

R. 31. 645

C/191

Dpt. Microbiología
Universidad de Sevilla

22 oct '98
23 oct

15. oct '98

98

TD
E/191

Microbiología



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**“ SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A *Borrelia burgdorferi*
EN POBLACION SANA Y GANADO CAPRINO DE LANZAROTE “**

14

325

SEVILLA, 1998

1998

RAFAEL CARRANZA GONZALEZ



Universidad de Sevilla
Departamento de Microbiología
Prof. M. Victoria Borobio Enciso

**D. María Victoria Borobio, Profesor Titular de Microbiología de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,**

C E R T I F I C A :

Que la tesis para optar al Grado de Doctor en Medicina que lleva por título "*Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en población sana y ganado caprino de Lanzarote*", ha sido realizada por D. Rafael Carranza González, bajo mi supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Sevilla a Veintiuno de Septiembre de mil novecientos noventa y ocho.



Fdo. Prof. Dr. María Victoria Borobio

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis, con una mención muy especial:

A la profesora Dra. María Victoria Borobio, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente estudio; sin su dedicación y consejos este trabajo no hubiera obtenido la calidad científica requerida.

Al Dr. Francisco Pascual, del Hospital General de Lanzarote, por su enorme labor epidemiológica que permitió el diseño de este estudio.

Al Dr. Carlos Moreno, del Hospital General La Mancha Centro por su cooperación y sabios consejos.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen Macarena por su ayuda y colaboración en todo momento.

A mis compañeros en el Servicio de Laboratorio del Hospital La Mancha Centro por sus aportaciones y ánimos a lo largo de este tiempo.

A Magdalena por su ayuda en la elaboración de esta tesis y su continuo apoyo.

A mi familia por su confianza.

GRACIAS A TODOS.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

- ACA: acrodermatitis crónica atrófica.
- Ac M: anticuerpos monoclonales.
- ADN, DNA: ácido desoxirribonucleico.
- ARN, RNA: ácido ribonucleico.
- *B. burgdorferi*: *Borrelia burgdorferi*.
- C: sistema del Complemento.
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention.
- EIA, ELISA: enzimoimmunoanálisis.
- EM: Eritema Migrans.
- FTA-abs: Fluorescent Treponemal Antibody Absortion Test.
- HLA: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- IFI: Inmunofluorescencia indirecta.
- Ig: inmunoglobulina.
- IL: interleukina.
- kb: kilobases.
- kDa: kilodaltons.
- LCB: linfocitoma cutáneo benigno.
- LCR: líquido cefalorraquideo.
- LcR: Reacción en Cadena de la Ligasa.
- Osp: proteínas de superficie externa, "outer surface proteins".
- PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.
- Rpm: revoluciones por minuto.
- RPR: Rapid Plasmin Reagin.

- s.l: sensu lato.
- SNC: sistema nervioso central.
- SNP: sistema nervioso periférico.
- s.s.: sensu stricto.
- USA, EEUU: Estados Unidos de América.
- WB: Western- blot.

INDICE

INDICE

I) INTRODUCCION.....	1
I.1.) PREFACIO.....	2
I.2.) RECUERDO HISTORICO.....	3
I.3.) AGENTE ETIOLOGICO.....	4
I.3.1.) Características biológicas generales	
I.3.2.) Caracteres genéticos	
I.3.3.) Estructura antigénica	
I.3.4.) Identificación de cepas productoras de Borreliosis de Lyme	
I.3.5.) Serotipado de cepas de <i>Borrelia burgdorferi</i>	
I.4.) MECANISMOS Y RUTAS DE TRANSMISION.....	12
I.4.1.) Mecanismos de transmisión	
I.4.2.) Vectores	
I.4.3.) Animales hospedadores de garrapatas <i>Ixodes</i>	
I.4.4.) Principales huéspedes intermediarios reservorios de <i>Borrelia burgdorferi</i>	
I.4.5.) Otros vectores	
I.4.6.) Vectores y reservorios de la Borreliosis de Lyme en España	
I.5.) PATOGENESIS E INMUNIDAD.....	21
I.6.) EPIDEMIOLOGIA DESCRIPTIVA.....	26
I.6.1.) Prevalencia e incidencia	
I.6.2.) Comportamiento epidémico y concepto de endemia	
I.6.3.) Distribución geográfica	
I.6.4.) Distribución temporal	
I.6.5.) Edad	
I.6.6.) Sexo	
I.6.7.) Ocupación	

I.7.) MANIFESTACIONES CLINICAS.....	35
I.7.1.) Infección asintomática	
I.7.2.) Infección primaria o temprana	
I.7.3.) Infección secundaria o diseminada	
I.7.4.) Infección terciaria, tardía o persistente	
I.7.5.) Infección congénita	
I.7.6.) Diferencias clínicas entre Estados Unidos de América y Europa	
I.7.7.) Clínica de la enfermedad de Lyme en España	
I.8.) DIAGNOSTICO.....	49
I.8.1.) Clínico	
I.8.2.) Laboratorio	
I.8.2.1.) Cultivo	
I.8.2.2.) Tinciones	
I.8.2.3.) Serología	
I.8.2.3.a.) Inmunofluorescencia indirecta	
I.8.2.3.b.) Enzimoimmunoanálisis	
I.8.2.3.c.) Western-blot	
I.8.2.3.d.) Detección de antígenos	
I.8.2.3.e.) Interpretación de los tests serológicos	
I.8.2.3.f.) Problemas del diagnóstico serológico	
I.8.2.4.) Evaluación de la respuesta inmunocelular	
I.8.2.5.) Detección genética.	
I.8.3.) Conclusiones	
I.9.) TRATAMIENTO.....	68
I.9.1.) Enfermedad temprana localizada	
I.9.2.) Enfermedad temprana diseminada y enfermedad tardía	
I.9.3.) Papel de los corticoesteroides	
I.9.4.) Respuestas pendientes	
I.10.) CONTROL Y PREVENCIÓN.....	73
I.10.1.) Conceptos generales	
I.10.2.) Quimioprofilaxis	
I.10.3.) Inmunoprofilaxis	
I.11.) CUESTIONES PENDIENTES DE RESOLUCIÓN.....	78
I.11.1.) Epidemiología y diagnóstico	
I.11.2.) Control y prevención	

II) OBJETIVOS.....	81
II.1.) SITUACION ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DE LYME EN ESPAÑA.....	82
II.2.) OBJETIVOS DE LA TESIS.....	85
 III) MATERIAL Y METODOS.....	 87
III.1.) LOCALIZACION DEL ESTUDIO.....	88
III.1.1.) Medio físico	
III.1.2.) Clima y flora	
III.1.3.) Fauna salvaje	
III.1.4.) Garrapatas	
III.1.5.) Población humana	
III.1.6.) Ganadería	
III.1.6.1.) Censo caprino	
III.1.6.2.) Explotaciones ganaderas	
III.1.6.3.) Actividad ganadera por municipios	
III.1.6.4.) Sistemas de explotación	
III.1.6.5.) Ganado no caprino	
III.2.) ESTUDIO DE PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- <i>Borrelia burgdorferi</i> EN SUEROS HUMANOS Y CAPRINOS DE LANZAROTE.....	100
III.2.1.) Seroprevalencia de anticuerpos frente a <i>Borrelia burgdorferi</i> en población general	
III.2.1.1.) Tamaño muestral	
III.2.1.2.) Selección de la muestra	
III.2.1.3.) Análisis serológico	
III.2.2.) Estudio serológico de la población de riesgo	
III.2.3.) Estudio serológico de reservorios: ganado caprino	
III.2.3.1.) Selección de la muestra	
III.2.3.2.) Análisis serológico	
III.3.) ESTUDIO DE VECTORES: GARRAPATAS.....	114
III.4.) ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	116

IV) RESULTADOS.....	117
IV.1.) SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- <i>Borrelia burgdorferi</i> EN MUESTRAS HUMANAS.....	118
IV.1.1.) Resultados por edad	
IV.1.2.) Resultados por sexo	
IV.1.3.) Resultados por medio de residencia	
IV.1.4.) Resultados en población de riesgo	
IV.1.5.) Resultados del Western-blot	
IV.2.) ESTADISTICA DE RESULTADOS EN SUEROS HUMANOS.....	125
IV.2.1.) Estadística por edad	
IV.2.2.) Estadística por sexo	
IV.2.3.) Estadística por medio de residencia	
IV.2.4.) Estadística en el grupo de riesgo	
IV.2.5.) Estadística del Western-blot	
IV.3.) RESUMEN DE RESULTADOS EN MUESTRAS SERICAS HUMANAS.....	131
IV.4.) SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- <i>Borrelia burgdorferi</i> EN MUESTRAS CAPRINAS.....	132
IV.4.1.) Resultados en el municipio de Haría	
IV.4.2.) Resultados en Teguiise	
IV.4.3.) Resultados en Tinajo	
IV.4.4.) Resultados en Arrecife	
IV.4.5.) Resultados en San Bartolomé	
IV.4.6.) Resultados en Tías	
IV.4.7.) Resultados en Yaiza	
IV.5.) ESTADISTICA DE RESULTADOS EN SUEROS CAPRINOS.....	138
IV.6.) RESUMEN DE RESULTADOS EN MUESTRAS SERICAS CAPRINAS.....	140
IV.7.) RESULTADOS DEL ESTUDIO DE GARRPATAS.....	141

V) DISCUSION.....	142
V.1.) RESULTADOS GLOBALES.....	143
V.2.) RESULTADOS EN SUEROS HUMANOS.....	145
V.3.) RESULTADOS EN SUEROS CAPRINOS.....	153
VI) CONCLUSIONES.....	157
VII) ANEXO.....	160
VIII) BIBLIOGRAFIA.....	162

INTRODUCCION

SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A *Borrelia burgdorferi* EN POBLACION SANA Y GANADO CAPRINO DE LANZAROTE

I) INTRODUCCION.

I.1.) PREFACIO.-

La enfermedad de Lyme es una epizoonosis distribuída ampliamente por el mundo. Es una de las infecciones más frecuente transmitida por vectores, entre los que destacan las garrapatas pertenecientes al Complejo *Ixodes ricinus*. Su agente etiológico es la espiroqueta denominada *Borrelia burgdorferi* sensu lato con tres especies conocidas patogénicas para el hombre: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* y *Borrelia afzelii*. Los hospedadores de estas garrapatas son, fundamentalmente, pequeños roedores y otros mamíferos silvestres y domésticos. El ser humano también puede ser parasitado produciéndose una infección que cursa en estadios, con manifestaciones clínicas multisistémicas, afectando principalmente a la piel , las articulaciones y el sistema nervioso. La borreliosis de Lyme constituye actualmente un importante problema sanitario, debido a su elevada incidencia y a dificultades diagnósticas aún no resueltas.

I.2.) RECUERDO HISTORICO.

Pese a ser una enfermedad conocida en Europa con nombres distintos desde principios de siglo, el reconocimiento de la borreliosis de Lyme como entidad morbosa diferenciada se debe a Steere et al., quienes en 1975 estudiaron un brote de artritis en un grupo de niños de la ciudad de Old Lyme en Connecticut, Estados Unidos ¹⁹⁸. En buena parte de los pacientes descubrieron antecedentes de afectación cutánea en forma de Eritema Crónico Migrans, lesión sugestiva de picadura de insecto ya descrita por un dermatólogo sueco llamado Afzelius en 1909 ³.

Investigaciones posteriores demostraron la transmisión por vectores de esta enfermedad y la variabilidad de su aspecto clínico con curso en estadios y manifestaciones multisistémicas. Los vectores implicados fueron inicialmente garrapatas del género *Ixodes* (*I.scapularis* e *I.pacificus* en USA ¹⁹⁴, *I.ricinus* en Europa ¹¹²), siendo después descritos algunos de menor importancia como *Amblyomma americanum* ¹⁸¹ y *Dermacentor variabilis* ¹⁶⁶.

Tanto en *Ixodes scapularis* como en muestras de enfermos fué aislada una espiroqueta, identificada en 1982 por Burgdorfer y Barbour ⁴⁰ y denominada *Borrelia burgdorferi* ¹⁰⁵.

Desde entonces la declaración de casos ha ido aumentando cada año, apareciendo nuevos vectores, huéspedes y aislados de *B.burgdorferi* con ciertas variaciones genéticas. De cualquier modo aún persisten problemas por resolver, referidos sobre todo a la epidemiología, diagnóstico y control de esta enfermedad.

I.3.) AGENTE ETIOLOGICO.

I.3.1.) Características biológicas generales.

La borreliosis de Lyme es producida por una espiroqueta cuya estructura esencial la componen un protoplasma rodeado por una membrana celular, flagelos y una membrana externa ¹⁹².

El género *Borrelia* se diferencia de *Treponema* por tener una morfología más larga y enrollada, un mayor número de flagelos y dividirse por septum (los treponemas lo hacen por constricción). Las borrelias son microorganismos de crecimiento lento, microaerófilos y fastidiosos. Crecen mejor a 33 ° centígrados, en el medio líquido denominado de Barbour-Stoenner-Kelly ²¹. El cultivo es relativamente sencillo en el caso de muestras procedentes de garrapatas, aumentando la dificultad de aislamiento para las muestras obtenidas de pacientes ¹⁹⁶. Los subcultivos sucesivos suponen la pérdida de patogenicidad de estas bacterias.

Las borrelias productoras de enfermedad de Lyme son las más largas (20-30 micras), estrechas (0.2-0.3 micras) y con menos flagelos (de 7 a 11) de su género ¹⁰¹.

I.3.2.) Caracteres genéticos.

La clasificación de *Borrelia* spp. se realiza actualmente por métodos genéticos. Su ADN contiene de 27.3 a 30.5 moles % de Guanina + Citosina, siendo este valor en *Treponema pallidum* de 52 a 53.7 y en leptospiras patógenas de 35.3 a 39.9 ²¹¹.

La homología del ADN entre *Borrelia*, *Leptospira* y *Treponema* es del 0 al 2%, siendo del 31 al 59% para las distintas especies del género *Borrelia* y elevándose al 76-100 % para las especies productoras de Fiebre recurrente en Norteamérica. La técnica de metilación del ADN también consigue diferenciar los distintos miembros de *Borrelia* spp., determinando la heterogeneidad existente en aislados procedentes de diferentes zonas geográficas e incluso de los pertenecientes a una misma región ^{31,211}.

