |
| 3.6.3 Pruebas serológicas para detección de virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y 2..... | 78 |
| 3.6.4 Pruebas serológicas para infección por <i>Treponema pallidum</i> | 79 |
| 3.7 Equipo..... | 79 |
| 3.8 Análisis estadístico..... | 79 |
| 3.9 Definición operacional de variables..... | 80 |
| 4. RESULTADOS..... | 82 |
| 4.1 Datos demográficos..... | 82 |
| 4.2 Pruebas serológicas..... | 85 |
| 4.2.1 ELISA..... | 85 |
| 4.2.2 Western blot..... | 90 |
| 4.2.2.1 Western blot positivo..... | 91 |
| 4.2.2.2 Manifestaciones clínicas..... | 99 |
| 4.3 Pacientes con Western blot dudoso..... | 105 |
| 4.4 Pacientes con Western blot negativo..... | 107 |
| 4.5 Grupo control..... | 109 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 4.6 Estudios adicionales..... | 110 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 111 |
| 6. PERSPECTIVAS..... | 121 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 123 |
| 8. ANEXOS..... | 124 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA..... | 132 |

LISTA DE TABLAS

| TABLA | | PAGINA |
|--------------|---|---------------|
| TABLA I | Esquema de antibióticos actualmente utilizado para tratamiento de la enfermedad de Lyme..... | 58 |
| TABLA II | Caracterización sociodemográfica de la población estudiada. | 84 |
| TABLA III | Resultados por las diferentes técnicas de ELISA..... | 87 |
| TABLA IV | Comparación entre los resultados obtenidos por ELISA IgM y ELISA C6..... | 88 |
| TABLA V | Comparación entre los resultados obtenidos por ELISA C6 y ELISA IgG..... | 89 |
| TABLA VI | Comparación entre los resultados obtenidos por ELISA IgM y ELISA IgG..... | 89 |
| TABLA VII | Resultados obtenidos por ELISA C6 y confirmados por Western blot IgG..... | 94 |
| TABLA VIII | Resultados obtenidos por ELISA IgM y confirmados por Western blot IgG..... | 95 |
| TABLA IX | Resultados obtenidos por ELISA IgG y confirmados por Western blot IgG..... | 95 |
| TABLA X | Caracterización sociodemográfica de la población estudiada..... | 99 |
| TABLA XI | Manifestaciones clínicas frecuentes de la población con Western blot positivo..... | 103 |
| TABLA XII | Manifestaciones clínicas estadísticamente significativas entre población positiva y negativa con Western blot..... | 104 |
| TABLA XIII | Caracterización sociodemográfica de los pacientes con Western blot dudoso para <i>B. burgdorferi</i> | 106 |
| TABLA XIV | Manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes con Western blot dudoso para <i>B. burgdorferi</i> | 107 |
| TABLA XV | Manifestaciones clínicas más frecuentes de los pacientes con Western blot negativo para <i>B. burgdorferi</i> | 108 |

INDICE DE FIGURA

| FIGURA | | PÁGINA |
|------------------|--|--------|
| Figura 1. | Bandas diagnósticas de IgG o IgM para <i>Borrelia</i> y anticuerpos monoclonales. Estandarización de Western blot..... | 42 |
| Figura 2. | Ciudades de distribución de la población estudiada..... | 70 |
| Figura 3. | Antígenos del estuche comercial de Western blot utilizado en este estudio..... | 76 |
| Figura 4 | Distribución según grado de riesgo ocupacional en la población estudiada..... | 83 |
| Figura 5 | Distribución de manifestaciones clínicas en la población estudiada..... | 85 |
| Figura 6 | Distribución de la población según resultados de la prueba de ELISA C6..... | 86 |
| Figura 7 | Distribución de los sueros positivos por la prueba de ELISA..... | 90 |
| Figura 8 | Distribución de bandas (KDa) de Western blot de Categoría 1 observado en sueros positivos..... | 91 |
| Figura 9 | Distribución de bandas (KDa) de Western blot de Categoría 3 observado en sueros positivos..... | 92 |
| Figura 10 | Ejemplos de algunos pacientes positivos y dudosos..... | 93 |
| Figura 11 | Comparación de resultados positivos y dudosos por la técnica de ELISA y su confirmación posterior mediante Western blot IgG en la población analizada..... | 96 |
| Figura 12 | Comparación de resultados positivos entre las diferentes técnicas de ELISA y su confirmación mediante Western blot..... | 97 |
| Figura 13 | Distribución de la población de pacientes con Western blot positivos con manifestaciones reumatológicas..... | 100 |
| Figura 14 | Manifestaciones neurológicas de la población de pacientes con Western blot positivos para <i>B. burgdorferi</i> | |

- Figura 15** Distribución de la población de pacientes estudiados con manifestaciones dermatológicas con Western blot positivo..... 102
- Figura 16** Prevalencia de síndromes clínicos comparando pacientes con serología positiva contra serología negativa..... 105

RESUMEN

Cassandra Michele Skinner Taylor

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: ***Seropositividad contra *Borrelia burgdorferi* en una población mexicana con sintomatología sugestiva de Enfermedad de Lyme.***

Número de páginas: 153

Candidato para el grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

Propósito del Estudio: Determinar la seropositividad contra *Borrelia burgdorferi* en una población mexicana con manifestaciones clínicas sugestivas de enfermedad de Lyme.

Material y métodos: Estudio transversal, observacional y descriptivo, que incluyó 188 pacientes de enero del 2005 a enero del 2007. A cada paciente se le realizó historia clínica y encuesta para valorar riesgo de padecer la enfermedad de Lyme. De cada uno se obtuvo una muestra de suero para buscar anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* por ELISA C6, que utiliza el antígeno inmunodominante VlsE y por los ELISA IgM e IgG con antígenos de tres genoespecies. Los sueros positivos o dudosos por cualquier técnica de ELISA, se confirmaron por Western blot IgG. Adicionalmente se buscó la presencia de anticuerpos contra *Treponema pallidum* (VDRL, FTA-ABS), contra el Virus de la Hepatitis B y el Virus de la Hepatitis C, así como contra los Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y 2, para descartar falsos positivos. A muestras de líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o biopsia de piel de 21 pacientes, se les realizó PCR para *Borrelia burgdorferi*.

Resultados: Obtuvimos 107 sueros positivos o dudosos por al menos una técnica de ELISA. Se confirmaron 62 sueros positivos (32.97%) por Western blot IgG y 20 sueros fueron dudosos (10.63%). Todos los sueros fueron negativos para las pruebas adicionales. Las muestras analizadas por PCR no fueron positivas, lo cual coincide con la baja detección reportada en la literatura. Los resultados de laboratorio se correlacionaron con los síntomas clínicos. Los síntomas observados fueron reumatológicos, neurológicos, cardíacos y dermatológicos.

Contribuciones y Conclusiones: Es la primera vez que se realiza un estudio de este tipo en el país, que demuestra la existencia de la enfermedad de Lyme en una población de pacientes mexicanos. Este estudio modificará las normas de control epidemiológico, el manejo de actividades al aire libre y ampliará las opciones de diagnósticos diferenciales con las que cuentan los médicos en el país.

Dra. en C. María del Socorro Flores González.
DIRECTOR DE TESIS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La enfermedad de Lyme es una infección multisistémica, la cual presenta manifestaciones dermatológicas, reumatológicas, neurológicas y cardíacas principalmente¹ se conoció primero en los Estados Unidos en 1975, después de un brote misterioso de artritis reumatoide juvenil cerca de la comunidad rural de Lyme, Connecticut. La ubicación rural de la comunidad y el comienzo del padecimiento durante el verano y principios del otoño, sugirió la posibilidad de que la transmisión de la enfermedad era debido a un artrópodo; la descripción de la enfermedad corrió a cargo del Dr. Allen Steere, profesor de inmunología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Tufts en Boston Massachusetts², el rash conocido como “eritema crónico migrans” (EM), descrito en Europa desde principios del siglo XX por Lipschutz y Afzelius, así como los numerosos cuadros neurológicos relacionados con la mordedura de garrapata del género *Ixodes* en Francia y Austria³ permitieron al Dr. Steere concluir que la artritis y el rash, aunadas a otras manifestaciones multisistémicas, formaban parte de la misma enfermedad la cual bautizó con el nombre del poblado donde se inicio el misterioso brote inicial, acuñándose el nombre de “Enfermedad de Lyme” a finales de los años setentas.

Posteriormente, siete años después de la caracterización clínica de la enfermedad, en el año de 1982, Willy Burgdorfer determinó que el agente etiológico de la Enfermedad de Lyme eran las bacterias de tipo espiroquetas, relacionadas con el género *Borrelia*, las cuales fueron aisladas de los intestinos

de las garrapatas del género *Ixodes*, nombradas ese año como *Borrelia burgdorferi*; la infección es transmitida por garrapatas del complejo *Ixodes ricinus*.⁴ y es, según el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), el padecimiento más frecuentemente transmitido por artrópodos en Estados Unidos.⁵

1.2 Vectores implicados en la transmisión.

En su mayor parte, las garrapatas del género *Ixodes* son vectores competentes para transmitir las bacterias *B. burgdorferi*, las garrapatas de los géneros *Ixodes dammini* y *Ixodes scapularis* se localizan en el oeste y centro de los Estados Unidos, las del género *Ixodes pacificus* se ubican principalmente en la región noreste y en el pacífico de Estados Unidos. Las garrapatas del género *Ixodes ricinus* se ubican primordialmente en Europa y el norte de África y el género *Ixodes persulcatus* es observado en Europa del este, Rusia y Asia (China, Japón y Corea)^{6 7}

En México, Hoffmann y colaboradores; reportaron 18 especies de *Ixodes* asociados a mamíferos y aves nativas, otros autores por su parte reportan 14 especies; un estudio reciente recopila en total 26 especies de *Ixodes* que parasitan un total de 28 especies diferentes vertebrados en el país,⁸ sin embargo se han relacionado algunos otros artrópodos con la transmisión de *Borrelia sp*, tales como las garrapatas conocidas como Lone Star, *Amblyomma americanum*, la garrapata del perro americano (*Dermacentor variabilis*), el del conejo (*Dermacentor parumapertus*) y *Haemaphysalis*^{4 9 10}

1.2.1 Ciclo biológico de las garrapatas Ixodes

Las garrapatas presentan un ciclo de vida de 2 años, iniciando en el estadio de larva, ninfa y finalmente como garrapata adulta.⁷ Las garrapatas adultas comienzan su reproducción poniendo los huevos en árboles a principios de la primavera, en el verano los huevos se convierten en larvas las cuales se alimentan de la sangre de reservorios tales como ratas, mamíferos pequeños, venados y pájaros migratorios (siendo éstos últimos de gran importancia para la difusión de *Borrelia spp.* a zonas no endémicas); al final del verano o principios del otoño, las larvas pasan a su forma de ninfas e hibernan hasta la siguiente primavera. Las ninfas se alimentan de sus reservorios y ocasionalmente de humanos durante la primavera y el verano. En los meses de otoño terminan su maduración transformándose en adultos. Las garrapatas adultas se alimentan de mamíferos grandes, tales como venados de cola blanca y ocasionalmente de humanos. Los venados de cola blanca son portadores de las formas adultas de las garrapatas y a partir de ellos pueden infestar otros mamíferos como ratones y liebres, los cuales permanecen en estado de reservorio sin contraer la enfermedad.^{11, 12, 13, 14,15}

El ser humano forma parte de este ciclo de manera accidental, la garrapata del género *Ixodes* puede parasitar a los humanos en cualquiera de sus tres estadios, sin embargo son las ninfas las que se encuentran relacionadas con más frecuencia.¹⁶ En Europa la proporción de garrapatas que portan *B. burgdorferi* varia en un amplio rango que va de 0% a 85%, en los Estados Unidos, este rango va de un 1% a un 100%,¹⁷ se estima que el 90% de los

casos de enfermedad de Lyme son causados por la mordedura de una ninfa infectada y solo en el 10% son producidos por la mordedura de una garrapata adulta.¹⁸

Las garrapatas se alimentan solamente en una ocasión durante cada estadio de su ciclo de vida, la mordedura de las garrapatas usualmente es indolora y puede pasar inadvertido, más de la mitad de individuos afectados no recuerdan la mordedura; durante su alimentación la garrapata puede transmitir la borrelia por la saliva, la borrelia se distribuye en el intestino de una garrapata infectada y una vez que la garrapata se alimenta de sangre, las borrelias penetran la mucosa intestinal diseminándose por los tejidos, incluyendo las glándulas salivares, transmitiéndose así al hospedero. El tiempo que permanece adherido a la piel es de suma importancia ya que la transmisión de las borrelias se reduce a las primeras 24 horas y a las 72 horas como máximo; la transmisión ovárica de *Borrelia burgdorferi* de garrapata madre puede ser muy eficaz, con transmisión de 5 a 9 generaciones subsecuentes.¹⁷

1.2.2 Hábitat y reservorios.

El hábitat natural son las zonas boscosas y de matorral, las garrapatas necesitan para completar su ciclo biológico un clima templado, con cierto grado de humedad para mantener su balance hídrico estable, principalmente en las fases de desarrollo; entre los elementos necesarios para transmitir la infección a los humanos se incluye un reservorio animal donde la *Borrelia* pueda permanecer viable por largos periodos. Existen una gran variedad de animales

que sirven como reservorio, por lo cual no es de sorprender el encontrar una larga lista de animales con evidencia serológica de exposición a *B. burgdorferi*. En Estados Unidos, esta lista incluye al ratón de pie blanco (*Peromyscus leucopus*), ardilla del este (*Tamias striatus*), ardilla gris (*Sciurus carolinensis*), conejos (*Sylvilagus floridanus*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y cuatro especies de animales domésticos como ganado (*Bos taurus*), caballo (*Equus caballus*), perro (*Canis familiares*) y gato (*Felis catus*); siendo el ratón de pie blanco el preferido de las formas inmaduras y el más importante reservorio de espiroquetas¹⁶.

1.3 Características microbiológicas del género *Borrelia*.

1.3.1 Clasificación.

El género *Borrelia* se compone de bacterias gram-negativas extracelulares e intracelulares facultativas, microaerofílicas, de la familia de *Spirochaetaceae* la cual también incluye a los géneros *Leptospira* y *Treponema*.¹⁹

La clasificación taxonómica de las Borrelias, fue establecida según criterios genéticos o moleculares a través del análisis de ARNr²⁰, hibridación recíproca DNA-DNA²¹, estudio de proteínas de la superficie externa como OspA,²² y el análisis mediante anticuerpos monoclonales. Por medio de estos estudios filogenéticos, basado en similitudes en el DNA, se ha agrupado los microorganismos en un sentido amplio con el término general de *Borrelia burgdorferi sensu lato*^{23,24} el cual se subdivide en múltiples genoespecies: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia andersoni*, *Borrelia bissetii*

identificadas en Norte América, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* y *Borrelia bissettii* en Europa, siendo esta última identificada como principal patógeno en Eslovenia ²⁵. En la región de Asia se ha identificado *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia japónica*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi* y *Borrelia sinica*^{26,19,27}. Los Estados Unidos de Norteamérica presentan solamente *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, como patógeno en humanos, aunque se ha encontrado otras especies en animales, por su parte en Europa se presenta *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, como patógenos en los seres humanos.²⁶ Sin embargo es de suma importancia remarcar que las otras genoespecies pueden ocasionar manifestaciones clínicas específicas.

1.3.2 Estructura biológica de *Borrelia burgdorferi*

La *B. burgdorferi* es la primera espiroqueta cuyo genoma completo ha sido secuenciado, su estructura es similar a la de todas las espiroquetas: un protoplasma cilíndrico rodeado primero por una membrana citoplásmica, luego por un periplasma que contiene los flagelos y finalmente una membrana de superficie externa; el genoma contiene 910,725 pares de bases, 9 plásmidos circulares y 12 plásmidos lineales con un tamaño combinado de más de 533,000 pares de bases,²⁸ el flagelo periplásmico está ubicado debajo de la membrana externa lo que le confiere movilidad a la espiroqueta, se describen como bacilos de 0.2 a 0.25 micras de ancho y de 10 a 30 micras de largo, ¹⁷ los cuales son cultivables en medio de cultivo BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) a una

temperatura óptima de 33-35°C.¹⁹ Son bacterias difíciles de obtener ya que crecen muy lentamente, sin embargo han sido aisladas en tejidos como la sangre, piel y líquido cefalorraquídeo.^{29 30}

Existe controversia en algunos hallazgos de laboratorio “in vitro”, por ejemplo se ha propuesto que *Borrelia burgdorferi* tiene la capacidad de convertirse en formas móviles y no móviles dependiendo del estrés fisiológico al que está expuesta la bacteria, cuando la bacteria se expone a un medio ambiente hostil de la forma espiral emergen pequeñas vesículas, hasta la formación de un quiste, la disminución de nutrientes provoca la transformación de la forma helicoidal a formas no móviles, quísticas o esféricas que revierten a formas vegetativas.³¹ Se calcula que la formación de estos cuerpos esféricos reduce la superficie bacteriana en un 75%, comparada con la forma vegetativa; por lo que la reacción de anticuerpos o de células del sistema inmune dirigidos contra antígenos de superficie está considerablemente disminuida.³²

La conversión a formas quísticas, por ejemplo, puede explicar exámenes diagnósticos negativos,³³ los quistes tienen la peculiaridad de que pueden permanecer latentes, sin embargo, cuando el medio ambiente se vuelve favorable el quiste regresa a la forma espiral original.³⁴ Un método rápido para generar formas quísticas de *Borrelia* es agregar agua destilada, con esto el 95% de las espiroquetas se convierten a quistes en 1 hora y a las 4 horas no hay presencia de formas móviles;³¹ se cree que es un mecanismo para evadir el sistema inmune,³³ La formación de esos quistes pudiera aclarar la dificultad

de cultivar *Borrelia burgdorferi* aun en presencia de la infección, puede explicar exámenes diagnósticos negativos y también las fallas frecuentes de terapia antibiótica y las recaídas.^{34 35}

Se han observado gránulos que emergen de espiroquetas senescentes, dichos gránulos contienen DNA y/o RNA y pueden representar formas involutivas, con la posibilidad de desarrollar nuevamente formas vegetativas o de ser una representación final de la desintegración de éstas, sin embargo algunos investigadores consideran que ambas posibilidades pueden suscitarse; esto podría explicar largos períodos de estado latente, resistencia a antibióticos, resultados negativos en la serología y baja sensibilidad de PCR.³³

Se han descrito también formas “L” o “esferoplastos” las cuales carecen de pared celular,³¹ pero conservando la viabilidad bacteriana,³⁶ además se han descrito variaciones en la flagelina, formas rígidas, inmóviles, muy pequeñas y enrolladas, así como también colonias de *Borrelia* con forma de acúmulos ovaes.³⁷

Investigaciones recientes han encontrado la presencia de *Borrelia burgdorferi* en macrófagos y queratinocitos, lo cual apoya la propuesta de que la *Borrelia* puede sobrevivir intracelularmente,³⁷ esta se enmascara con colágena alrededor de las colonias, escapando así del sistema inmune y ocasionando la seronegatividad en los estudios del laboratorio.³⁷ Este mismo patógeno ha sido detectado de forma viable, en lisados de fibroblastos cultivados en humanos,

siendo observados intracelularmente en el fibroblasto en la región perinuclear, esto sugiere que *Borrelia burgdorferi* puede adherirse, penetrar o invadir los fibroblastos presentes en los hospederos.³⁸

Aunado a lo anterior, se ha demostrado la presencia de *Borrelia burgdorferi*, en su forma viable en el citoplasma de células endoteliales humanas, lo que indica que la localización intracelular del patógeno pudiera ser un mecanismo potencial, por el cual evade la respuesta inmune del hospedero, explicando así su persistencia.³⁹ Por otro lado, dicho microorganismo es capaz de adherirse, invadir y eliminar a los linfocitos humanos.⁴⁰

La matriz extracelular parece proveer un nicho protector para las espiroquetas cuando están en el hospedero mamífero; la estrategia para evadir el sistema inmune incluye la variación antigénica en el locus *Vls* e interferencias con las funciones de complemento, anticuerpos y linfocitos o interferencia en la colágena con opsoninas y actividades líticas, *B. burgdorferi* tiene la capacidad de adherirse a la superficie de células del huésped por proteínas tales como p66, DbpA, DbpB y BBK32.^{41, 42}

1.3.3 Componentes inmunogénicos.

La identificación de las proteínas de *Borrelia burgdorferi*, ha sido crucial en la caracterización de los factores de virulencia y respuesta inmune de hospederos; se ha descubierto que las proteínas de superficie tienen influencia directa en las manifestaciones clínicas, las diferentes genoespecies pueden

expresar proteínas de superficie similares y algunos diferentes, como por ejemplo OspA, flagelina y p93, las cuales pueden ser responsables de las diferencias clínicas observadas en Europa y Estados Unidos. En Europa existe una marcada heterogeneidad en las proteínas OspC.^{43,44}

Los componentes inmunogénicos de *Borrelia burgdorferi sensu lato* son lipoproteínas, lípidos, carbohidratos y proteínas. Son especialmente importantes las proteínas de superficie externa denominados *Outer surface protein "Osp"*, tales como OspA (30-32 kDa) OspB (34-36 kDa), OspC (22- 25 kDa), OspD (28-30 kDa), OspE (19 kDa), OspF (26 kDa), OspG (22 kDa), los genes que codifican proteínas de superficie externa, se encuentran localizados en los plásmidos.^{17,27} Existen también otros polipéptidos importantes que incluyen el flagelar (41 kDa), la proteína del gancho del flagelo codificado en el gen flgE,⁴⁵ proteínas de choque térmico 58-60 kDa y otras de 22 kDa, 39 kDa, 55 kDa, 66 kDa, 66-73 kDa, un antígeno que es parte del protoplasma cilíndrico (93 kDa), un gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa^{46,43} y otras proteínas como la proteína A que se une a decorina (DbpA), P66 ,la proteína que se une a fibronectina BBK32.⁴⁷ y las proteínas que se unen a moléculas de adhesión. Existe una proteína VlsE, una lipoproteína de superficie codificada por el plásmido lineal lp28-1 de *Borrelia burgdorferi* B31, la cual es altamente inmunogénica, con un peso molecular de 34 a 35 kDa; dentro de la porción variable de VlsE se observa una región invariable (IR6) la cual se conserva presente en todas las especies de *Borrelia burgdorferi sensu lato*.^{48,19,49}

Por lo menos 6 proteínas se expresan después de la transmisión de *Borrelia burgdorferi*, la proteína EppA no se encuentra expresada por *Borrelia burgdorferi* en las garrapatas, pero es muy probable que se encuentre expresada en los hospederos humanos.⁵⁰

La proteína OspA es particularmente inmunogénica se expresa importantemente en la *Borrelia burgdorferi* que se encuentra en las garrapatas sin alimentar; una disminución en la expresión de OspA, inicia en las últimas 12 horas de la fase de alimentación de la garrapata, después de la ingesta de sangre y continúa en el huésped mamífero por ejemplo.⁵¹ La regulación de la expresión de OspA puede estar relacionada con la ubicación del operón de Osp AB. El producto de desecho que se produce en mayor cantidad en las garrapatas es la guanina, la cual es posible que regule a OspA y OspB.⁵²

Una vez que el organismo entra en un hospedero mamífero, los niveles de guanina de la garrapata disminuyen, ya que este nuevo ambiente no estimula la síntesis de enzimas metabólicas de guanina, disminuyendo la expresión de Osp A y OspB; la expresión de OspC es referida para infección en mamíferos, en las glándulas salivales de la garrapata predomina de forma importante la expresión de OspC, sin embargo algunos organismos expresan solo expresan OspE y OspF; dejando a OspA y OspB ausentes.^{53,54}

1.3.4 Patogénesis

La patogenia se determina por moléculas que expresa el microorganismo. Muchas de esas moléculas se codifican en los veintiún plásmidos lineales o

circulares encontrados en *Borrelia burgdorferi*. La pérdida de ciertos plásmidos se asocia con pérdida de infectividad y virulencia.⁵⁵

La expresión de algunas moléculas inmunogénicas de las borrelias parece depender del ambiente donde se encuentran los microorganismos. Hay modificaciones en el repertorio de las moléculas expresadas después que el organismo es inoculado por la garrapata en un huésped mamífero. Los cambios en las proteínas de superficie van a ser cruciales para la habilidad de las borrelias de escapar del intestino de las garrapatas, llegar a las glándulas salivales del vector y luego poder entrar al huésped mamífero.¹⁰

Después de la mordedura, la *Borrelia burgdorferi* deja el endotelio intestinal de la garrapata, la invade, se esparce vía hemática y linfática hacia el aparato salival. La saliva de las garrapatas juega un papel importante en la sobrevivencia y diseminación del organismo, secretando proteínas como la OspC que ayudan a colonizar el huésped y proteger al patógeno de una respuesta inmune.⁵⁶ Esta a su vez contiene compuestos que suprimen la función de los neutrófilos, la activación del complemento y otras respuestas inmunes a *Borrelia burgdorferi*.⁵⁷ Las espiroquetas se unen al plasminógeno del mamífero lo cual provee el mecanismo por el cual *Borrelia burgdorferi* puede digerir la matriz extracelular y penetrar en las paredes celulares usando las propias enzimas del huésped. Por lo tanto, *Borrelia burgdorferi* tiene la evolucionada práctica y el equipamiento para penetrar al huésped.^{58,54}

La respuesta inmune inicia en el sitio de la mordedura, donde se encuentra la lesión típica el *eritema migrans*. Dependiendo de la especie de borrelia y el huésped, la primera línea de defensa está mediada por complemento. Al examen histológico la lesión consiste en un infiltrado perivascular de leve a intenso con linfocitos, macrófagos y un número pequeño de células plasmáticas como parte de la respuesta inmune. Las células inflamatorias producen citocinas que incluyen TNF- α , IFN- γ , Interleucina 1 e Interleucina 6.⁴³

La mayoría de los pacientes después del inicio de la enfermedad tienen una respuesta con producción de anticuerpos tipo IgM a las 6 a 8 semanas después de la infección, en respuesta a la proteína OspC o la proteína flagelar de las espiroquetas.¹ Sin embargo, los niveles de anticuerpos séricos, pueden estar bajos debido al secuestro de los mismos en complejos inmunes.⁵⁹

Después de días o meses del inicio de la infección, *Borrelia burgdorferi* se disemina ampliamente. En este período se puede recuperar espiroquetas de sangre y de líquido cefalorraquídeo aislándose en pequeñas cantidades en miocardio, retina, músculo, hueso, hígado, bazo, meninges y cerebro.⁶⁰ La unión ocurre a través de la interacción con OspA, una de las proteínas de superficie, y de otras proteínas no bien estudiadas.⁵⁸ Para diseminarse la borrelia se une a ciertas proteínas y se adhiere a integrinas, proteoglicanos (heparín, heparán sulfato, dermatán sulfato) derivados de las células epiteliales, decorina (DbpA), glucosaminoglicanos que permiten la alineación con colágena fibrilar a la matriz extracelular en el corazón, sistema nervioso o

articulaciones así como fibronectina y vitronectina que permiten diseminación en la vasculatura. Estas uniones son necesarias para establecer la infección.^{43,61} Después de establecida la infección, el huésped responde involucrando fagocitos, células B, células T y células gamma-delta.

Las lipoproteínas de las espiroquetas que se unen a las moléculas CD14 y los receptores en macrófagos, son activadores potentes de respuesta inmune innata.