Borrelia burgdorferi sensu lato, el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, es divergente genéticamente y, basándonos en técnicas de reasociación DNA- DNA y modelos de restricción enzimática MseI del RNAr 5S- 23S, podemos diferenciar al menos 10 especies o grupos genómicos distintos:

- El primero, al que pertenecen las cepas americanas similares a la primera cepa de referencia, *Borrelia burgdorferi* B 31, denominado ahora *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ²⁰.
- Un segundo grupo formado exclusivamente por aislados no norteamericanos, llamado inicialmente 20047 y actualmente *Borrelia garinii* ²⁰.
- El tercer grupo denominado al principio VS461, hoy corresponde a *Borrelia afzelii*.^{20,48}
- Un cuarto grupo de especies llamado DN 127 ¹⁶³.
- Otros genogrupos compuestos por cepas no reconocidas hasta el momento como patógenos para el ser humano, del que forman parte *Borrelia japonica* ¹⁰⁷, *B. valaisiana* ²⁰⁹, *B. lusitaniae* ¹¹⁹, *B. andersonii* ¹³³, *B. tanukii* ⁷⁹ y *B. turdi* ⁷⁹.

En Estados Unidos de América solamente se han aislado *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. andersonii* y el grupo DN 127 ^{20,133}, mientras que *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae* y *B. valaisiana* han sido halladas en Europa ^{20,48,119,209}.

Los aislados de *Borrelia japonica*, *B. tanukii* y *B. turdi* se limitan, hasta la fecha, a Japón 79,107 .

Las cepas de *Borrelia* productoras de enfermedad de Lyme contienen dos tipos de ADN extracromosómico:

- plásmidos circulares enrollados, habituales en todas las bacterias.
- plásmidos lineales, que son un componente estructural único en las eubacterias. Uno de ellos, de 49 kilobases, codifica la información genética de las proteínas mayores de superficie externa Osp A y Osp B de *Borrelia burgdorferi*, constituyendo éstos genes una unidad transcripcional única ²¹¹.

La proteína Osp C se halla codificada por un plásmido circular de 26 kilobases, mientras que la Osp D está localizada en un plásmido lineal de 38 kilobases y Osp E y F en uno de 45 kb ¹⁹³.

Otra función relacionada con plásmidos posiblemente sea la patogenicidad, pues se ha demostrado que la pérdida de plásmidos durante subcultivos bacterianos, supone una pérdida de la infectividad de esas cepas ¹⁹³.

Los perfiles plasmídicos reflejan variaciones importantes entre los distintos aislados ²³. Así, en el caso de las cepas norteamericanas de *B. burgdorferi*, se encuentran plásmidos de mayor tamaño (cerca de 149 Kb) que en las cepas europeas.

De cualquier forma, y debido tanto a ésta gran diversidad de patrones plasmídicos durante el cultivo, los estudios del ADN extracromosómico resultan más útiles en epidemiología que para tipar subespecies ²¹¹.

I.3.3.) Estructura antigénica.

En la taxonomía de la Borreliosis de Lyme se plantean tres cuestiones esenciales:

- 1) Identificar las especies de *Borrelia* productoras de enfermedad de Lyme, diferenciándolas de treponemas y otras borrelias causantes de Fiebre recurrente ²⁴.
- 2) Caracterizar las cepas al nivel de subespecies.
- 3) Diferenciar cada especie productora de Borreliosis de Lyme.

Los dos primeros puntos pueden resolverse mediante análisis inmunológicos, mientras que el tercero requiere del uso de métodos genéticos.

Para valorar la diversidad antigénica de los distintos aislados de cepas productoras de enfermedad de Lyme se utilizan anticuerpos monoclonales (AcM).

El análisis, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, de lisados de células completas de *Borrelia burgdorferi* muestra un perfil característico con más de 30 proteínas:

- Proteínas mayores de peso molecular constante de 41 kilodaltons (proteína flagelar p41) ⁵⁹ y proteínas de “shock caliente” (heat shock proteins) de 66 (p66), 60 y 73 kDa ¹²⁴.
- Lipoproteínas mayores de peso molecular variable asociadas a la membrana externa (outer surface protein): Osp A (31-32 kDa), Osp B (33-36 kDa). Ambas proteínas están cotranscritas por un operón situado en plásmidos lineales de unas 50 kilobases ²¹¹.
- Proteína C asociada a la membrana externa de 21 a 24 kDa: Osp C ²¹¹.
- Otras proteínas asociadas a membrana externa: Osp D (28-30 kDa.), Osp E (19 kDa.) y Osp F (26 kDa.) ¹⁹³.
- Proteína protoplásmica de 83-100 kDa también denominada como p93 ¹²⁴.
- Polipéptido de 39 kDa: Bmp A ¹⁸⁷.

- Lipopolisacárido con propiedades de endotoxina de Gram negativo, también inespecífica.
- Otras proteínas cuyo valor antigénico está siendo empleado en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme: 18, 28, 45 y 58 kDa. Su identidad está poco clara todavía ¹⁹³.

Únicamente se conoce la función de algunas de estas proteínas. Todas las cepas de *Borrelia burgdorferi* presentan como mínimo las proteínas Osp A u Osp C. Mientras las cepas norteamericanas tienen un patrón antigénico típico compuesto por Osp A de 31 kDa, Osp B de 34 kDa y carente de Osp C ²¹¹, las cepas europeas son más variables y a menudo expresan la proteína Osp C. En seres humanos rara vez se detectan anticuerpos frente a los antígenos Osp A y Osp B de *B. burgdorferi*. En cambio el componente Osp C es una proteína mayor inmunodominante en la respuesta inmunológica precoz humana ²¹¹.

Otros antígenos inmunodominantes son la proteína flagelar p 41 que participa en la respuesta inmune, precoz y tardía, y las proteínas p 66 y p 83-100. La p 60 produce reacciones cruzadas con antígenos equivalentes de un amplio rango de bacterias, en cambio la p 83-100 es altamente específica ²¹².

Al subcultivar un aislado de *B. burgdorferi* pueden producirse cambios cuantitativos en las proteínas asociadas a membrana Osp A, Osp B y Osp C ²¹³. De cualquier modo, la electroforesis en gel de poliacrilamida o el western blot resultan ser las mejores técnicas para la serotipia de estas bacterias.

I.3.4.) Identificación de cepas productoras de Borreliosis de Lyme.

Como ya hemos dicho se realiza empleando anticuerpos monoclonales (AcM). Así tenemos anticuerpos específicos frente al componente p 83-100 (AcM L 100 1D4), el antígeno Osp

A (AcM L 32 1F 11) y la proteína Osp C (AcM L22 1 F8) que consiguen identificar a *B. burgdorferi* sólo (L100 1D4) o en combinación (L32 1F11+L22 1F8). Además mediante éstos AcM podemos diferenciar las cepas productoras de enfermedad de Lyme de otras borrelias causantes de Fiebre recurrente y de *Treponema* spp²¹¹.

Más recientemente la identificación de las cepas se realiza por caracterización molecular separando distintas genoespecies y variantes . Así, en España han podido aislarse cepas procedentes tanto de garrapatas vectores (*I. ricinus*)⁸⁰ como de pacientes con Eritema migrans, pertenecientes a todas las genoespecies patógenas de *Borrelia burgdorferi sensu lato*⁶⁸.

I.3.5.) Serotipado de cepas de *Borrelia burgdorferi*.

La serotipia de los microorganismos causantes de la enfermedad de Lyme se fundamenta en la heterogeneidad antigénica de las proteínas asociadas a membrana anteriormente citadas. El uso de la proteína Osp B para éste propósito está desaconsejado, pues numerosos aislados de *Borrelia burgdorferi* pierden este componente y además puede variar antigenicamente en subclones derivados de una misma cepa²¹¹.

I.3.5.a.) Sistema de serotipado basado en la diversidad antigénica de Osp A.

Se considera el más apropiado actualmente. Empleando 8 AcM frente a Osp A se han podido diferenciar al menos siete serotipos de *B. burgdorferi*. La distribución de éstos serotipos difiere según el origen geográfico y la fuente biológica de los aislamientos. Surge la pregunta de si todas las cepas aisladas de garrapatas o reservorios animales son patógenas para el hombre o si existen diferentes grados de patogenicidad. Los estudios realizados

sugieren diferencias en la patogenicidad y el organotropismo de los distintos serotipos. Aún no está claro si ciertos serotipos son no patógenos para el ser humano y por tanto cual sería el factor o los factores de virulencia.

Se ha implicado la presencia de Osp B como el antígeno que pudiera desempeñar un papel en la patogenicidad de *B. burgdorferi*, ya que las cepas que perdieron esta proteína rara vez aparecen en los aislados de pacientes con enfermedad de Lyme ²¹¹.

I.3.5.b.)Diversidad antigénica de Osp C.

La proteína Osp C es expresada por casi el 50% de los aislados europeos de *B. burgdorferi* mediante la realización de western blot usando dos AcM anti-Osp C (L22 1F8 y L22 1F10). Se ha revelado que la diversidad antigénica de esta proteína de *B. burgdorferi* es mayor de lo esperado ²¹³.

I.3.5.c.)Diversidad antigénica de p 41.

Tanto las cepas de *Borrelia* productoras de enfermedad de Lyme como las causantes de Fiebre recurrente, comparten un antígeno flagelar común (p 41) reconocido por el Ac M H 9724. Este Ac M es específico de género. Otros Ac M como L411 C11 reconocen epitopos comunes del flagelo de *B. burgdorferi* y de tres especies de *Borrelia* productoras de Fiebre Recurrente, pero no del flagelo de *B. hermsii*. Así mismo el Ac M L411 D3 reacciona frente al flagelo de *B. burgdorferi* serotipo Osp A2, mientras que otros serotipos no reaccionan o lo hacen débilmente, lo que indica la existencia de relación entre los serotipos Osp A y los serotipos p 41 ²³.

I.3.5.d.)Conclusiones.

El uso de anticuerpos monoclonales es útil para identificar y diferenciar *Borrelia spp.* a diferentes niveles taxonómicos:

1) Género *Borrelia*.- mediante el Ac M H9724 se reconocen los epitopos flagelares comunes específicos de género.

2) Especies de *Borrelia* productoras de enfermedad de Lyme.- existen al menos dos Ac M que reconocen epitopos comunes específicos de especie:

- Ac M L100 1D4, reacciona con el antígeno p100.

- Ac M L32 1F11, reacciona con el antígeno de superficie externa Osp A.

3) Caracterización de *B. burgdorferi* al nivel de subespecies.- basándonos en la diversidad antigénica Osp A se diferencian como mínimo siete tipos. Además caracterizando otras proteínas como Osp B y Osp C podemos ampliar el subtipado.

Existe pues una gran variabilidad antigénica intra e inter especies, lo cual puede resultar en variaciones regionales en la presentación clínica y en la respuesta inmune producidas en la enfermedad de Lyme. Así *B. burgdorferi sensu stricto*, especialmente prevalente en USA, se asocia con manifestaciones reumatológicas mientras que las cepas de *B. burgdorferi* s.l. euroasiáticas (*B. garinii* y *B. afzelii*) originan predominantemente alteraciones dermatológicas y neurológicas ¹⁹.

I.4.) MECANISMOS Y RUTAS DE TRANSMISION.

La borreliosis de Lyme se transmite al ser humano por la picadura o mordedura de garrapatas, especialmente del género *Ixodes*. Steere y colaboradores fueron los primeros en implicar como vectores de la enfermedad de Lyme a las garrapatas, tras estudios epidemiológicos previos a la identificación del organismo causal ¹⁹⁴. Las garrapatas ya habían sido asociadas con el Eritema Migrans en Europa, con lo que el aislamiento de espiroquetas similares en garrapatas y pacientes confirmó la etiología y la forma de transmisión de la enfermedad ^{38-41,105}.

I.4.1.) Mecanismos de transmisión.

La transmisión de las borrelias productoras de enfermedad de Lyme se produce fundamentalmente durante la alimentación de la garrapata vector sobre el animal hospedador ^{6,7}. La garrapata parasita a su huésped insertando su boca en los tegumentos del animal. A través de este acoplamiento de su tubo digestivo, la garrapata ingiere los fluidos tisulares del huésped y elimina sus propias secreciones salivares.

Durante este proceso de salivación y posiblemente también por regurgitación, son transmitidas las borrelias de vector a huésped. Esto sucede normalmente cuando la garrapata lleva al menos 48 horas fijada al animal, puesto que es necesario un periodo mínimo para que los vectores infectados se alimenten de su huésped antes de transmitirle las espiroquetas ⁷. Otro mecanismo de transmisión conocido, aunque posiblemente de menos importancia sea la transmisión vertical o el paso transovárico de *B. burgdorferi*, de

forma que las larvas de *Ixodes* no necesitarán alimentarse en huéspedes infectados para ser portadoras de borrelias ¹⁶⁴. Así se sabe que la infección puede llegar a ser hasta del 100 % en huevos de *Ixodes ricinus* e *Ixodes pacificus*, mientras en el caso de la progenie de *I.scapularis* la tasa de infección es mucho más baja. Además se ha observado algún caso de infección en vertebrados debido a transmisión transovárica por *I.ricinus* ⁶.

I.4.2.) Vectores.

Como hemos citado, el vector principal de la enfermedad de Lyme son las garrapatas pertenecientes al grupo de *Ixodes persulcatus* ²⁵. La distribución geográfica del género *Ixodes* es variable, habiéndose determinado dos focos principales, uno en Norteamérica y otro en Eurasia.

En la zona norteamericana se han hallado al menos dos garrapatas del género *Ixodes* transmisoras de la borreliosis de Lyme:

- *Ixodes scapularis*, extendida por el nordeste de los Estados Unidos desde la costa atlántica al Mississippi y por el sudeste desde el Atlántico a Oklahoma y Texas ⁷.

- *Ixodes pacificus*, cuyo hábitat abarca la costa del Pacífico ¹¹⁸.

Inicialmente se separó una especie denominada *Ixodes dammini* y localizada en el este de U.S.A., que recientemente ha sido reubicada en la especie *I.scapularis* por sus características genéticas ¹⁵⁰.

En el continente Euroasiático destacaremos:

- *Ixodes ricinus*, extendida desde las Islas Británicas hasta los 55° de longitud Este y desde el Norte de Africa al Norte de Europa hasta los 65° de latitud Norte ⁶.

- *Ixodes persulcatus*, convive con *I. ricinus* en Europa del Este, extendiéndose a lo largo de Asia hasta Japón ⁶.

Algunas otras especies, fuera del grupo de *Ixodes persulcatus*, han sido implicadas también como vectores competentes de la enfermedad de Lyme: *Amblyoma americanum*, *Argas reflexus*, *Ixodes hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes dentatus*, *Ixodes neotomae*, *Dermacentor parumapertus*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes trianguliceps*, *Ixodes canisuga*, *Hamaphysalis punctata*,... ^{6-8, 166, 181} Por último, se ha descrito la transmisión de *B. burgdorferi* por insectos hematófagos, aunque aún no esté demasiado claro su papel ¹⁰. Después nos referiremos más detalladamente a estos vectores relacionándolos con sus animales hospedadores.

I.4.2.a.) Ciclo vital de Ixodes.

Todas las especies del grupo *Ixodes persulcatus* tienen un ciclo biológico similar, aunque existen variaciones dependientes de la localización geográfica. Nos referiremos de manera general al ciclo vital de *I. scapularis* que fue el primero estudiado en detalle.

Las hembras adultas de *I. scapularis* depositan sus huevos en el suelo en primavera. De ellos saldrán las larvas hacia la mitad del verano, parasitando huéspedes (roedores sobre todo), de los que al alimentarse adquieren las borrelias. Después de 3 a 5 días las larvas se desprenden, cayendo al suelo y transformándose en ninfas. Tras pasar en este estadio evolutivo las estaciones de otoño e invierno del primer año, las ninfas emergen nuevamente en primavera e inicio del verano, parasitando nuevos huéspedes (numerosos animales salvajes y domésticos, incluyendo al ser humano) y transmitiendo la infección durante el proceso alimentario. Después vuelven a caer al suelo convirtiéndose, ya en otoño, en formas

adultas de garrapata. Las hembras adultas parasitan nuevos huéspedes (ciervos, grandes mamíferos domésticos, humanos) en los días finales del otoño o inicio del invierno. El ciclo, que se completa con la puesta de huevos en la primavera siguiente, dura unos dos 38 años ^{6,38}. En el caso de *Ixodes ricinus* e *I. persulcatus* la duración del ciclo vital puede llegar a los tres años e incluso en latitudes más septentrionales hasta los seis años ⁷. El estadio de ninfa parece ser el más efectivo para transmitir la borreliosis de Lyme al huésped, debido a su pequeño tamaño y a la corta duración del período alimentario.

Como ya se dijo, existen variaciones en el ciclo biológico de las garrapatas según el punto geográfico, variando además la tasa de infestación por *Borrelia burgdorferi* de éstos vectores lo cual resulta un buen predictor de la incidencia de enfermedad de Lyme. Así tendremos:

-en el sur de U.S.A. las formas inmaduras de *I. scapularis* parasitan esencialmente lagartos que, al ser reservorios no competentes para la infección, presentan tasas de infestación por *B. burgdorferi* menores del 1% ¹¹⁶.

-en el oeste de U.S.A. *I. pacificus* revela tasas de infección por la espiroqueta del 1 al 5% ¹¹⁷.

-en el este de U.S.A. *I. scapularis* parasita reservorios competentes (ratones) capaces de transmitir *B. burgdorferi* a las larvas de las garrapatas, presentando tasas de infección en formas inmaduras del 25% y en formas adultas de hasta el 50% ^{128,164,190}.

-en Europa y Rusia tanto *I. ricinus* como *I. persulcatus* tienen una ecología similar a la de *I. scapularis* del nordeste de Norteamérica (las formas inmaduras se alimentan principalmente de mamíferos y aves), con lo que las tasas de infestación por *B. burgdorferi* son en torno al 25-50% ¹³⁶.

La complejidad de la ecología de la enfermedad de Lyme en Europa y Asia es mayor que la de Norteamérica debido a la diversidad de climas y ecosistemas ²⁵. Así se han descrito vectores transmisores de la borreliosis de Lyme como la garrapata del erizo (*I.hexagonus*) en Suiza, una garrapata de aves (*I.uriae*) en Suecia, *I.ovatus* en Japón y *Haemaphysalis longicornis* en China ¹⁸⁶. También en Australia se ha descrito una enfermedad similar al Lyme, producida por garrapatas, aunque no se ha aislado todavía el microorganismo causal ²⁰⁰.

I.4.3.) Animales hospedadores de garrapatas *Ixodes*.

Cada garrapata vector citada parasita numerosas especies animales. Así, *Ixodes ricinus* puede hallarse en más de 300 clases de animales, incluyendo mamíferos, pájaros y también reptiles ⁷.

Los estadios larvario y de ninfa de *Ixodes* se alimentan de huéspedes de tamaño pequeño, mediano y grande (roedores, pájaros, reptiles). Las formas adultas parasitan fundamentalmente animales de media y gran talla como son ciertos mamíferos (cánidos, ciervos, ganado, humanos) ⁷.

El ratón de patas blancas, *Peromyscus leucopus*, es un importante huésped para larvas y ninfas de la forma nordeste de *I.scapularis*. En cambio sus formas adultas prefieren alimentarse en el ciervo de cola blanca, *Odocoileus virginianus*, cánidos (incluyendo al perro) y humanos ^{7,33,84,117,118}.

Un lagarto, *Sceloporus occidentalis*, es huésped habitual de los estadios subadultos de *I.pacificus* y también de *I.scapularis* variedad sudeste de U.S.A. e *I.ricinus*, aunque al

parecer es incompetente para transmitir la borreliosis de Lyme ¹¹⁶. Así mismo, se han hallado ninfas de *I. ricinus* en lagartijas españolas por Oteo et al ¹⁵⁴.

El ratón de la madera o ratoncillo de campo, *Apodemus sylvaticus*, es parasitado comunmente por *I. ricinus* en fase larvaria ¹³⁶, mientras que sus ninfas se encuentran en liebres, ardillas, pájaros y lagartos ¹³⁷.

El ratón de bandas negras, *Apodemus agrarius*, es posiblemente el reservorio principal en Centroeuropa de *I. ricinus* ². También se ha descrito al campañol (*Clethrionomys glareolus*) como hospedador competente de *I. ricinus*.

Las aves constituyen al parecer un medio natural de distribuir las garrapatas a largas distancias durante sus migraciones en otoño y primavera, aunque posiblemente no resulten competentes para la transmisión directa de la enfermedad de Lyme ⁹.

I.4.4.) Principales huéspedes intermediarios reservorios de la borreliosis de Lyme.

Hemos de destacar una serie de animales cuyo papel como reservorio de *Ixodes*, les confiere una especial importancia en la transmisión de la enfermedad de Lyme:

- El ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*), es un importante huésped de *Borrelia burgdorferi* en el ámbito geográfico de *I. scapularis* ¹¹. Hasta un 80-90 % de estos roedores se hallan infectados en zonas endémicas de enfermedad de Lyme durante los meses centrales del verano. Aunque la espiroquetemia es muy importante en estos animales, las consecuencias clínicas son mínimas. Las tasas de infección son mayores durante el verano y el inicio del otoño, coincidiendo con la máxima infestación de este ratón por garrapatas ⁷.

- La ardilla gris del este de Norteamérica se ha visto implicada, junto a mapaches y musarañas, como reservorio de borrelias en el este de los Estados Unidos ⁸.
- Los ratones del género *Apodemus* constituyen un importante reservorio europeo para las larvas de *I. ricinus* ². Otros roedores, como las ratas noruegas, también han sido citadas como hospedadores competentes de la infección ¹⁸⁹.
- Los cérvidos posiblemente sean sólo huéspedes incompetentes de las borrelias productoras de enfermedad de Lyme, aunque son necesarios nuevos estudios para confirmarlo ⁷.
- Las aves están infectadas por *B. burgdorferi*, habiendo sido detectadas en petirrojos, gorjeadores de las praderas, zorzales y mirlos ¹⁰. Pese a no estar clara su habilidad para transmitir borrelias, sí resultan ser vectores capaces de transportar garrapatas a zonas más o menos alejadas, ampliando la distribución de la enfermedad de Lyme ⁷.
- El ganado también es parasitado por garrapatas, fundamentalmente el vacuno ^{42,74}, aunque también se han encontrado en ovejas y cabras ^{74,77,139,207}.
- Los cánidos y caballos se han visto implicados también como posibles reservorios de la borreliosis de Lyme ^{43,49,72,120,138}.
- El ser humano no parece ser un reservorio efectivo para transmitir estas espiroquetas a nuevas garrapatas.

I.4.5.) Otros vectores menos importantes.

Una serie de garrapatas de diversos géneros y algunos insectos hematófagos han sido implicados también como posibles vectores de la borreliosis de Lyme. Entre ellos tenemos:

- *Amblyomma americanum*, garrapata abundante en New Jersey. Aún no se ha demostrado

claramente su papel como transmisor de la enfermedad de Lyme (en un estudio sus larvas no fueron capaces de adquirir *B. burgdorferi* al alimentarse en hamsters infectados ¹⁶⁶).

- *Argas reflexus*, implicadas en Italia como garrapatas transmisoras de la enfermedad de Lyme en habitantes de edificios viejos ³⁹.

- *Ixodes hexagonus*, parasita normalmente erizos, mustélidos y ocasionalmente humanos. Aunque se han detectado borrelias en este vector, aún han de ser caracterizadas ³⁹.

- También se han relacionado como posibles vectores las garrapatas del perro (*Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis*) y las del conejo (*Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes dentatus*, *I. neotomae*, *D. parumapertus*) aunque raramente parasitan humanos ^{39,166}.

- Los insectos hematófagos (moscas del ciervo y del caballo, tábanos, mosquitos) pueden ocasionalmente transmitir la enfermedad de Lyme. Así se han publicado casos de Eritema Crónico Migrans tras picadura de estos insectos, pero experimentalmente no se ha conseguido transmitir la infección de mosquitos a animales de laboratorio. Por todo ello el papel de estos insectos permanece aún poco claro ³⁹.

I.4.6.) Vectores y reservorios de *Borrelia burgdorferi* en España.

Es bien conocido , como ya se dijo, que el vector fundamental de *Borrelia burgdorferi* en Europa es *Ixodes ricinus*. En nuestro país *I. ricinus* se encuentra ampliamente distribuída, especialmente en la mitad norte peninsular, aunque sus áreas de localización concreta no están bien determinadas ^{156,178}.

Los datos sobre vectores en España son escasos. Sáez et al. han comunicado la presencia de espiroquetas en garrapatas *Ixodes* de una vaca perteneciente a un paciente con borreliosis de Lyme, pero no pudieron identificarlas ¹⁷⁸. García Moncó et al. en 1992 aislaron una cepa de *Borrelia burgdorferi*, denominada ESP-1, a partir de *Ixodes ricinus*, con diferencias antigénicas significativas respecto a las cepas americanas ⁸⁰. Oteo y colaboradores hallaron espiroquetas fluorescentes con el antisuero de un paciente con enfermedad de Lyme en el 11% de garrapatas *I. ricinus* ¹⁵³. Estos últimos autores han encontrado también borrelias en *Ixodes frontalis*, *I. hexagonus*, *I. trianguliceps*, *I. canisuga* y *Haemaphysalis punctata* ¹⁵⁴. Así mismo Barral et al. han aislado e identificado cepas de *B. burgdorferi* a partir de *Ixodes ricinus* del País Vasco ²⁶. Por último han sido implicados otros posibles vectores en nuestro país distintos de las garrapatas del género *Ixodes*, como garrapatas del perro ⁷⁶ y otros animales domésticos y salvajes que citaremos posteriormente. Es necesario realizar nuevos estudios para identificar los vectores de esta infección en España y establecer con mayor exactitud su epidemiología. Recientemente Escudero, Barral y colaboradores han aislado y caracterizado varias cepas de *B. burgdorferi* procedentes en su mayoría de *Ixodes ricinus*, aunque 2 de ellas procedían de enfermos con Eritema migrans.

Las cepas eran originarias de La Rioja, País Vasco y Castilla- León y presentaron un perfil genético variable con representación de todos los genotipos descritos como causantes de enfermedad en humanos. Así mismo consiguieron identificar cepas de borrelias causantes de Fiebre Recurrente, renombrando al microorganismo como *Borrelia iberica* ⁶⁸.

En cuanto a los reservorios españoles de la enfermedad de Lyme las investigaciones son escasas con algunas excepciones: trabajos en Huesca con ovejas y cabras ⁷⁴, en perros de Soria ¹⁷⁹ y Madrid ⁴⁹, en zorros en Zaragoza ¹⁵¹ e incluso en algunas aves en La Rioja ^{157,160}.

I.5.) PATOGENESIS E INMUNIDAD.

Las espiroquetas productoras de la enfermedad de Lyme penetran en el huésped a través de la piel debido a la picadura de la garrapata vectora. Por ello la primera manifestación clínica es cutánea, el Eritema Crónico Migrans, y sucede tras 3 a 30 días de la picadura. La histología de ésta lesión demuestra un infiltrado celular linfo-histiocitario y una afectación de todas las capas dérmicas. En ocasiones *B. burgdorferi* se ha cultivado de estas biopsias aunque generalmente no es visualizada, lo que puede indicar que los microorganismos migran a través de la piel desde el punto de inoculación ¹⁹².

Una vez que las borrelias llegan a sangre, cruzando los endotelios vasculares, se produce la diseminación hematogena y una afectación difusa de los distintos órganos de la economía. Esta se manifiesta con un cuadro clínico similar a la mononucleosis aguda con faringitis, conjuntivitis, adenopatías, hepato-esplenomegalia, mialgias y neumonitis ¹⁵². En la diseminación de la infección parece importante la activación del plasminógeno, producida por la espiroqueta al penetrar en los tejidos del huésped ⁷⁸.

A menudo, y coincidiendo con las lesiones dermatológicas, algunos pacientes presentan cefaleas y cervicálgias, lo que es interpretado como una infección transitoria del SNC. Sin embargo en ciertos casos se desarrolla una auténtica meningitis, habitualmente después de 4 semanas de la aparición de EM. En estos casos la evaluación del líquido cefalorraquídeo revela una pleocitosis linfocitaria con aumento de proteínas y secreción intratecal de anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, pudiendo ser cultivada la espiroqueta causante ¹⁹³.