El crecimiento de *Borrelia burgdorferi* a temperaturas elevadas induce la producción de proteínas de choque térmico tales como groEL. El líquido sinovial de pacientes con artritis de Lyme contiene anticuerpos contra el análogo groEL de *Borrelia burgdorferi*, lo que sugiere que las proteínas de choque térmico de la bacteria pueden inducir artritis por medio de un mecanismo similar. La vasculopatía ha sido identificada en nervios periféricos, cerebro y tejido sinovial de pacientes con enfermedad de Lyme. Los cambios patológicos en los vasos sanguíneos se asemejan a los encontrados en la endarteritis obliterante, la lesión vascular asociada con sífilis.⁶²

La diseminación de *Borrelia burgdorferi* a través del sistema nervioso central se ha demostrado en modelos animales. La activación del sistema fibrinolítico juega un rol en la penetración de las uniones de la barrera hematoencefálica y la invasión del sistema nervioso central. La borrelia penetra las leptomeninges, las raíces nerviosas sensitivas y motoras, las raíces dorsales, pero no el

parénquima cerebral. Se han observado espiroquetas en el perineuro (el tejido conectivo que rodea cada nervio periférico). Aunque no hay cambios inflamatorios en líquido cefalorraquídeo, se ha demostrado producción intratecal de anticuerpos contra borrelia.⁵⁴ El líquido cefalorraquídeo podría ayudar a definir el rol de la autoinmunidad en el sistema nervioso central. Los anticuerpos antiaxonales tienen reactividad cruzada con flagelina y pueden producir disfunción neurológica mediante alteración del transporte axonal sin inducir cambios patológicos marcados. Los anticuerpos y las células B reaccionan contra la proteína básica de mielina, anticuerpos séricos a cardiolipina y células T que producen Interferón gamma in vitro sobre la exposición de proteína básica de mielina.^{63,43}

El mecanismo principal para la resolución de la lesión cardíaca es a través de respuesta inmune celular. Se ha descrito el aislamiento de *Borrelia burgdorferi* en biopsias de endomiocardio de pacientes con cardiomiopatía dilatada crónica.⁵⁴ La autoinmunidad puede también señalar los cambios inflamatorios en la enfermedad de Lyme, lo que puede explicar la persistencia de los síntomas y los hallazgos en algunos pacientes posterior a una terapia antibiótica adecuada. También pudieran ser explicados por el mimetismo existente entre un determinante antigénico de Osp A y un epítipo de los antígenos hLFA-1 α asociados a la función leucocitaria;^{64,65} una molécula de adhesión que se encuentra en todos los leucocitos y se expresa fuertemente en las células T. El suero de pacientes con artritis de Lyme crónica y resistente al

tratamiento tiene reactividad cruzada con LFA-1, mientras que el suero de otras formas de artritis no la tiene.⁶⁴

Una elevada prevalencia de marcadores clase II HLA-DR2 y DR4 así como HLA-DR beta alelo1 se han identificado en aquellos pacientes con artritis de Lyme refractaria,⁶⁶ indicando que células CD4 + T puede estar en el proceso.⁶⁷ Éstos pacientes también desarrollan anticuerpos anti-Osp A al mismo tiempo del inicio de la artritis, lo que sugiere que Osp A podría estar implicada en un proceso autoinmune. Osp A es reconocida de manera preferencial en pacientes quienes no han respondido al tratamiento. Una alternativa de una reacción autoinmune directa en la enfermedad de Lyme podría ser un mecanismo indirecto. Por ejemplo, las células T se activan contra los antígenos de *Borrelia burgdorferi* y pueden mantener la inflamación local mediante la activación de células autoreactivas.^{68,63}

Borrelia burgdorferi expresa proteínas con capacidad de inmunomodulación, que pueden modificar las proteínas de superficie que regulan el tráfico celular en los sitios de inflamación de las células de mamíferos. Las células de Langerhans disminuyen la expresión de marcadores del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Las células endoteliales así como las sinoviales incrementan la expresión de las moléculas del HLA clase II. Los cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) expuestas a *Borrelia burgdorferi* incrementan la expresión de selectina-E, moléculas de adhesión

celular vascular (VCAM)-1 y moléculas de adhesión intercelular (ICAM). *Borrelia*, sin embargo, no produce ninguna toxina conocida.

Los complejos inmunes y crioglobulinas en líquido sinovial, fueron los primeros datos inmunológicos descritos en la Enfermedad de Lyme.⁶⁹ Las células T tienen un papel importante en la respuesta inmune; la disminución de las respuestas de las células T colaboradoras incrementa la severidad de la enfermedad y la depleción de las células T supresoras reduce la severidad de la enfermedad. Las células TH1 liberan citocinas tales como Interferón gamma, Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 12 (IL-12), éstas están involucradas en la producción y prolongación de la respuesta celular a patógenos intracelulares como virus y algunas bacterias. Las células TH2 producen Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 6 (IL-6) que participan en la producción de respuesta inmune humoral. Las células T clonadas de pacientes con enfermedad de Lyme producen citocinas TH1 (IL-2, GM-CSF e Interferón gamma) pero no citocinas TH2 (IL-4 e IL-5). El rol específico de las células T gamma/delta en la respuesta contra *Borrelia burgdorferi* es desconocida, sin embargo, éstas células se han aislado del líquido sinovial de pacientes con artritis de Lyme. Éstas células también generan aumento en el ligando FAS e inducción de apoptosis en las células T sinoviales⁷⁰.

1.3.5 Epidemiología.

La incidencia y distribución real en el mundo de la enfermedad de Lyme es aún desconocida, debido primordialmente a sus características epizootológicas y a

las dificultades en el diagnóstico, la mayoría de los reportes provienen de los países desarrollados, el número de casos reportados en los Estados Unidos se ha incrementado de 491 casos en 1982 a 64,382 durante los años 2003 al 2005, esto a pesar de los esfuerzos realizados para prevenir la enfermedad; en las áreas endémicas de los Estados Unidos (Connecticut, Delaware, Maryland, Massachussets, Minnesota, New Jersey, New York, Pennsylvania, Rhode Island y Wisconsin) se presentan alrededor de 29.2 a 300 casos nuevos por cada 100,000 habitantes al año,⁷¹ existen casos reportados en todos los Estados de la Unión Americana, sin embargo existe un incremento significativo en el riesgo de infección, en los Estados del Noreste, Región Norte Central y algunos estados de la Costa del Pacífico.¹

En Europa, los estudios de seroprevalencias para la infección por *B. burgdorferi* más altas se hallaron en Alemania, Austria, Eslovenia y Suecia, presentando esta última una incidencia de 135 casos por cada 100.000 habitantes por año.⁷²; durante el año de 1995 la incidencia anual en Slovenia y Austria se estimaban entre 120 a 130 casos por 100,000 residentes, similar a la frecuencia observada en Connecticut.⁵⁴ Un estudio realizado en Alemania encontró que la seroprevalencia iba del 13% al 47%, en los grupos de riesgo, tales como trabajadores forestales y corredores, mientras que en el grupo control formado por donadores de sangre sanos, la seroprevalencia se ubicaba entre el 2% al 10%.⁷³

España por su parte muestra que la infección por *Borrelia burgdorferi* se encuentra ampliamente distribuida, con una prevalencia que oscila entre el 0% y el 38%, dependiendo de la zona geográfica, las prevalencias más altas se encontraron en el norte de España; ⁷⁴ ⁷⁵ existen además reportes en Asia (China ⁷⁶ y Japón ⁷⁷), Australia, ⁷⁸el Norte de África ⁷⁹, Brasil ⁸⁰y Colombia. ⁸¹

Los reportes muestran una frecuencia similar de la infección entre hombres y mujeres en los Estados Unidos, en personas de cualquier rango de edad, sin embargo se ha descrito una distribución bimodal, con una alta tasa, en niños entre los 5 y 9 años y otra en adultos con edades por arriba de los 30 años. ⁸² Las personas que trabajan al aire libre, en trabajos como encuestadores, recursos forestales, jardinería y servicio de utilería, entre otros, presentan un mayor riesgo de adquirir la enfermedad de Lyme. Participar en actividades recreativas al aire libre como caminatas, campismo, caza y jardinería puede incrementar los niveles de riesgo, así como también vivir cerca de la maleza o visitar áreas espesas,⁸³ actualmente un riesgo creciente, se ha relacionado de forma directa a la cantidad de tiempo que una persona pasa al aire libre en áreas endémicas de garrapatas.

1.4 Cuadro clínico.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme, generalmente se dividen en tres fases: localizada temprana, diseminada temprana y enfermedad tardía o crónica.

1.4.1. Fase localizada temprana.

Esta fase incluye eritema migrans (EM) y hallazgos asociados. EM ocurre en 90% de los pacientes, generalmente durante el primer mes posterior a la mordedura por garrapata. Sin embargo solamente un 30% de los pacientes lo recuerdan, el eritema migrans puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, aunque generalmente se localiza cerca de la axila, región inguinal, hueco poplíteo y cintura, esto debido a que las garrapatas tienden a alojarse en esas áreas cálidas y húmedas; dicho eritema es asintomático, aunque puede causar dolor, comezón y ardor, se extiende típicamente en el curso de algunos días. La lesión puede ser uniformemente roja o tener aspecto del "ojo de buey " debido al halo claro en el centro,^{84,85,86} otras variaciones en la lesión incluyen los centros necróticos o vesiculares,⁸⁷ aproximadamente el 10% de pacientes con EM presentan lesiones dérmicas múltiples.⁸⁸

La enfermedad localizada temprana se ha asociado a manifestaciones inespecíficas, semejantes a las encontradas en un resfriado común, tales como fatiga, malestar general, cefalea, rigidez de nuca,⁸⁹ mialgias, artralgias, linfadenopatía regional o generalizada,⁹⁰ también puede presentarse rinitis, sinusitis y tos así como odinofagia y cefalea, es importante mencionar que en ausencia del EM, estos síntomas no son diagnósticos de enfermedad de Lyme; un cuadro pseudo-gripal, pudiera ser la característica única de la enfermedad de Lyme temprana,⁹¹ el cuadro "gripal" induce el uso de antibióticos empíricos que puede provocar que los síntomas tempranos pasen inadvertidos.⁹²

1.4.2. Fase diseminada temprana

En el 37% de los casos, la enfermedad diseminada temprana ocurre los primeros días o meses después de la mordedura, pudiendo ser la primera manifestación de la infección de *Borrelia burgdorferi* sin EM precedente (el cual pudo haber pasado desapercibido por el paciente) o el cuadro pseudo gripal no asociado a la infección por el médico; las secuelas más frecuentes en pacientes con EM o sin ella no tratados con antibióticos son:

Manifestaciones reumatológicas: Durante la fase temprana diseminada, las espiroquetas alcanzan el sistema musculoesquelético y pueden producir artritis; ^{93,94} las manifestaciones musculoesqueléticas pueden aparecer dos semanas después de EM, el 60% de los pacientes no tratados desarrollan síntomas ⁸⁷ como artralgiás sin artritis que involucra varias articulaciones de manera migratoria. Existen monoartritis y oligoartritis asimétrica con un patrón semejante a la Artritis Reumatoide,¹ el líquido articular obtenido por artrocentesis es de características inflamatorias, predominando los polimorfonucleares y observando aumento en la concentración de proteínas. ⁹⁵

Manifestaciones neurológicas: Se estima que entre el 10% a 15 % de los pacientes no tratados en las primeras semanas o meses desarrollará síntomas, ⁹⁶ estos pueden aparecer de 2 a 3 meses después del inicio de la infección; puede ocurrir parálisis de los nervios craneales, involucrando especialmente al VII par craneal (en el 10% puede ser bilateral)⁸⁹, radiculoneuritis y meningitis linfocítica. La tríada (Meningitis linfocítica, parálisis facial y radiculoneuritis) sin

anormalidades en estudios de imagen, se conoce como síndrome de Bannwarth (Garin-Boujadox-Bannwarth) y es más común en Europa que en los Estados Unidos, ¹ el involucro del VIII par craneal se manifiesta por mareo y sordera.⁹⁷ El 10% de pacientes no tratados pueden desarrollar meningitis aséptica caracterizada por cefalea, fotofobia y rigidez de nuca,⁹⁸ el líquido cefalorraquídeo (LCR) generalmente muestra pleocitosis, ligero predominio de linfocitos, elevación leve de proteínas y glucosa normal,⁹⁹ la meningitis generalmente se resuelve espontáneamente, mientras que al tratar el resto de manifestaciones tempranas, aceleramos la resolución y prevenimos la progresión a la fase crónica de la enfermedad.¹⁰⁰

Manifestaciones cardiacas: Estas ocurren uno o dos meses después de la primo infección, en la gran mayoría de los casos la enfermedad cardiaca comienza a resolverse durante o aún antes del tratamiento con antibióticos, los pacientes pueden estar asintomáticos o quejarse de fotosensibilidad, síncope, disnea, palpitaciones y dolor torácico;¹⁰¹ los síntomas más frecuentes son la presencia de palpitaciones (en el 69%), anormalidades en la conducción (en el 19%) entre ellos bloqueo AV de primero, segundo o tercer grado, miocarditis (en el 10%) y falla ventricular izquierda (en el 5%).¹⁰² Las manifestaciones de involucro miocárdico mas frecuentes son: alteraciones no específicas en onda ST y T; otras alteraciones de conducción van desde intervalos P-R prolongados hasta periodos alternantes de taquicardia y bradicardia.

Puede ocurrir cardiomegalia o derrame pericárdico leve con pocas o ninguna manifestación clínica, se ha observado disfunción ventricular izquierda o insuficiencia cardíaca congestiva entre un 10% a 15% de los pacientes, en su mayor parte las disfunciones miocárdicas tienden a ser leves y autolimitadas;¹⁰³ la carditis puede deberse a invasión directa de las bacterias al miocardio.^{43,104}

1.4.3. Fase tardía.

El término "tardío" es mejor utilizado en este caso que el término "crónico", pues el primero, es más exacto; a pesar de la respuesta inmune inducida contra *Borrelia burgdorferi*, las espiroquetas sobreviven en algunos órganos y sistemas tales como corazón, sistema nervioso central y articulaciones, desencadenando manifestaciones de carácter tardío de difícil diagnóstico; esto ocurre generalmente de 4 meses a 4 años después del EM.

Las manifestaciones musculoesqueléticas son las más frecuentes (hasta en un 80% de pacientes no tratados), incluyendo artralgias, episodios intermitentes de artritis y monoartritis en especial de las rodillas; los antibióticos son efectivos para la artritis, aunque en un 10% de estos pacientes se desarrollará un cuadro de artritis crónica y recidivante que involucra a las articulaciones grandes y que suele ser resistente al tratamiento con antibiótico, además las grandes articulaciones puede involucrar las entésis de manera similar a las espondiloartropatias seronegativas.¹⁰⁵ Es poco frecuente encontrar daño articular agresivo pero se han descrito casos de erosiones, quistes y osteopenia.¹⁰⁶ Los ataques de artritis pueden durar semanas o meses con

remisiones y exacerbaciones, disminuyendo en frecuencia y severidad con el paso del tiempo.⁹³ En algunos pacientes puede persistir la inflamación articular, particularmente los que tienen HLA_DBRB1*0401 o alelos semejantes.⁸⁷

La neuroborreliosis terciaria, muestra analogía con la neurosífilis terciaria (o terciarismo sifilítico), siendo esta una característica importante de la fase tardía de la enfermedad de Lyme, observándose hasta en un 10% de pacientes no tratados; sus características clínicas incluyen encefalopatía, disfunción neurocognitiva, y neuropatía periférica, en Europa la neuroborreliosis es más frecuente por la presencia de *B. garinii* que no se ha aislado en América, mientras que en Estados Unidos las manifestaciones crónicas son más leves.¹

Como parte de la disfunción cognitiva los pacientes tienen síntomas vagos y en parte pueden presentar falla en la memoria, dificultad para concentrarse y lagunas mentales.¹⁰⁷ En ocasiones los familiares detectan estas alteraciones que son ocultadas por el paciente por manifestar la sensación de que se “esta haciendo viejo”. Como datos de encefalopatía tenemos los cambios de carácter y en el patrón del sueño, aún en ausencia de criterios objetivos de involucro del sistema nervioso central.¹⁰⁸ Se han identificado otros síntomas que nos orientan a pensar en enfermedad de Lyme, aunque estos no hayan estado presentes constantemente, como adormecimiento, hormigueo, temblor muscular, fotosensibilidad, hiperacusia, acúfenos, vértigo y depresión.¹⁰⁹ Otra manifestación terciaria es la poliradiculoneuropatía crónica axonal, con parestesias y dolor radicular que involucra el plexo braquial o el plexo

lumbosacro.⁹⁹ La leucoencefalitis aguda o crónica con involucro de la sustancia blanca del cerebro o médula espinal, puede estar caracterizado por anormalidades leves o mielopatía severa (ataxia, espasticidad y alteraciones sensoriales).^{110,96} La resonancia magnética nuclear puede recordar Esclerosis Múltiple con áreas hiperintensas en la sustancia blanca de cerebro o médula espinal.¹¹¹ Una secuela neurológica tardía de la enfermedad de Lyme es la hipersensibilidad auditiva, visual, gustativa, olfatoria y al tacto.¹⁰⁷ Se ha reportado una reducción importante a la tolerancia al ruido en pacientes sin problemas previos de audición.^{112, 113} Los cambios morfológicos de borrelia explican su sobrevida en el cerebro así como las placas amiloides y degeneración vacuolar nerviosa en hipocampo en pacientes con Alzheimer.¹¹⁴ Los síntomas neuropsiquiátricos incluyen paranoia, demencia, esquizofrenia, enfermedad bipolar, ataques de pánico, depresión mayor y desordenes obsesivos compulsivos.¹⁰⁹

Manifestaciones cutáneas: En la fase tardía el linfocitoma que se puede localizar en lóbulos de oreja o en areola y la acrodermatitis crónica atrófica (cambios tróficos en las zonas distales de las extremidades, que inicialmente recuerdan livedo reticularis, y posteriormente la piel se vuelve fina y atrófica) son considerados casi exclusivamente de Europa, pues son características cutáneas ocasionadas por la infección por *B. afzelii*, la cual no se encuentra en los Estados Unidos.¹¹⁰ Hay evidencia que relaciona al linfocitoma solitario y al linfoma cutáneo primario de células B, con infección por *B. afzelii*, sugiriendo un papel patógeno de este organismo.¹¹⁵ Además, se ha descrito un síndrome

llamado "dermatitis granulomatosa intersticial con pseudorosetas histiocíticas", ligado a la infección por *Borrelia burgdorferi*, que representa la enfermedad subaguda de la piel.¹¹⁶ Pueden aparecer diferentes tipos de rash y esclerosis cutánea que asemeja escleroderma.¹¹⁷

1.4.4. Síndrome post-lyme.

Un 10% de los pacientes tienden a presentar el síndrome conocido como post-Lyme,^{118 94} dicho síndrome se caracteriza por fatiga, dolor musculoesquelético, alteraciones cognitivas, entre otras; estos síntomas se pueden confundir con fibromialgia, ya que este también se caracterizan por dolor musculoesquelético difuso, mialgias, cefalea, parestesias, alteraciones del patrón del sueño y fatiga.¹¹⁹ Para establecer el diagnóstico de síndrome post-Lyme es necesario hacer diagnóstico diferencial con Síndrome de Fatiga Crónica o Fibromialgia, dicho problema se debe primordialmente a que un pequeño porcentaje de pacientes desarrolla fibromialgia en asociación o inmediatamente después de la infección, lo que sugiere que *Borrelia burgdorferi* es uno de los agentes infecciosos que pueden desencadenar el síndrome de dolor crónico.^{120,93,121,122}

1.4.5. Otras manifestaciones.

Existen otras manifestaciones presentes, tales como lo son el dolor facial y dental así como disfunción de la articulación temporomandibular y de los músculos masticatorios con disfagia y edema de cara.¹¹³

En el caso de las manifestaciones oftalmológicas, estas pueden ocurrir solas o en combinación con otras manifestaciones; la coroiditis es una de las primeras

en describirse,¹²³ sin embargo la conjuntivitis es, probablemente, la manifestación más frecuente,⁸² no es raro encontrar la presencia de inflamación intraocular, la cual puede llevar a la ceguera. Son serológicamente difíciles de diagnosticar y su cuadro se asemeja a los observados en sífilis.¹²⁴

Se ha descrito complicaciones neuro-ópticas, como neuropatía óptica bilateral o neuritis óptica,¹²⁵ otras manifestaciones encontradas son la uveítis, vasculitis retiniales, escleritis posterior y fotofobia;¹²⁶ el involucro hepático suele ser subclínico⁹⁰ y pueden presentar hepatitis leve en etapa temprana, comúnmente la función hepática esta ligeramente anormal, sobretodo en enfermedad diseminada.⁸²

1.5 Diagnóstico

Como ya se ha mencionado el diagnóstico de este padecimiento no es sencillo, es necesario realizar un examen físico exhaustivo, con especial atención a los síntomas neurológicos, reumatológicos y cardiacos, asociados a la enfermedad de Lyme; los hallazgos físicos son inespecíficos y a menudo normales, sin embargo, en algunas ocasiones se pueden encontrar artritis, meningitis y parálisis facial en presentaciones atípicas. De manera frecuente no es posible tomar decisiones terapéuticas en base a pruebas objetivas, ya que existe un número considerable de casos de enfermedad de Lyme crónica, en pacientes sintomáticos, quienes no presentan datos a la exploración o en las pruebas confirmatorias de laboratorio; para determinar si un paciente en particular es candidato para tratamiento con antibióticos, es necesario considerar la historia

de posible exposición, mordedura de garrapatas, erupciones cutáneas o síntomas consistentes con las presentaciones multisistémicas de la enfermedad de Lyme.

El diagnóstico de enfermedad de Lyme es inicial y principalmente de tipo clínico, un elevado número de pacientes no recuerdan el antecedente de la mordedura de garrapata, y se observa que hasta un 50 % de los afectados tampoco presentan la lesión cutánea característica (eritema migrans); el diagnóstico se torna aún más difícil cuando aparecen complicaciones neurológicas, cardíacas o reumatológicas. A pesar de la historia previa de los pacientes, a la mayor parte de los clínicos les es difícil relacionar la sintomatología con el diagnóstico de infección por *Borrelia burgdorferi*.

1.5.1 Métodos directos

Consisten en la observación y/o aislamiento del microorganismo en las muestras clínicas (biopsia de piel, líquido sinovial, sangre y líquido cefalorraquídeo). La mayor parte de los métodos directos representan procedimientos escasamente sensibles, pero constituyen los únicos métodos de confirmación precisa.

Existen una variedad de técnicas que han sido desarrolladas para la detección directa de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, estas pruebas proporcionan evidencia de la presencia de espiroquetas intactas o componentes de la espiroqueta (ADN), proteínas y/o ADN de las garrapatas vectores, de los hospederos intermediarios o de pacientes; se han empleado cuatro diferentes pruebas en el

laboratorio clínico: ensayos basados en microscopía, detección de las proteínas de *Borrelia burgdorferi* o del ácido nucleico de ésta y el cultivo. ²⁶

1.5.1.1 Observación microscópica

Algunas de las técnicas utilizadas son la microscopía de campo oscuro y la tinción de tejidos humanos, la tinción de nitrato de plata y la de naranja de acridina son dos de los métodos para altamente utilizados en la identificación de borrelia; las espiroquetas se pueden identificar como *Borrelia burgdorferi* mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales murinos en la detección por inmunofluorescencia (IFA), sin embargo tanto en el caso de la microscopía de campo oscuro como el IFA su utilidad tiende a ser muy poca, ¹²⁷ esto debido a que el número de microorganismos en las muestras clínicas no suele ser adecuada, por lo que no está indicado para el diagnóstico. ¹²⁸ Su utilidad se ve también limitada para la confirmación por laboratorio, debido a que el microorganismo puede adoptar diversas formas.

1.5.1.2 Cultivo de muestras clínicas

El cultivo de *Borrelia burgdorferi sensu lato* indudablemente es la prueba ideal para la confirmación de la infección activa, sin embargo, esta sólo se emplea en investigación debido a que la técnica es altamente costosa, lenta (mínimo 12 semanas) y con baja sensibilidad, en comparación con el resto de las técnicas; se han propuesto diferentes medios, tanto sólidos como líquidos, para su aislamiento, sin embargo en la actualidad se considera como medio de elección el denominado Barbour-Stoenner-Kelley modificado (BSK-II). ¹²⁸

El cultivo del agente presenta una baja sensibilidad, esto debido al reducido número de microorganismos infectantes; en líquidos corporales es aún más difícil el aislamiento, debido a la rapidez con la que el microorganismo se adhiere a los tejidos. Las muestras de piel de eritema migrans puede dar cultivos positivos en un 40% o 60% de los casos;^{129 130} en lesiones de acrodermatitis crónica atrófica, LCR, líquido sinovial y sangre, se han encontrado resultados poco alentadores.^{29 131}

El cultivo puede ser crucial en casos individuales donde el cuadro clínico sugiera la enfermedad a pesar de serología negativa (Borreliosis seronegativa) como por ejemplo en eritema migrans atípico, sospecha de neuroborreliosis atípica sin detección intratecal de anticuerpos o en sospecha de borreliosis en pacientes inmunocomprometidos.¹³²

1.5.1.3 Detección de antígenos importantes en el inmunodiagnóstico

Es importante conocer la composición antigénica de *Borrelia burgdorferi sensu lato*; las pruebas que detectan antígenos sufren las mismas limitantes que la microscopía, por lo que se han utilizado detección de antígenos en líquido cefalorraquídeo y orina, esto sin buenos resultados.

Los antígenos disponibles incluyen células lisadas enteras de diferentes cepas, antígenos parcialmente purificados o proteínas recombinantes. Se han evaluado también la inmunoreactividad de diferentes proteínas, cuyos pesos moleculares pueden variar ligeramente entre las cepas y tienen diferente

localización en la bacteria, se considera a la proteína flagelar de 41kDa (flagelina o FlaB) como un importante antígeno inmunodominante, lamentablemente a pesar de ser altamente inmunogénico, este antígeno tiene también una alta reactividad cruzada con antígenos en otras bacterias, particularmente cuando son desnaturalizados, como en el Western Blot.

La proteína flagelar de la capa externa (FlaA) con un peso molecular de 37 kDa es otro antígeno inmunodominante, especialmente en enfermedad temprana; uno de los antígenos inmunodominantes que aparece después de la infección con *Borrelia burgdorferi sensu lato* es que la codifica para la proteína OspC de 21 a 25 kDa. La OspC es heterogénea, la proteína BmpA cromosómicamente codificada de 39 kDa también es inmunogénica. Se han encontrado diferencias genéticas y antigénicas entre las secuencias de BmpA de las diferentes genoespecies de *Borrelia burgdorferi sensu lato* lo que limita su uso en las pruebas serológicas; otra proteína inmunogénica es la proteína A que se une a Decorina (DbpA) también denominada Osp17, la cual tiene un peso molecular aproximado de 17 kDa.

La proteína VlsE, una lipoproteína de superficie codificada por el plásmido lineal lp28-1 de *Borrelia burgdorferi* B31 es altamente inmunogénica con un peso molecular de 34 a 35 kDa; una de las regiones invariables (IR6), que se encuentra dentro de la porción variable de VlsE, y es altamente inmunogénica, esta se conserva en todas las especies de *Borrelia burgdorferi sensu lato* haciéndola buen candidato para ser usado como un antígeno inmunodominante

reactivo, las proteínas P35/BBK32 y P37 son otros antígenos prometedores. BBK32 es una proteína de unión de fibronectina descrita inicialmente como p35 de 47kDa.²⁶

1.5.1.4 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sondas de ADN

La utilización de técnicas moleculares se basan principalmente en métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la sensibilidad de las pruebas de PCR puede disminuir por la degradación del ADN de *Borrelia burgdorferi sensu lato* durante el transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras.²⁶ Debido a que la dinámica de la respuesta inmunológica despertada en la enfermedad de Lyme no se comprende del todo y que el cultivo es poco sensible, debido a la baja cantidad de microorganismos presentes en las muestras y al hecho de que muchos de ellos son secuestrados en los tejidos, la detección de pequeñas cantidades de ADN de *Borrelia burgdorferi* por PCR es potencialmente útil, siendo la piel, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y la sangre total tejidos que pueden ser investigados por PCR.

Algunos de los ejemplos, son los genes de los plásmidos que codifican para Osp A y Osp B, genes del cromosoma como los que codifican para la proteína flagelar o p66 (clon de 2H1) o segmentos de genes de 16s ARNr o 5s/23s ARNr gene de la región intergénica.¹³³ Puede ser cualitativo (PCR convencional o anidado) o cuantitativo (PCR competitivo o PCR en tiempo real), la selección del gen apropiado, es lo que determinará la sensibilidad de cada prueba.^{134 135}

Para el diagnóstico de laboratorio de la infección por *Borrelia burgdorferi sensu lato* usualmente un PCR cualitativo es suficiente.