Otras veces las manifestaciones neurológicas consisten en neuropatías centrales y

periféricas, quedando aún por determinar si son resultado de la invasión directa tisular por las borrelias o debido a mecanismos indirectos inflamatorios e inmunológicos ¹⁵². La afectación cardiaca también suele aparecer tras varias semanas de los síntomas cutáneos. Consiste en una carditis que envuelve al sistema de conducción, cursando a menudo con bloqueos auriculoventriculares incompletos o completos con buena evolución (autolimitados en menos de 4-6 semanas). La patogénesis de la carditis de Lyme posiblemente se relacione con fenómenos de autoinmunidad, pues se han demostrado inmunocomplejos circulantes incluyendo crioglobulinas y C1q anómalo. De cualquier modo existen también estudios que defienden la infección miocárdica por *B. burgdorferi*, habiéndose observado infiltrados linfocitarios endomiocárdicos con espiroquetas ¹⁵².

La artritis suele manifestarse más tardíamente, después de la afectación neurológica y cardiaca, incluso varios años después del episodio dermatológico. En su patogenia se ha implicado la producción local en el espacio articular de inmunocomplejos, posiblemente como respuesta a los antígenos de *B. burgdorferi* presentes en estos tejidos.

Histologicamente se comporta como una sinovitis crónica, similar a la de la artritis reumatoide aunque sin la presencia de autoanticuerpos ¹⁹⁴. Algunas investigaciones han demostrado in vitro la producción de IL-1 por macrófagos, inducida por *B. burgdorferi*; esta producción local de IL-1 en la articulación pudiera jugar un papel importante en la patogénesis de la artritis de Lyme ⁹⁴. Una terapia antimicrobiana apropiada podría erradicar la infección en los espacios articulares, eliminando el estímulo antigénico y acabando así con la inflamación ¹⁵². La artritis es especialmente frecuente en U.S.A. al parecer por la mayor capacidad artritogénica que posee *B. burgdorferi* sensu stricto ¹⁹.

En el curso de la borreliosis de Lyme la primera respuesta inmunológica detectada es la de

células linfocitarias T, específica frente a *B. burgdorferi*. Además, ya hacia la segunda semana de la enfermedad, pueden elevarse los títulos de Ig M frente a *B. burgdorferi*, con un pico máximo hacia la tercera y sexta semana de la aparición del EM. Estos títulos pueden mantenerse altos e incluso sufrir una segunda elevación en casos de enfermedad de Lyme no resuelta, al mantenerse el estímulo antigénico. La respuesta de Ig G se desarrolla generalmente después del EM, aumentando sobre todo los subclones Ig G1 y G3 frente a *B. burgdorferi*. En caso de pacientes que padecen artritis, la Ig G se eleva al aparecer la lesión articular y puede persistir así varios años ¹⁵².

Por último referir que se han observado pacientes con clínica de Lyme, cuyos niveles de anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi* no eran superiores a los de los controles. En estos casos aparecía una fuerte respuesta proliferativa de los linfocitos T frente a *B. burgdorferi*. La presencia de clínica persistente, posiblemente relacionada con estimulación antigénica mantenida en pacientes con altos títulos de anticuerpos o respuesta celular T elevada, sugiere que éstos individuos permanecen infectados crónicamente por la borreliosis de Lyme ¹⁵².

Actualmente no disponemos de investigaciones suficientes para determinar si la infección ya curada o la presencia de títulos mantenidos de Ig G confieren inmunidad en humanos. Parece ser que la enfermedad de Lyme no suele producir recurrencia habitualmente, aunque puede volver a desarrollarse en pacientes que han perdido sus anticuerpos Ig G. Además la terapia antimicrobiana precoz en el curso de la infección puede limitar el número de microorganismos que produzcan estimulación antigénica, evitando de éste modo el desarrollo de anticuerpos en cantidad adecuada.

Estudios recientes en modelos animales indican que los linfocitos T parecen modular la

severidad de la enfermedad de Lyme ^{44,110}. La producción de citoquinas por estas células T y su patogenia en la infección ha sido estudiada en modelos experimentales animales, pero al no desarrollar estas especies una clínica morbosa similar a la producida en humanos, los resultados no pueden extrapolarse.

En cuanto a los componentes estructurales de *B. burgdorferi* que desencadenan la respuesta inmune en el huésped es ya conocido el papel fundamental desempeñado por las proteínas de superficie externa del microorganismo causante de la enfermedad de Lyme ^{211,212}.

Interacciones inespecíficas de *Borrelia burgdorferi* con el huésped.

La borreliosis de Lyme afecta a una serie de órganos de la economía produciendo una enfermedad inflamatoria crónica con una serie de manifestaciones clínicas poco específicas. Mientras que el proceso morboso parece estar asociado con la persistencia prolongada del microorganismo en los tejidos, una serie de mecanismos no específicos contribuyen a las distintas manifestaciones clínicas ²⁷.

Por un lado tenemos un conjunto de respuestas inflamatorias inespecíficas como único mecanismo patogénico demostrado hasta el momento en la enfermedad de Lyme ^{27,204}:

- Elevación de crioglobulinas del tipo Ig M en pacientes con EM.
- Aumento de crioglobulinas Ig G en caso de artritis activa de Lyme.
- Los niveles de anticuerpos permanecen altos durante las fases de enfermedad activa y disminuyen en las remisiones.
- Presencia de inmunocomplejos circulantes en pacientes afectados de artritis activa.
- Producción de IL-1 por macrófagos expuestos a *B. burgdorferi* y también por sinoviocitos

infectados.

Por otra parte existen una serie de hechos demostrativos de la reactividad cruzada entre anticuerpos frente a *B. burgdorferi* y frente a otras células, lo que podría explicar ciertos mecanismos patogénicos de autoinmunidad ²⁷:

- Presencia de anticuerpos anti-mielina y frente a otros compuestos neurales con reactividad cruzada con anticuerpos anti- *B. burgdorferi*.
- Anticuerpos anti-hepatocitos.
- Existencia de un antígeno bacteriano común de *B. burgdorferi*, que aumentaría la reactividad cruzada en la enfermedad de Lyme.
- Presencia de proteínas "heat shock" compartidas por la mayoría de las células eucariotas.
- Homología entre la proteína flagelar de *B. burgdorferi* y la de *Treponema pallidum* y otras bacterias.

Por último, la capacidad de *B. burgdorferi* para adherirse a numerosos tipos de células, permite a estas bacterias residir en gran cantidad de tejidos sin necesidad de interacciones específicas. Se ha demostrado esta adherencia en ²⁷:

- Distintos tipos celulares de las garrapatas vectores, entre ellas células epiteliales intestinales.
- Células de la glía.
- Células endoteliales.
- Líneas celulares HEP-2, Vero y Mc Coy.

I.6.) EPIDEMIOLOGIA DESCRIPTIVA.

I.6.1.) Prevalencia e incidencia.

La incidencia actual de la borreliosis de Lyme es mal conocida. Ello es debido a dos motivos fundamentales:

- El carecer de un método suficientemente eficaz para aislar los microorganismos causantes de esta enfermedad de los tejidos infectados.
- La poca sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico.

El Centers for Diseases Control de Atlanta ha establecido en Estados Unidos un sistema nacional de seguimiento de la enfermedad de Lyme desde el año 1980 ⁵². A través de él se ha podido comprobar la distribución de esta enfermedad por los distintos estados norteamericanos. Hoy día la borreliosis de Lyme constituye la más frecuente de las enfermedades transmitidas por garrapatas en USA ⁵⁸. En los últimos años ha aumentado de forma importante el número de casos declarados aunque no está claro si por un aumento real de la incidencia o debido a una mejora en el diagnóstico y seguimiento. El CDC recomienda que el seguimiento de la enfermedad se emplee más para monitorizar tendencias que para evaluar la incidencia real del problema. De cualquier modo, la borreliosis de Lyme es considerada endémica en la inmensa mayoría de los estados de la Unión, siendo su incidencia durante el año 1992 de 3.9 por 100.000 habitantes y resultando Connecticut el estado con mayores tasas declaradas en dicho año (53.6 / 100.000) ⁵⁴.

Una investigación prospectiva realizada por Hanrahan et al. en Fire Island (New York), valoró la incidencia de Borreliosis de Lyme en una comunidad durante el verano. La definición de casos se limitó a la aparición de Eritema Migrans más serología positiva. La incidencia anual fue del 1% y la frecuencia acumulada del 7.5 %. Además se hizo el seguimiento serológico de toda la comunidad estudiada, observándose en el 3.1 % de casos una elevación de al menos 4 veces en el título de anticuerpos Ig G frente a *B. burgdorferi*⁹⁶.

Por último, otro estudio prospectivo de Steere y colaboradores en Great Island (Massachusetts), evaluó a una población a lo largo de 4 años durante la estación veraniega. Los casos fueron definidos mediante una historia de Eritema Migrans o enfermedad gripal durante los meses de verano seguida, dentro del año en curso, por artritis o también por la aparición de ataques recurrentes de oligoartritis sin causa conocida. La incidencia anual fue del 1.5 al 3.3 % durante los 4 años valorados, con una frecuencia acumulada del 16 % y una razón infección inaparente/infección subclínica 1:1. La proporción de controles con serología positiva frente a *B. burgdorferi* en los distintos estudios varió del 0 al 10 %¹⁹⁹.

En Europa no existe aún un seguimiento bien establecido de la borreliosis de Lyme. Los datos al respecto son aportados por los distintos países y regiones, permitiendo asegurar que la distribución de la infección es amplia y constante por todo el continente. Estudios serológicos realizados en Inglaterra cifran la incidencia de la enfermedad de Lyme en el 1% en la zona de Londres y hasta un 7% en Southampton¹⁴³. En una población rural de Alemania Occidental se observaron títulos de anticuerpos positivos frente a *B. burgdorferi* en un 15.7 % de casos¹⁴². Un estudio prospectivo realizado en una población de riesgo de trabajadores forestales en Holanda, estableció la existencia de Ig G anti *B. burgdorferi* a títulos valorables por ELISA en el 28 % de esta población, mientras en un grupo de

controles sólo fueron del 5 %. La razón infección clínica/infección subclínica fue muy diferente a la de USA, existiendo una gran mayoría de afectados asintomáticos por razones aún no aclaradas ¹¹⁴.

Otro estudio de seroprevalencia realizado en trabajadores forestales de Brandemburgo en Alemania, demostró tasas del 8% de anticuerpos Ig G anti *B. burgdorferi* frente al 4% que presentó un grupo control cuando se investigó por inmunofluorescencia indirecta, mientras que ascendió al 18% para el primer grupo y al 5% para los controles al analizar mediante enzimoimmunoensayo ¹⁶⁹.

Un trabajo más, éste de tipo prospectivo, realizado en Suecia en una zona de alta endemia de infección de Lyme concluyó que el 25% de los residentes al inicio del estudio presentaron títulos positivos de anticuerpos Ig G en suero determinados por ELISA, pasando la tasa al 34% en el transcurso de 3 años. Además el 11% de casos desarrollaron clínica compatible con la Borreliosis durante el período de seguimiento ²⁹.

En España también han aumentado los casos descritos de borreliosis de Lyme en los últimos años. La distribución de la enfermedad en nuestro país parece ser más focal, posiblemente en coincidencia con la presencia no uniforme de *Ixodes ricinus* en el sur de Europa. En un estudio de seguimiento serológico realizado por el Centro Nacional de Referencia para Microbiología y publicado en el año 1993 ⁵, se trabajó sobre sueros de pacientes con alguna afectación orgánica sugestiva de Enfermedad de Lyme (Eritema Migrans, artritis, alteración neurológica o afectación cardíaca). Aunque no hay datos de prevalencia/incidencia, se confirmó el diagnóstico de Borreliosis de Lyme en el 7 % de los casos y fue de probable infección en el 2.4 %. Otros estudios serológicos de seguimiento se han realizado en distintas regiones españolas con resultados variables. Así en La Rioja,

Oteo et al. determinaron la existencia de anticuerpos anti *B.burgdorferi* en el 3 al 30% de los sujetos estudiados según su área de residencia ¹⁵⁸.

En Valladolid, Tamayo y colaboradores demostraron reactividad serológica en el 10.5 % de un grupo de trabajadores expuestos a factores de riesgo para esta enfermedad ²⁰⁵. Otro estudio hecho en Sevilla por López Prieto y Borobio en un grupo de controles, halló seropositividad para la *B.burgdorferi* en el 1.3 % ¹²³. Sin embargo otro trabajo sevillano no halló ningún caso de seropositividad en un grupo control, sin clínica de enfermedad de Lyme ⁸⁶. En Asturias se determinaron mediante ELISA anticuerpos Ig G/M anti-*B.burgdorferi* en habitantes de distintas comarcas, encontrándose valores desde el 0 % en medio urbano hasta el 24 % en campesinos de la Sierra. La relación infección aparente/inaparente fue de 1:15 ¹⁶. Así mismo se han hallado bajas prevalencias para la infección en Barcelona ⁵¹ y Canarias ^{50,115}, mientras otro estudio realizado en Soria encontró tasas de anticuerpos en el 13% de la población ¹⁷⁷.

I.6.2.) Comportamiento epidémico y concepto de endemia.

La incidencia de la enfermedad de Lyme en un área geográfica determinada depende de la densidad de población de las garrapatas vector y de la prevalencia de la infección por *B. burgdorferi* en estas garrapatas. Así en EEUU el 20-35 % de las ninfas de *Ixodes scapularis* en los estados del Nordeste están infectadas por *B.burgdorferi*., mientras que sólo lo están el 1% de *I. pacificus* en los estados del Oeste ⁵⁴. En España se han observado en La Rioja tasas de infección por *B. burgdorferi* del 28% en *I. ricinus* ^{153,154}.

Los requisitos para establecer una zona como endémica para la Enfermedad de Lyme fueron

establecidos por Smith et al; según este trabajo es suficiente la presencia de la garrapata en el área geográfica y la descripción de al menos un caso de borreliosis de Lyme para considerarla zona endémica. Estos mismos criterios han sido mantenidos por Oteo y Guerrero para definir la zona endémica de esta infección en nuestro país ¹⁵⁵.

I.6.3.) Distribución geográfica.

En Estados Unidos se han diferenciado tres regiones endémicas principales ¹⁷⁹:

- Areas costeras del Nordeste.
- Alto Medio Oeste, incluyendo los estados de Minnesota y Wisconsin.
- Noroeste, incluyendo regiones de California, Oregón Sur y Nevada Occidental.

En Europa la presencia de la infección coincide con la distribución de *Ixodes ricinus* que, como ya hemos dicho, es desigual en el área meridional de este continente. Así, por ejemplo en España se ha observado una disminución del número de casos de la enfermedad de Norte a Sur. En el informe de Anda et al. las cifras son del 41 % para la zona Norte, descendiendo hasta el 26 % en el Sur ⁵. Además en la zona Sur de España se ha implicado la coexistencia entre borreliosis de Lyme y la endemia local de Fiebre recurrente por *Borrelia hispanica*, recientemente renombrada como *B.iberica*, con la posibilidad de reacciones serológicas cruzadas entre ambas espiroquetas ⁵.

La distribución de garrapatas del género *Ixodes* en nuestro país varía según las zonas geográficas, predominando *I. ricinus* en el Norte y Centro. Oteo y colaboradores han estudiado la presencia de *B. burgdorferi* en intestino medio de garrapatas de La Rioja mediante Inmunofluorescencia, hallándola en un 28 % de *I.ricinus* pero también en la

mayoría de especies de este género (*I. simplex*, *I. trianguliceps*, *I. canisuga*, *I. frontalis*, *I. acuminatus*, ...) ^{153,154}. También se ha detectado en España la presencia de borrelias productoras de Lyme en garrapatas de los géneros *Dermacentor* y *Rhipicephalus* ^{154,176}.

En el resto del mundo han sido descritos casos de Enfermedad de Lyme en Asia y también en países donde no existen *Ixodes spp.*, lo que implicaría la necesidad de nuevos vectores transmisores de la enfermedad como otras garrapatas e incluso insectos hematófagos.

I.6.4.) Distribución temporal.

La existencia de variaciones estacionales en el número de casos de Borreliosis de Lyme recogidos por los distintos sistemas nacionales de seguimiento se corresponde con el ciclo vital de su garrapata vectora.

La mayor incidencia se produce en el verano e inicio del otoño y en general durante los meses cálidos, en los que la presencia de ninfas de garrapatas y la actividad humana en el campo son mayores. Así mismo, el máximo número de casos de Eritema Crónico Migrans observados en Europa coincide con esta época del año ¹⁵².

I.6.5.) Edad.

En la literatura hay casos de enfermedad de Lyme recogidos en todas las edades. Sin embargo parece existir un acúmulo de incidencia en los niños. Así en el estado norteamericano de Connecticut, mientras la incidencia general de Lyme durante el año 1986 fue de 22 por 100.000 habitantes, se elevó al 39/100.000 en el grupo de 5 a 9 años de edad.

En Westchester County, New York, las 2/3 partes de casos de borreliosis de Lyme declarados durante los años 1982 y 83 corresponden a sujetos menores de 40 años, siendo el 43% menores de 19 años ¹⁵².

En cambio, otro estudio llevado a cabo por Steere et al. en Great Island (Massachusetts) sugiere que el riesgo de padecer esta infección aumenta con la edad ¹⁹⁹.

También en Europa se ha encontrado esta mayor predisposición infantil a la enfermedad de Lyme. Así el 46% de los niños con antecedentes de picaduras por garrapata presentaron reactividad frente a *B.burgdorferi* en un estudio realizado entre población rural de Alemania Occidental ¹⁴². En España Anda y col. hallaron serologías positivas en el 25% de individuos de entre 0 y 9 años con sospecha de borreliosis de Lyme ⁵.

I.6.6.) Sexo.

Parece existir un ligero predominio de la enfermedad en varones, posiblemente por la mayor exposición a picaduras de garrapatas debido al desempeño de actividades al aire libre ¹⁵². En nuestro país un estudio serológico de casos con clínica de Lyme, estableció una razón de 1.6 varones positivos por cada mujer ⁵.

I.6.7.) Ocupación.

Se ha demostrado un riesgo ocupacional para el padecimiento de la enfermedad de Lyme. Son los trabajadores al aire libre en zonas con gran densidad de reservorios de *B.burgdorferi* los que presentan el riesgo más acusado.

En USA dos estudios similares valoraron éste factor de riesgo. Se estudiaron pacientes con historia previa de borreliosis de Lyme a los que se realizó una serología frente a este microorganismo, comparando después los grupos seropositivos y seronegativos. Smith y colaboradores hallaron un 7% de trabajadores positivos por ELISA y Western-blot ¹⁸⁸.

Por su parte Neubert et al. refieren un 34% de trabajadores forestales con títulos positivos de IgM anti-*B.burgdorferi* por inmunofluorescencia indirecta ¹⁴⁶. Las diferencias entre ambos trabajos pueden deberse a la distinta técnica serológica empleada y también al criterio para definir la positividad. Sin embargo ambos investigadores encuentran varias similitudes: la historia previa de picaduras de garrapatas en muchos casos, la presencia de rash compatible con EM, la afectación cardiaca, articular o neurológica frecuentes y el aumento del título de anticuerpos frente a *B.burdorferi* con la edad.

En cualquier caso en los dos estudios se comprueba que la seropositividad se asocia de manera significativa con antecedentes de picadura de garrapata o de EM, ambos hechos relacionados muy directamente con un riesgo laboral. Smith compara sus resultados con los de un grupo de donantes de sangre del mismo área geográfica (1% seropositivos frente a *B.burgdorferi*) y un grupo de pacientes de Enfermedades de Transmisión Sexual con RPR negativo (0% seropositividad frente a enfermedad de Lyme).

Newbert no dispone de un grupo control externo, por lo que reexamina al grupo de trabajadores forestales seropositivos tras 3 años, hallando un 26% de casos con clínica compatible con Lyme o historia sugestiva de enfermedad temprana y un 62% con elevación de al menos 4 veces en el título de IgG anti- *B.burgdorferi* entre la primera determinación y las posteriores.

En el continente europeo también se ha observado esta asociación ocupacional en la

borreliosis de Lyme. En Alemania Occidental se halló reactividad serológica frente a *B.burgdorferi* en el 15% de una población rural, siendo del 27% para un grupo de trabajadores forestales ¹⁶⁹.

Un estudio prospectivo en una población de riesgo suiza demostró anticuerpos IgG anti *B.burgdorferi* en un 26% de casos, mientras que no superó el 6% en el grupo control ⁷¹.

Oteo en La Rioja encuentra serorreactividad para la enfermedad de Lyme en el 38% de los trabajadores del campo, especialmente los habitantes de la zona de la sierra (31% frente al 3% en La Rioja Baja) ¹⁵⁷. Un estudio realizado en Asturias demuestra la mayor incidencia de la borreliosis de Lyme en campesinos de la comarca de la sierra (24%) frente a otras áreas rurales asturianas (6%) y urbanas (0%) ¹⁶.

I.7.) MANIFESTACIONES CLINICAS.

La borreliosis de Lyme es una enfermedad polisistémica que, por analogía con la sífilis, se divide en 3 fases o estadios. Esta separación resulta un tanto arbitraria pues la enfermedad puede manifestarse de formas diversas, cambiando el orden de las fases o solapándose unas con otras. Además al instaurar tratamiento con antimicrobianos la evolución del proceso puede variar. De cualquier modo mantendremos esta división por resultar más didáctica.

A veces la infección por *B. burgdorferi* es asintomática. En otros casos se inicia con afectación dermatológica (estadio 1), pudiendo ocasionar después clínica neurológica y/o cardíaca (estadio 2), apareciendo finalmente manifestaciones articulares (estadio 3).

Asbrink et al. proponen clasificar evolutivamente la infección en dos formas ¹⁴:

- **Enfermedad precoz.**- puede presentarse bajo formas localizadas o diseminadas. La forma localizada se manifiesta con Eritema Migrans y sin signos ni síntomas de diseminación, durando días o semanas. La forma diseminada supone compromiso de diversos órganos o sistemas de la economía, produciéndose la diseminación por vía hematogena o linfática.

- **Enfermedad crónica o tardía.**- representa la persistencia de la infección especialmente en articulaciones, corazón y sistema nervioso central.

Desglosando por fases evolutivas la clínica de la enfermedad diferenciaremos:

I.7.1.) Infección Asintomática.

Se ha observado en población sometida a seguimiento serológico que una buena parte de los individuos identificados como infectados por *B. burgdorferi*, no recordaba haber

presentado clínica compatible con la enfermedad de Lyme.

Sin embargo persiste el problema de los falsos positivos serológicamente, con lo que no podemos conocer la tasa de sujetos infectados realmente. De cualquier modo existen diferencias en la razón infección aparente /infección inaparente hallada en Norteamérica (1:1) y en Europa, lugar donde la infección subclínica es mucho más frecuente ^{15,63}.

Quizá la actitud más útil sea la de realizar estudios de seguimiento en seropositivos asintomáticos, para llegar a conocer el riesgo de presentación de complicaciones tardías y el posible beneficio del empleo de antimicrobianos en éstos pacientes ⁹².

I.7.2.) Fase primaria o de Infección temprana.

I.7.2.a.) Eritema Crónico Migrans.

El comienzo más típico es la aparición de una lesión patognomónica en este estadio de la enfermedad, denominada Eritema Crónico migrans (EM).

Se trata de una mácula o pápula eritematosa que se extiende hasta formar un anillo de bordes indurados con una zona central más clara. A veces esta lesión es muy eritematosa e indurada con el centro vesicular o necrótico. Se localiza preferentemente en muslo, ingle o axila y en el 30% de casos el paciente recuerda un antecedente de picadura por garrapata en el lugar del EM de 2 a 20 días antes. El EM aparece en el 50-75% de casos de enfermedad de Lyme en USA, siendo menos frecuente en Europa ^{141,191}. Suele durar una media de 28 días sin tratamiento antimicrobiano adecuado, reduciéndose su evolución a 7 días si administramos esta terapia. Ocasionalmente puede recidivar meses después de su desaparición. Otras veces se manifiesta como lesiones anulares múltiples tras varios días del

inicio del EM; es el llamado EM múltiple, más frecuente en USA. Parece que *Borrelia afzelii* ha sido cultivada más frecuentemente a partir de las biopsias cutáneas de pacientes con EM, por lo que se sospecha un mayor tropismo de ésta especie por la piel ^{45,48}.

Otras manifestaciones cutáneas de la borreliosis de Lyme son urticaria y rash malar.

I.7.2.b.) Manifestaciones generales.

También en este estadio inicial pueden aparecer, debido a la diseminación hematogena de la espiroqueta, una serie de cuadros transitorios de afectación orgánica ^{152,192}:

- Síndrome pseudogripal, con malestar general, fiebre, cansancio, cefalea, escalofríos y linfadenopatía.
- Neumonitis intersticial.
- Hepatitis.
- Esplenomegalia.
- Orquitis.
- Meningitis temprana, habitualmente con LCR normal.
- Miocarditis.
- Conjuntivitis.
- Artromialgias.
- Hematuria.

En conclusión esta fase primaria de la enfermedad de Lyme es muy variable, por lo que en ausencia de EM presenta un comienzo inespecífico que obliga a orientar el diagnóstico buscando los antecedentes epidemiológicos (endemia y picadura por garrapatas, estación del año, ocupación del paciente,...).

I.7.3.) Fase Secundaria o de Infección diseminada.

Tras su diseminación hematológica, *B. burgdorferi* parece acantonarse en una serie de nichos biológicos donde permanece aislada del sistema inmunitario del huésped. Aunque aún no se conocen en detalle, se ha implicado la producción de “slime” e incluso la localización intracelular de la espiroqueta como mecanismos para evadir la acción inmune. En este estadio aparecen manifestaciones clínicas variadas, destacando las neurológicas y cardíacas:

I.7.3.a.) Manifestaciones neurológicas.

Se inician tras varias semanas o meses de la fase primaria, durando también varias semanas o meses con posibilidad de recurrencias o cronificación. En USA aparecen en el 15-20% de los casos, siendo todavía más frecuentes en Europa ^{15,113,191}. La afectación habitual es meningitis, a menudo con neuropatía de pares craneales o periférica. En menos ocasiones los enfermos presentan signos de encefalitis y rara vez demencia o mielitis transversa.

En Europa la radiculalgia es el síntoma inicial más frecuente, apareciendo después pleocitosis sin signos meníngeos ni encefalíticos ¹¹³.

La meningitis del Lyme cursa con la clínica meníngea habitual y un LCR con pleocitosis linfocitaria (>100 células/mm³), aumento de proteínas y glucosa normal. Hay aumento de células mononucleares en respuesta a *B.burgdorferi*, con producción intratecal de Ig G, M y A específicas frente a la espiroqueta. Además algunos clones de células T del LCR reaccionan con antígenos del huésped, incluyendo la proteína básica de la mielina, mielina periférica, cardiolipina y galactocerebrósidos. Aún permanece desconocido si ésta

autorreactividad causa lesión tisular o es un fenómeno secundario. A veces el cultivo del LCR es positivo para *B. burgdorferi*^{152,192}.

Otra manifestación neurológica frecuente son las neuropatías. La parálisis facial uni o bilateral es la afectación más habitual de pares craneales en la enfermedad de Lyme. Otras veces aparecen neuropatías periféricas y de otros nervios craneales y radiculoneuritis. Electromiográficamente se demuestra lesión axonal primaria con desmielinización de segmentos proximales y distales. Histológicamente apreciamos una afectación predominantemente axonal con infiltración perivascular linfoplasmocitaria. No se visualizan borrelias a éste nivel, pero se ha hallado Ig M anti *B. burgdorferi* fijada a los axones, lo que sugiere una interacción lesiva entre las proteínas de la espiroqueta y las proteínas axonales del huésped¹¹³.

Las genoespecies con tropismo neurológico más acusado son *Borrelia burgdorferi* sensu stricto y *Borrelia garinii*^{19,208}.

Las complicaciones neurológicas pueden ser tratadas eficazmente con terapia antimicrobiana intravenosa.

I.7.3.b.) Manifestaciones cardiacas.

La afectación cardiaca en el curso de la enfermedad de Lyme se observa en el 8-10% de los casos en USA¹⁹², elevándose al 15-18% en Europa^{15,191}.

Lo más frecuente es la aparición de bloqueo atrioventricular de distintos grados (1º, tipo Wenckebach, completo). En otros casos puede existir miopericarditis aguda, disfunción ventricular izquierda moderada y raras veces cardiomegalia con pancarditis fatal. Más habituales son los transtornos transitorios con duración de 3 días a 6 semanas. También

pueden producirse alteraciones electrocardiográficas, especialmente en la repolarización. A veces los bloqueos aurículo-ventriculares requieren del implante temporal de marcapasos.

I.7.3.c.) Otras manifestaciones.