Lo más importante en el desarrollo de un nuevo protocolo de PCR, es la selección del gen blanco y el iniciador de amplificación, se recomienda un cebador con rendimiento de 100 a 300 bp como una alta eficiencia de amplificación bajo las condiciones estándar del PCR.²⁶ El PCR debe permitir el diagnóstico de las especies de *Borrelia*, y el reporte debe especificar la especie patógena encontrada, la utilidad diagnóstica de PCR es similar a la del cultivo. La detección de *borrelia* en fluidos corporales es mucho más difícil que en tejido tanto en cultivo como en PCR,¹³⁶ únicamente el PCR de líquido sinovial presenta la mayor sensibilidad que el cultivo.¹³⁷

La sensibilidad del PCR para la detección del ADN de *Borrelia burgdorferi sensu lato* en sangre, plasma o suero de pacientes con enfermedad de Lyme es baja, esto puede ser un reflejo de la falta de espiroquetemia o de una espiroquetemia transitoria, así como un bajo nivel de espiroquetas en sangre y/o la presencia de inhibidores de PCR en la sangre del huésped.¹³⁸

La más alta tasa de detección (50-70%) del cultivo y del PCR es en biopsias de piel de pacientes con eritema migrans o acrodermatitis crónica atrófica,¹³¹ esto en contraste con la detección de *Borrelia* por PCR o por cultivo de líquido cefalorraquídeo de los pacientes con neuroborreliosis es de sólo 10-30%.¹³⁶ El aislamiento de los microorganismos de líquido cefalorraquídeo es más

frecuente en pacientes con una duración corta de la enfermedad que en aquellos en quienes la enfermedad ha tenido una evolución más larga.¹³⁶ De igual manera en el 50-70% de los pacientes por artritis de Lyme, el líquido sinovial es positivo para borrelia por PCR, sin embargo el cultivo rara vez tiene éxito; ¹³⁹ es importante mencionar que los mejores resultados de PCR se obtienen del tejido sinovial, no del líquido sinovial. ¹⁴⁰

1.5.2 Métodos indirectos

Debido a que ni la visualización directa ni los cultivos han probado ser lo suficientemente sensibles para uso rutinario en el diagnóstico de enfermedad de Lyme, éste depende básicamente de pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*.

1.5.2.1 Inmunofluorescencia indirecta

Esta prueba fue una de las primeras disponibles para la identificación de *Borrelia burgdorferi*, la inmunofluorescencia indirecta (IFA) usa organismos cultivados fijados a laminillas de vidrio; los especímenes de suero se diluyen en preparaciones que pueden incluir un absorbente tal como el material derivado de la treponema de Reiter o del saco de la yema de huevo para remover los anticuerpos no específicos. Los anticuerpos dirigidos contra las borrelias detectan por medio del microscopio de fluorescencia usando isotiocianato de fluoresceína con anticuerpos IgG o IgM. ²⁶ Al excitarse el isotiocianato de fluoresceína hace emitir luz fluorescente de color verde, lo que indica la

presencia del antígeno en la muestra o de anticuerpos específicos del suero.¹⁴¹
Se consideran positivos títulos de 128 para IgM y 256 para IgG.²⁶

La IFA ha empleado para el diagnóstico en diversas muestras biológicas, pero su principal limitante es la subjetividad del observador y las frecuentes reacciones cruzadas.¹⁴¹ En un estudio en pacientes con enfermedad de Lyme temprana IFA resultó menos sensible que ELISA,¹⁴² algunos otros estudios señalan que la especificidad y sensibilidad de IFA es adecuada en casos complicados, pero no en aquellos pacientes con eritema migrans únicamente.

143

La necesidad de un microscopio de fluorescencia y personal bien entrenado además de la subjetividad en la lectura e interpretación de la microscopía de fluorescencia, son limitaciones importantes en la utilización de este método.

1.5.2.2 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

El método serológico más ampliamente utilizado se basa en ensayos inmunoenzimáticos de ELISA convencional.¹⁴⁴ La prueba de ELISA ha demostrado ser más sensible y específica que la IFA y es la prueba más utilizada para el diagnóstico de enfermedad de Lyme. La sensibilidad y la especificidad varían ampliamente dependiendo del laboratorio que lo produce y de la población estudiada.

Esta prueba usualmente utiliza antígenos derivados del organismo completo; según el estuche comercial, se puede detectar IgM, IgG, IgA o conjuntamente

IgM / IgG. Los antígenos purificados como el componente flagelar, o antígenos recombinantes como el p39 han sido agregados a la mezcla de antígenos en diversos estuches comerciales.

El ELISA se asocia con una alta tasa de resultados *falsos positivos*, por lo que toda prueba con resultado positivo o indeterminado debe ser confirmada por Western Blot. Desafortunadamente esta prueba serológica no ha sido estandarizada con variaciones intralaboratorio e interlaboratorio.¹⁴⁵

Existen dos tipos principales de técnicas de ELISA, uno se basa en la detección de anticuerpos dirigidos contra el antígeno de 41kDa y otro para detectar los anticuerpos contra el antígeno 39kDa. La prueba basada en el antígeno de 41kDa es muy sensible pero poco específica, mientras que usa el antígeno de 39 kDa es muy específica¹⁴⁶ pero poco sensible.¹⁴⁷

Recientemente salió al mercado un estuche comercial que emplea solamente un derivado peptídico sintético obtenido de la secuencia VIsE (IR6 o C6); en la prueba de ELISA C6 se utiliza un péptido antigénico sintético derivado de la proteína de membrana VIsE, que se expresa inmediatamente después de la infección, y le confiere al ELISA alta especificidad y sensibilidad.¹⁴⁸ La proteína tiene una secuencia peptídica altamente conservada en las especies de *Borrelia burgdorferi* y en otras genopecies, como *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii*. Como el antígeno empleado en ELISA C6 representa una pequeña secuencia definida de la proteína VIsE, el riesgo de reacciones cruzadas con antígenos encontrados en otros microorganismos es muy reducido,¹⁴⁹⁴⁸ además de no

incluir la proteína de superficie Osp A, por lo que hay ausencia de falsos positivos en individuos vacunados aunque persiste la reactividad cruzada en pacientes con sífilis, ehrlichiosis y Artritis Reumatoide.^{150 151}

Una de las limitantes principales de las pruebas de ELISA, es que hasta la fecha no existe una prueba estandarizada aprobada por la FDA, y existen numerosas variaciones en la composición antigénica de los estuches comerciales existentes, y por lo tanto, en la sensibilidad y especificidad de cada una; el ELISA tiene ventajas comparada con otros inmunoensayos, pues es rápida, objetiva (al expresarse numéricamente) y automatizada.

Las preparaciones de células con antígeno completo carecen de especificidad por la posibilidad de reacción cruzada con antígenos bacterianos comunes, con proteínas de choque térmico, antígenos flagelares y otros;²⁶ un resultado “falso positivo” se define como una prueba de ELISA positiva con un Western Blot negativo. La reactividad cruzada de anticuerpos puede ocurrir con otras enfermedades producidas por otras borrelias, como la fiebre ondulante; enfermedades producidas por otras espiroquetas (sífilis, leptospirosis, pinta); enfermedades virales y autoinmunes (lupus, artritis reumatoide).

Se observa también la presencia de reactividad cruzada importante con la flagelina de bacterias gram-negativas que habitualmente colonizan el intestino o producen infecciones urinarias; el virus de Epstein-Barr y los parásitos pueden producir resultados falsos positivos por medio de la activación policlonal de

células B, fenómeno similar al ocurrido en enfermedades inflamatorias crónicas como endocarditis bacteriana subaguda. Se estima que aproximadamente un 5% de la población general puede tener una prueba de ELISA positiva secundaria a anticuerpos generados por otras infecciones o a una respuesta inmune a la flora normal.^{141 152 153}

Un resultado “falso negativo” en ELISA es, se presenta comúnmente en etapas tempranas de la enfermedad antes de que se desarrollen anticuerpos IgM; en pacientes con enfermedad tardía quienes recibieron tratamiento en fases tempranas con detención del desarrollo de una respuesta humoral normal y, raramente en pacientes en quienes los títulos de anticuerpos han disminuido a través del tiempo. Finalmente el paciente con enfermedad de Lyme, puede permanecer seropositivo aún cuando la enfermedad ya no se encuentre activa.

154

Las preparaciones usadas como fuente de antígenos deben incluir OspC, que es el antígeno inmunodominante de la respuesta IgM y también deben incluir DbpA que es el antígeno inmunodominante de la respuesta IgG, así como los antígenos recombinantes específicos (VlsE) o péptidos sintéticos. La proteína VlsE tiene otros epítopes inmunodominantes además de la región C6 que podría mejorar la sensibilidad diagnóstica. La heterogeneidad de los epítopes inmunodominantes debe ser considerada, especialmente en Europa en donde hay mayor variedad de genoespecies que afecten al hombre.¹⁵⁵

1.5.2.3 Western blot

El Western blot utiliza antígenos totales de lisados de células separados electroforéticamente de acuerdo a su peso molecular transferidos a una membrana la cual se incuba con los sueros a analizar. Esta prueba ha contribuido al conocimiento de los antígenos inmunodominantes,²⁶ sin embargo, como los antígenos varían dependiendo las cepas de borrelias, no existe un estuche comercial estandarizado hasta la fecha.

En el Western blot se detectan las proteínas inmunodominantes Osp A (30 a 32 kDa), Osp B (34 a 36 kDa) y Osp C (21 a 25 kDa) y algunas otras más, los anticuerpos contra estas proteínas pueden persistir por meses o años por lo que no son marcadores de actividad.

Como una prueba confirmatoria, el inmunoblot debe tener alta especificidad (por lo menos 95%), dado que la gran cantidad de antígenos presentes en los lisados de células totales. Algunos estuches usan anticuerpos monoclonales para definir; cuando se usan antígenos recombinantes la identificación de bandas diagnósticas es mucho más fácil, sin embargo en una prueba confirmatoria deben usarse lisado de células totales que expresan mayor diversidad de antígenos inmunodominantes.

Los criterios de interpretación del inmunoblot recomendados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) que utilizan en Estados Unidos

no se aplican a pacientes infectados con cepas europeas;¹⁵⁶ Dressler y colaboradores demostraron que la respuesta inmune de los pacientes europeos muestran anticuerpos dirigidos contra un espectro más estrecho de proteínas de *Borrelia*, que el mostrado por sueros de pacientes americanos. Los patrones de reacción en el inmunoblot varían considerablemente en sueros de función de las cepas utilizadas como antígenos; el uso de antígenos recombinantes en el inmunoblot tiene varias ventajas sobre los antígenos de células enteras lisadas:

- 1) Se pueden seleccionar antígenos específicos (p83/100, Bmp A).
- 2) Pueden combinar dos antígenos homólogos provenientes de diferentes cepas.
- 3) Es posible diseñar segmentos de antígenos con alta especificidad como por ejemplo fragmentos internos de flagelina.
- 4) Se pueden usar antígenos expresados de forma primaria in vivo (Dbp A, VlsE).¹⁵⁷

El CDC considera que los sueros de pacientes son positivos para anticuerpos IgG dirigidos contra *borrelia* si presentan al menos 5 bandas de reacción antígeno-anticuerpo con cualquiera de las proteínas de los siguientes pesos moleculares 18, 21 (Osp C), 28, 30, 39 (Bmp A), 41(Fla), 45, 58, 66 y 93 kDa. En cambio, considera un resultado positivo para IgM cuando la prueba da inmunorreacción con al menos 2 de las siguientes 3 bandas: 21 kDa (Osp C), 39 kDa (Bmp A) y 41kDa.¹⁵⁸

La interpretación del Western Blot en Europa difiere a la descrita por el CDC, y depende de los antígenos utilizados. Si se emplean antígenos recombinantes se considera positivo para IgG si existen; 2 o más bandas de las siguientes: p83/100, p58, p39, OspC (p25), p41, Osp 17. En cuanto a IgM se considera positivo si hay 2 o más bandas: p39, OspC, p41, Osp 17 o Osp C sólo. Si se utiliza lisado de células completas, el Western blot IgG se considera positivo cuando hay 2 o más bandas de reacción antígeno-anticuerpos de los siguientes pesos moleculares: p83/100, p58, p39, p30, OspC (p25) p14, Osp 17 y p21. IgM es positivo con la presencia de 1 banda: p41, p39, p30, OspC y Osp17. ¹⁵⁹

Un ejemplo de las bandas más frecuentes por IgG e IgM se anexa en Figura 1.

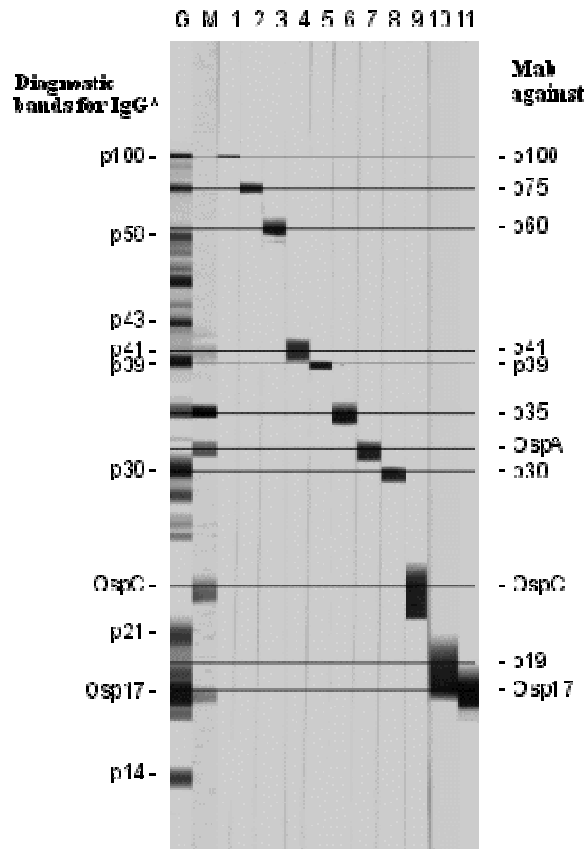


Figura 1. Bandas diagn3sticas de IgG o IgM para borrelia y anticuerpos monoclonales Estandarizaci3n de Western blot.¹³²

1.5.2.4 Determinación del índice líquido cefalorraquídeo/suero

En Lyme existen manifestaciones neurológicas importantes, por lo que es necesario determinar la disfunción potencial de la barrera hematoencefálica, por la detección intratecal de anticuerpos dirigidos contra *Borrelia*; ¹⁶⁰ la determinación del índice de anticuerpos de líquido cefalorraquídeo/suero nos confirma el involucro actual o pasado del sistema nervioso; el índice puede ser positivo en algunos casos en los que los anticuerpos séricos son negativos o indeterminados, sobretodo si la enfermedad del paciente ha sido de corta duración. ¹³²

El índice de IgG líquido cefalorraquídeo/suero puede ser positivo entre el 80% y 90% de los pacientes, de 8 a 14 días después del inicio de la enfermedad e incluso el 100% de los pacientes, 841 días o más posteriores al inicio de la enfermedad. ¹⁶¹ La detección de anticuerpos IgM intratecales, muestran un alto grado de sensibilidad en neuroborreliosis con un índice suero / líquido cefalorraquídeo positivo y es esencial para el diagnóstico de borreliosis crónica, en el sistema nervioso central. ¹⁶²

Sin embargo, la punción lumbar ha sido desaconsejada como prueba diagnóstica para descartar la infección activa del sistema nervioso central, en la enfermedad de Lyme la evaluación del líquido cefalorraquídeo no es confiable para diagnosticar encefalopatía o neuropatía, por su pobre sensibilidad, por ejemplo, la pleocitosis estaba presente en sólo uno de 27 pacientes (sensibilidad del 3%) y con solo siete células, el índice de anticuerpos era

positivo (>1) en solo uno de 27 pacientes (sensibilidad del 3%). Un índice entre los anticuerpos del Lyme en el líquido cefalorraquídeo y los del suero determinados por ELISA, sería de esperar que el índice propuesto de 1.3, tuviera incluso una sensibilidad más baja.

1.6 Criterios de diagnóstico clínico.

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme debe realizarse con bases clínicas que sugieran la enfermedad. En las etapas tempranas el diagnóstico clínico puede hacerse solamente mediante la identificación de la lesión clásica de eritema migrans; es importante recordar que muy probablemente estos pacientes sean seronegativos, ya que dicha lesión, se desarrolla antes de que la respuesta inmune aparezca.

La evaluación serológica debe ser realizada únicamente si existe evidencia clínica y no como método de rastreo en una población asintomática.

Para realizar el diagnóstico es recomendable efectuar dos pruebas serológicas ¹⁶³, de forma inicial mediante una prueba de ELISA seguida de Western blot; la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFA) puede ser sustituta de la prueba de ELISA, ¹⁶⁴ si dicha prueba es positiva o indeterminada debe realizarse la prueba de Western blot (IgM e IgG para infecciones tempranas con menos de 4 semanas de sintomatología o IgG si los síntomas se han presentado por más de 4 semanas). Si el resultado de ELISA es negativo, no es necesario realizar Western blot.

Es importante señalar que las pruebas de diagnóstico serológico son insensibles durante las primeras semanas de la infección; el 20% o 30% de los pacientes en Estados Unidos tienen respuestas positivas, usualmente del isotipo IgM durante este periodo. Dos a cuatro semanas después de la mordedura el 70% u 80% de los pacientes tienen serorreactividad, incluso después del tratamiento antibiótico, después de un mes, la mayoría de los pacientes con infección activa tienen respuestas de anticuerpos IgM.

1.7 Vigilancia epidemiológica.

El CDC (Centro de Control de Enfermedades Transmisibles) en Estados Unidos y el EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis) en Europa, son los encargados de vigilar los aspectos epidemiológicos, vectores, biología molecular y además aprueba los métodos serológicos adecuados para la detección de Lyme.^{71, 132}

Definición de caso de enfermedad de Lyme para vigilancia nacional: (Estados Unidos)

- **Eritema migrans observada por el médico:** Esta lesión se expande lentamente en un periodo de días o semanas formando una lesión larga, redondeada, frecuentemente con una zona clara central. Para propósitos de vigilancia, una lesión solitaria debe medir al menos 5 cm.
- **Sistema Nervioso:** Al menos debe estar presente una de las siguientes manifestaciones clínicas y evidencia de infección por el

laboratorio: meningitis linfocítica, neuritis craneal, radiculoneuropatía o raramente, encefalomiелitis sola o en combinación con la radiculoneuropatía. Para propósitos de vigilancia, la encefalomiелitis debe presentar evidencia de anticuerpos vs. *Borrelia burgdorferi* de producción intratecal en el líquido cefalorraquídeo.

- **Sistema cardiovascular:** Inicio reciente de defectos de conducción auriculoventricular de alto grado (2º o 3er. grado) que se resuelven en días o semanas y también se asocian con miocarditis.
- **Sistema musculoesquelético:** Ataques breves y recurrentes (en las últimas semanas o meses) o inflamación objetiva y confirmada por el médico de una o varias articulaciones, en algunas ocasiones seguida de artritis crónica monoarticular u oligoarticular.
- **Evidencia de laboratorio:** Aislamiento de *Borrelia burgdorferi* del tejido o fluidos corporales o la detección de valores diagnósticos de anticuerpos en contra de la espiroqueta por medio del esquema de dos pasos: (ELISA y Western blot) interpretado acorde a los criterios del CDC.

Definición de Caso según la European Union Concerted on Lyme

Borreliosis:

- **Eritema crónico migrans:** Definido como lesión eritematosa, no elevada, con aclaramiento central y borde activo, frecuentemente de color intenso. Cultivo de borrelia a partir de la biopsia de piel con cambios significativos en los niveles de anticuerpos específicos o la presencia de IgM específica.
- **Linfocitoma:** Nódulo o placa eritematosa, no dolorosa, usualmente en el lóbulo de la oreja, hélix, pezón o escroto. Más frecuente en niños (especialmente en la oreja) que en adultos. La evidencia de laboratorio sugiere cambios en los niveles de anticuerpos específicos o la presencia de IgM específica contra borrelia.
- **Neuroborreliosis temprana:** Meningoradiculitis dolorosa con o sin parálisis facial u otro tipo de neuritis craneal (Síndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth). En niños más comúnmente meningitis, parálisis facial unilateral (en algunos casos bilateral) u otras neuritis craneales. Anticuerpos específicos antiborrelia IgM e IgG intratecales. Bandas oligoclonales específicas en líquido cefalorraquídeo. Cambios significativos en los niveles de anticuerpos específicos o la presencia de IgM específica. Cultivo de líquido cefalorraquídeo positivo.
- **Carditis por Lyme:** Inicio agudo de alteraciones auriculoventriculares (II-III), alteraciones de la conducción, alteraciones del ritmo y en algunas

ocasiones miocarditis o pancarditis. Cambios significativos en los niveles de anticuerpos o IgG específica. Cultivo de biopsia de endocardio.

- **Artritis por Lyme:** Ataques breves y recurrentes de inflamación articular objetiva de una o varias articulaciones que usualmente progresa a artritis crónica. Presencia de IgG específica o anticuerpos (niveles usualmente altos). Cultivo de líquido o tejido sinovial.
- **Acrodermatitis crónica atrófica:** Lesiones eritematosas de larga duración, usualmente en las superficies extensoras de las extremidades, posiblemente con inflamación. Las lesiones eventualmente se vuelven atróficas sobre las prominencias óseas. Puede haber induración cutánea. Presencia de IgG específica o niveles elevados de anticuerpos y la presencia de histología o cultivo de la biopsia de piel.
- **Neuroborreliosis crónica:** Una condición rara. Encefalitis, encefalomielitis, meningoencefalitis, radiculomiелitis de larga duración. Pleocitosis linfocítica en líquido cefalorraquídeo. Anticuerpos específicos detectados intratecalmente. IgG sérica específica. Bandas oligoclonales específicas en líquido cefalorraquídeo.

Pese a contar actualmente con todas las pruebas antes descritas, es importante resaltar que el criterio clínico continúa siendo necesario en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme tardía.^{86,165,97,98}

1.8 Co-infecciones

Aunque *Borrelia burgdorferi* sigue siendo el patógeno más frecuentemente transmitido por las garrapatas. Durante la mordedura la garrapata puede introducir otras infecciones, existen coinfecciones que pueden complicar el diagnóstico, signos y síntomas de la enfermedad de Lyme, estas infecciones pueden ocurrir solas o en varias combinaciones.

Las coinfecciones con ehrlichia y con subespecies de babesia son descritas cada vez más en pacientes con enfermedad de Lyme, particularmente en aquellos en etapa crónica. Bartonella es otro organismo que es transmitido por garrapatas *Ixodes* y la evidencia sugiere que es un agente potencial de coinfección en la enfermedad de Lyme. Recientes estudios en animales y humanos sugieren que la enfermedad de Lyme puede ser más severa y resistente a la terapia en pacientes coinfectados, por lo tanto pruebas y tratamientos simultáneos para las coinfecciones son obligatorias en los pacientes con enfermedad de Lyme.

1.8.1 Babesiosis (Piroplasmosis)

La babesia es un protozooario intracelular, existen alrededor de 100 especies del género Babesia, aunque en los Estados Unidos la mayoría de las infecciones en humanos son causadas por *Babesia microti* y en Europa por *Babesia divergens* y *B. Boris*. Como coinfección de *Borrelia burgdorferi* cerca de un 20% de los casos de enfermedad de Lyme tienen de forma concomitante infección por Babesia; cuando ambas infecciones están presentes la duración

de la enfermedad así como la intensidad de los síntomas son mayores, con la presencia de fiebre, escalofríos, debilidad generalizada, síntomas gastrointestinales (anorexia, náusea, dolor abdominal, vómito, diarrea entre otros), anemia, mialgias, artralgias, síntomas respiratorios y orina oscura.

Esta combinación puede ser letal, en algunos pacientes cerca del 7% pueden presentar coagulación intravascular diseminada, síndrome agudo de distress respiratorio y falla cardíaca. La mayoría de los pacientes con Babesia tienen la forma crónica persistente de la infección, frecuentemente presentan anemia hemolítica severa probablemente correlacionada con la invasión de los eritrocitos por el parásito y una cuenta leucocitaria disminuida. ¹⁶⁶

1.8.2 Micoplasmas

Aproximadamente 60% de los pacientes con enfermedad de Lyme tienen infecciones por micoplasmas (*Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. penetrans*, entre otros). Los micoplasmas se encuentran intracelulares en varios tejidos y raramente están libres en circulación. Las infecciones por micoplasmas pueden causar de manera independiente muchos de los signos y síntomas encontrados en la enfermedad de Lyme o pueden exacerbarlos y complicar el tratamiento de la condición. Además de la enfermedad de Lyme, se ha encontrado infecciones por micoplasmas con una incidencia del 40-60% en fibromialgia, síndrome de fatiga crónica, artritis reumatoide y síndrome de la guerra del golfo.

1.8.3 Ehrlichiosis

Otras coinfecciones encontradas en enfermedad de Lyme son las rickettsiosis producidas por especies de Ehrlichia, ¹⁶⁷ estas son organismos gram-negativos, pleomórficos, intracelulares obligados, estructuralmente similares a los micoplasmas, así como también en su localización y sintomatología resultante. Pueden causar síntomas y signos después de 1 a 3 semanas de la exposición tales como fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, tos y confusión, además de anemia transitoria moderada, aumento en la velocidad de sedimentación globular, aumento de la creatinina y el nitrógeno ureico; la serología sólo es positiva después de 1 ó 2 semanas. ¹⁶⁷

1.8.4 Bartonella.

Bartonella sp es una bacteria gram negativa que causa múltiples manifestaciones, incluyendo la enfermedad por arañazo de gato, angiomatosis bacilar y otras; las especies más importantes asociados a patología en el humano son *B. henselae*, *B. quintana* y *B. bacilliformis*. Los síntomas de bartonella son prácticamente indistinguibles de Lyme, incluyen linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia, cefalea, encefalopatía, somnolencia, malestar similar a la gripa, pérdida de peso, odinofagia, osteólisis y osteomielitis.

En casos agudos puede haber anemia y hemólisis, fiebre alta, respuesta inmune disminuida, ictericia, enzimas hepáticas alteradas y mialgias, se ha reportado también endocarditis, miocarditis, irritabilidad del sistema nervioso central con agitación, ansiedad, insomnio, convulsiones, síntomas de encefalitis

con déficits cognitivos y confusión; también se observa gastritis, dolor abdominal bajo (adenitis mesentérica), nódulos subcutáneos a lo largo de las extremidades y eritema, telangiectasias y erupciones papulares eritematosas.

168

Los pacientes con enfermedad de Lyme están en riesgo de contraer una variedad de infecciones oportunistas, incluyendo otras infecciones bacterianas, virales y fúngicas, esto puede complicar el diagnóstico y el tratamiento, pero puede ser principalmente un problema en la fase tardía persistente de la enfermedad. Los pacientes en etapa tardía con manifestaciones neurológicas tales como meningitis, encefalitis, neuropatía periférica y otros signos y síntomas pueden complicarse con coinfecciones que no son reconocidas o tratadas por sus médicos.

1.9 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la enfermedad de Lyme requiere la consideración de etiologías infecciosas y no infecciosas; entre las causas no infecciosas están las enfermedades tiroideas, artritis degenerativa, desórdenes metabólicos (deficiencia de vitamina B12, diabetes), intoxicación por metales pesados, vasculitis y trastornos psiquiátricos primarios.

Las causas infecciosas pueden imitar ciertos aspectos de las manifestaciones multisistémicas típicas vistas en la enfermedad de Lyme crónica, estas incluyen síndromes virales como el parvovirus B19 o la infección del virus del Nilo y

bacterianas como fiebre recurrente, sífilis, leptospirosis y micoplasma; las características clínicas de la enfermedad de Lyme crónica pueden ser indistinguibles de la fibromialgia y el síndrome de fatiga crónica.

1.10 Tratamiento

Puesto que la enfermedad de Lyme puede hacerse persistente, recurrente y refractaria incluso a pesar del uso de antibiótico, la evaluación y el tratamiento debe ser inmediato y agresivo; los datos disponibles apoyan el uso inmediato de antibióticos para prevenir la enfermedad de Lyme crónica, puede ser necesario iniciar terapia antibiótica en base a la sospecha diagnóstica (incluso sin una prueba definitiva) por lo que decisiones sobre el tratamiento no deberían basarse rutinariamente o exclusivamente en los resultados de laboratorio.^{2 94}

No se ha estandarizado la dosis óptima de los antibióticos ni la duración de la terapia, pero algunos datos sugieren que las dosis elevadas y los tratamientos prolongados son benéficos. La farmacoterapia de primera elección para la enfermedad de Lyme puede incluir en orden alfabético: amoxicilina, azitromicina, cefuroxima, claritromicina, doxiciclina y tetraciclina, estos antibióticos tienen resultados similares en ensayos comparativos de la enfermedad temprana de Lyme.^{118 169 170 17190}

Kaplan y colaboradores ha sugerido que 100 mg dos veces al día durante 30 días de doxiciclina oral es tan efectivo como 2g diarios durante 30 días de ceftriaxona intravenosa en la enfermedad de Lyme temprana diseminada.¹⁷² Es una práctica común considerar los antibióticos intravenosos cuando fracasan los medicamentos orales en pacientes con Lyme persistente, recurrente o

refractario y como la primera opción terapéutica para ciertas condiciones como encefalitis, meningitis, neuritis óptica, derrame articular y bloqueo cardiaco.

Está justificado también el uso de antibióticos intravenosos cuando se pretende obtener buena penetración en el sistema nervioso central.^{173,174,175}

En cuanto a antibióticoterapia por vía intramuscular, la penicilina benzatínica (de 1.2 a 2.4 millones de unidades por semana) es a veces efectiva en pacientes que no responden a los antibióticos orales ni intravenosos; un tercio de la población con enfermedad de Lyme crónica responde a la penicilina benzatínica intramuscular a la dosis estándar por 2 a 4 semanas.^{176,43} La infección polimicrobiana es una nueva preocupación para los pacientes con enfermedad de Lyme y la coinfección es cada vez más descrita en pacientes críticamente enfermos.⁹⁴

La terapia combinada con dos o más antibióticos es cada vez más utilizada para la enfermedad de Lyme refractaria^{15 177 178 179 180 181 64} y ha sido utilizada como terapia inicial para algunas presentaciones crónicas. Este enfoque ya es usado en otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la Babesiosis,¹⁸² el esquema de antibióticos actualmente utilizado para tratamiento de la enfermedad de Lyme, se observa en la Tabla I.

El tratamiento de la etapa crónica de la enfermedad de Lyme, requiere una combinación de antibióticos.

Existen cuatro razones principales para el empleo de antibióticoterapia combinada:

1. *Borrelia burgdorferi* se encuentra en fluidos y tejidos; no existe un antibiótico capaz de lograr concentraciones eficaces en ambos compartimientos, una combinación lógica, por ejemplo, es azitromicina y penicilina.
2. Otra razón, es el hecho de que borrelia puede penetrar a las células y permanecer viable, por lo que combinaciones típicas incluyen antibióticos con efecto a nivel extra e intracelular, por ejemplo, macrólidos y metronidazol; otra combinación propuesta es la combinación de un agente bactericida con uno bacteriostático, de preferencia un antibiótico que actúe a nivel de la pared celular con una tetraciclina.
3. Se ha reconocido que borrelia, a lo largo de su ciclo, puede tomar diversas formas (espiroqueta, esferoplasto, quiste). Los esferoplastos y quistes no poseen pared celular, por lo que los betalactámicos no afectan, sin embargo dichas formas han mostrado susceptibilidad a las tetraciclinas y macrólidos. Aparentemente borrelia, puede cambiar a cualquiera de estas formas durante el curso de la infección, ésta es la razón por la cual son necesarios diferentes antibióticos a lo largo del ciclo.

4. Los antibióticos comúnmente empleados para tratar la enfermedad de Lyme, no matan a la forma quística, pero existe evidencia fehaciente de que metronidazol y tinidazol son efectivos contra estas formas; se recomiendan estos fármacos también, en pacientes crónicamente enfermos, que no responden adecuadamente a antibióticos convencionales.¹⁸³

Una secuencia lógica y atractiva sería utilizar terapia intravenosa primero (ceftriaxona intravenosa por ejemplo), por lo menos hasta que la progresión de la enfermedad sea detenida y luego seguir con terapia oral para la enfermedad de Lyme persistente y recurrente. Existen informes que muestran tasas de fracaso entre el 30% y 62% dentro de los tres años siguientes al tratamiento breve con antibióticos que se pensaban eficaces contra la enfermedad de Lyme.^{93,6} La terapia sintomática (particularmente medicación antiinflamatoria, antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina e hidroxiclороquina) puede ser útil en conjunto con los antibióticos y en casos de falla a antibióticos.

Complica significativamente la decisión de suspender antibióticos, el hecho de que algunos pacientes presentan recurrencia de la enfermedad después de la resolución inicial de sus síntomas, lo que sugiere una terapia antibiótica incompleta, aún más que un tratamiento arbitrario de 30 días, la respuesta clínica del paciente debería guiar la duración de la terapia. La decisión de

suspender antibióticos, debería realizarse consultando a los pacientes y tomando en cuenta factores como la frecuencia y duración de la infección persistente, frecuencia de la recurrencia, probabilidad de enfermedad de Lyme refractaria, avances con los antibióticos, la importancia para el paciente de interrumpir los antibióticos y el potencial para un seguimiento meticuloso.

La aproximación ideal sería continuar con la terapia para la enfermedad de Lyme hasta que la espiroqueta sea erradicada.¹⁸⁴

TABLA I.- ESQUEMA DE ANTIBIÓTICOS ACTUALMENTE UTILIZADO PARA TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE LYME ¹⁷⁵

| Medicamentos | Dosificación | |
|---|--|---|
| | – Adultos | Niños |
| Preferentemente oral Amoxicilina | 500 mg c / 8 hrs. | 50 mg/kg/ día distribuido en tres dosis diarias (máx. 500 mg por dosis) |
| Doxiciclina | 100 mg c / 12 hrs. | < 8 años no recomendado > 8 años: 1-2 mg/kg/ c / 12 hrs. (máx. 100 mg/ dosis) |
| Alternativas orales Cefuroxima-acetilo | 500 mg c / 12 hrs. | 30 mg/kg /día distribuido en dos veces (máx. 500 mg/día) |
| Preferentemente – parenteral Ceftriaxona | 2 g / IV / día | 75-100 mg/kg IV / día (máx. 2 g) |
| Alternativa – parenteral Cefotaxima | 2 g / IV c / 8 hrs. | 150-200 mg/kg/ día IV, en tres dosis (máx. 6g) |
| Penicilina G | 18-24 millones de unidades IV /día. Divididas c/ 4 hrs. | 200.000– 400.000 unidades/ kg distribuidas diariamente y administradas cada 4 horas (max. 18-24 millones unidades/ día) |

1.11 Importancia de búsqueda de enfermedad de Lyme

Existen escasos reportes en cuanto a las evidencias de borreliosis en seres humanos de nuestro país. En Sinaloa se describe un caso de eritema crónico migrans asociado a artritis.¹⁸⁵ En Nuevo León encontraron solo un paciente reportado con lesiones crónicas cuya biopsia fue positiva por PCR para borreliosis.¹⁸⁶ Gordillo y colaboradores reportaron un 0.3 % de positividad en un rastreo al azar de sueros congelados provenientes de donadores de todo el país, el mayor número de los sueros positivos fueron de individuos del noreste y del centro de México.¹⁸⁷

En el año 2003 se reportó un estudio de un banco de sueros de la ciudad de México y el noreste de la República Mexicana, donde se encontraron 12.6% casos positivos por ELISA, de los cuales 3.43 % fueron confirmados por Western blot en el Distrito Federal y 6.2% en la zona del noreste del país, incluyendo Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.¹⁸⁸

Un estudio realizado en Houston Texas, área considerada como no endémica, se encontró un número inesperadamente elevado de seropositividad y se planteó la posibilidad de la presencia de la enfermedad no diagnosticada por no sospechar en ella.¹⁸⁹

1.12 Originalidad

Por primera vez se realizó un estudio sistemático en nuestro país, basado en sintomatología y métodos de laboratorio que puedan detectar *Borrelia burgdorferi* incluyendo las especies americanas y europeas en pacientes con

sintomatología sugestiva de Lyme. Los pacientes positivos fueron catalogados erróneamente como idiopáticos antes de incluirse en este estudio.

1.13 Justificación

En México, se ha reportado la presencia de 26 especies de garrapatas *Ixodes*, siendo este el vector portador de la enfermedad de Lyme, además se ha reportado *Ixodes scapularis*, como el vector más frecuente en Estados Unidos, zonas de Coahuila y sur de Texas.⁵⁴ Se ha identificado *Ixodes* en Baja California, Yucatán, Golfo de México y la noreste de la República Mexicana.¹⁹⁰ Vargas y colaboradores encuentran en garrapatas *Ixodes scapularis* y *Amblyomma americanum* del noreste de México la presencia de DNA de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* en ninfas (7%) y 2 garrapatas adultas (3%).¹⁹¹

Se ha demostrado la presencia de un 3% de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en venados de cola blanca del noreste de México.¹⁴ Los venados son los hospederos finales de *Ixodes* adultos y la función primaria de estos mamíferos en el ciclo de vida de las garrapatas es mantener al vector. En caballos del área suburbana de Monterrey se detectó también la presencia de seropositividad en pequeño porcentaje.¹⁹² Otro estudio identificó *Borrelia burgdorferi* en un 16% de perros residentes del área metropolitana de Monterrey.¹⁹³

Esto pone de manifiesto la presencia del vector en nuestro ecosistema, existen además reportes aislados de la presencia de la *Borrelia burgdorferi* en humanos y animales. Lamentablemente el diagnóstico de Lyme no forma parte de los diagnósticos diferenciales habituales en nuestra práctica clínica debido a su

carácter proteiforme y lo bizarro de sus manifestaciones y por no considerar nuestra región como área endémica.

La historia de visitas a múltiples médicos en busca de diagnóstico y tratamiento para síntomas comúnmente clasificados como idiopáticos con la consecuente desesperanza y mala calidad de vida.

El reconocer la enfermedad de Lyme y establecer sus características, mejorará los esfuerzos educacionales y preventivos permitirá diagnósticos tempranos, lo cual favorecerá el inicio de tratamientos oportunos para brindar una posibilidad de cura, lo que impactará en la salud pública de esta región.

Por lo anterior y basados en los parámetros y valores antes descritos, el presente estudio nos presenta la siguiente incógnita a responder: ¿Cual es la prevalencia de enfermedad de Lyme en pacientes atendidos en nuestro medio, con sintomatología sugestiva del padecimiento?

1.14 Hipótesis.

La presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* es superior al 20% en pacientes con sintomatología sugestiva de enfermedad de Lyme.

1.14.1 Hipótesis Nula.

La presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* es inferior al 20% en pacientes con sintomatología sugestiva de enfermedad de Lyme.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la seropositividad de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*, en pacientes del Hospital Universitario "Dr. José E. González" de Monterrey (Centro de referencia de 3er nivel del Noreste del país), Hospital del IMSS siglo XXI en México, D.F. y pacientes referidos de diferentes consultas privada de distintas especialidades, con sintomatología sugestiva de la enfermedad de Lyme de enero del 2005 hasta enero del 2007.

2.2 Objetivos específicos

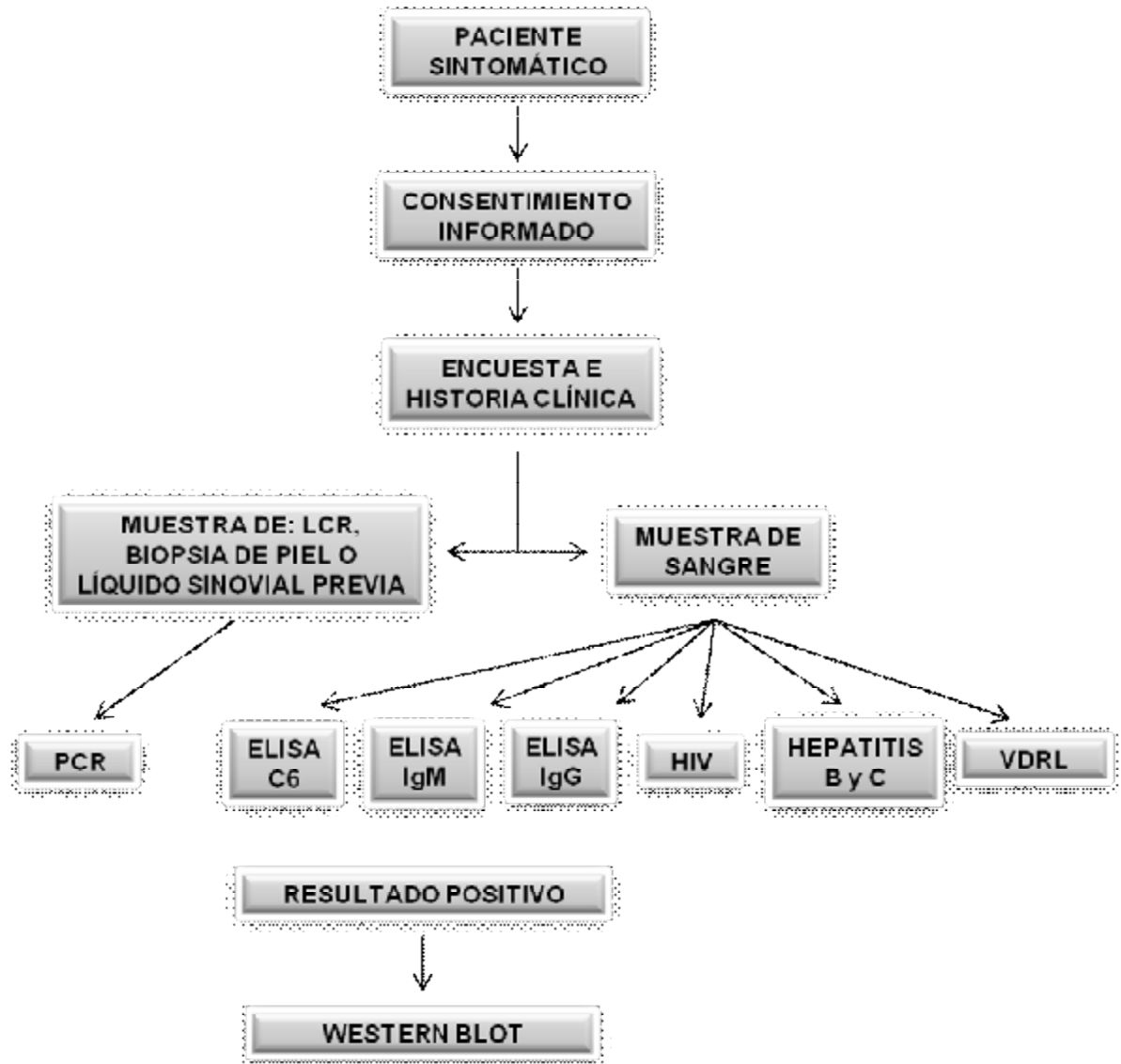
- 2.2.1 Recabar el grupo de pacientes atendidos en nuestro medio, con sintomatología sugestiva de enfermedad de Lyme.
- 2.2.2 Determinar las características clínicas presentes en el grupo a evaluar.
- 2.2.3 Establecer la prueba más adecuada para escrutinio en pacientes con síntomas en nuestra población.
- 2.2.4 Determinar la frecuencia enfermedad de Lyme, en los pacientes con sintomatología sugestiva de la enfermedad, evaluados en el período de tiempo establecido.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, observacional y descriptivo de los pacientes con síntomas presuntivos de enfermedad de Lyme a fin de determinar la presencia del padecimiento.

El presente estudio inició con la impartición de asesoría especializada a los diversos servicios del Hospital Universitario así como a los especialistas particulares, con la finalidad de actualizar sus conocimientos en relación a la enfermedad de Lyme, principalmente en lo concerniente a las manifestaciones clínicas de la misma. Esto se hizo con la finalidad de identificar a los pacientes con sintomatología sugestiva de dicho padecimiento, posteriormente se evaluaron clínicamente a cada uno de los pacientes referidos y se buscó la presencia o ausencia de seropositividad hacia la *Borrelia burgdorferi* mediante estudios inmunológicos.

3.1 Estrategia general.



3.2 Período y población de estudio.

Se estudiaron un total de 214 pacientes, los cuales fueron reclutados de enero del 2005 hasta enero del 2007. Los pacientes del estudio fueron remitidos por los diferentes servicios del Hospital Universitario "Dr. José E. González" de

Monterrey NL (centro de referencia de 3er nivel del Noreste de México), Hospital Siglo XXI del IMSS en México D.F. y pacientes de la consulta privada de diferentes especialidades.

En el caso de los estudios serológicos se utilizó como grupo control 60 individuos voluntarios sanos; se realizó a todos los pacientes, una historia clínica completa además de exploración física. Un total de 214 pacientes fueron referidos, a los cuales se les aplicó una encuesta con la finalidad de valorar el riesgo de presentar la enfermedad de Lyme, además de las características clínicas y demográficas.

Las distintas variables fueron capturadas en una base de datos Microsoft Excel. En su mayor parte los pacientes fueron remitidos con resumen clínico de sus médicos de base, quienes no llegaron a un diagnóstico definitivo de sus pacientes.

3.2.1 Criterios de inclusión.

- 1) Presentar sintomatología sugestiva de enfermedad de Lyme.
- 2) Aceptar participar en el estudio (firmando el consentimiento informado diseñado para este estudio), en el caso de menores de edad, fue necesario que sus padres o tutores aceptaran firmar el consentimiento informado.

3) Contar con al menos una de las siguientes manifestaciones que se consideraron como síntomas sugestivos:

A) Dermatología

- Eritema migrans observado por el médico.
- Acrodermatitis crónica atrófica confirmada histopatológicamente.
- Esclerodermia localizada (Morfea) confirmada histopatológicamente.
- Linfocitoma.

B) Reumatología

- Artritis franca de una o más articulaciones sin etiología conocida.
- Fibromialgia de presentación atípica (varones de cualquier edad, mujeres menores de 45 años, con síntomas acompañantes no característicos de fibromialgia, con antecedente de exposición a garrapatas y que no responda a tratamiento habitual).

C) Cardiología

- Bloqueo aurículo-ventricular de aparición reciente, generalmente de grado alto (II o III), en pacientes jóvenes aparentemente sanos.
- Defectos de conducción que se resuelven en días – semanas sin tratamiento.
- Pericarditis sin etiología definida.
- Valvulopatía sin etiología definida.

D) Neurología

- Radiculoneuropatía.
- Meningitis linfocítica.

- Encefalopatía.
- Neuritis craneal (Parálisis de Bell unilateral o bilateral).

E) Otras sintomatologías

- Antecedente de contacto y/o mordedura por garrapata.
- Fiebre sin etiología definida o fiebre post-mordedura.
- Lesión dérmica post-mordedura.
- Artralgias de inicio súbito sin origen aparente, alternando períodos de exacerbación y remisión.
- Mialgias que incluso se generalizan, sin causa determinada, alternando períodos de exacerbación y remisión.
- Parestesias de inicio reciente, sin causa definida.
- Alteración cardíaca inespecífica.
- Síntomas de déficit cognitivo reciente (déficit de memoria, olvidos, dificultad para recordar palabras, para concentrarse).
- Manifestaciones psiquiátricas (depresión, ansiedad, ataques de pánico).
- Pérdida o aumento inexplicable de peso.
- Meningismo.
- Cefalea tipo migrañosa de aparición reciente.
- Fatiga de recién inicio.

3.2.2 Criterios de exclusión

- 1.- Personas con un diagnóstico de etiología bien definida.
- 2.- La presencia de un tiempo menor a dos semanas de mordedura por garrapata.
- 3.- Sintomatología de menos de un mes de evolución.
- 4.- Pacientes con serología positiva para treponema pallidum, para virus de hepatitis B, para virus de hepatitis C y Virus de Inmunodeficiencia Humana.

Se incluyeron 188 pacientes que cumplieron los criterios y se excluyeron 26 pacientes; debido a que 5 pacientes presentaron criterios clínicos y serológicos para Artritis Reumatoide al momento de la toma de muestra; un paciente fue excluido por diagnóstico de Enfermedad de Still y 20 pacientes más no fueron evaluables pues no contaban con datos de encuesta completos (referidos del IMSS siglo XXI, México, DF); posteriormente se reclutaron 60 individuos sanos, para control de las pruebas serológicas. El grupo estudiado estuvo integrado de pacientes de distintos puntos del país (Figura 2).



Figura 2: Ciudades de distribución de la población estudiada.

3.3 Diagnostico Serológico

Posterior a la firma del consentimiento informado, se realizó venopunción, para obtener 20 ml de sangre venosa periférica, los sueros fueron separados en diferentes alícuotas, que se conservaron en refrigeración a 4°C sí el análisis era realizado dentro de las siguientes 24-48 horas y en congelación a -20°C sí era diferido por más tiempo.

A cada suero se le realizaron estudios iniciales de discriminación mediante pruebas de Ensayo Inmunoenzimático ELISA C6 (Immunitics, Boston, MA, Estados Unidos), ELISA IgM y ELISA IgG (NOVA TEC Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Alemania), realizadas por triplicado; los sueros positivos y/o dudosos por cualquiera de las técnicas de ELISA se les realizó Western blot

confirmatorio (Euroimmun, Luebeck, Alemania). Aquellos pacientes que contaran con una muestra de líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo o biopsias de piel previa o en el momento de su referencia, se determinó la presencia de *Borrelia burgdorferi* mediante un PCR específica.

A la totalidad de las muestras se le realizó serología para detección de virus de hepatitis B y C, para virus de Inmunodeficiencia Humana 1 y 2 y VDRL para descartar infección luética, y en caso de resultar positivo se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta FTA-ABS.

3.3.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Se utilizaron 2 estuches comerciales diferentes de ELISA para aumentar la posibilidad de detectar antígenos de cepas de borrelia americanas y europeas. Seguimos íntegramente el protocolo de la casa comercial y utilizamos los controles suministrados por el fabricante.

3.3.1.2 ELISA C6 (Immunetics, Boston, MA, Estados Unidos)

En este ensayo se utilizaron placas recubiertas con un péptido sintético (péptido C6) como antígeno, este se deriva de la proteína VlsE la cual ha demostrado ser específica para *Borrelia burgdorferi sensu lato* y altamente inmunogénica; esta secuencia peptídica es igualmente antigénica para la detección de pacientes infectados con *Borrelia burgdorferi* así como con las genoespecies

europeas incluyendo *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii*. A continuación describimos este procedimiento:

Se identificó adecuadamente el suero de cada paciente, se descongeló y se realizaron las diluciones correspondientes, se colocaron 100 microlitos (dilución 1: 21) de las muestras en cada pozo así como un control positivo y otro negativo para la reacción. Las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el excedente de los reactantes mediante 4 lavados con solución amortiguadora según indicaciones del fabricante.

Posteriormente se agregaron 100 microlitos de conjugado a cada pozo y se incubó durante 20 minutos, se lavó en 4 ocasiones, colocándose sobre una superficie absorbente con el fin de eliminar el exceso de la solución de lavado; se agregaron 100 microlitos de sustrato (TMB), se incubó durante 4 minutos y para detener la reacción, finalmente se adicionaron 100 microlitos de solución stop (H_2SO_4 1 M). Los valores de absorbancia fueron leídos a los 5 minutos, a 450 nm con un filtro de referencia de 650nm.

La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante para el estuche comercial, calculando el valor del índice de las muestras dividiendo la densidad óptica de las muestras entre la densidad óptica del calibrador tomando en cuenta los siguientes valores para determinar los resultados:

- Resultado Negativo: Menor o igual a 0.9.
- Resultado Dudoso: De 0.91-1.09.
- Resultado Positivo: Mayor a 1.10.

3.3.1.3 ELISA IgM e IgG (NOVA TEC Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Alemania)

El protocolo es el mismo tanto para la determinación de IgM e IgG, variando únicamente el control positivo y el conjugado utilizado en cada estuche comercial; la prueba recombinante Nova Tec ELISA-IgM e IgG *Borrelia burgdorferi* está prevista para la determinación cualitativa de anticuerpos clase IgM e IgG vs. *Borrelia burgdorferi* en sueros humanos. Para el diagnóstico se incluyen los antígenos inmunodominantes OspC del filo B31 (*B. sensu stricto*), 20047 y T25 (*B. garinii*), p100 y p18 del filo PKo (*B. afzelii*), p4li del filo PBi (*B. garinii*) y el VisE de diferentes genoespecies. Este estuche contiene el epítipo recombinante OspC (22-23KDa) para PKo de *B. afzelii* y 20047 de *B. garinii* y p41i (proteína flagelina recombinante) para PBi de *B. garinii*.

Durante los ensayos realizados se siguieron las instrucciones del fabricante; para la determinación de anticuerpos anti-IgM se colocaron 100ul de las muestras problemas y de los sueros controles diluidos (1:100) en sus respectivos pozos. Se cubrieron los pozos con cinta adherente contenida en el estuche comercial y se incubó por 1 hora a 37°C.

Al concluir la incubación se realizaron 3 lavados con buffer para retirar el exceso de los reactantes. Se colocó 100ul del conjugado *Borrelia burgdorferi* anti IgM dentro de los pozos y se cubrieron con cinta adhesiva nuevamente, posteriormente se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

Al terminar la incubación se realizaron 3 lavados, se colocaron 100ul de solución TMB en los pozos, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad; finalmente se detuvo la reacción con 100ul de solución stop en los pozos en el mismo orden que se agregó la solución TMB. Se midió la absorbancia del espécimen a 450/620 nm dentro de los 30 min. posteriores a la adición de la solución stop.

Interpretación de los resultados. El Valor de corte se obtuvo promediando el valor de los calibradores. Se reporta como unidades NTU (Nova Tec Units) tomando en cuenta los siguientes valores para su interpretación:

- Resultado Negativo: De 9 a 11.
- Resultado Dudoso: Mayor a 11.
- Resultado Positivo: Menor a 9.

3.3.1.4 ELISA IgG (NOVA TEC Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Alemania)

Inmunoensayo enzimático *in vitro* para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* en suero humano. Los procedimientos utilizados para ésta prueba fueron similares al ELISA IgM

(NOVA TEC Immundiagnostica MBH, Dietzenbach, Alemania) con la diferencia de que en éste se detectaron anticuerpos dirigidos contra IgG.

3.4. Inmunotransferencia WESTERN BLOT IgG (EUROIMMUN; Alemania)

Es la prueba confirmatoria para la detección de anticuerpos anti-*Borrelia*. Esta se realizó a todo paciente con un resultado positivo / indeterminado de ELISA.

Utiliza antígenos completos de *Borrelia burgdorferi sensu stricto*.

Los procedimientos de la prueba se detallan a continuación:

1. Se bloqueó la tira reactiva por 15 min. con 1.5 ml de solución de lavado.
2. Se diluyó el suero problema a 1:51 con solución de lavado.
3. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min. con agitación constante.
4. Se lavó la tira tres veces durante 5 min. con solución de lavado incluida en el estuche comercial.
5. Se agregaron 1.5 ml del conjugado dirigido contra IgG.
6. Posteriormente se repitieron los pasos 3 y 4.
7. Finalmente se añadió 1.5 ml de solución de revelado hasta observar bandas de precipitación.

Los antígenos se clasifican según el fabricante en 3 categorías (Figura 3):

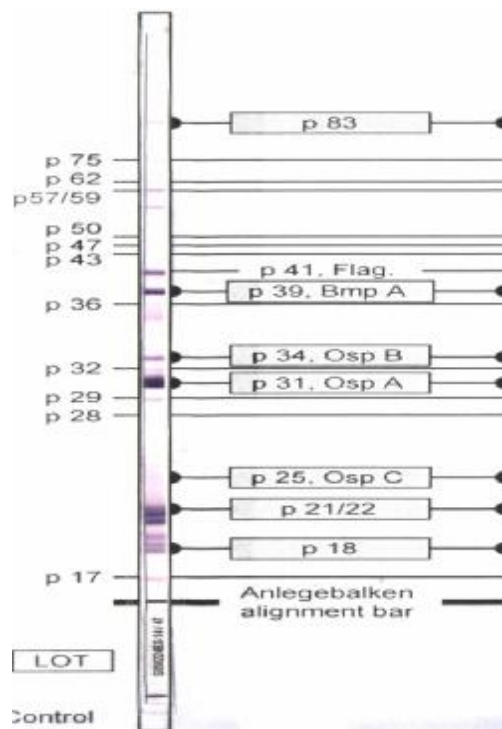
- **Categoría 1:** Antígenos que pudieran dar reacciones cruzadas. (p17, p28, p29, p32, p36, p43, p47, p50, p57/59, p62, p75).
- **Categoría 2:** Antígeno 41kDa (flagelina) específico de género.

- **Categoría 3:** Antígenos altamente específicos de género y especie (p18, p21/22, p25 (Osp C), p 31(Osp A), p34 (Osp B), p 39 (Bmp A), p83).

Los resultados obtenidos, se interpretaron de la siguiente manera:

- **NEGATIVO:** Sin bandas, o débil intensidad de algunos antígenos de categoría 1 y 2.
- **INDETERMINADO:** Una banda de categoría 3 y varias de categoría 1 y 2. Se recomendó repetir la prueba después de algunas semanas.
- **POSITIVO:** Más de una banda de categoría 3. Además y particularmente en estadios crónicos, se pueden observar numerosas bandas de categoría 1 y 2.

Figura 3. Antígenos del estuche comercial de Western blot utilizado en este estudio



3.5 PCR (Reacción de cadena de polimerasa).

Para detectar la presencia de *Borrelia burgdorferi* en líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo o biopsia de piel por PCR, las muestras biológicas se procesaron para extraer el DNA utilizando el método de extracción modificado por Sambrook-Russell 2001.