Además de los ya descritos, pueden aparecer durante la fase secundaria de la borreliosis de Lyme una serie de alteraciones menos frecuentes como ¹⁹²:

- Síndrome de distress respiratorio del adulto.
- Hepatitis recurrente.
- Miositis.
- Osteomielitis.
- Paniculitis.
- Afectación grave de los tejidos profundos del ojo con iritis, coroiditis y panoftalmitis con retinitis exudativa.
- Linfocitoma cutáneo benigno: es una lesión inusual, rojo intenso o violeta, nodular, localizada comunmente en el lóbulo auricular o en el pezón (a menudo sobre el lugar de picadura de garrapata). Es más frecuente en Europa y sin un tratamiento adecuado puede persistir varios meses e incluso años. Histológicamente se trata de folículos de linfocitos T y B, plasmocitos, macrófagos y células cebadas y eosinófilos a veces.
- Manifestaciones músculo-esqueléticas: aparecen tras varias semanas o meses del inicio de la enfermedad (la media suele ser hacia los 6 meses) con artralgias intermitentes y mialgias migratorias. Más tarde, y sobre todo en USA (60% de casos), cursa con oligoartritis asimétrica que afecta fundamentalmente a huesos largos y especialmente a la articulación de la muñeca. Otras veces se ven comprometidas las estructuras periarticulares con

entesopatías. En el líquido sinovial hay de 500 a 110.000 células blancas/mm³ con predominio de polimorfonucleares y presencia de inmunocomplejos. Las causas por las que *B. burgdorferi* se activa o permanece latente a este nivel aún son poco claras.

I.7.4.) Fase terciaria o de Infección tardía o persistente.

I.7.4.a.) Manifestaciones articulares.

Son las más características de este estadio final de la enfermedad de Lyme. Consisten habitualmente en episodios de artritis iniciados tras varios meses a tres años del EM. Generalmente aparecen hacia el segundo año de la evolución morbosa durando varios meses. Se han descrito en el 60% de los casos de borreliosis de Lyme en USA que no habían recibido tratamiento antimicrobiano adecuado en las fases iniciales del proceso ¹⁹². Es menos frecuente en Europa ^{15,141}.

Suelen ser oligoartritis asimétricas con afectación de huesos largos (la muñeca preferentemente) y sólo ocasionalmente cursa simulando una artritis reumatoide. A veces es una artritis crónica (10% casos) definida como inflamación articular continuada durante al menos un año seguido.

En la histología se observa una hipertrofia vellosa sinovial, depósito de fibrina e infiltración por células mononucleares con expresión intensa de HLA-DR en muchos tipos celulares. A veces pueden visualizarse espiroquetas dentro y alrededor de los vasos en forma de endarteritis obliterante. Rara vez se cultiva *Borrelia burgdorferi* en el líquido articular, donde sí existe una concentración de células mononucleares reactivas a dicho microorganismo. En los casos más severos puede afectarse el cartilago y hueso articular,

ocasionando inestabilidad en la juntura ¹⁹².

La evolución es variable pudiendo curar (se ha visto que la antibioterapia muestra eficacia en algunos casos), recurrir o cronificarse. Cada vez existen menos casos de curso desfavorable debido a la mejora diagnóstica y terapéutica ¹⁹².

Las cepas con mayor tropismo articular son las de la especie *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ^{19,208}.

I.7.4.b.)Manifestaciones neurológicas tardías.

Comienzan después del primer año del inicio de la enfermedad, constituyendo un conjunto variado de síndromes que afectan tanto al sistema nervioso central como al periférico. Son más frecuentes en el continente europeo que en Norteamérica ^{15,113}.

Uno de ellos fue descrito por Ackermann et al. en 48 pacientes de Alemania Occidental. Se trata de una encefalomielitis progresiva que cursa con paraparesia espática, ataxia, disfunción vesical, déficits de 7º y 8º pares craneales y alteraciones cognitivas, incluso con demencia. Para su diagnóstico se demuestra la producción intratecal de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* ¹.

En USA se han encontrado pocos casos de enfermedad de Lyme con afectación neurológica tardía y, pese a haberse descrito algunas encefalitis subagudas, síndromes desmielinizantes y demenciales, no han podido confirmarse estos diagnósticos con la producción intratecal de anticuerpos anti *B. burgdorferi*. Más comunes han sido las descripciones de alteraciones sutiles del sistema nervioso central y/o periférico. En estos casos los pacientes presentaban parestias distales intermitentes o radiculalgias después de un año de las primeras manifestaciones de la enfermedad. En el examen físico no se demostraban anomalías, pero

electromiográficamente se asemejaban a una neuropatía axonal ¹⁹².

Los mayores problemas diagnósticos surgen en los enfermos con afectación ligera del Sistema Nervioso Central y sin otros síntomas clásicos de enfermedad de Lyme, en los que es difícil demostrar la relación entre ésta clínica y la infección activa del SNC por *B. burgdorferi*.

I.7.4.c.)Otras manifestaciones.

Entre ellas destacan:

- Queratitis: similar a la luética, apareciendo varios años tras la infección inicial por *B. burgdorferi*.

- Acrodermatitis crónica atrófica: se observa principalmente en países europeos ¹⁵. Es de comienzo insidioso, a menudo sobre áreas cutáneas donde se localizó el EM, con piel hinchada y coloración rojo-azulada. Su evolución es crónica durante años, conduciendo a atrofia cutánea. Puede cultivarse *B. burgdorferi* en biopsias de estas lesiones, incluso tras 10 años de curso evolutivo. Histológicamente presenta pérdida de arrugas en la epidermis, teleangiectasia e infiltrado mononuclear. A veces aparecen placas de esclerodermia concomitantes.

En casos de cursos muy prolongados con artritis crónica y afectación ósea (periostitis, subluxación de pequeño huesos), pueden verse lesiones cutáneas subyacentes sugestivas de la extensión directa de *B. burgdorferi* ¹⁹².

-Fascitis difusa: han sido descritos algunos casos en los que se logró identificar espiroquetas de la afectación cutánea, asociándose a eosinofilia en sangre periférica ⁸⁷.

-Dermoatrofia idiopática de Pasini y Pierini: se trata de una forma de atrofia cutánea

específica y rara en la que, según un estudio realizado por los autores que le dan su nombre, los pacientes presentaron títulos de anticuerpos específicos para *B. burgdorferi* ³⁶.

I.7.5.) Infección congénita. ¹⁹²

Al parecer existe la posibilidad de transmisión transplacentaria de *B. burgdorferi*. Así, se han descrito dos casos de muerte durante la primera semana de vida, en niños cuyas madres padecieron la enfermedad de Lyme durante el primer trimestre del embarazo. En ambos se observaron espiroquetas en varios tejidos infantiles pero no se realizaron cultivos ni serologías. Otro estudio retrospectivo de 19 casos de borreliosis de Lyme durante el embarazo, halló que 5 de ellos se asociaron con muerte fetal, no pudiendo concluirse que fueran originados por la enfermedad materna. Por último un seguimiento realizado en 463 niños procedentes tanto de áreas endémicas como no endémicas de borreliosis de Lyme, no pudo establecer asociación entre malformaciones congénitas y la presencia de anticuerpos anti- *B. burgdorferi* en sangre del cordón umbilical. Tampoco ninguno de éstos niños presentó anticuerpos Ig M frente a la espiroqueta.

En conclusión *B. burgdorferi* puede transmitirse a través de la placenta, pero no parece ser causa habitual de muerte fetal ¹⁹².

I.7.6.) Diferencias clínicas entre USA y Europa en la enfermedad de Lyme.

Las resumiremos en el siguiente esquema:

Tabla I.

	Europa	Estados Unidos
Signos cutáneos	+++ , rara vez EM múltiple. + M.tardías (LCB,ACA).	+ ,más frecuente EM múltiple. Rara vez m. tardías.
S. reumatológicos.	++ ,pequeñas articulaciones.	+++ ,grandes articulaciones.
S. cardiacos.	+	+++
S. neurológicos.	+ ,afectación frecuente SNP.	Raros.
S. biológicos.	Raros.	S.inflamatorio en 50% casos.

I.7.7.) Clínica de la enfermedad de Lyme en España.

No presenta diferencias importantes respecto a lo observado en el resto de Europa. Podemos reflejarlo en un cuadro realizado por Anda et al. sobre 499 casos de posible enfermedad de Lyme remitidos al Centro Nacional de Referencia de Microbiología en Majadahonda ⁵:

Tabla II.

Nº de casos de Lyme confirmados y probables separados según sus manifestaciones clínicas

(en porcentaje):

Clínica	Totales	Confirmados	Probables
EM	9	9 (100)*	0
M. Neurológicas	310	24 (8)**	3 (1)
Artritis	79	0***	3 (4)
M. Cardiovasculares	101	2 (2)**	6 (6)
Total	499	35 (7)	12 (2)

* Se observó una correspondencia absoluta entre EM y diagnóstico de enfermedad de Lyme.

** Gran variabilidad en las m. neurológicas y cardíacas con una correspondencia baja con el diagnóstico de Lyme.

***Muy poca correspondencia entre manifestaciones músculo-esqueléticas y diagnóstico de Lyme.

En nuestro país la clínica de la Borreliosis de Lyme imita la descrita en el continente europeo; desglosando las distintas manifestaciones han podido apreciarse las siguientes particularidades:

- Estadíos iniciales.- en general se produce un cuadro pseudogripal con fiebre, escalofríos, cefaleas, astenia y mialgias ¹⁷⁵. El Eritema Crónico Migrans fue descrito en primer lugar por Rodríguez Torres en 1988 ¹⁷³, publicándose posteriormente numerosos casos. De cualquier

modo muchos diagnósticos clínicos de enfermedad de Lyme carecen de antecedentes dermatológicos claros o presentan cuadros variados: acrodermatitis crónica atrófica ⁸⁹, linfocitoma cutáneo ⁸⁵, esclerodermia localizada ¹²⁷, nódulos fibrosos periarticulares ⁶⁹ y lesiones evanescentes en diana ¹⁵⁶.

- Manifestaciones neurológicas.- son muy numerosas y variadas: meningoencefalitis linfocitaria ^{90,102,144}, parálisis facial ^{102,144}, radiculoneuritis, encefalitis, mielitis, polineuritis, meningitis crónica, ataxia, convulsiones, cefaleas, síndrome de Guillain-Barré ¹²², distrofia simpática refleja ⁸³, alteraciones neuropsíquicas ¹⁷⁷ e incluso algún caso controvertido de Esclerosis múltiple ⁸¹. Guerrero y colaboradores comunicaron que más del 60% de los pacientes de un estudio presentaron alteraciones neurológicas, especialmente meningitis linfocitaria y polirradiculopatías ⁸⁹.

- Manifestaciones oculares.- son poco frecuentes con algún caso de uveítis ¹⁵⁹.

- Manifestaciones articulares.- son escasamente reseñadas en la literatura científica española ¹⁴⁸. Anda et al. no hayan en 35 casos de enfermedad de Lyme de toda España ninguna alteración articular ⁵, aunque en una serie publicada por Guerrero el 46% de casos presentaron alteraciones articulares y el 28% artritis ⁸⁹.

- Manifestaciones cardíacas.- también son escasas las comunicaciones al respecto en nuestro país ⁹⁰, con diversidad de grados de afectación cardíaca especialmente bloqueos de conducción ^{5,91}.

- Manifestaciones hepáticas.- tanto hepatitis como alteraciones transitorias de la función hepática han sido descritas en relación con la infección por *B. burgdorferi* en España.

- Antecedentes de picadura por garrapatas.- aunque permiten el diagnóstico de sospecha ⁸⁸, es raro encontrarlos en nuestro medio, especialmente en la descripción de casos aislados, aunque sí aparecen con mayor frecuencia en series de pacientes publicadas.

I.8.) DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la Borreliosis de Lyme permanece como uno de los problemas esenciales a la hora de controlar esta enfermedad. Los complicados criterios clínicos manejados y la falta de estandarización de las técnicas de laboratorio empleadas hasta el momento, han conducido a diagnósticos erróneos con demasiada frecuencia.

I.8.1.) Diagnóstico clínico.

Se basa en la identificación de una serie de signos clínicos característicos junto a la demostración de una historia con antecedentes de exposición a vectores presumiblemente infectados por *B. burgdorferi*.

Aunque los síntomas han quedado bien establecidos y documentados en la abundante literatura médica, al tratarse de una enfermedad multisistémica puede manifestarse de forma muy variada. Realizar un diagnóstico definitivo puede resultar dificultoso; esto puede ser aún más complicado debido a la semejanza de la enfermedad de Lyme con otros procesos inflamatorios, inmunológicos y neurológicos, a menudo idiopáticos y refractarios a la terapias habituales.

Sin embargo la Borreliosis de Lyme es considerada una enfermedad curable con el uso de antimicrobianos apropiados. Por otra parte, aunque no debemos minimizar el potencial patógeno de *B. burgdorferi*, tampoco hemos de postular ésta enfermedad para explicar tan amplia variedad de alteraciones físicas y mentales ¹⁸⁶.

El diagnóstico debiera hacerse idealmente durante el estadio primario de la enfermedad, a

fin de evitar complicaciones posteriores. Durante esta fase temprana, la base diagnóstica reposa en una historia clínica adecuada que recoja antecedentes de picadura por garrapatas, existencia de un síndrome constitucional y, sobre todo, de Eritema Migrans. Sin embargo muchos pacientes no recuerdan haber sido picados por garrapatas, los síntomas constitucionales son muy poco específicos y numerosas lesiones cutáneas pueden asemejarse al EM, así como aparecer otras manifestaciones dermatológicas diferentes a ésta afectación patognomónica de la Borreliosis de Lyme ²⁵.

Los estadios intermedio y tardío de la enfermedad pueden mimetizar numerosos procesos diferentes, por lo que ya en estas fases es necesaria la confirmación diagnóstica mediante el laboratorio, especialmente si no existe el antecedente de exposición a garrapatas infectadas.

Se han propuesto numerosos criterios para definir los casos de Borreliosis de Lyme. Así los CDC americanos en 1990 estableció, con propósitos de seguimiento epidemiológico de la enfermedad, que una persona la padece si ⁵³:

- Presenta EM de al menos 5 cms. de diámetro o
- Presenta al menos un signo objetivo de enfermedad musculoesquelética, neurológica o cardiovascular más confirmación de la infección mediante técnicas de laboratorio.

I.8.2.) Diagnóstico de laboratorio.

I.8.2.1.) Cultivo.