Se utilizó la metodología descrita por *Liveris y cols.*¹⁹⁴ para la amplificación de la secuencia de la región 16S-23S del ADN de *Borrelia burgdorferi*. Se utilizaron los iniciadores P_A –P⁴² que amplifican una sección que comprende 1,712 pares de bases (pb).³⁸

————→ 5'-GGT ATG TTT AGT GAG GG-3' (iniciador en sentido) (P_A)

←———— 5'-CAG GCT CTA CAC TTC TG-3' (iniciador en contrasentido) P⁴²

(Operon Technologies, Co.)

Para verificar la especificidad de los iniciadores utilizados se descartaron productos de amplificación con ADN de bacterias tales como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira canicola* y *Clostridium perfringens*. El ADN utilizado como control positivo fue el material genético de *Borrelia burgdorferi* (ATTC™35210).

3.6. Estudios adicionales.

Se realizaron pruebas para descartar reacciones cruzadas más frecuentes con borrelia. A cada suero se le realizó VDRL (V.D.R.L. LATEX BIO-RAD SYPHILIS SEROLOGICAL DIAGNOSIS), ELISA para hepatitis B (MONOLISA Ag HBs PLUS), hepatitis C (ORTHO HCV 3.0), para VIH 1 y 2 (Multispot HIV-1|HIV-2). Los sueros positivos por VDRL, se confirmaron por FTA-ABS. Todas las pruebas se realizaron según las especificaciones del fabricante.

3.6.1 Pruebas serológicas para hepatitis B (MONOLISA Ag HBs PLUS)

Estuche comercial para detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B por técnica inmunoenzimática en suero o plasma humano. Utiliza tres anticuerpos monoclonales con capacidad para unirse a los distintos subtipos del Ag HBs actualmente reconocidos por la OMS.

3.6.2 Pruebas serológicas para Hepatitis C

ORTHO HCV 3.0 ELISA TEST SYSTEM SAve Potenciado es un inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (anti-HCV) en suero o plasma humanos. Este ensayo utiliza los antígenos recombinantes c22-3, c-200 y NS5.

3.6.3 Pruebas serológicas para detección de Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y 2.

Inmunoensayo enzimático (BIO-RAD) para detección temprana y diferenciación de anticuerpos anti- HIV-1 y anti- HIV-2 en suero o plasma humanos.

3.6.4. Pruebas serológicas para infección por *Treponema pallidum*.

Venereal Disease Research Laboratory-latex, (BIO-RAD) Utiliza un antígeno cardiolipídico asociado a un látex que permite la realización rápida de una microaglutinación para la detección cualitativa o cuantitativa de la sífilis.

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

3.7 Equipo.

Durante el trabajo se utilizaron lector de ELISA Marca TECAN Modelo Sunrise-Touch Screen 960063, centrífuga Beckman Modelo Allegra 21 R, -70°C congelador vertical REVCO Modelo ULT2586-3-A36, -20°C congelador horizontal GE Modelo 15SAB-WH, agitador Lab-Line Mod. 4625 No. serie 1472051119855.

3.8 Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron mediante el programa informático SPSS versión 12, se evaluaron los estadísticos descriptivos tradicionales (medidas de tendencia central, de posición y de dispersión); las variables numéricas binarias, fueron analizadas mediante prueba de chi cuadrada y exacto de Fisher, por su parte las variables numéricas no paramétricas, ordinales y continuas, se

analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se realizó además un análisis multivariado del tipo regresión logística, todas las pruebas aplicadas fueron a dos colas y se consideró un valor α de 0.05. ¹⁹⁵

3.9. Definición operacional de variables:

- **Alto riesgo ocupacional:** Ocupación en la que exista exposición constante a garrapatas, o bien, aquella donde se lleven a cabo múltiples actividades al aire libre, tales como veterinarios, campesinos, ganaderos, agrónomos, entomólogos, cazadores, etc.)
- **Bajo riesgo ocupacional:** Poseer una ocupación tal donde no exista exposición a garrapatas ni al aire libre (estudiantes, amas de casa, profesionistas).
- **Área rural:** De acuerdo con la definición del INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) se trata de aquella población con número de habitantes menor a 2,500 personas; tales ejemplos serían bosques, praderas y áreas agrícolas.
- **Área suburbana:** Esta zona se caracteriza por presentar desarrollo urbanístico mezclado con áreas pequeñas de pastizal. Se considera un paso de transición a zona urbana. Con un número de habitantes entre 2500 y 15000 mil habitantes.
- **Área urbana:** Se refiere al espacio físico construido con diversas edificaciones (vivienda, fábricas, edificios, bodegas) e infraestructura de servicios (drenaje, tuberías de agua, tendidos eléctricos); habitan

poblaciones mayores de 15,000 personas. Área poblada en un 90% y un 10% de árboles.

4. RESULTADOS

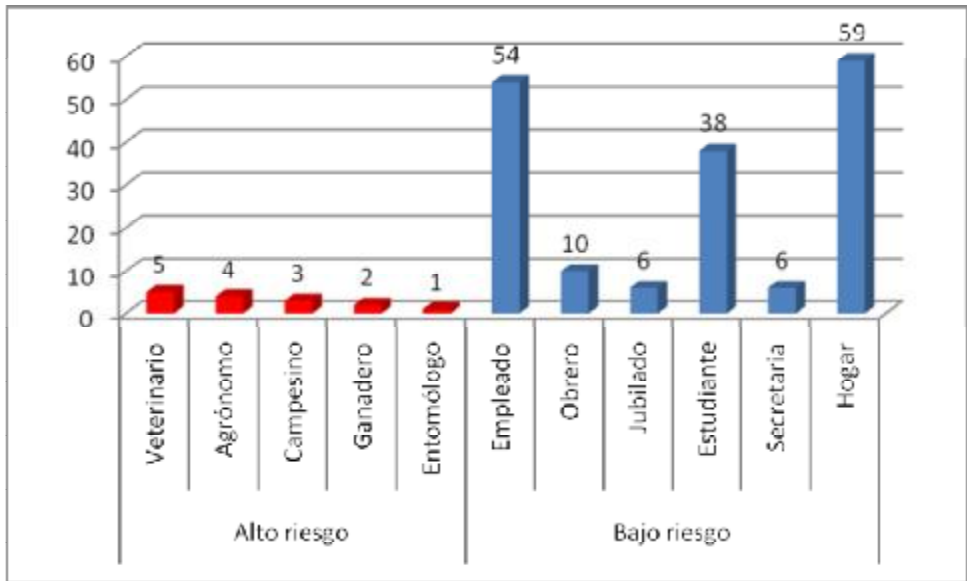
4.1 Datos demográficos.

De un total de 214 pacientes referidos, 188 pacientes cumplieron los criterios previamente establecidos; fueron excluidos un total de 26 pacientes (5 pacientes presentaron criterios clínicos y serológicos para Artritis Reumatoide, un paciente por diagnóstico de Enfermedad de Still y 20 pacientes fueron referidos por otros médicos, por no contar con datos de encuesta completos), se obtuvo además suero y encuesta de 60 voluntarios sanos con la finalidad de incluirlos como controles para las evaluaciones serológicas.

Se analizó la distribución por género y se observó que el 62% pertenece al género femenino y el restante 38% al masculino, La edad promedio observada fue de 43.5 años, siendo los 46 años la edad más frecuente; el 50% de los pacientes mostraban una edad de 43.5 años o menos, lo anterior con una dispersión de las datos con respecto a la media antes mencionada de 16.7 años.

De acuerdo a la distribución geográfica de la residencia de los pacientes estudiados, se encontró que en su mayoría pertenecen al área urbana del Noreste de México y al Distrito Federal; el estado de Nuevo León representó el 63.82% del total de la población, de los cuales 104 pacientes habitan el área urbana, 13 pacientes del área suburbana y un solo paciente vive en el área rural. En cuestión laboral, el 92% realizaba ocupaciones de bajo riesgo (amas de casa, estudiantes, empleados); los pacientes que desarrollaban ocupaciones

de alto riesgo (agrónomos, veterinarios, campesinos y entomólogos) representaron el 8% restante (Figura 4).



N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Figura 4.- Distribución según grado de riesgo ocupacional en la población estudiada.

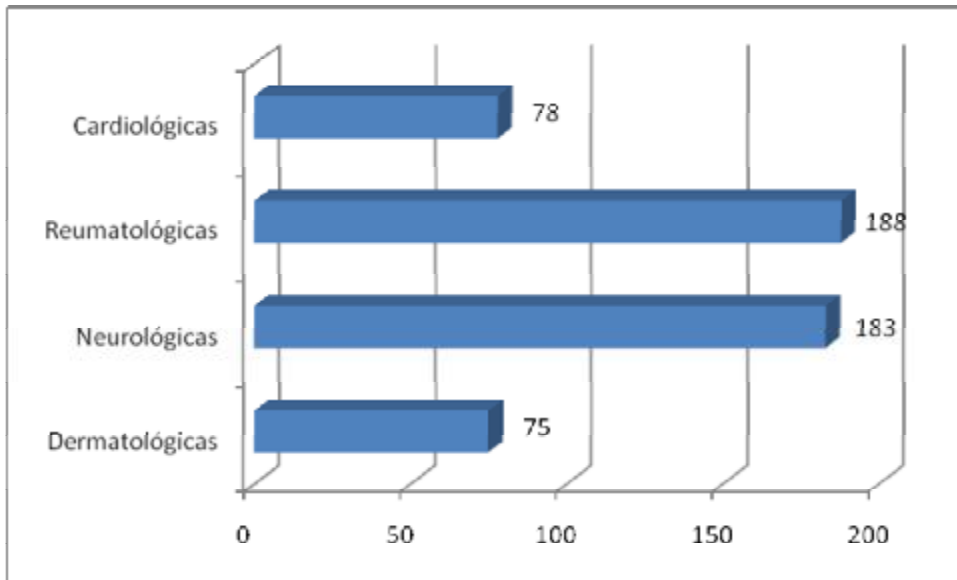
Las descripciones de las características sociodemográficas de la población se resumen en la Tabla II. Se observó que solamente 95 pacientes recordaron haber tenido contacto con garrapatas (50%) y 54 pacientes (24%) recordaron haber sido mordidos por el vector de la enfermedad de Lyme.

TABLA II
CARACTERIZACIÓN SOCIODEMOGRÁFICA
DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

| Dato | n | % |
|----------------------------------|----------|----------|
| Género Femenino | 117 | 62 |
| Género Masculino | 71 | 38 |
| Área Urbana | 164 | 87.23 |
| Área suburbana | 13 | 6.9 |
| Área rural | 1 | 0.5 |
| Recuerda contacto con Garrapata | 95 | 50.53 |
| Recuerda mordedura por garrapata | 54 | 28.72 |

N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Al revisar las manifestaciones clínicas referidas por los pacientes, las más frecuentes fueron las de carácter reumatológico (188), seguidas por las manifestaciones neurológicas (183), cardiacas en 78 pacientes y dermatológicas en 75 pacientes (Figura 5). Es importante destacar que 81.5% de los pacientes presentaron más de una manifestación clínica.



N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

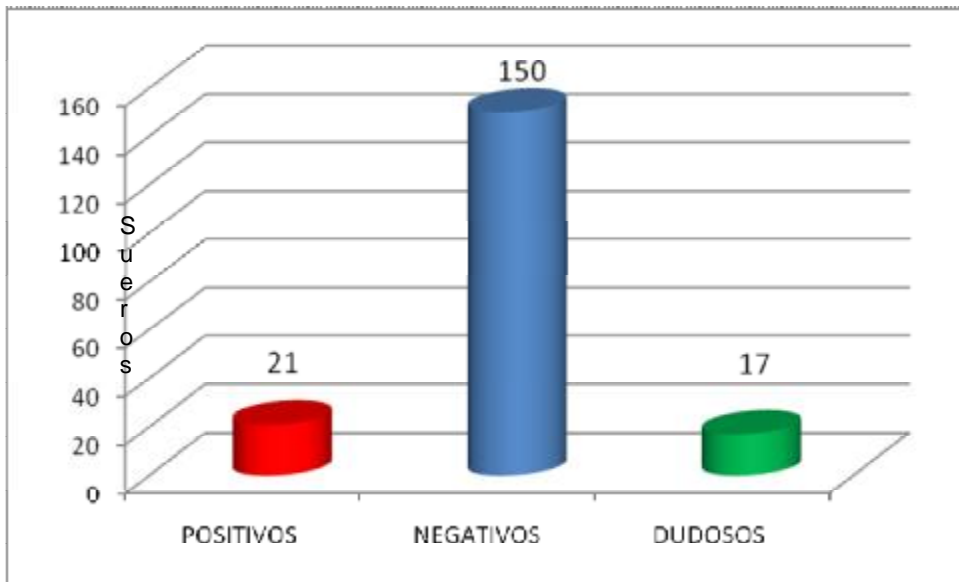
Figura 5.- Distribución de manifestaciones clínicas en la población estudiada.

4.2 Pruebas serológicas

4.2.1 ELISA

Para detectar la presencia de anticuerpos contra borrelia de las cepas americanas y europeas en los sueros de nuestros pacientes, se utilizaron estuches comerciales de laboratorios diferentes: ELISA C6 (Immunetics, Boston, MA, Estados Unidos) y ELISA IgM e IgG (NOVA TEC Immundiagnóstica GmbH, Dietzenbach, Alemania). Se realizó ELISA IgM e IgG a pesar de contar con pacientes que referían síntomas de larga evolución pues se ha descrito la persistencia de IgM a través de los años.

Del total de muestras analizadas por la técnica de ELISA C6 (n=188), se obtuvieron 11% (21) de los sueros con resultado positivo, 79.8 % (150) negativos y 9.04% (17) dudosos con valores en la zona gris (Figura 6).



N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Figura 6.- Distribución de la población según resultados de la prueba de ELISA C6.

Al utilizar ELISA IgM, 37.2% (70) de los sueros fueron positivos y 13.8% (26) dudosos, en contraparte por ELISA IgG solamente se obtuvieron 5.3% (10) sueros positivos y 2.12 % (4) resultaron dudosos por encontrarse en la zona gris (Tabla III).

Se puede observar que con la técnica de ELISA IgM se detectó un total 51.06% de sueros positivos y dudosos. Por ELISA C6 la suma de positivos y dudosos fue de 20.2% y por ELISA IgG solamente un 7.4% de sueros positivos.

TABLA III
RESULTADOS POR LAS DIFERENTES
TÉCNICAS DE ELISA

| ELISA | POSITIVO | DUDOSO | NEGATIVO |
|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
| C6 | 21 | 17 | 150 |
| IgM | 70 | 26 | 92 |
| IgG | 10 | 4 | 174 |

Al sumar los resultados obtenidos por las tres técnicas, 101 (53:72%) sueros resultaron positivos y 47 (25%) dudosos. Cabe mencionar que solamente 15 (9.04%) sueros, fueron positivos por más de una técnica de ELISA y solamente 2 (1.06%) sueros fueron positivos por las 3 técnicas.

Tomando en cuenta los resultados anteriores y con la intención de determinar cual de las pruebas utilizadas sería más recomendada para tamizaje se compararon cada una de las técnicas de manera individual contra las otras 2 pruebas. Cuando se compara ELISA C6 contra ELISA IgM, se observó que del total de sueros analizados (n=188) se detectaron 11 sueros positivos, por ambas técnicas, pero por IgM hubo reactividad en 51 sueros que fueron negativos por ELISA C6, en cambio solo 3 casos, que fueron negativos por ELISA IgM fueron positivos por ELISA C6. De los pacientes de la zona gris o

dudosos por IgM 7 fueron positivos por ELISA C6 y 3 fueron indeterminados por ambas técnicas (Tabla IV).

TABLA IV
COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS
OBTENIDOS POR ELISA IgM Y ELISA C6.

| | | IgM | | |
|-----------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | | Positivo (n=70) | Indeterminado (n=26) | Negativo (n=92) |
| C6 | Positivo (n=21) | 11 | 7 | 3 |
| | Indeterminado (n=17) | 8 | 3 | 6 |
| | Negativo (n=150) | 51 | 16 | 83 |

Al comparar ELISA C6 contra ELISA IgG, observamos que 6 casos fueron positivos por esta última técnica y negativos por ELISA C6, sin embargo 15 sueros resultaron positivos solamente por ELISA C6. Por ambas técnicas 2 sueros se encontraron positivos. De los dudosos por ELISA IgG 4 fueron positivos por ELISA C6 y 2 de los positivos por IgG fueron dudosos por ELISA C6. (Tabla V).

TABLA V
COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS
OBTENIDOS POR ELISA C6 Y ELISA IgG.

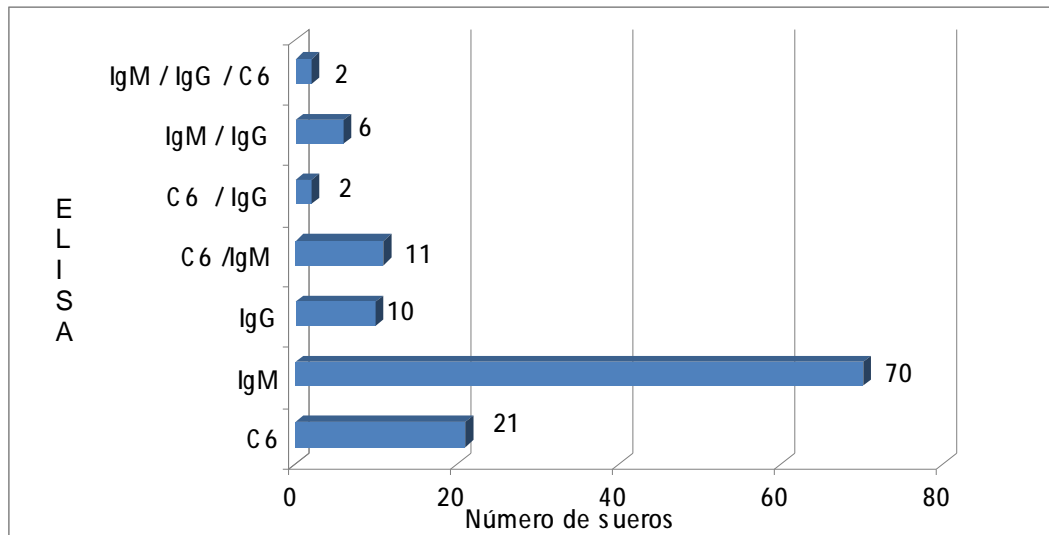
| | | IgG | | |
|-----------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| | | Positivo (n=10) | Indeterminado (n=4) | Negativo (n=174) |
| C6 | Positivo (n=21) | 2 | 4 | 15 |
| | Indeterminado (n=17) | 2 | 0 | 15 |
| | Negativo (n=150) | 6 | 0 | 144 |

Al comparar ELISA IgM y ELISA IgG se presentó inmunoreactividad en ambas técnicas en 6 sueros. Hay una predominancia importante en la positividad de ELISA IgM ya que en 60 pacientes no presentaron positividad por ELISA IgG. Es importante señalar que 4 sueros positivos por IgM fueron dudosos por IgG (Tabla VI).

TABLA VI
COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
POR ELISA IgM Y ELISA IgG.

| | | IgM | | |
|------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | | Positivo (n=70) | Indeterminado (n=26) | Negativo (n=92) |
| IgG | Positivo (n=10) | 6 | 1 | 3 |
| | Indeterminado (n=4) | 4 | 0 | 0 |
| | Negativo (n=174) | 60 | 25 | 89 |

De los datos anteriores se concluye que ELISA IgM sola y/o en combinación con ELISA C6 aumenta la sensibilidad diagnóstica en pacientes con síntomas sugestivos de enfermedad de Lyme (Figura 7)



N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Figura 7.- Distribución de los sueros positivos por la prueba de ELISA

4.2.2 Western Blot

Al total de sueros positivos ó dudosos (101) por cualquier técnica de ELISA, se les realizó la prueba confirmatoria de Western blot por IgG. Resultaron positivos 62 (32.97 %) sueros y 20 (10.63%) sueros fueron dudosos por Western blot.

4.2.2.1 Western blot positivo.

La interpretación del Western Blot para confirmar la presencia de anticuerpos antiborrelia se basó tanto en el número como en el tipo de las bandas de inmunorreacción presentes. Se consideró la interpretación sugerida por el fabricante, se clasificó en tres categorías según las bandas de reacción antígeno-anticuerpo; Categoría 1 (bandas de reactividad cruzada y otras bandas poco definidas), categoría 2 (bandas específicas de género) y categoría 3 (bandas específicas de especie).

La reactividad de los anticuerpos de clase IgG frente a antígenos de *B. burgdorferi*. Se encontró que la banda más frecuente de la categoría 1 fue la p57/59 seguida de la p62 y p75 (Figura 8). En la categoría 2 formada por la banda p41 fue positiva en 48 (47.5%) de 101 sueros.

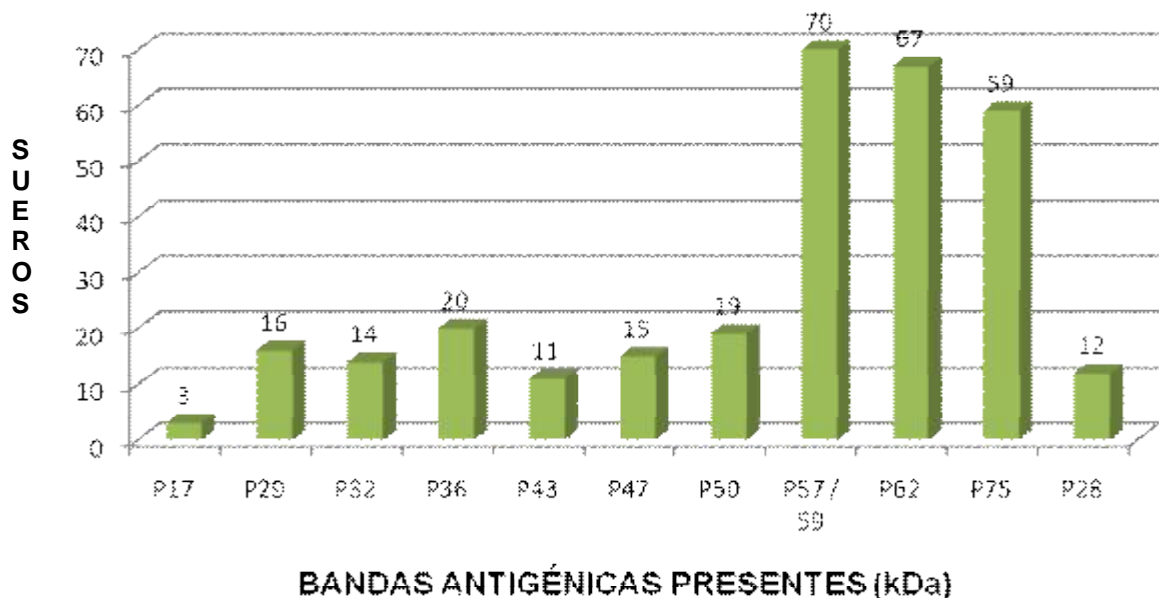


Figura 8.- Distribución de bandas (Kda) de Western blot de Categoría 1 observado en sueros positivos .

La categoría 3 (específica de especie) se encontró que la banda más reactiva fue la p83, seguida por la p31. (Figura 9).

Todos los pacientes presentaron reactividad de IgG contra antígenos contra *B. burgdorferi* de categoría 1 y 3 en un promedio de 8.22 bandas. El grupo de sueros que presentaron solamente una banda de categoría 3 (altamente específica) se catalogaron como Western blot dudoso. Este grupo presentó reactividad preferente por la banda 41 (categoría 2) y por la banda menos específica p57/59 al igual que los pacientes positivos. En promedio los sueros con Western blot dudosos presentaron reactividad a 5.2 bandas.

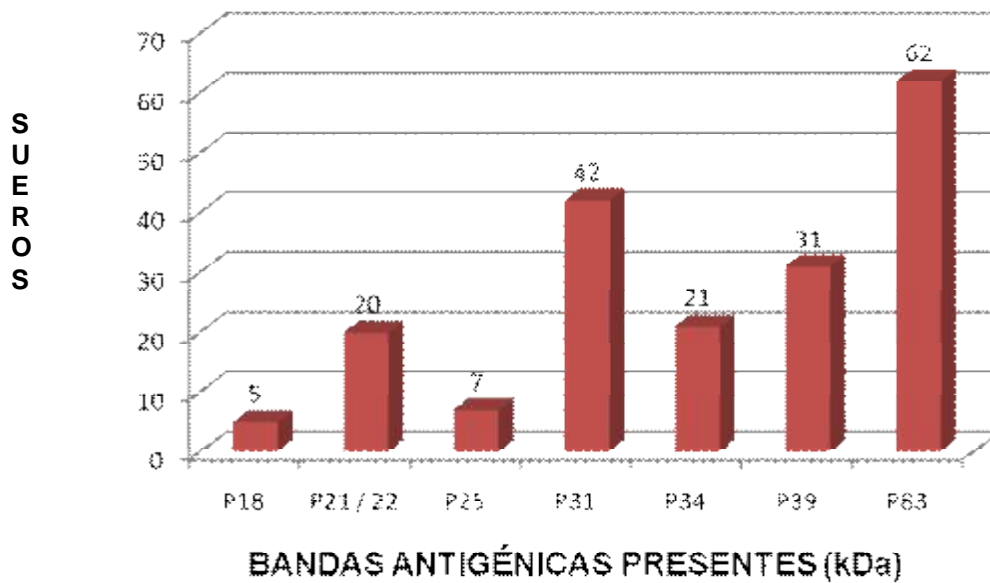


Figura 9.- Distribución de bandas (KDa) de Western blot de Categoría 3 observado en sueros positivos.

En la figura 10 se muestra el Western blot obtenido con algunas de las muestras analizadas para estudio de reactividad de anticuerpos de clase IgG frente a antígenos de *Borrelia burgdorferi*. Como se observa, los sueros mostraron reacción con una diversidad de bandas de alto y bajo peso molecular, con intensidad variable, igual o menor a la observada en los Western blot control suministrados por el laboratorio fabricante, los cuales fueron realizados con anticuerpos monoclonales contra cada uno de los antígenos de *Borrelia burgdorferi*.

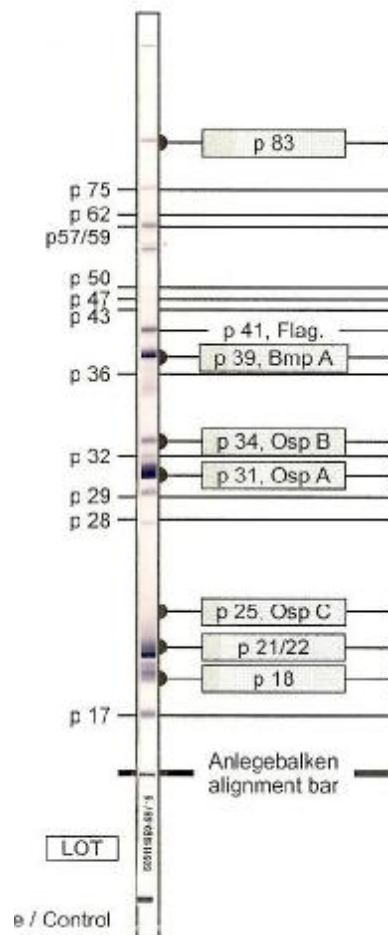


Figura 10.- Ejemplos de algunos pacientes positivos y dudosos.