Borrelia burgdorferi es una espiroqueta cultivable aunque todavía resulte difícil su aislamiento de forma regular de sangre, LCR o líquido articular. Ello es debido a la escasez en número de éstos microorganismos en los fluidos corporales citados y también a la

existencia de factores bactericidas que pueden impedir su crecimiento "in vitro". Mejores resultados se han conseguido al cultivar *B. burgdorferi* a partir de biopsias de lesiones de EM, aunque aún son pocos los laboratorios que tienen experiencia en éstas técnicas ²⁰¹.

De cualquier modo, *B. burgdorferi* puede ser cultivada a partir de:

- Piel o sangre en el estadio 1 de la enfermedad,
- Piel, LCR o sangre en el estadio 2 de la enfermedad y
- Piel o líquido sinovial en el estadio 3 de la enfermedad.

El medio de cultivo utilizado es el denominado de Barbour-Stoenner-Kelley o BSK-I compuesto de sustancias nutritivas y adicionado de L-cisteína, ditiotreitól y antibióticos ²¹. Posteriormente se han empleado medios modificados como el BSK-II ¹², similar al anterior pero sin glutamina y el BSK-H, carente de gelatina ²⁸.

El éxito en el cultivo puede mejorar si concentramos las muestras clínicas obtenidas. Así el LCR puede centrifugarse durante 20 minutos a 12.000 rpm y luego resuspenderse en 0,5 ml del medio de cultivo. Las muestras de piel y líquido articular deben ser tomadas con aguja y jeringa y ser resuspendidas también en 0,5 ml. de medio de Kelly. Deben incubarse a 33° C y, tras 7 días de incubación, los tubos son examinados bajo el microscopio de campo oscuro. Si son negativos se subcultivan, repitiendo éste procedimiento durante 5 semanas. Es importante para obtener buenos resultados del cultivo, la cantidad y calidad de la muestra. Así, las biopsias cutáneas deben tener un diámetro mínimo de 4mm. y ser mantenidas en una solución de cloruro sódico durante su transporte. La cantidad de LCR deseable para cultivo debe ser de al menos 1 ml. ²⁰¹

La probabilidad de aislar *B. burgdorferi* disminuye conforme avanzan los estadios de la enfermedad. De esta manera se han publicado cultivos positivos en el 60-70% de casos de

biopsias cutáneas de pacientes con EM y en el 30-40% de enfermos con acrodermatitis crónica atrófica. Las cifras disminuyen hasta el 3% para muestras de sangre de pacientes con EM y del 7-10% para LCR de pacientes con neuroborreliosis. Es posible cultivar la espiroqueta de enfermos con respuesta de anticuerpos negativa, especialmente en el estadio inicial del proceso ²⁰¹. Además el cultivo también puede ser positivo pese a haber recibido tratamiento antimicrobiano adecuado ¹⁶⁷.

En general podemos concluir diciendo que el cultivo no es recomendable de forma rutinaria. Únicamente es aconsejable en casos seleccionados (p.e. EM con serología negativa), para confirmar el diagnóstico de la enfermedad en los estadios 2 y 3 y para controlar la eficacia de la terapéutica empleada.

I.8.2.2.) Tinciones.

Las espiroquetas productoras de la enfermedad de Lyme pueden visualizarse en tejidos mediante tinciones histoquímicas. El valor de estos métodos para el diagnóstico es limitado, tanto por la escasez aparente de microorganismos como por la dificultad para distinguir ciertas estructuras tisulares de las borrelias localizadas en ellas. Además hay que tener precaución al interpretar las preparaciones de cultivos en el microscopio de campo oscuro, pues pueden tomarse por borrelias ciertas "pseudoespiroquetas". Por todas estas razones, la sensibilidad de estas técnicas es baja ¹⁴⁰.

I.8.2.3.) Serología.

La respuesta serológica frente a antígenos de *B. burgdorferi* puede demostrarse de varias formas ⁶⁶:

- Barbour et al. emplearon la Inmunofluorescencia indirecta con células completas de *B. burgdorferi* en el año 1983.
- Rusell et al. en 1984 recurrieron al Enzimoimmunoanálisis.
- Otras técnicas usadas han sido Hemaglutinación indirecta, Fijación del Complemento, Inmunofluorescencia de superficie, Western-blot, ...
- Ya en el año 1990 había al menos 20 kits comerciales diferentes para la búsqueda de anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, pero estos ensayos no están aún bien estandarizados y su utilidad diagnóstica permanece controvertida.

Existen una serie de limitaciones en estas pruebas serológicas debido a:

- Complejidad y variabilidad antigénica de *B. burgdorferi*²⁴ (numerosos antígenos se hallan codificados en plásmidos, lo cual supone una importante variación).
- Respuestas inmunes impredecibles durante los distintos estadios de la enfermedad¹⁴⁰.
- Epitopos comunes entre *B. burgdorferi* y otros microorganismos y componentes tisulares, con la consiguiente falta de especificidad de sus antígenos^{13,34,129,172}.
- Reactividad de autoanticuerpos con antígenos del organismo¹⁸³.

Todas estas limitaciones suponen un descenso en la sensibilidad y especificidad de los distintos inmunoensayos utilizados.

La baja sensibilidad de las técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme se debe a¹⁴⁰:

- La carencia de antígenos apropiados en la prueba usada.- la variación antigénica entre cepas de *B. burgdorferi* procedentes de diferentes zonas geográficas podría contribuir a ello, pero el empleo de ensayos con antígenos múltiples de *B. burgdorferi* B 31, compartidos con muchas otras cepas, y más recientemente la introducción de kits comerciales para *Borrelia*

garinii disminuyen éste riesgo. De cualquier forma, dada la capacidad mutagénica de las borrelias y la reciente descripción de distintas genopecies, se mantiene la posibilidad de una pobre sensibilidad diagnóstica debido a este motivo.

- Los altos valores de cut-off establecidos para las distintas pruebas serológicas en un intento de disminuir el número de falsos positivos en la población general.

- La respuesta inmune retrasada frente a *B.burgdorferi* en los pacientes infectados.- en la fase inicial de la enfermedad hay una inmunosupresión temporal por aumento de la actividad de células supresoras. Además el uso de antimicrobianos puede disminuir la carga antigénica óptima para desencadenar la respuesta inmunológica. Estos dos factores podrían explicar la seronegatividad observada en el estadio temprano de la enfermedad de Lyme, pero no reflejan necesariamente la falta de sensibilidad de los tests serológicos. Lo ideal en estos casos es repetir la prueba 1 ó 2 semanas después para demostrar una posible seroconversión.

En lo que se refiere a la baja especificidad de la serología diagnóstica de la enfermedad de Lyme, destacan 2 causas principalmente ¹⁴⁰:

- El uso de inmunoensayos indiscriminadamente en la población, aumentando el número de resultados falsos positivos al utilizar estas pruebas como método de despistaje.

- La utilización de sustratos celulares que contienen múltiples determinantes antigénicos. Esta variedad antigénica supone que la prueba vea aumentada su sensibilidad y reducida su especificidad.

El componente ideal de estos ensayos inmunológicos sería un antígeno específico de *B.burgdorferi* sensu lato que resultara uniformemente inmunogénico tanto en pacientes con enfermedad temprana como tardía. Diversos estudios han identificado anticuerpos frente a

antígenos de *B. burgdorferi*, (p.e. antígenos de 39, 41, 93 y 23-25 kDa.) como marcadores significativos para la enfermedad de Lyme.

Lo más adecuado sería, pues, medir la respuesta serológica de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la membrana externa de *B. burgdorferi* de cada región geográfica particular (*B. burgdorferi* sensu stricto en América y además *B. garinii* y *B. afzeli* en Eurasia)³⁷. Así, algunos antígenos empleados en las pruebas serológicas para diagnosticar la enfermedad de Lyme son:

- Proteína de 41 kDa.- muy inmunógena pero inespecífica, con importante respuesta de anticuerpos. Su uso purificado ha mejorado el rendimiento¹⁰³.
- Proteína de 39 kDa.- resulta sensible y específica como marcador tardío de enfermedad²⁰³.
- Proteína de 93 kDa.- también resulta específica en períodos tardíos^{145,212}.
- Proteínas de 21-25 kDa y proteína de 34 kDa.- son marcadores específicos en estadios clínicos tempranos^{47,67}.
- Antígeno GIpQ.- identificado recientemente por Schwann como epitopo específico presente en pacientes con Borreliosis Recurrente. Su interés en nuestro caso reside en la exclusión de falsos seropositivos en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme¹⁸².

I.8.2.3.a.) Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Está basada en la reacción entre antígenos de *B. burgdorferi* y suero del paciente (que supuestamente contiene anticuerpos frente a la enfermedad de Lyme), realizándose su lectura mediante un microscopio de fluorescencia tomando como referencia la fluorescencia de la prueba respecto a un estándar.

Suelen probarse diluciones séricas seriadas o una dilución única que represente la dilución umbral establecida como positiva. El punto final de positividad del test es la más alta dilución de la muestra que reproduzca la reactividad del control considerado positivo.

También se ha empleado una prueba fluorométrica de lectura automatizada, en un intento de evitar los problemas de subjetividad en la interpretación. De cualquier modo, las técnicas de IFI presentan una serie de problemas ⁶⁶:

- La mayoría de individuos no infectados por *B. burgdorferi* pueden reaccionar en la IFI, por lo que ha de establecerse un umbral de positividad suficientemente elevado para reducir estas reacciones inespecíficas.

- Cada fabricante en su kit comercial recomienda diluciones séricas distintas, utiliza antígenos y diluyentes diferentes y suele establecer la reactividad de la técnica con una única cepa de *B. burgdorferi*. Todo esto supone una insuficiente correspondencia entre las distintas pruebas ensayadas.

- En general los estudios realizados han reflejado una mala correspondencia intra/interlaboratorios, tanto para los kits comercializados como para los inmunoensayos propios.

Pese a todos estos inconvenientes algunos estudios han hallado la misma reproducibilidad en la IFI que en el enzimoimmunoensayo ¹⁸.

I.8.2.3.b.) Enzimoimmunoanálisis. (EIA).

Esta técnica consiste en hacer reaccionar antígenos de *B. burgdorferi*, fijados generalmente en microplacas, con suero del paciente a una dilución predeterminada. Trás un período de incubación y lavado se añade un complejo enzimático y un sustrato coloreado,

procediéndose después a su lectura fotométrica o visual según los valores de absorbancia de las muestras respecto a un control positivo.

Los antígenos más empleados suelen ser sonicados de células completas de *B. burgdorferi* que pueden haber sido modificados enriqueciéndolos o removiendo alguna de las fracciones antigénicas. Otros antígenos utilizados más recientemente son la proteína flagelar de 41 kDa., la proteína de 39 kDa. y diversas proteínas de membrana externa (Osp A, Osp B, Osp C). También se están empleando antígenos recombinantes.

Así, para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme en estadios tempranos podemos utilizar un EIA para detectar Ig M, empleando como antígenos Osp C recombinante y el fragmento de 14 kilodaltons de la flagelina ¹⁷¹. Otra posibilidad es recurrir a un EIA Ig M de captura que ofrece una buena sensibilidad en fases iniciales de la infección ⁹⁷. Para el diagnóstico de la enfermedad avanzada disponemos, por ejemplo, de un EIA para Ig G con p 83 recombinante ¹⁷⁰.

Es deseable introducir en la técnica controles tanto internos (del propio kit comercial) como externos (del laboratorio), incluyendo un suero fuertemente positivo, otro debilmente positivo (cuya reactividad sea de 1 a 2 desviaciones estándar sobre el umbral considerado positivo) y otro negativo (1-2 desviaciones estándar bajo el umbral negativo). Así mismo conviene testar cada muestra por duplicado y participar en programas de control de calidad externos al laboratorio para validar la seguridad de las técnicas empleadas.

En general, el EIA es preferible a la IFI al presentar una mayor sensibilidad y especificidad y estar más estandarizados ^{22,46,132}.

I.8.2.3.c.) Western-Blot (W.B.)

Los antígenos de *B. burgdorferi* son separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y fijados a un soporte de nitrocelulosa sobre el que se hace reaccionar el suero o LCR del paciente supuestamente infectado. La interpretación se basa en el número, tamaño e intensidad tintorial de cada banda antigénica encontrada.

La ventaja fundamental de esta prueba es su mayor sensibilidad respecto a otras técnicas y el proporcionar una información más detallada sobre la inmunorreactividad del paciente analizado. Así en un trabajo realizado, el W-B Ig M presentó una sensibilidad del 68% comparado con el 43% del EIA mientras que para el W-B Ig G la sensibilidad fue del 65% respecto al 38% del EIA ¹⁰⁸. También mediante esta técnica, conseguimos información sobre las genoespecies de *B. burgdorferi* implicadas en la infección en cada caso ¹⁷.

En cuanto a los inconvenientes del W-B destacaremos ²⁰¹:

- La existencia de inmunorreactividad cruzada entre sueros de pacientes con cáncer y colagenosis y los infectados por *B. burgdorferi*, apareciendo falsos positivos.
- Los kits comerciales aún no están estandarizados y los criterios interpretativos son variables.
- La baja especificidad, evitable únicamente aumentando el número de bandas requeridas para dar el W-B como positivo (disminuyendo así la sensibilidad). De cualquier modo se ha conseguido mejorar también la especificidad de esta técnica, depurando los antígenos de *B. burgdorferi* y definiendo más claramente los criterios de interpretación.

Los criterios de interpretación del W.B. son:

- Cuantitativos.- basados en el número de bandas reveladas por la prueba. Fueron propuestos por Dressler et al. en 1993 ⁶⁵.

- Cualitativos.- en este caso se valora la aparición de determinadas bandas (Tilton y colaboradores, 1994) ²⁰⁶.

- Combinación de ambos.- propuestos por Engstrom en 1995 ⁶⁷ y después adoptados y mejorados por los CDC americanos ⁵⁵.

Resumiremos en la tabla III los criterios más aceptados para la interpretación del W.B. para *B.burgdorferi* sensu stricto en USA:

Tabla III.

	W.B.Ig M (enfermedad temprana)	W.B. Ig G (enfermedad avanzada)
Engstrom (Positivo)	2 bandas de: 24,39,41kDa.	2 bandas de: 20,24,35,39,88.
Engstrom (Negativo)	Otras combinaciones.	Otras combinaciones.
Dressler (Positivo)	2 de:18,21,28,37,41,45,58,93.	5de:18,21,28,30,39,41,45,58,66,93
Dressler (Negativo)	Otras combinaciones	Otras combinaciones
C D.C.	Criterios de Engstrom	Criterios de Dressler

Añadir para terminar que en Europa aún no se hallan bien establecidos y por tanto aceptados estos criterios, aunque como veremos después Hauser , Wilske et al. han realizado recientemente un estudio con cepas europeas de *B.burgdorferi* s.s. , *B.garinii* y *B.afzelii* ⁹⁸.