Los sueros positivos y dudosos por la técnica de ELISA C6 (n=38) que se confirmaron por Western blot correspondieron al 68.4%(26), quedando 15.8% (6) sueros en la zona gris y 15.8%(6) sueros negativos. Llama la atención que los sueros que se reportan como positivos por ELISA C6 al confirmarse por Western blot se reportan como positivos o dudosos pero ninguno como negativo

(Tabla VII)

TABLA VII

RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA C6 Y CONFIRMADOS POR WESTERN BLOT IgG.

| ELISA C6 | WESTERN BLOT | | |
|----------------------------|---------------------|---------------|-----------------|
| | POSITIVO | DUDOSO | NEGATIVO |
| Positivo (n=21) | 17 | 4 | 0 |
| Dudoso (n=17) | 9 | 2 | 6 |

Al valorar los resultados de ELISA IgM se obtiene reactividad por Western blot en el 62.5% (60) de sueros. En este grupo la suma total de sueros positivos y dudosos correspondía a 96. En la zona gris se quedan 17.7% (17) sueros y 19.8% (19) se reportan como negativos. (Tabla VIII)

TABLA VIII

RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA IgM y CONFIRMADOS POR WESTERN BLOT IgG.

| ELISA IgM | WESTERN BLOT | | |
|----------------------------|---------------------|---------------|-----------------|
| | POSITIVO | DUDOSO | NEGATIVO |
| Positivo (n=70) | 42 | 15 | 13 |
| Dudoso (n=26) | 18 | 2 | 6 |

En el grupo de ELISA IgG solamente 14 sueros se tuvieron que confirmar por Western blot. De estos el 64.2% (9 sueros) se reportan positivos, 14.2% (2) como dudosos por encontrarse en la zona gris y 21.4% (3) sueros como negativos. En el grupo dudoso se pudo confirmar el 100% de los pacientes por Western blot. (Tabla IX)

TABLA IX

RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA IgG y CONFIRMADOS POR WESTERN BLOT IgG.

| ELISA IgG | WESTERN BLOT | | |
|----------------------------|---------------------|---------------|-----------------|
| | POSITIVO | DUDOSO | NEGATIVO |
| Positivo (n=10) | 5 | 2 | 3 |
| Dudoso (n=4) | 4 | 0 | 0 |

En resumen obtuvimos una confirmación por Western blot de 62 sueros (32.9%) y 20 sueros (10.6%) se reportaron dudosos. Al comparar las técnicas entre si en ambos grupos (positivos o dudosos) se distingue un alto predominio de sueros confirmados con Western blot por ELISA IgM sin embargo en el grupo de sueros positivos por ELISA C6 la especificidad fue mayor. Una observación importante del grupo de sueros dudosos es que el 65.9 % (31 sueros) se logra diagnosticar como positivo, recalcando la importancia de monitorizar a un paciente con suero reportado como dudoso. (Figura 11)

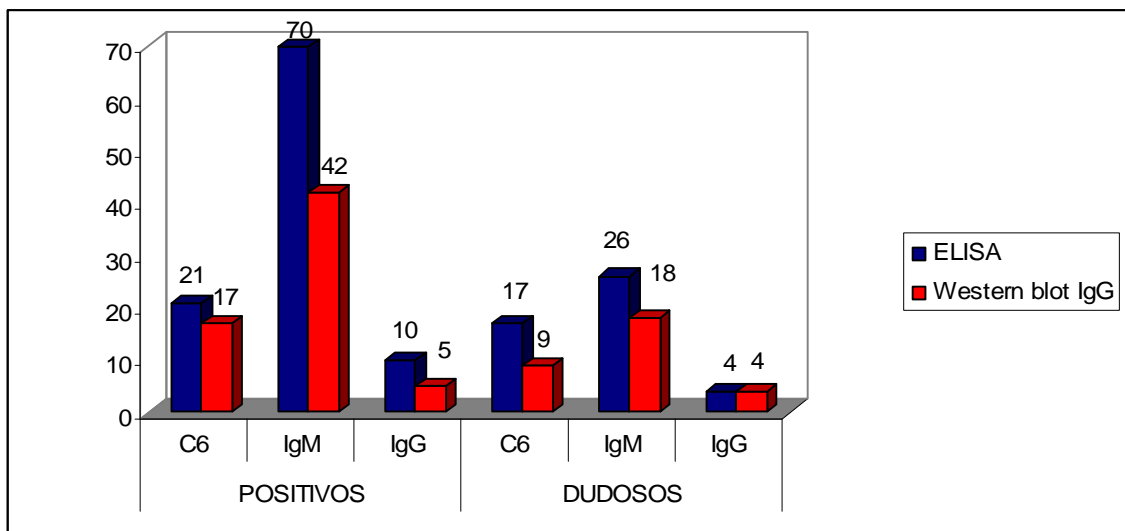


Figura 11.- Comparación de resultados positivos y dudosos por la técnica de ELISA y su confirmación posterior mediante Western blot IgG en la población analizada.

Al comparar los sueros que resultaron positivos por más de 1 técnica, se observó que la combinación que reportó mas reactividad por Western blot fue la de ELISA IgM y ELISA C6. (Figura 12)

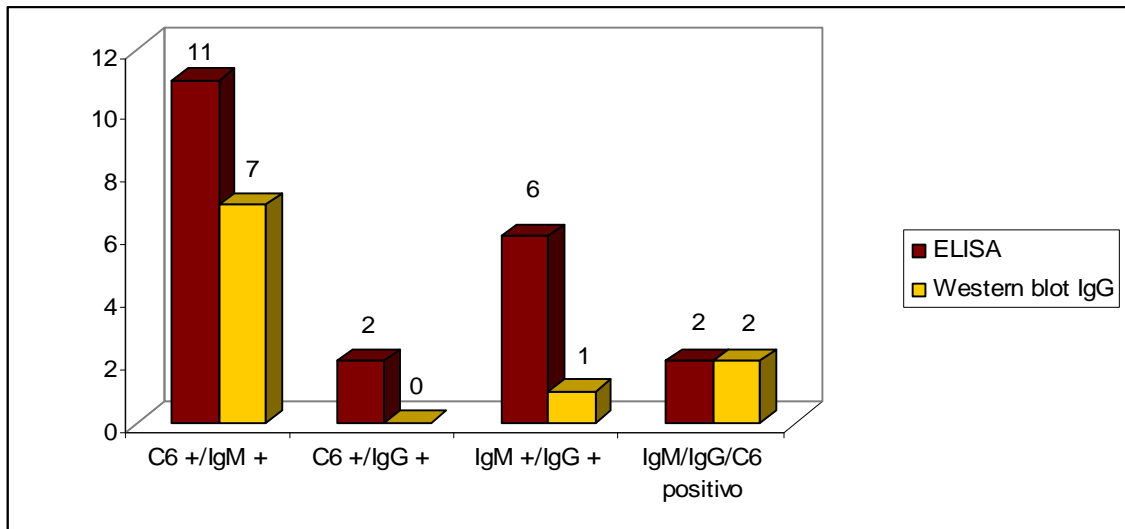


Figura 12.-Comparación de resultados positivos entre las diferentes técnicas de ELISA y su confirmación mediante Western blot

Al analizar las características sociodemográficas de los 62 sueros que resultaron positivos por Western blot, el género predominante fue el femenino, con una cifra de 44 mujeres versus 18 hombres; este grupo presentó una edad promedio de 35.91 años cumplidos, observando en la mitad de ellos una edad de 36 años o menos, con una separación de los datos con respecto al promedio de 16.75 años. Es importante mencionar que la distribución observada por edad fue muy similar a la encontrada en la población general. Al distribuir los pacientes positivos por grupos etarios, se observó un mayor porcentaje de

positividad estadísticamente significativo en el grupo de pacientes mayores de 45 años ($p < 0.001$).

En cuanto a ubicación geográfica de los pacientes con Western blot positivo ($n=62$), el 88.7% radicaban en zonas urbanas, 9.7% residía en zonas suburbanas y solo un paciente (1.6%) habitaba en el área rural; un total de 45 de los 62 pacientes positivos habitan en el estado de Nuevo León y el resto provenía de diferentes estados del país y en su mayoría del Distrito Federal. La ocupación más frecuente observada en los pacientes con Western blot positivo fue la del grupo de bajo riesgo con en el 85.48%, mientras los pacientes con ocupaciones de alto riesgo (veterinarios, agrónomos, entomólogos, ganaderos, campesinos) representaron solamente el 14.51% de resultados positivos (similar a lo encontrado en la población total); las características sociodemográficas en general se describen en la Tabla X.

Es importante recalcar que de todos los datos demográficos, solamente el recordar el contacto con garrapatas y la edad mayor a 45 años fueron estadísticamente significativos al compararse con la población con Western blot negativo, mediante una prueba de hipótesis a una confiabilidad del 95%.

TABLA X
CARACTERIZACIÓN SOCIODEMOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

| Dato | Western Blot positivo | Western Blot negativo | P |
|---|-----------------------|-----------------------|--------|
| Edad menor a 45 años / mayor a 45 años | 44 18 | 40 66 | <0.001 |
| Género Femenino Masculino | 44 18 | 61 45 | 0.083 |
| Ocupación Alto riesgo Bajo riesgo | 9 53 | 7 99 | 0.092 |
| Recuerda contacto con Garrapata / No recuerda contacto | 42 20 | 44 62 | 0.001 |
| Recuerda mordedura por garrapata / No recuerda mordedura | 18 44 | 32 74 | 0.874 |

4.2.2.2 Manifestaciones clínicas

Se observó que las manifestaciones de tipo reumatológicas fueron las mayormente observadas en pacientes Western blot positivos esta población (147) seguidas de las neurológicas (104), dermatológicas (37) y finalmente las de tipo cardiaco (21); siendo esta proporción similar a los síntomas de la población total reclutada.

De las manifestaciones reumatológicas los síntomas más frecuentemente observados fueron la fatiga crónica, artralgiyas y mialgias, sin embargo también destaca la presencia de artritis, siendo la oligoartritis la presentación más típica, (Figura 13).

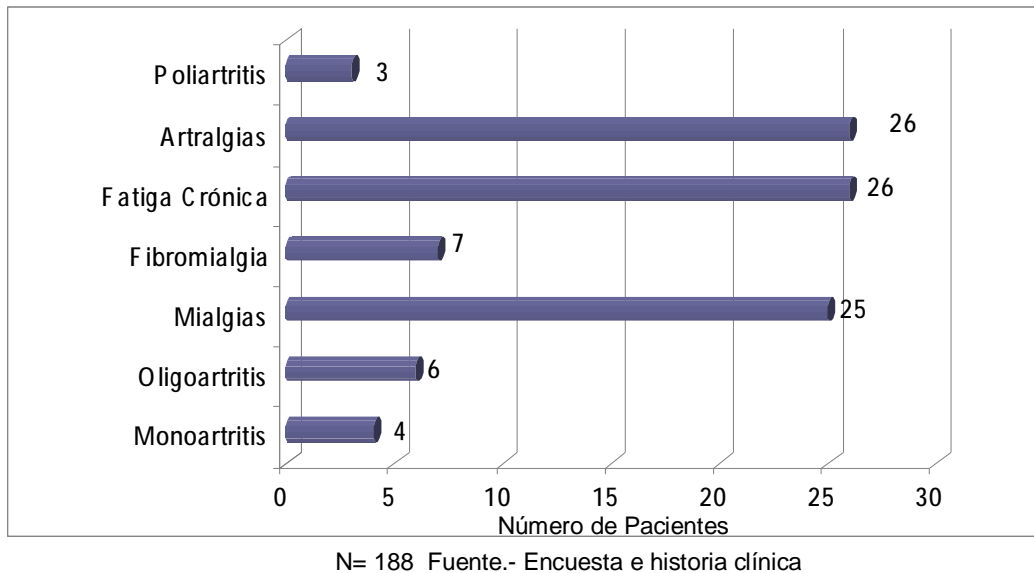
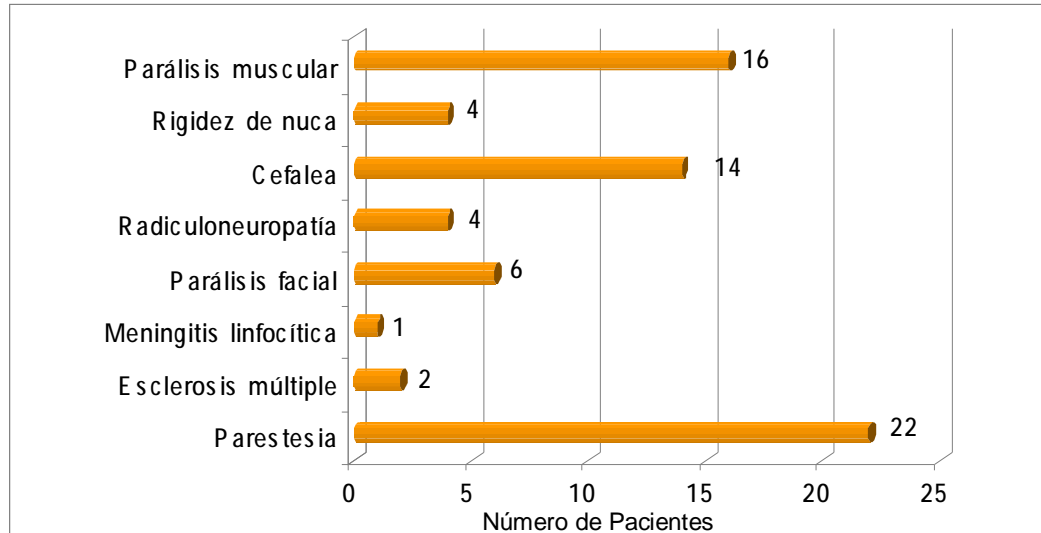


Figura 13.- Distribución de la población de pacientes con Western blot positivos con manifestaciones reumatológicas.

Algunas de las manifestaciones de neuroborreliosis fueron parestesias, parálisis muscular y cefalea como manifestaciones frecuentes aunque no son muy específicas. Dentro de este grupo observamos pacientes con síntomas de gran discapacidad como con radiculoneuropatía (4 pacientes), síntomas semejantes a esclerosis múltiple. (2 pacientes), meningitis aséptica (1 paciente). Las parálisis faciales unilaterales sin etiología definida se presentaron en 6 pacientes. (Figura 14).

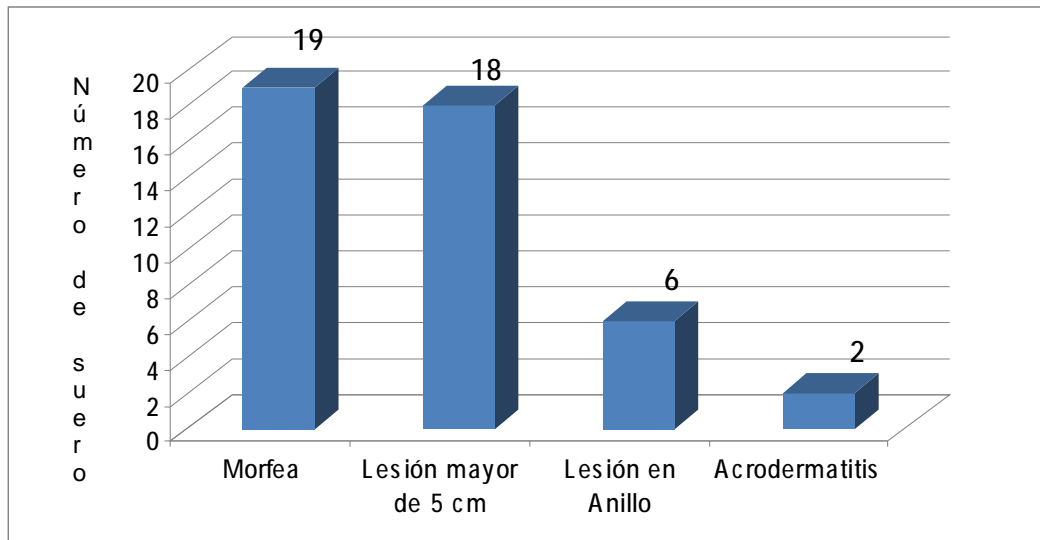


N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Figura 14 Manifestaciones neurológicas de la población de pacientes con Western blot positivos para *B. burgdorferi*

Al analizar las manifestaciones cardíacas que presentó la población positiva en Western blot se encontró principalmente valvulopatía de etiología desconocida y solamente se documentó un caso de bloqueo AV de tercer grado.

En el segmento de manifestaciones de tipo dermatológico, encontramos que la manifestación más frecuente fue la morfea 58% (19 pacientes) diagnosticada histopatológicamente. Un total de 18 pacientes presentaron una lesión mayor a 5 cm en algún momento de su evolución, sobretodo asociado a mordedura de garrapatas y 6 pacientes presentaron lesiones en forma de anillos semejantes al “eritema migrans”, 2 pacientes presentaron acrodermatitis crónica atrófica diagnosticada por el Servicio Dermatología del Hospital. (Figura 15)



N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Figura 15- Distribución de la población de pacientes estudiados con manifestaciones dermatológicas con Western blot positivo.

Otras manifestaciones menos frecuentes fueron fiebre, nefritis, y pérdida de peso. Al analizar individualmente los síntomas, sobresalen las lesiones dermatológicas post-mordedura, artralgias, fatiga crónica, parestesias, cervicalgia, lesión de más de 5 cm asociado con mordedura de garrapata y la morfea (Tabla XI).

TABLA XI
MANIFESTACIONES CLINICAS FRECUENTES DE LA POBLACIÓN
CON WESTERN BLOT POSITIVO

| Manifestación clínica | Número de pacientes | % |
|--------------------------------|----------------------------|----------|
| Lesión dérmica post- mordedura | 29 | 46.8 |
| Artralgias | 27 | 43.5 |
| Fatiga crónica | 26 | 41.9 |
| Parestesias | 22 | 35.5 |
| Morfea | 19 | 30.6 |
| Lesión dérmica > 5 cm. | 19 | 30.6 |
| Cervicalgia | 18 | 29 |
| Oligoartritis | 16 | 25.8 |

N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

De este mismo grupo, las manifestaciones clínicas estadísticamente significativas con respecto a la población negativa fueron lesión dérmica mayor a 5 centímetros, morfea, parestesias, cefalea, fatiga, valvulopatía, monoartritis , artralgias y alteración cardiaca (Tabla XII).

TABLA XII

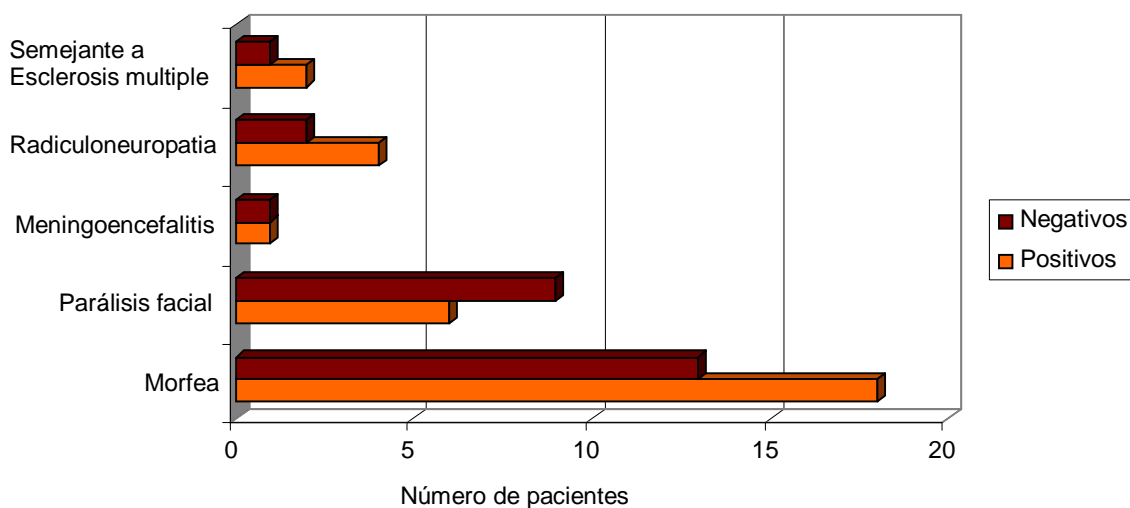
MANIFESTACIONES CLÍNICAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE POBLACIÓN POSITIVA Y NEGATIVA CON WESTERN BLOT

| Manifestación | Western Blot positivo | Western Blot negativo | p |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|----------|
| Lesión Dérmica > 5 cm. | 19 | 9 | < 0.001 |
| Alteración Cardíaca | 16 | 54 | 0.001 |
| Morfea | 19 | 03 | < 0.001 |
| Artralgias | 27 | 26 | 0.010 |
| Parestesias | 22 | 16 | 0.002 |
| Cefalea | 14 | 08 | 0.005 |
| Fatiga | 22 | 16 | 0.002 |
| Valvulopatía | 09 | 40 | <0.001 |
| Monoartritis | 04 | 01 | 0.043 |

N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Al comparar algunas manifestaciones específicas en pacientes con Western blot positivo se observa síntomas que son más frecuentes en los positivos a

excepción de la parálisis facial que fue más importante en pacientes seronegativos. (Figura 16)



N= 188 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Figura 16.- Prevalencia de síndromes clínicos comparando pacientes con serología positiva contra serología negativa

4.3 Pacientes con Western blot dudoso

Encontramos 20 sueros dudosos por Western blot, (10.63% del grupo estudiado); este grupo de pacientes poseen sintomatología sugestiva y presentan un resultado positivo y/o dudoso, en cualquiera de las tres técnicas de ELISA empleadas y un Western blot con al menos una banda altamente específica de género y especie.

De los 20 pacientes con Western blot dudoso, nueve (45%) recuerdan haber tenido contacto con garrapatas y solo 4 de ellos (20%), recordaron haber sido mordidos por garrapatas. Las principales características sociodemográficas no muestran diferencias al compararlas con el grupo Western blot positivo, el

género femenino, la media de edad, la ubicación geográfica y la profesión mantuvieron una relación similar en ambos grupos. Las características demográficas en los pacientes con Western blot dudoso, se resumen en la Tabla XIII

TABLA XIII
CARACTERIZACIÓN SOCIODEMOGRÁFICA DE LOS
PACIENTES CON WESTERN BLOT DUDOSO
PARA *B. burgdorferi*

| Variable analizada | Número de pacientes | % |
|-----------------------------------|---------------------|----|
| Género Femenino | 12 | 60 |
| Género Masculino | 8 | 40 |
| Ocupación de alto riesgo | 1 | 5 |
| Ocupación de bajo riesgo | 19 | 95 |
| Área urbana | 18 | 90 |
| Área suburbana | 2 | 10 |
| Área rural | 0 | 0 |
| Recuerda contacto con garrapatas | 9 | 45 |
| Recuerda mordedura por garrapatas | 4 | 20 |

n= 20 Fuente.- Encuesta e historia clínica

Las manifestaciones clínicas más frecuentes entre los pacientes con resultado dudoso de Western blot fueron mialgias, fatiga crónica, morfea, artralgias, cervicalgia, oligoartritis, fibromialgia y parestesias (Tabla XIV).

TABLA XIV

**MANIFESTACIONES CLÍNICAS MÁS FRECUENTES
EN LOS PACIENTES CON WESTERN BLOT
DUDOSO PARA *B. burgdorferi***

| Manifestación clínica | Número de pacientes | % |
|------------------------------|----------------------------|----------|
| Mialgias | 10 | 50 |
| Fatiga crónica | 9 | 45 |
| Morfea | 9 | 45 |
| Artralgias | 8 | 40 |
| Cervicalgia | 7 | 35 |
| Oligoartritis | 6 | 30 |
| Fibromialgia | 5 | 25 |
| Parestesias | 5 | 25 |

n= 20 Fuente.- Encuesta e historia clínica

4.4 Pacientes con Western blot negativo

Obtuvimos 106 sueros negativos a través de cualquiera de las tres pruebas de ELISA o negativos al confirmarlos por el método de Western blot IgG. Las características demográficas en la población negativa son similares a las previamente descritas en la población total, positiva e indeterminada,

encontrando solo una diferencia, ya que predomina el género masculino, en este grupo.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes entre este grupo de pacientes fueron: alteración cardíaca, lesión dermatológica, valvulopatía, fatiga crónica, mialgias, artralgias (Tabla XV).

TABLA XV
MANIFESTACIONES CLÍNICAS MÁS FRECUENTES
DE LOS PACIENTES CON WESTERN BLOT
NEGATIVO PARA *B burgdorferi*

| Manifestación clínica | Número de pacientes | % |
|-----------------------|---------------------|----|
| Alteración cardíaca | 54 | 51 |
| Lesión dermatológica | 41 | 39 |
| Valvulopatía | 40 | 38 |
| Fatiga crónica | 35 | 33 |
| Mialgias | 35 | 33 |
| Artralgias | 26 | 25 |

n= 106 Fuente.- Encuesta e historia clínica

4.5 Grupo control

Obtuvimos suero y encuesta de 60 voluntarios aparentemente sanos, quienes sirvieron como control interno de las pruebas realizadas (ELISA C6, ELISA IgM, ELISA IgG). En este grupo, encontramos las siguientes características:

- El 90% de ellos pertenecían al género femenino
- Todos los sujetos controles se encontraban asintomáticos al momento de la toma de la muestra y no contaban con antecedentes médicos de importancia.
- El 23.33% refirió contacto (exposición) con garrapatas (14 sujetos).
- El 3.33% refirió mordedura por garrapatas (2 personas).
- La edad promedio observada fue de 28.05 años con un rango de 17-52 años; el 50% de ellos presentaron una edad de 26.5 o menos, con un alejamiento de los datos con respecto al promedio señalado de 8.16 años.
- A todos los sueros se les realizaron las tres diferentes pruebas de ELISA por triplicado. Todos los sueros fueron negativos, en todas las pruebas de ELISA empleadas, por lo que a ningún suero se le realizó Western blot.

4.6 Estudios adicionales

Los sueros del grupo control, de los pacientes negativos y de los positivos por Western blot IgG para *Borrelia burgdorferi* resultaron negativos por la técnica de ELISA para virus de Hepatitis B, virus de Hepatitis C, Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 y 2; un suero de los pacientes positivos para Western blot resultó falso positivo por VDRL.

Se obtuvieron 21 muestras de diferentes tejidos para realizar PCR para *Borrelia spp.* (16 biopsias de piel, 3 muestras de líquido cefalorraquídeo y 2 de artrocentesis), dando en su totalidad reportes negativos.

5. DISCUSION

El presente estudio demuestra la existencia de la enfermedad de Lyme en nuestro medio donde se detectó una prevalencia de 32% de casos en una población sintomática sin diagnóstico definido.

La mayoría de los pacientes tenían un bajo riesgo ocupacional lo cual difiere con lo reportado en la literatura donde se ha reportado una incidencia del 13 al 47% en sujetos de alto riesgo como trabajadores forestales y corredores.⁷³ Esto puede explicarse por la metodología de nuestro estudio, ya que al ser éste un estudio piloto para detectar la existencia del padecimiento, y no un estudio epidemiológico de población abierta, se incluyó solamente a pacientes con manifestaciones clínicas sugestivas de enfermedad de Lyme sin diagnóstico definido, quienes fueron referidos por médicos de distintos servicios hospitalarios y especialistas privados. La mayoría de la población residía en área urbana (población que acude al médico con más frecuencia), sin embargo, esta investigación pone de manifiesto la presencia del padecimiento y da pie a la realización de nuevos estudios, a fin de conocer aún más acerca de la enfermedad de Lyme en nuestra población.

De acuerdo a lo reportado por Nadelman et al, la enfermedad es similar en ambos géneros y presenta una distribución bimodal en los segmentos de niños y adultos jóvenes arriba de 30 años.⁸² Nuestro estudio mostró un predominio en el género femenino y encontró un aumento de frecuencia en el intervalo de edades de 31 a 40 años. Una explicación para la diferencia de resultados con

respecto a lo reportado en la literatura, pudiera ser el hecho que la población pediátrica no es predominante en las consultas de los servicios hospitalarios que refirieron pacientes.

Con respecto a las manifestaciones clínicas observadas en este estudio, las más frecuentes en orden descendente fueron: las articulares, neurológicas, cardíacas y dermatológicas, lo cual es similar a lo reportado en la literatura.

En los pacientes con ELISA y Western blot positivo los síntomas reumatológicos como las artralgias, artritis monoarticular, oligoarticular o poliarticular así como la fatiga crónica, fueron los síntomas más frecuentes. Estos coinciden con lo descrito en la población americana ¹.

Las manifestaciones neurológicas de nuestra población incluyeron parestesias, parálisis muscular, cefalea, radiculoneuropatía, síntomas similares a esclerosis múltiple, meningitis aséptica y parálisis facial los cuales son síntomas comunes en la población europea¹⁹⁷ y se asocian a la infección por la genoespecie *B. garinii*. Existe la posibilidad no explorada en este estudio, de la presencia en nuestro medio de varias cepas de *Borrelia burgdorferi* con distinto poder patógeno, similar a lo que ocurre en Europa.

Es importante recalcar que los síntomas encontrados no se pueden atribuir únicamente a la enfermedad de Lyme por lo que es importante descartar otras enfermedades que pudieran que producir síntomas similares. Obviamente hasta

no tener un estudio epidemiológico diseñado para caracterizar a la población abierta no podemos asegurar cuales son las manifestaciones típicas de nuestra población.

Encontramos anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en algunos pacientes con morfea, ésta es una manifestación que ha tenido controversias en cuanto a su asociación con la bacteria.¹⁹⁸ Existen reportes a favor de su asociación en Italia, Suiza, Puerto Rico, Turquía y Japón, pero también existen reportes en contra en España, Finlandia, Holanda y Francia.¹⁹⁹ Algunos autores sugieren que la morfea tiene una fuerte distribución en Europa y Asia, pero se observa muy esporádica en Estados Unidos.²⁰⁰

Entre los hallazgos cardiovasculares, el padecimiento más frecuentemente encontrado fue la valvulopatía. La mayor parte de los pacientes incluidos en este estudio, no tenían una etiología definida y fueron referidos de la Ciudad de México. Este hallazgo sugiere que podríamos incluir a la enfermedad de Lyme como diagnóstico diferencial de la valvulopatía reumática, tradicionalmente atribuida a la fiebre reumática en nuestro país.

Con respecto a las pruebas utilizadas para el diagnóstico serológico de Lyme en la población analizada, observamos que existe variabilidad en la sensibilidad de las diferentes pruebas para la detección de los anticuerpos anti *Borrelia burgdorferi*. Los estuches de ELISA no detectan anticuerpos contra todos los antígenos de las especies conocidas de *Borrelia*, ni aún el estuche de ELISA C6 que detecta una fracción inmunodominante de las cepas americanas y

europeas de *Borrelia burgdorferi*. En nuestro estudio el ELISA C6 solo detectó 3 casos que no se detectaron por las otras técnicas de ELISA, por lo que obtuvimos una sensibilidad menor a lo reportado en la literatura.^{148,149,155} Se ha reportado heterogeneidad de la proteína VlsE entre las genoespecies de *Borrelia burgdorferi*, por lo que el ELISA C6 no permitiría detectar todas las especies.²⁰¹ Una explicación de nuestros resultados es que en nuestra región existan diferentes genoespecies que no compartan el mismo antígeno VlsE que es usado en la prueba C6 por lo que dicha prueba mostró falsos negativos en la población analizada. Otra razón importante que pudiera a su vez explicar nuestros resultados, sería que los pacientes que se reportaron negativos o indeterminados por ELISA C6 pudieron haber recibido tratamiento con antibióticos después de la infección, provocando que los títulos de anticuerpos anti VlsE disminuyeran a niveles indetectables por ELISA C6 como en el estudio de Philipp et al, donde se demuestra en un gran cantidad de pacientes disminución de 4 órdenes en los títulos de anticuerpos o incluso hasta niveles indetectables de anticuerpos después de 6 a 12 meses del tratamiento. Se ha demostrado que la sensibilidad de dicha prueba es similar a la de otras técnicas de ELISA en la población con sintomatología crónica. Estos datos son puntos en contra y una llamada de atención a la propuesta de considerar el ELISA C6 como estándar de oro o la mejor prueba para usarse en el rastreo inicial.^{202, 203}

La prueba de ELISA IgM resultó positiva en un porcentaje elevado de pacientes contrario a lo esperado al inicio del estudio, ya que la mayoría de los pacientes tenían síntomas crónicos y no contaban con diagnóstico y tratamiento

adecuados. Se ha reportado una nueva respuesta IgM en pacientes crónicos con persistencia de *Borrelia burgdorferi* a lo largo de toda la enfermedad.²⁰⁴ Otra explicación de la respuesta IgM en nuestros pacientes pudiera ser la persistencia de IgM o IgG años después de la infección activa en pacientes sin sintomatología²⁰⁵ tal y como fue encontrado en pacientes con 20 años de evolución. No podemos descartar que simplemente pudiera tratarse de reinfección obviamente con un nuevo cuadro clínico.

En los casos en que la prueba de Western blot IgG fue positiva pero que ELISA IgG fueron negativos, se podrían explicar por la alta sensibilidad del Western blot IgG que detecta pequeñas cantidades de anticuerpos.

Si bien este estudio en particular no fue diseñado con la finalidad de evaluar la sensibilidad y especificidad de cualquiera de los estuches utilizados, ya que no se cuenta con una técnica estándar como cultivo contra *Borrelia* en los pacientes positivos (por lo que tenemos limitantes para sugerir cual fue la mejor prueba diagnóstica en nuestro medio), si nos permite en base a los resultados obtenidos, podamos sugerir (con las reservas del caso y hasta que se elabore un estudio diseñado para tal fin) que los estuches para ELISA que incluyan C6 e IgM con antígenos recombinantes de *Borrelia burgdorferi*, *B. afzelii* y *B. garinii* y la confirmación con Western blot son la mejor opción.

En relación a las muestras procesadas por PCR cabe mencionar que los resultados observados en todas las muestras fueron negativas. Lo anterior

puede explicarse en base a otros estudios e investigaciones realizadas, en los cuales se observaron resultados muy similares a los nuestros. Se ha sugerido que el PCR tiene mayor sensibilidad en etapas tempranas de la enfermedad antes de que los pacientes hayan recibido tratamiento antibiótico. A pesar de ser un examen muy sensible para detectar DNA del agente etiológico de la enfermedad, existen limitaciones en esta técnica por ejemplo que la presencia de *Borrelia burgdorferi* no persiste de manera continua en la sangre, fluido espinal o sinovial; por el contrario ésta se adhiere a los tejidos de las articulaciones y nervios.^{26,206} Un PCR realizado al líquido sinovial puede ser positivo en una etapa temprana de la enfermedad neurológica, pero usualmente los resultados son negativos en pacientes con daños avanzados en el sistema nervioso central. El PCR puede apoyar a los médicos en establecer un diagnóstico de neuroborreliosis, sin embargo un resultado negativo no excluye neuroborreliosis. El PCR es un apoyo al diagnóstico pero no un sustituto para el diagnóstico clínico o serológico.²⁰⁷ El PCR puede contribuir a la confiabilidad del diagnóstico durante etapas tempranas de la infección y puede ser una herramienta valiosa para el control del tratamiento, según se demostró en 8 pacientes con EM quienes resultaron negativos a PCR después del tratamiento a base de antibióticos.²⁰⁸

En el estudio que nosotros realizamos se demuestra que no se ha diagnosticado previamente la enfermedad de Lyme. Si bien la causa de dicho subdiagnóstico no fue motivo de estudio, es de suponer que, entre otras, ha influido en nuestro medio la carencia de información sobre este padecimiento,

tanto de los médicos como en los pacientes. Seguramente también ha contribuido al subdiagnóstico de la enfermedad de Lyme, la latencia de la enfermedad, los síntomas multivariados y multisistémicos, que le han valido el calificativo de la nueva gran imitadora al igual que otras enfermedades causadas por espiroquetas,⁶³ como en su momento fue considerada la sífilis o el lupus. Una razón más es el hecho de que la mordedura de las garrapatas pasa inadvertida en muchas personas, principalmente las que no se exponen con frecuencia. Cabe mencionar al respecto que en nuestra población se recordó el contacto y mordedura por garrapatas de la misma frecuencia reportada en la literatura.^{84,90} Otra razón pudiera ser la lesión del eritema migrans en ocasiones no se identifica como tal y desaparece espontáneamente.

Los estudios epidemiológicos de enfermedades infecciosas presentan grandes dificultades, esto es especialmente notable en las zoonosis transmitidas por vectores, debido al gran número de factores implicados en su transmisión. Existe escasa o nula información por parte de las autoridades sanitarias mexicanas, acerca de la presencia de la enfermedad, a pesar de la colindancia de nuestro país con el área de Texas.¹⁸⁹ Es necesario prestar especial atención a la gran movilización de la fauna entre las fronteras entre México y Estados Unidos, así como a la repoblación con venados de cola blanca “texana” a ranchos cinegéticos de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.¹⁹⁶ Es importante tomar en cuenta la presencia de gran cantidad de vectores en nuestro país ⁸ que hacen titánico la realización de un estudio epidemiológico.

A pesar de que los pacientes con enfermedad de Lyme acuden a consulta médica, no son diagnosticados. Muchos de los pacientes con Lyme en nuestro país se encuentran en etapas tardías de la enfermedad, lo que incrementará significativamente el costo del tratamiento y el riesgo de presentar más secuelas. Lo anterior pone de manifiesto la importancia que tiene la realización de estudios de seroprevalencia en población sana, así como establecer medidas de control y prevención de esta entidad.

Es importante descartar la existencia de diferentes reacciones cruzadas en las pruebas serológicas empleadas, siendo las más frecuentes e importantes, la infección por otros treponemas (sífilis, leptospira, treponemas comensales de cavidad oral), virus (citomegalovirus, Epstein – Barr, hepatitis B, hepatitis C, VIH 1y VIH 2). Nuestro estudio descartó en el grupo estudiado, la presencia de sífilis, VHB, VHC, VIH; por lo que con base a nuestros resultados y la sensibilidad y especificidad del Western blot IgG, ²⁶ podemos inferir que en la población analizada la posibilidad de que otras infecciones mimeticen los síntomas de Lyme es muy baja.

En base a las manifestaciones clínicas no es posible establecer el diagnóstico definitivo entre pacientes con enfermedad de Lyme y pacientes con artritis. Estudios histológicos del tejido sinovial muestran cambios similares en pacientes con artritis reumatoide y artritis por Lyme. En la etapa temprana de la inflamación, la *Borrelia burgdorferi* interactúa con polimorfonucleares y células epiteliales, estimulando la producción de especies reactivas del oxígeno,

productos de la peroxidación lipídica, así como otros mediadores de la inflamación, lo cual conlleva a la destrucción progresiva del cartílago articular y la desintegración de la matriz extracelular.¹⁷ Estos cambios igualmente aparecen en pacientes con artritis reumatoide en fases tempranas. Por esta razón consideramos necesario tomar en cuenta la enfermedad de Lyme como un diagnóstico diferencial importante a descartar en pacientes con artritis reumatoide temprana. Esto igualmente se debe considerar en pacientes con artritis en estadios crónicos cuando hay resistencia al tratamiento o no respondedores a la terapia habitual.

En la población analizada por nosotros, en los sujetos con resultados dudosos o negativos, no podemos descartar la posibilidad de falsos negativos por diferentes factores como el de la existencia de una subespecie diferente de *Borrelia burgdorferi*, las pruebas comerciales existentes no permiten detectar la presencia de nuevas subespecies. Aunado a lo anterior, el uso indiscriminado de antibióticos en nuestro medio, puede ser causante de una disminución de *Borrelia* circulante, lo que interferirá con la producción de anticuerpos. La utilización de esteroides o inmunosupresores, (lo cual ocurrió en una tercer parte de los pacientes), podría ser una razón adicional, para la disminución en la producción de anticuerpos detectables; otra razón es la presencia de que están evadiendo al sistema inmune, al encontrarse bacterias encapsuladas, en fase latente, rodeados de proteínas propios o creciendo en etapa intracelular.

Un aspecto importante descubierto en este estudio, fue la sensación de impotencia, desesperanza y dolor que experimentaron muchos pacientes, principalmente aquellos que habían acudido a múltiples médicos en busca de un diagnóstico etiológico. Aunque no fue objetivo del estudio se les dio seguimiento posterior después del inicio de tratamiento, muchos de ellos tuvieron mejoría en los aspectos cutáneos, articulares, y sobretodo cambios positivos en su estado anímico. Sentimos enorme satisfacción en muchos casos donde el diagnóstico cambió radicalmente su evolución y pronóstico.

6. PERSPECTIVAS

Un área de oportunidad en nuestro trabajo es dirigirnos a la búsqueda de enfermedad de Lyme en pacientes con artritis temprana, los cuales en esta fase presentan síntomas inespecíficos de la enfermedad y que al intervenir con una identificación oportuna nos permita instaurar un tratamiento antimicrobiano adecuado, evitando la progresión de la enfermedad a fases de cronicidad lo cual conlleva a una discapacidad eludible.

Continuar la evaluación de la población incluida en este estudio con Western blot IgM para identificar su sensibilidad y compararlo con Western blot IgG.

Es de suma importancia iniciar un estudio epidemiológico dirigido a establecer las características de la enfermedad de Lyme en nuestro país, así como, encontrar las genoespecies presentes en nuestro medio.

Se debe crear un equipo multidisciplinario para atención de estos pacientes de manera integral, involucrando aspectos psicológicos, nutricionales, rehabilitación y la intervención oportuna de especialistas como neurólogos, infectólogo, dermatólogo, cardiólogo para evitar complicaciones.

Es importante remarcar la necesidad de ir en búsqueda de etiología en pacientes con diagnósticos idiopáticos y serología negativa, ya que durante el transcurso del estudio, se encontraron pacientes con discrepancias en los resultados de la prueba ELISA y que tuvieron un resultado confirmatorio por la prueba de Western blot.

Es necesario diseñar programas de prevención en las comunidades urbanas y rurales así como revisar exhaustivamente la importación de animales posibles portadores de vectores.

Deben establecerse criterios adecuados que establezcan el diagnóstico de las enfermedades transmitidas por artrópodos en la región y permitan la notificación adecuada a las autoridades sanitarias.

Nos proponemos a corto plazo sugerir la inclusión de la enfermedad de Lyme dentro de los programas de control epidemiológico de las autoridades sanitarias.

7. CONCLUSIONES

- 1.- Existe enfermedad de Lyme en México.
- 2.- La seropositividad encontrada en este estudio fue superior a la estimada inicialmente.
- 3.- Las manifestaciones articulares y neurológicas fueron las más frecuentemente encontradas en nuestra población lo cual coincide con lo descrito en la literatura.
- 4.- La prueba de ELISA que detectó un mayor número de sueros en nuestra población, fue la prueba de ELISA IgM que utiliza antígenos recombinantes de 3 genospecies.
- 5.- En la población estudiada la prueba de ELISA C6 fue menos sensible a lo reportado en la literatura.
- 6.- La mejor combinación de pruebas para el tamizaje inicial fueron dados por ELISA IgM junto con ELISA C6, pues obtuvieron el mayor número de casos confirmados por Western blot.
- 7.- El PCR en nuestra población no contribuyó como herramienta diagnóstica.
- 8.- La enfermedad de Lyme debe formar parte de los diagnósticos diferenciales en patologías con sintomatología sugestiva.
- 9.- Es la primera vez que se realiza un estudio de este tipo en el país y que conducirá modificaciones en las normas de control epidemiológico, manejo de actividades al aire libre y ampliará las opciones de diagnósticos diferenciales en los médicos de todas las latitudes del país.

ANEXO 1

CUESTIONARIO PARA PACIENTES

PROTOCOLO : DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE LYME

Nombre: _____ Edad _____ Sexo _____

Ocupación _____ Teléfono _____ Ciudad _____

RECUERDA USTED:

SI

NO

Contacto con garrapatas o pinolillos

Algún tipo de mordedura de garrapata

Hace cuanto tiempo? _____ En que ciudad _____

Lesión en la piel después de la mordedura?

La lesión ha medido más de 5cm

Lesión en forma de anillo?

Lesión oscura sobre sus manos?

Fiebre después de mordedura de garrapatas

Parálisis facial o de Bell

Artritis o inflamación Articular

Adormecimiento o parálisis de músculos

Alteraciones cardiacas

Fatiga crónica

Dolor generalizado muscular

Rigidez de su cuello

ANEXO 2

**PROTOCOLO DE INVESTIGACION: DIAGNOSTICO DE ENFERMEDAD
DE LYME.**

CONSULTA DE REFERENCIA: **DERMATOLOGÍA**

NOMBRE DEL MÉDICO: _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

ANTECEDENTES RELEVANTES:

DATOS IMPORTANTES EXPLORACIÓN FÍSICA

HA PRESENTADO

SI

Eritema migrans

Linfocitoma cutis

Acrodermatitis crónica

Lesiones post-mordedura de garrapatas

Se le realizó biopsia diagnóstica

IDX: _____

Comentarios:

ANEXO 3.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN: DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE LYME

CONSULTA DE REFERENCIA: **NEUROLOGÍA**

NOMBRE DEL MÉDICO: _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

ANTECEDENTES RELEVANTES:

DATOS IMPORTANTES EXPLORACIÓN FÍSICA

| | SI |
|------------------------|--------------------------|
| Meningitis linfocítica | <input type="checkbox"/> |
| Parálisis facial | <input type="checkbox"/> |
| Radiculoneuropatía | <input type="checkbox"/> |
| Encefalomiелitis | <input type="checkbox"/> |
| Punción Lumbar | <input type="checkbox"/> |
| Cefalea | <input type="checkbox"/> |
| Fatiga | <input type="checkbox"/> |
| Parestesias | <input type="checkbox"/> |
| Rigidez de nuca | <input type="checkbox"/> |

IDX: _____

Comentarios:

ANEXO 4.

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN: DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD
DE LYME.**

CONSULTA DE REFERENCIA: **CARDIOLOGÍA**

NOMBRE DEL MÉDICO: _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

ANTECEDENTES RELEVANTES:

DATOS IMPORTANTES EXPLORACIÓN FÍSICA

DATOS RELEVANTES

SI

Bloqueo AV grado II o III agudo

Palpitaciones

Bradycardia

Bloqueo de rama

Miocarditis

IDX: _____

Comentarios: _____

ANEXO 5.

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN: DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD
DE LYME**

CONSULTA DE REFERENCIA: **REUMATOLOGÍA**

NOMBRE DEL MÉDICO: _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

ANTECEDENTES RELEVANTES:

DATOS IMPORTANTES EXPLORACIÓN FÍSICA

DATOS RELEVANTES

| | SI |
|---------------------|--------------------------|
| Monoartritis | <input type="checkbox"/> |
| Oligoartritis | <input type="checkbox"/> |
| Artralgias/mialgias | <input type="checkbox"/> |
| Fibromialgia | <input type="checkbox"/> |
| Artrocentesis | <input type="checkbox"/> |

IDX: _____

Comentarios: _____

ANEXO 6.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

AUTORIZACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: SEROPOSITIVIDAD Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN UNA POBLACIÓN MEXICANA CON SINTOMATOLOGÍA SUGESTIVA DE ENFERMEDAD DE LYME

1. LA NATURALEZA Y PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO

Se le ha sido solicitado tomar parte en un estudio para conocer si en nuestro medio hay una enfermedad secundaria a la mordedura de garrapatas. Se han reportado casos aislados y por ser una enfermedad poco conocida la mayoría de los médicos no la diagnostica. Es importante que usted lea y comprenda la información en este consentimiento informado; y sienta la libertad de hacer preguntas hasta que usted entienda completamente.

2. EXPLICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS A SEGUIR

Una vez que usted decida participar en este estudio, se le tomará una muestra única de sangre de aproximadamente 10cc. Se le hará una entrevista para complementar algunos datos de su historia clínica y exploración física. Se le solicitará que llene una encuesta. La visita total tomará aproximadamente 30 minutos.

3. RIESGOS Y MOLESTIAS

En este estudio, las posibles molestias que le puede ocasionar, es el tiempo que le lleve contestar el cuestionario y las de la extracción de sangre.

4. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Los resultados del estudio le servirán para tener un mejor conocimiento de su enfermedad, evitar complicaciones y ayudar para que a otras personas se les haga un diagnóstico temprano.

5. DERECHO DE CANCELAR SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO/ PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Usted es libre de dejar este estudio en cualquier momento. Su decisión de no participar en este estudio como de dejarlo en cualquier momento después de haber iniciado no afectará su atención médica futura.

6. CONFIDENCIALIDAD

Todos los registros obtenidos mientras usted participa en este estudio estarán disponibles solo para el personal médico involucrado. Los resultados del estudio, incluyendo pruebas de laboratorio, podrán publicarse con fines científicos bajo el entendido que su identidad no será revelada.

He leído, o han leído por mí, la información anteriormente escrita antes de firmar esta forma de consentimiento. Yo he tenido siempre la oportunidad amplia de preguntar y he recibido las respuestas que han satisfecho dichas

preguntas. Si no participo o si discontinúo mi participación en este estudio no seré penalizado y no renunciaré a ninguno de mis derechos legales. Por lo tanto yo acepto voluntariamente tomar parte en este estudio.

Por la firma de este consentimiento informado, no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA

FECHA

MEDICO INVESTIGADOR

NOMBRE Y FIRMA

FECHA

TESTIGO 1

NOMBRE Y FIRMA

FECHA

TESTIGO 2

NOMBRE Y FIRMA

FECHA

BIBLIOGRAFÍA

1. Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 2001 Jul 12;345(2):115-25.
2. Kelly, Harris, Ruddy, Sledge. Textbook of rheumatology. Fifth ed. ; 1997. .
3. Wolfgang Kristoferitsch. Rheumatic disease clinics of north america. ; 1989. .
4. Jouda F, Crippa M, Perret JL, Gern L. Distribution and prevalence of borrelia burgdorferi sensu lato in ixodes ricinus ticks of canton ticino (switzerland). Eur J Epidemiol 2003;18(9):907-12.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease-united states 2001-2002. MMWR Morb Mort Weekly Report 2004 2004;53(17):365-369.
6. Masters E, Granter S, Duray P, Cordes P. Physician-diagnosed erythema migrans and erythema migrans-like rashes following lone star tick bites. Arch Dermatol 1998 Aug;134(8):955-60.
7. Oteo Revuelta JA, Estrada Pena A. Ixodes ricinus, a demonstrated vector of borrelia burgdorferi in spain. Med Clin (Barc) 1991 Apr 20;96(15):599.
8. Guzman-Cornejo C, Robbins-G. R, Perez-M. Tila. The ixodes (acari: Ixodidae) of mexico: Parasite-host and and host-parasite checklist. ZOOTAXA 2007;1553:47-58.
9. Marquez-Jimenez FJ, Hidalgo-Pontiveros A, Contreras-Chova F, Rodriguez-Liebana JJ, Muniain-Ezcurra MA. Ticks (acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in spain. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005 Feb;23(2):94-102.
10. Burgdorfer W. Vector/host relationships of the lyme disease spirochete, borrelia burgdorferi. Rheum Dis Clin North Am 1989 Nov;15(4):775-87.
11. Keirans JE, Hutcheson HJ, Durden LA, Klompen JS. Ixodes (ixodes) scapularis (acari:Ixodidae): Redescription of all active stages, distribution,

- hosts, geographical variation, and medical and veterinary importance. *J Med Entomol* 1996 May;33(3):297-318.
12. Steere AC. Lyme disease: A growing threat to urban populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 29;91(7):2378-83.
 13. Singh-Behl D, La Rosa SP, Tomecki KJ. Tick-borne infections. *Dermatol Clin* 2003 Apr;21(2):237,44, v.
 14. Martinez A, Salinas A, Martinez F, Cantu A, Miller DK. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. *J Wildl Dis* 1999 Oct;35(4):799-803.
 15. Hamilton DR. Lyme disease. the hidden pandemic. *Postgrad Med* 1989 Apr;85(5):303,8, 313-4.
 16. Burgdorfer W. Rheumatic diseases clinic of North America. 1989;15(4).
 17. Singh SK, Girschick HJ. Lyme borreliosis: From infection to autoimmunity. *Clin Microbiol Infect* 2004 Jul;10(7):598-614.
 18. 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 southwestern Ireland. *Exp Appl Acarol* 1999 Sep;23(9):717-29.
 19. Oteo Revuelta JA, Blanco Ramos JR, Ibarra Cucalón V. Revisión y actualizaciones en Lyme. *Revista Medicina* 2002;8(69).
 20. Wallich R, Helmes C, Schaible UE, Lobet Y, Moter SE, Kramer MD, Simon MM. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of *OspA*, *fla*, *HSP60*, and *HSP70* gene probes. *Infect Immun* 1992 Nov;60(11):4856-66.
 21. Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G. An *OspA* serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and *OspA* sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1993 Feb;31(2):340-50.

22. 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 Apr;60(4):1677-83.
23. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. Delineation of borrelia burgdorferi sensu stricto, borrelia garinii sp. nov., and group VS461 associated with lyme borreliosis. Int J Syst Bacteriol 1992 Jul;42(3):378-83.
24. Baranton G, Marti Ras N, Postic D. Molecular epidemiology of the aetiological agents of lyme borreliosis. Wien Klin Wochenschr 1998 Dec 23;110(24):850-5.
25. Ruzic-Sabljić E, Arnez M, Lotric-Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Strle F. Genotypic and phenotypic characterisation of borrelia burgdorferi sensu lato strains isolated from human blood. J Med Microbiol 2001 Oct;50(10):896-901.
26. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev 2005 Jul;18(3):484-509.
27. Shapiro ED, Gerber MA. Lyme disease. Clin Infect Dis 2000 Aug;31(2):533-42.
28. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a lyme disease spirochaete, borrelia burgdorferi. Nature 1997 Dec 11;390(6660):580-6.
29. Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelman R, Kaslow RA. Spirochetes isolated from the blood of two patients with lyme disease. N Engl J Med 1983 Mar 31;308(13):740-2.
30. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE. The spirochetal etiology of lyme

disease. N Engl J Med 1983 Mar 31;308(13):733-40.

31. Alban PS, Johnson PW, Nelson DR. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of borrelia burgdorferi. Microbiology 2000 Jan;146 (Pt 1)(Pt 1):119-27.
32. Ovcinnikov NM, Delektorskij VV. Current concepts of the morphology and biology of treponema pallidum based on electron microscopy. Br J Vener Dis 1971 Oct;47(5):315-28.
33. Brorson O, Brorson SH. A rapid method for generating cystic forms of borrelia burgdorferi, and their reversal to mobile spirochetes. APMIS 1998 Dec;106(12):1131-41.
34. Brorson O, Brorson SH. Transformation of cystic forms of borrelia burgdorferi to normal, mobile spirochetes. Infection 1997 Jul-Aug;25(4):240-6.
35. Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of borrelia garinii cystic forms to motile spirochetes in vivo. APMIS 2001 May;109(5):383-8.
36. Mursic VP, Wanner G, Reinhardt S, Wilske B, Busch U, Marget W. Formation and cultivation of borrelia burgdorferi spheroplast-L-form variants. Infection 1996 May-Jun;24(3):218-26.
37. Aberer E, Kersten A, Klade H, Poitschek C, Jurecka W. Heterogeneity of borrelia burgdorferi in the skin. Am J Dermatopathol 1996 Dec;18(6):571-9.
38. Klempner MS, Noring R, Rogers RA. Invasion of human skin fibroblasts by the lyme disease spirochete, borrelia burgdorferi. J Infect Dis 1993 May;167(5):1074-81.
39. Ma Y, Sturrock A, Weis JJ. Intracellular localization of borrelia burgdorferi within human endothelial cells. Infect Immun 1991 Feb;59(2):671-8.
40. Dorward DW, Fischer ER, Brooks DM. Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing lyme disease. Clin Infect Dis

41. Cabello FC, Godfrey HP, Newman SA. Hidden in plain sight: *Borrelia burgdorferi* and the extracellular matrix. *Trends Microbiol* 2007 Aug;15(8):350-4.
42. Norris SJ. Antigenic variation with a twist--the borrelia story. *Mol Microbiol* 2006 Jun;60(6):1319-22.
43. Sigal LH. Lyme disease: A review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1997;15:63-92.
44. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kuhbeck R, Barbour AG, Kramer M. Antigenic variability of *borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci* 1988;539:126-43.
45. Jwang B, Dewing P, Fikrig E, Flavell RA. The hook protein of *borrelia burgdorferi*, encoded by the *flgE* gene, is serologically recognized in lyme disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995 Sep;2(5):609-15.
46. Anda P, Gebbia JA, Backenson PB, Coleman JL, Benach JL. A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homolog in *borrelia burgdorferi* and *borrelia hermsii*. *Infect Immun* 1996 Jan;64(1):262-8.
47. Liang FT, Jacobs MB, Bowers LC, Philipp MT. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in lyme borreliosis. *J Exp Med* 2002 Feb 18;195(4):415-22.
48. Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP, Norris SJ. Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1999 Dec;37(12):3997-4004.
49. Wallich R, Brenner C, Kramer MD, Simon MM. Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *borrelia burgdorferi* expressed only in vivo. *Infect Immun* 1995 Sep;63(9):3327-35.

50. Champion CI, Blanco DR, Skare JT, Haake DA, Giladi M, Foley D, Miller JN, Lovett MA. A 9.0-kilobase-pair circular plasmid of borrelia burgdorferi encodes an exported protein: Evidence for expression only during infection. *Infect Immun* 1994 Jul;62(7):2653-61.
51. de Silva AM, Telford SR,3rd, Brunet LR, Barthold SW, Fikrig E. Borrelia burgdorferi OspA is an arthropod-specific transmission-blocking lyme disease vaccine. *J Exp Med* 1996 Jan 1;183(1):271-5.
52. Margolis N, Hogan D, Tilly K, Rosa PA. Plasmid location of borrelia purine biosynthesis gene homologs. *J Bacteriol* 1994 Nov;176(21):6427-32.
53. Embers ME, Wormser GP, Schwartz I, Martin DS, Philipp MT. Borrelia burgdorferi spirochetes that harbor only a portion of the lp28-1 plasmid elicit antibody responses detectable with the C6 test for lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 2007 Jan;14(1):90-3.
54. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of lyme disease. *J Clin Invest* 2004 Apr;113(8):1093-101.
55. Purser JE, Norris SJ. Correlation between plasmid content and infectivity in borrelia burgdorferi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Dec 5;97(25):13865-70.
56. Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM, Bowman AS. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in ixodes ricinus tick saliva: A potential role in enhanced borrelia burgdorferi transmission. *Immunology* 2004 Nov;113(3):401-8.
57. Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, ixodes dammini. *J Exp Med* 1985 Feb 1;161(2):332-44.
58. Hu LT, Perides G, Noring R, Klempner MS. Binding of human plasminogen to borrelia burgdorferi. *Infect Immun* 1995 Sep;63(9):3491-6.
59. Schutzer SE, Coyle PK, Belman AL, Golightly MG, Drulle J. Sequestration of antibody to borrelia burgdorferi in immune complexes in seronegative lyme disease. *Lancet* 1990 Feb 10;335(8685):312-5.

60. Duray PH, Steere AC. Clinical pathologic correlations of lyme disease by stage. *Ann N Y Acad Sci* 1988;539:65-79.
61. Coburn J, Medrano M, Cugini C. *Borrelia burgdorferi* and its tropisms for adhesion molecules in the joint. *Curr Opin Rheumatol* 2002 Jul;14(4):394-8.
62. 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 Jul;58(7):2404-7.
63. Garcia-Monco JC, Benach JL. The pathogenesis of lyme disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1989 Nov;15(4):711-26.
64. Gross DM, Forsthuber T, Tary-Lehmann M, Etling C, Ito K, Nagy ZA, Field JA, Steere AC, Huber BT. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant lyme arthritis. *Science* 1998 Jul 31;281(5377):703-6.
65. Guerau-de-Arellano M, Huber BT. Development of autoimmunity in lyme arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002 Jul;14(4):388-93.
66. Steere AC, Dwyer E, Winchester R. Association of chronic lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N Engl J Med* 1990 Jul 26;323(4):219-23.
67. Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 2001 Oct;108(8):1097-104.
68. Weis JJ. Host-pathogen interactions and the pathogenesis of murine lyme disease. *Curr Opin Rheumatol* 2002 Jul;14(4):399-403.
69. Hardin JA, Steere AC, Malawista SE. Immune complexes and the evolution of lyme arthritis. dissemination and localization of abnormal C1q binding activity. *N Engl J Med* 1979 Dec 20;301(25):1358-63.
70. Yin Z, Braun J, Neure L, Wu P, Eggens U, Krause A, Kamradt T, Sieper J. T cell cytokine pattern in the joints of patients with lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthritis Rheum* 1997 Jan;40(1):69-79.

71. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lyme disease--united states, 2003-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007 Jun 15;56(23):573-6.
72. Berglund J, Blomberg I, Hansen BU. Lyme borreliosis in rheumatological practice: Identification of lyme arthritis and diagnostic aspects in a swedish county with high endemicity. *Br J Rheumatol* 1996 Sep;35(9):853-60.
73. Rath PM, Ibershoff B, Mohnhaupt A, Albig J, Eljaschewitsch B, Jurgens D, Horbach I, Fehrenbach FJ. Seroprevalence of lyme borreliosis in forestry workers from brandenburg, germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996 May;15(5):372-7.
74. Oteo JA, Martinez de Artola V, Eiros JM. Human ehrlichiosis in spain. various epidemiologic considerations. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995 Apr;13(4):265.
75. Segura F, Diestre G, Sanfeliu I, Cardenosa N. Seroprevalence of borrelia burgdorferi infection in the area of valles occidental (barcelona, spain). *Med Clin (Barc)* 2004 Sep 25;123(10):395.
76. Zhang QE, Zhang PH, Li SQ, Li RY, Pei DK. Investigation of lyme disease in xinjiang. *Chin Med J (Engl)* 1991 Mar;104(3):244-6.
77. Carlberg H, Naito S. Lyme borreliosis--a review and present situation in japan. *J Dermatol* 1991 Mar;18(3):125-42.
78. Wills MC, Barry RD. Detecting the cause of lyme disease in australia. *Med J Aust* 1991 Aug 19;155(4):275.
79. Zahaf A, Bouassida S, Boudaya S, Turki H. Lyme disease in sfax. *Ann Dermatol Venereol* 1994;121(2):177-9.
80. Hoshinari NH, Barros PJ, Yassuda P, Baggio D, Steere AC, Pagliarini RC, Cossermelli W. Epidemiological study of lyme disease in brazil. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1992 Mar-Apr;47(2):71-5.

81. Palacios R, Osorio LE, Giraldo LE, Torres AJ, Philipp MT, Ochoa MT. Positive IgG western blot for borrelia burgdorferi in colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999 Jul-Aug;94(4):499-503.
82. Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis. Lancet 1998 Aug 15;352(9127):557-65.
83. Piacentino JD, Schwartz BS. Occupational risk of lyme disease: An epidemiological review. Occup Environ Med 2002 Feb;59(2):75-84.
84. Torok E, Lakos A, Dragodan K, Lanyi C. Erythema chronicum migrans lipschutz. Orv Hetil 1987 Sep 20;128(38):1983-6.
85. Smith RP, Schoen RT, Rahn DW, Sikand VK, Nowakowski J, Parenti DL, Holman MS, Persing DH, Steere AC. Clinical characteristics and treatment outcome of early lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. Ann Intern Med 2002 Mar 19;136(6):421-8.
86. Steere AC, Dhar A, Hernandez J, Fischer PA, Sikand VK, Schoen RT, Nowakowski J, McHugh G, Persing DH. Systemic symptoms without erythema migrans as the presenting picture of early lyme disease. Am J Med 2003 Jan;114(1):58-62.
87. Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T. Lyme borreliosis. Lancet Infect Dis 2003 Aug;3(8):489-500.
88. Edlow JA. Erythema migrans. Med Clin North Am 2002 Mar;86(2):239-60.
89. Pachner AR, Steiner I. Lyme neuroborreliosis: Infection, immunity, and inflammation. Lancet Neurol 2007 Jun;6(6):544-52.
90. Steere AC, Bartenhagen NH, Craft JE, Hutchinson GJ, Newman JH, Rahn DW, Sigal LH, Spieler PN, Stenn KS, Malawista SE. The early clinical manifestations of lyme disease. Ann Intern Med 1983 Jul;99(1):76-82.
91. Sigal LH. Summary of the first 100 patients seen at a lyme disease referral center. Am J Med 1990 Jun;88(6):577-81.

92. Richardson RD, Engel CC, Jr. Evaluation and management of medically unexplained physical symptoms. *Neurologist* 2004 Jan;10(1):18-30.
93. Steere AC, Glickstein L. Elucidation of Lyme arthritis. *Nat Rev Immunol* 2004 Feb;4(2):143-52.
94. Weinstein A, Britchkov M. Lyme arthritis and post-Lyme disease syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2002 Jul;14(4):383-7.
95. Sigal LH. Lyme arthritis: Lessons learned and to be learned. *Arthritis Rheum* 1999 Sep;42(9):1809-12.
96. Treib J, Fernandez A, Haass A, Grauer MT, Holzer G, Woessner R. Clinical and serologic follow-up in patients with neuroborreliosis. *Neurology* 1998 Nov;51(5):1489-91.
97. Halperin JJ. Neuroborreliosis (nervous system Lyme disease). *Curr Treat Options Neurol* 1999 May;1(2):139-46.
98. Halperin JJ. Nervous system Lyme disease. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002 Winter;2(4):241-7.
99. Halperin JJ. Lyme disease and the peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 2003 Aug;28(2):133-43.
100. Berglund J, Stjernberg L, Ornstein K, Tykesson-Joelsson K, Walter H. 5-y follow-up study of patients with neuroborreliosis. *Scand J Infect Dis* 2002;34(6):421-5.
101. Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE. Lyme carditis: Cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1980 Jul;93(1):8-16.
102. McAlister HF, Klementowicz PT, Andrews C, Fisher JD, Feld M, Furman S. Lyme carditis: An important cause of reversible heart block. *Ann Intern Med* 1989 Mar 1;110(5):339-45.

103. Bateman H, Sigal L. Update on lyme carditis. *Curr Infect Dis Rep* 2000 Aug;2(4):299-301.
104. Pinto DS. Cardiac manifestations of lyme disease. *Med Clin North Am* 2002 Mar;86(2):285-96.
105. Weyand CM, Goronzy JJ. Immune responses to borrelia burgdorferi in patients with reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1989 Sep;32(9):1057-64.
106. Lawson JP, Steere AC. Lyme arthritis: Radiologic findings. *Radiology* 1985 Jan;154(1):37-43.
107. Coyle PK, Schutzer SE. Neurologic aspects of lyme disease. *Med Clin North Am* 2002 Mar;86(2):261-84.
108. Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Chronic neurologic manifestations of lyme disease. *N Engl J Med* 1990 Nov 22;323(21):1438-44.
109. Fallon BA, Nields JA, Burrascano JJ, Liegner K, DelBene D, Liebowitz MR. The neuropsychiatric manifestations of lyme borreliosis. *Psychiatr Q* 1992 Spring;63(1):95-117.
110. Donta ST. Late and chronic lyme disease. *Med Clin North Am* 2002 Mar;86(2):341,9, vii.
111. Kohler J, Kern U, Kasper J, Rhese-Kupper B, Thoden U. Chronic central nervous system involvement in lyme borreliosis. *Neurology* 1988 Jun;38(6):863-7.
112. Shotland LI, Mastroianni MA, Choo DL, Szymko-Bennett YM, Dally LG, Pikus AT, Sledjeski K, Marques A. Audiologic manifestations of patients with post-treatment lyme disease syndrome. *Ear Hear* 2003 Dec;24(6):508-17.
113. Moscatello AL, Worden DL, Nadelman RB, Wormser G, Lucente F. Otolaryngologic aspects of lyme disease. *Laryngoscope* 1991 Jun;101(6 Pt 1):592-5.

114. Meer-Scherrer L, Chang Loa C, Adelson ME, Mordechai E, Lobrinus JA, Fallon BA, Tilton RC. Lyme disease associated with alzheimer's disease. *Curr Microbiol* 2006 Apr;52(4):330-2.
115. Kutting B, Bonsmann G, Metze D, Luger TA, Cerroni L. *Borrelia burgdorferi*-associated primary cutaneous B cell lymphoma: Complete clearing of skin lesions after antibiotic pulse therapy or intralesional injection of interferon alfa-2a. *J Am Acad Dermatol* 1997 Feb;36(2 Pt 2):311-4.
116. Moreno C, Kutzner H, Palmedo G, Goertler E, Carrasco L, Requena L. Interstitial granulomatous dermatitis with histiocytic pseudorosettes: A new histopathologic pattern in cutaneous borreliosis. detection of *borrelia burgdorferi* DNA sequences by a highly sensitive PCR-ELISA. *J Am Acad Dermatol* 2003 Mar;48(3):376-84.
117. Wackernagel A, Bergmann AR, Aberer E. Acute exacerbation of systemic scleroderma in *borrelia burgdorferi* infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005 Jan;19(1):93-6.
118. Donta ST. Long-term outcomes of lyme disease. *JAMA* 2000 Jun 21;283(23):3068; author reply 3069.
119. Goldenberg DL. Fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and myofascial pain syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1995 Mar;7(2):127-35.
120. Dinerman H, Steere AC. Lyme disease associated with fibromyalgia. *Ann Intern Med* 1992 Aug 15;117(4):281-5.
121. Lightfoot RW, Jr, Luft BJ, Rahn DW, Steere AC, Sigal LH, Zoschke DC, Gardner P, Britton MC, Kaufman RL. Empiric parenteral antibiotic treatment of patients with fibromyalgia and fatigue and a positive serologic result for lyme disease. A cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 1993 Sep 15;119(6):503-9.
122. Sigal LH, Patella SJ. Lyme arthritis as the incorrect diagnosis in pediatric and adolescent fibromyalgia. *Pediatrics* 1992 Oct;90(4):523-8.
123. Haupl T, Hahn G, Rittig M, Krause A, Schoerner C, Schonherr U, Kalden JR, Burmester GR. Persistence of *borrelia burgdorferi* in ligamentous tissue

from a patient with chronic lyme borreliosis. *Arthritis Rheum* 1993 Nov;36(11):1621-6.

124. Karma A, Seppala I, Mikkila H, Kaakkola S, Viljanen M, Tarkkanen A. Diagnosis and clinical characteristics of ocular lyme borreliosis. *Am J Ophthalmol* 1995 Feb;119(2):127-35.
125. Burkhard C, Gleichmann M, Wilhelm H. Optic nerve lesion following neuroborreliosis: A case report. *Eur J Ophthalmol* 2001 Apr-Jun;11(2):203-6.
126. Mikkila HO, Seppala IJ, Viljanen MK, Peltomaa MP, Karma A. The expanding clinical spectrum of ocular lyme borreliosis. *Ophthalmology* 2000 Mar;107(3):581-7.
127. Magnarelli LA. Laboratory diagnosis of lyme disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1989 Nov;15(4):735-45.
128. Preac-Mursic V, Wilske B, Reinhardt S. Culture of borrelia burgdorferi on six solid media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991 Dec;10(12):1076-9.
129. Berger BW. Cutaneous manifestations of lyme borreliosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1989 Nov;15(4):627-34.
130. Strle F, Breitenfeld V. Lyme borreliosis--another new infectious disease. *Lijec Vjesn* 1986 Nov-Dec;108(11-12):501-3.
131. Asbrink E, Hovmark A. Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1985 Apr;93(2):161-3.
132. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007 Feb;49(1):13-21.

133. Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human borrelia burgdorferi infections. Clin Microbiol Rev 1997 Jan;10(1):185-201.
134. Ornstein K, Berglund J, Bergstrom S, Norrby R, Barbour AG. Three major lyme borrelia genospecies (borrelia burgdorferi sensu stricto, B. afzelii and B. garinii) identified by PCR in cerebrospinal fluid from patients with neuroborreliosis in sweden. Scand J Infect Dis 2002;34(5):341-6.
135. Oliver JH,Jr, Chandler FW,Jr, Luttrell MP, James AM, Stallknecht DE, McGuire BS, Hutcheson HJ, Cummins GA, Lane RS. Isolation and transmission of the lyme disease spirochete from the southeastern united states. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Aug 1;90(15):7371-5.
136. Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svenungsson B, Stiernstedt G. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1990 Mar;28(3):473-9.
137. Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC. Detection of borrelia burgdorferi DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with lyme arthritis. N Engl J Med 1994 Jan 27;330(4):229-34.
138. Wallach FR, Forni AL, Hariprashad J, Stoeckle MY, Steinberg CR, Fisher L, Malawista SE, Murray HW. Circulating borrelia burgdorferi in patients with acute lyme disease: Results of blood cultures and serum DNA analysis. J Infect Dis 1993 Dec;168(6):1541-3.
139. Eiffert H, Karsten A, Thomssen R, Christen HJ. Characterization of borrelia burgdorferi strains in lyme arthritis. Scand J Infect Dis 1998;30(3):265-8.
140. Jaulhac B, Chary-Valckenaere I, Sibilis J, Javier RM, Piemont Y, Kuntz JL, Monteil H, Pourel J. Detection of borrelia burgdorferi by DNA amplification in synovial tissue samples from patients with lyme arthritis. Arthritis Rheum 1996 May;39(5):736-45.
141. Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF, Riviere GR. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for lyme disease. J Clin Microbiol 1990 Jun;28(6):1276-9.

142. Christova I. Enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescent assay, and recombinant immunoblotting in the serodiagnosis of early lyme borreliosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003 Sep-Dec;16(3):261-8.
143. Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for lyme disease. *J Infect Dis* 1984 Mar;149(3):465-70.
144. Bunikis J, Barbour AG. Laboratory testing for suspected lyme disease. *Med Clin North Am* 2002 Mar;86(2):311-40.
145. Luger SW, Krauss E. Serologic tests for lyme disease. interlaboratory variability. *Arch Intern Med* 1990 Apr;150(4):761-3.
146. Simpson WJ, Schrumph ME, Schwan TG. Reactivity of human lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to borrelia burgdorferi. *J Clin Microbiol* 1990 Jun;28(6):1329-37.
147. Robinson JM, Pilot-Matias TJ, Pratt SD, Patel CB, Bevirt TS, Hunt JC. Analysis of the humoral response to the flagellin protein of borrelia burgdorferi: Cloning of regions capable of differentiating lyme disease from syphilis. *J Clin Microbiol* 1993 Mar;31(3):629-35.
148. Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD, Jr, Philipp MT, Steere AC, Wormser GP, Marques AR, Johnson BJ. Serodiagnosis of lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of borrelia burgdorferi compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J Infect Dis* 2003 Apr 15;187(8):1187-99.
149. Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJ, Miller JN, Philipp MT. Sensitive and specific serodiagnosis of lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of borrelia burgdorferi vlsE. *J Clin Microbiol* 1999 Dec;37(12):3990-6.
150. Mogilyansky E, Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Tilton RC. Comparison of western immunoblotting and the C6 lyme antibody test for laboratory detection of lyme disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004 Sep;11(5):924-9.

151. Fawcett PT, Rose CD, Budd SM, Gibney KM. Effect of immunization with recombinant OspA on serologic tests for lyme borreliosis. Clin Diagn Lab Immunol 2001 Jan;8(1):79-84.
152. Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to borrelia burgdorferi. Am J Epidemiol 1988 Apr;127(4):818-25.
153. Kaell AT, Redecha PR, Elkon KB, Golightly MG, Schulman PE, Dattwyler RJ, Kaell DL, Inman RD, Christian CL, Volkman DJ. Occurrence of antibodies to borrelia burgdorferi in patients with nonspirochetal subacute bacterial endocarditis. Ann Intern Med 1993 Dec 1;119(11):1079-83.
154. Kalish R. Lyme disease. Rheum Dis Clin North Am 1993 May;19(2):399-426.
155. Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V. Improvement of lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 2005 Aug;43(8):3602-9.
156. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation criteria for standardized western blots for three european species of borrelia burgdorferi sensu lato. J Clin Microbiol 1997 Jun;35(6):1433-44.
157. Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillenbrand B, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Pradel I, Rossler D, Schulte-Spechtel U. An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol 1999 Dec;188(3):139-44.
158. Kowal K, Weinstein A. Western blot band intensity analysis. application to the diagnosis of lyme arthritis. Arthritis Rheum 1994 Aug;37(8):1206-11.
159. Wilske B. Microbiological diagnosis in lyme borreliosis. Int J Med Microbiol 2002 Jun;291 Suppl 33:114-9.
160. Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, von Busch K, Kuhbeck R, Pfister HW, Einhaupl K. Intrathecal production of specific antibodies against

- borrelia burgdorferi in patients with lymphocytic meningoradiculitis (bannwarth's syndrome). J Infect Dis 1986 Feb;153(2):304-14.
161. Hansen K, Lebech AM. Lyme neuroborreliosis: A new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of borrelia burgdorferi--specific immunoglobulin G, A, and M. Ann Neurol 1991 Aug;30(2):197-205.
162. Kristoferitsch W. Neurologic manifestations in lyme borreliosis. Clin Dermatol 1993 Jul-Sep;11(3):393-400.
163. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for test performance and interpretation from the second national conference on serologic diagnosis of lyme disease. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995 Aug 11;44(31):590-1.
164. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis 2006 Nov 1;43(9):1089-134.
165. Halperin JJ, Golightly M. Lyme borreliosis in bell's palsy. long island neuroborreliosis collaborative study group. Neurology 1992 Jul;42(7):1268-70.
166. Mylonakis E. When to suspect and how to monitor babesiosis. Am Fam Physician 2001 May 15;63(10):1969-74.
167. Gayle A, Ringdahl E. Tick-borne diseases. Am Fam Physician 2001 Aug 1;64(3):461-6.
168. Spach DH, Koehler JE. Bartonella-associated infections. Infect Dis Clin North Am 1998 Mar;12(1):137-55.
169. Luft BJ, Dattwyler RJ, Johnson RC, Luger SW, Bosler EM, Rahn DW, Masters EJ, Grunwaldt E, Gadgil SD. Azithromycin compared with amoxicillin in the treatment of erythema migrans. A double-blind,

- randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1996 May 1;124(9):785-91.
170. Luger SW, Papparone P, Wormser GP, Nadelman RB, Grunwaldt E, Gomez G, Wisniewski M, Collins JJ. Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in treatment of patients with early lyme disease associated with erythema migrans. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Mar;39(3):661-7.
171. Massarotti EM. Lyme arthritis. *Med Clin North Am* 2002 Mar;86(2):297-309.
172. Kaplan RF, Jones-Woodward L, Workman K, Steere AC, Logigian EL, Meadows ME. Neuropsychological deficits in lyme disease patients with and without other evidence of central nervous system pathology. *Appl Neuropsychol* 1999;6(1):3-11.
173. Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Successful treatment of lyme encephalopathy with intravenous ceftriaxone. *J Infect Dis* 1999 Aug;180(2):377-83.
174. Pfister HW, Preac-Mursic V, Wilske B, Schielke E, Sorgel F, Einhaupl KM. Randomized comparison of ceftriaxone and cefotaxime in lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1991 Feb;163(2):311-8.
175. Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, Rush TJ, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ. Practice guidelines for the treatment of lyme disease. the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 2000 Jul;31 Suppl 1:1-14.
176. Liang FT, Caimano MJ, Radolf JD, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* outer surface protein (osp) B expression independent of ospA. *Microb Pathog* 2004 Jul;37(1):35-40.
177. Perides G, Charness ME, Tanner LM, Peter O, Satz N, Steere AC, Klempner MS. Matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1998 Feb;177(2):401-8.
178. Akin E, Aversa J, Steere AC. Expression of adhesion molecules in synovia of patients with treatment-resistant lyme arthritis. *Infect Immun* 2001 Mar;69(3):1774-80.

179. Hu LT, Eskildsen MA, Masgala C, Steere AC, Arner EC, Pratta MA, Grodzinsky AJ, Loening A, Perides G. Host metalloproteinases in lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 Jun;44(6):1401-10.
180. Lin B, Kidder JM, Noring R, Steere AC, Klempner MS, Hu LT. Differences in synovial fluid levels of matrix metalloproteinases suggest separate mechanisms of pathogenesis in lyme arthritis before and after antibiotic treatment. *J Infect Dis* 2001 Jul 15;184(2):174-80.
181. Steere AC, Gross D, Meyer AL, Huber BT. Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant lyme arthritis. *J Autoimmun* 2001 May;16(3):263-8.
182. Sigal LH. Musculoskeletal manifestations of lyme arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1998 May;24(2):323-51.
183. Cameron D, Gaito A, Harris N, Bach G, Bellovin S, Bock K, Bock S, Burrascano J, Dickey C, Horowitz R, Phillips S, Meer-Scherrer L, Raxlen B, Sherr V, Smith H, Smith P, Stricker R, ILADS Working Group. Evidence-based guidelines for the management of lyme disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004;2(1 Suppl):S1-13.
184. Wormser GP, Ramanathan R, Nowakowski J, McKenna D, Holmgren D, Visintainer P, Dornbush R, Singh B, Nadelman RB. Duration of antibiotic therapy for early lyme disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2003 May 6;138(9):697-704.
185. Maradiaga-Ceceña M:,A., Barguera-Heredia J, Kumate-Rodriguez J. Eritema cronico migrans asociado a artritis. enfermedad de lyme o una variante. *Revista Mexicana De Reumatologia* 1991;6:61.
186. Salinas-Melendez JA, Tamez-Gonzalez R, Welsh-Lozano O, Barrera-Saldaña HA. Detection of borrelia burgdorferi DNA in human skin biopsies and dog synovial fluid by the polymerase chain reaction. *Rev Latinoam Microbiol* 1995 Jan-Mar;37(1):7-10.
187. Gordillo G, Torres J, Solorzano F, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Munoz O. Serologic evidences suggesting the presence of borrelia burgdorferi infection in mexico. *Arch Med Res* 1999 Jan-Feb;30(1):64-8.

188. Gordillo-Perez G, Torres J, Solorzano-Santos F, Garduno-Bautista V, Tapia-Conyer R, Munoz O. Seroepidemiologic study of lyme's borreliosis in mexico city and the northeast of the mexican republic. *Salud Publica Mex* 2003 Sep-Oct;45(5):351-5.
189. Harvey WT, Salvato P. 'Lyme disease': Ancient engine of an unrecognized borreliosis pandemic? *Med Hypotheses* 2003 May;60(5):742-59.
190. Kohls GM, Clifford CM. Three new species of ixodes from mexico and description of the male of *I. auritulus auritulus neumann*, *I. conepati cooley* and *I. lasallei mendez* and *ortiz* (acarina: Ixodidae). *J Parasitol* 1966 Aug;52(4):810-20.
191. Vargas MH. Evidence of *borrelia burgdorferi sensu stricto* infection in ticks from northeast of mexico. 2007;6(1):830-5.
192. Salinas-Melendez JA, Galvan de la Garza,S., Riojas-Valdes VM, Wong Gonzalez A, Avalos-Ramirez R. Antibody detection against *borrelia burgdorferi* in horses located in the suburban areas of monterrey, nuevo leon. *Rev Latinoam Microbiol* 2001 Oct-Dec;43(4):161-4.
193. Salinas-Melendez JA, Avalos-Ramirez R, Riojas-Valdez VM, Martinez-Munoz A. Serological survey of canine borreliosis. *Rev Latinoam Microbiol* 1999 Jan-Mar;41(1):1-3.
194. Liveris D, Gazumyan A, Schwartz I. Molecular typing of *borrelia burgdorferi sensu lato* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1995 Mar;33(3):589-95.
195. Dawson B., Trapp R. *Bioestadística médica*. 3a. edición ed. ; 2002. .
196. Conociendo al venado de cola blanca "texano" [Internet]; c200804/2008].
197. Feder HM,Jr, Johnson BJ, O'Connell S, Shapiro ED, Steere AC, Wormser GP, Ad Hoc International Lyme Disease Group, Agger WA, Artsob H, Auwaerter P, Dumler JS, Bakken JS, Bockenstedt LK, Green J, Dattwyler RJ, Munoz J, Nadelman RB, Schwartz I, Draper T, McSweegan E, Halperin JJ, Klempner MS, Krause PJ, Mead P, Morshed M, Porwancher R, Radolf JD, Smith RP,Jr, Sood S, Weinstein A, Wong SJ, Zemel L. A critical

- appraisal of "chronic lyme disease". *N Engl J Med* 2007 Oct 4;357(14):1422-30.
198. Eisendle K, Grabner T, Zelger B. Morphoea: A manifestation of infection with borrelia species? *Br J Dermatol* 2007 Dec;157(6):1189-98.
199. Goodlad JR, Davidson MM, Gordon P, Billington R, Ho-Yen DO. Morphoea and borrelia burgdorferi: Results from the scottish highlands in the context of the world literature. *Mol Pathol* 2002 Dec;55(6):374-8.
200. Weide B, Walz T, Garbe C. Is morphoea caused by borrelia burgdorferi? A review. *Br J Dermatol* 2000 Apr;142(4):636-44.
201. Gottner G, Schulte-Spechtel U, Wilske B. Heterogeneity of the immunodominant surface protein VlsE among the three genospecies of borrelia burgdorferi pathogenic for humans. *Int J Med Microbiol* 2004 Apr;293 Suppl 37:172-3.
202. Philipp MT, Wormser GP, Marques AR, Bittker S, Martin DS, Nowakowski J, Dally LG. A decline in C6 antibody titer occurs in successfully treated patients with culture-confirmed early localized or early disseminated lyme borreliosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005 Sep;12(9):1069-74.
203. C6 peptide ELISA still not the answer [Internet]; c14 abril 2008. Available from: [Http://www.canlyme.com/mdlc6peptide2004.html](http://www.canlyme.com/mdlc6peptide2004.html).
204. Craft JE, Fischer DK, Shimamoto GT, Steere AC. Antigens of borrelia burgdorferi recognized 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 Oct;78(4):934-9.
205. 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 Sep 15;33(6):780-5.
206. Carlson D, Hernandez J, Bloom BJ, Coburn J, Aversa JM, Steere AC. Lack of borrelia burgdorferi DNA in synovial samples from patients with antibiotic

treatment-resistant lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 1999 Dec;42(12):2705-9.

207. Huppertz HI, Schmidt H, Karch H. Detection of borrelia burgdorferi by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and urine of children with neuroborreliosis. *Eur J Pediatr* 1993 May;152(5):414-7.
208. Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, Hofmann H. Diagnostic value of PCR for detection of borrelia burgdorferi in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *J Clin Microbiol* 1998 Sep;36(9):2658-65.