I.8.2.3.d.) Detección de Antígenos de *B. burgdorferi*.

Puede realizarse en sangre, LCR, orina y biopsias cutáneas. Se han empleado diferentes técnicas como EIA de membrana usando anticuerpos monoclonales, Western-blot y pruebas de inhibición competitiva. Aún no se dispone de kits comerciales bien estandarizados ²⁰¹.

I.8.2.3.e.) Interpretación de los tests serológicos.

Para evaluar adecuadamente la información aportada por las diferentes pruebas serológicas es necesario conocer su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. En estudios realizados en USA ⁶⁰, la sensibilidad y especificidad de los diferentes inmunoensayos fueron determinados en referencia a criterios de diagnóstico clínicos restrictivos. Los resultados obtenidos fueron del 53 al 80% de sensibilidad y del 37 al 84% de especificidad, dependiendo del estadio de la enfermedad en que estuviera cada paciente.

Como podemos ver la serología de la borreliosis de Lyme no debe ser empleada como técnica de despistaje, sino en pacientes con fuerte sospecha clínica de la enfermedad. Así, en un trabajo publicado en 1991 se apreció que en zonas geográficas sin endemia de Borreliosis de Lyme del 1 al 2 % de la población eran seropositivos, mientras que en áreas endémicas los porcentajes de población sana con anticuerpos frente a *B.burgdorferi* ascendían al 10 % ⁷¹.

I.8.2.3.f.) Problemas en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme.

Son fundamentalmente tres ²⁰¹:

- 1.- La respuesta de anticuerpos en la borreliosis de Lyme es lenta y persistente.
- 2.- La reactividad cruzada es importante.
- 3.- La neuroborreliosis se diagnostica valorando la secreción intratecal de anticuerpos anti-*B. burgdorferi*.

1.) Respuesta de anticuerpos lenta y persistente.- con respecto a este primer punto existen varios problemas:

- Los inmunoensayos disponibles detectan anticuerpos anti- *B.burgdorferi* en suero tras 2-4

semanas de iniciarse la infección primaria en menos del 50% de los pacientes. Además la terapia antimicrobiana puede disminuir o suprimir esta respuesta temprana ⁶².

- Durante la fase inicial de la infección en la que se manifiesta el Eritema Migrans, únicamente se detectan anticuerpos específicos en menos del 50% de los casos ²⁰². En los estadios intermedio y tardío de la enfermedad aparecen anticuerpos séricos en más del 80% de casos, por lo que en casi el 20% no existen inmunoglobulinas frente a *B. burgdorferi*. Así mismo la detección de estos anticuerpos en LCR no está estandarizada ²⁰¹.

- Los anticuerpos más precozmente detectados son Ig M frente al antígeno flagelar de *B. burgdorferi*. Posteriormente aparece Ig M frente a otros antígenos de menor peso molecular (21-22, 31 y 34 kDa) ⁶². Para el diagnóstico precoz se han empleado pruebas utilizando un fragmento del antígeno flagelar de *B. burgdorferi* purificado y Osp C recombinante ¹⁷¹. Así mismo, en fases iniciales de la enfermedad con clínica, podemos valorar los niveles de complemento total, C3, Ig M total y agregados de inmunoglobulinas e inmunocomplejos ³⁵.

- Después de 6-8 semanas pueden detectarse Ig G e Ig A frente a *B. burgdorferi*, declinando la Ig M por lo general. A veces persisten niveles elevados de Ig M, lo cual si se acompaña de nuevos síntomas obliga a considerar retratar la infección ¹⁰⁰. Además aparecen anticuerpos frente a otros antígenos diversos de *B. burgdorferi*. Los tests serológicos más apropiados durante las fases 2 y 3 de la enfermedad detectan Ig G específica o polivalente, empleando antígenos aislados o complejos antigénicos de las distintas genoespecies de *B. burgdorferi* ^{100,109,131}.

2.) *Borrelia burgdorferi* presenta reactividad cruzada importante con distintos antígenos.-

-Lo más común son las reacciones cruzadas entre enfermedad de Lyme y sífilis que, una vez eliminadas, pueden aumentar la sensibilidad de la serología de la borreliosis de Lyme hasta

casi un 97%. Para ello deben retestarse todos los sueros positivos para *B. burgdorferi* mediante VDRL o RPR, pues la enfermedad de Lyme no produce anticuerpos detectables en las pruebas no treponémicas. En caso de persistir la duda diagnóstica, podremos realizar un Western-blot para determinar la reactividad sérica frente a *B. burgdorferi*. En contra del diagnóstico de Lyme estaría el no hallar bandas de reacción frente a antígenos específicos de *B. burgdorferi*, mientras que lo contrario hablaría a favor de la enfermedad de Lyme ¹⁴⁰.

- Las reacciones cruzadas con otras borrelias productoras de Fiebre Recurrente pueden soslayarse revisando la historia clínica y el riesgo de exposición a esta enfermedad. Otro tanto sucede con la reactividad cruzada con otros treponemas como los causantes de procesos periodontales. En ambos casos podemos emplear el Western-blot para *B. burgdorferi* y pruebas de laboratorio específicas para otras espiroquetas, intentando orientar definitivamente el diagnóstico ⁶².

- Por último aparecen reacciones cruzadas entre pacientes con enfermedad de Lyme y mujeres gestantes o multíparas, multitransfundidos, enfermos autoinmunes, infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana o por Herpes Simple y tras ciertas vacunaciones antivirales. Esto es reflejo de la presencia de anticuerpos frente al sistema HLA y anticuerpos policlonales que reaccionan también con *B. burgdorferi* ¹⁴⁰.

Los antígenos de *Borrelia burgdorferi* con mayor potencial para producir reacciones cruzadas parecen ser las proteínas de “heat shock” de 60 a 70 kilodaltons y la flagelina de 41 kDa ^{34,129}.

Para evitar todo este complejo de reacciones cruzadas, lo ideal sería usar un ELISA con antígenos recombinantes específicos de *B. burgdorferi*, estandarizar adecuadamente las técnicas de Western-blot y excluir el resto de enfermedades citadas.

Un estudio español conducido por Gutiérrez, concluye que la serorreversión en las pruebas diagnósticas de la enfermedad de Lyme en ausencia de tratamiento específico adecuado debe relacionarse con un falso resultado positivo ⁹².

3.) En pacientes con neuroborreliosis los niveles de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en LCR son mucho más bajos que en suero, por lo que, aunque disminuye la posibilidad de reacciones cruzadas, las técnicas diagnósticas han de ser mucho más sensibles. El método más empleado evalúa la secreción intratecal de anticuerpos anti- *B. burgdorferi* ²⁰¹. Para ello se realizan un EIA de captura simultáneamente en suero y LCR, midiendo los niveles de anticuerpos específicos respecto a la cantidad de anticuerpos totales. Otra solución sería correlacionar anticuerpos anti- *B. burgdorferi* en suero y LCR con otras sustancias de referencia como albúmina o anticuerpos frente al tétanos, por ejemplo. Esencialmente estos métodos tratan de corregir la filtración de anticuerpos de suero a LCR, producida a través de la barrera hematoencefálica, que puede verse dañada en caso de enfermedad neurológica por *B. burgdorferi*. Pese a ello han sido descritos falsos negativos en fases iniciales de la enfermedad neurológica hasta en el 10% de casos ⁹³.

I.8.2.4.) Evaluación de la respuesta inmunocelular.

La respuesta inmune celular aumenta conforme lo hace la duración de la enfermedad de Lyme. La reacción más temprana se produce frente al antígeno flagelar de 41 kDa de *Borrelia burgdorferi*, siendo inicialmente de células T y posteriormente de linfocitos B.

Existen 2 problemas, fundamentalmente, para emplear en el diagnóstico de la borreliosis de Lyme las pruebas de Respuesta Inmune Celular ²⁰¹:

- La respuesta de linfocitos T aparece frente a numerosos antígenos bacterianos, por lo que

las reacciones cruzadas son abundantes

- La dificultad técnica de estos ensayos.

Por todo ello, los usos de estas pruebas quedan restringidos a casos de Lyme con diagnóstico clínico bien establecido, para propósitos de investigación y quizá también a pacientes con seronegatividad mantenida pese a presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad.

I.8.2.5.) Detección genética.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LcR) se basan en la amplificación y detección de secuencias específicas del DNA de *B. burgdorferi* en muestras clínicas. Se trata de una buena alternativa diagnóstica debido a la limitada eficacia del cultivo y la falta de estandarización de la serología.

Inconvenientes en el uso de estas técnicas son la presencia de falsos positivos, por contaminación y por detección de otros microorganismos cuando la secuencia de DNA a detectar no es seleccionada cuidadosamente. También aparecen falsos negativos, en caso de muestras con muy escasa cantidad de DNA diana o por presencia de inhibidores de la Taq polimerasa²⁰¹.

Entre sus ventajas hay que destacar la rapidez diagnóstica, su gran sensibilidad y especificidad (siempre que se disponga de los cebadores adecuados) y la diferenciación de genoespecies de borrelias productoras de enfermedad de Lyme.

En general, la amplificación ha estado dirigida al locus Osp A, a varios loci cromosómicos o al gen de la proteína flagelar, regiones todas ellas cuya estabilidad genética no ha sido bien determinada. Más prometedora parece resultar la búsqueda diagnóstica mediante genes

RNA como secuencia blanco, pues son genes muy conservados. Los “primers” o cebadores más usados han sido para la búsqueda de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto por lo que las cepas europeas pueden dar falsos negativos con estas técnicas ¹³⁴.

Especialmente indicada resulta su aplicación en el diagnóstico de la neuroborreliosis debido a los bajos rendimientos de serología y cultivo, pese a que todavía las tasas conseguidas de positividad no superan el 25% ¹⁴⁷.

Por otra parte, mediante las PCR y LcR se ha conseguido disminuir el problema de la interacción de las moléculas detectoras y el DNA del huésped. Este método discrimina secuencias con diferencias mínimas, pudiendo aplicarse a la caracterización de cepas y especies de los microorganismos causantes de la enfermedad de Lyme.

En definitiva se trata de un método diagnóstico sensible y específico pero, hoy por hoy, no puede sustituir a la combinación de clínica más serología.

I.8.3.) Conclusiones.

Podemos resumir el presente diagnóstico de la enfermedad de Lyme en 3 epígrafes esenciales:

- Es fundamental establecer un diagnóstico clínico preciso mediante una buena historia que indague en los antecedentes del paciente. Deben excluirse otras causas etiológicas para aumentar el rendimiento de la serología ^{4,184}.
- Debemos considerar debidamente las limitaciones de las técnicas de laboratorio disponibles hasta la fecha ⁹⁹. La aplicación secuencial de pruebas de EIA que demuestren la presencia persistente de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* y la interpretación del WB con criterios contrastados, aumentan la rentabilidad de éstas técnicas.

- Es necesario continuar con los esfuerzos en la investigación para desarrollar pruebas diagnósticas que resulten de mayor utilidad para el clínico.

En USA los CDC recomiendan un protocolo para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme en dos escalones ⁵⁵:

1°) EIA o IFI Ig G/M para realizar un despistaje inicial de anticuerpos anti- *B.burgdorferi*.

2°) Confirmación de resultados positivos o equívocos con WB Ig G/M.

En Europa los criterios para el diagnóstico serológico no están bien establecidos y la evaluación de las pruebas de Western-blot no ha conseguido resultados suficientemente reproducibles entre los distintos investigadores. Un estudio realizado recientemente por Hauser, Wilske et al. ⁹⁸ ha intentado establecer los criterios de interpretación del WB con cepas europeas de *Borrelia burgdorferi* sensu lato :

-para Ig G frente a *B. burgdorferi* sensu stricto al menos una banda de p 83-100, p 58, p 56, alguna de las Osp C, p 21 y p17a.

-para Ig G frente a *B.afzelii* al menos 2 bandas de p 83-100, p 58, p 43, p 39, p 30, Osp C, p 21, p 17 y p 14.

-para Ig G frente a *B. garinii* al menos una banda de p 83-100, p 39, Osp C, p 21 y p 17b.

-para Ig M frente a *B.burgdorferi* s.s. al menos una banda de p 39, Osp C y p 17 a ó una banda intensa p 41.

-para Ig M frente a *B.afzelii* al menos una banda de p 39, Osp C y p 17 ó una banda intensa p 41.

-para Ig M frente a *B.garinii* al menos una banda de p 39 y Osp C ó una banda intensa de p 41.

De cualquier modo parece que en Europa conviene usar en los Western-blot cepas de *B.garinii* y *B.afzelii* mejor que de *B.burgdorferi* sensu stricto, pues la reactividad con sueros de enfermos de Lyme es mayor con las primeras cepas ⁹⁸.

I.9.) TRATAMIENTO.

Los antimicrobianos usados en el tratamiento de la borreliosis de Lyme son similares a los empleados para controlar la sífilis y otras espiroquetosis. Así, inicialmente se trataron las lesiones de Eritema Migrans con Penicilina, demostrando cierta eficacia. Más tarde, las Tetraciclinas se mostraron superiores a Penicilina y Eritromicina en un estudio terapéutico randomizado de la enfermedad de Lyme temprana. También en este trabajo se averiguó que, en la fase 2 de la enfermedad con manifestaciones neurológicas, un tratamiento adecuado era Penicilina por vía endovenosa, siendo los resultados peores en caso de artritis ¹⁹².

Las pruebas de sensibilidad de *B. burgdorferi* a antimicrobianos han sido realizadas "in vitro" y en animales de experimentación, pero no están bien estandarizadas aún. En general, *B. burgdorferi* es muy sensible a Tetraciclinas, Ampicilina, Ceftriaxona e Imipenem, moderadamente sensible a Penicilina, Oxacilina y Cloramfenicol y resistente a Aminoglucósidos, Rifampicina y Ciprofloxacina. La Eritromicina es activa "in vitro" pero no "in vivo". No se han encontrado diferencias en los patrones de sensibilidad entre cepas europeas y americanas y tampoco se han descrito resistencias adquiridas ¹⁹².

I.9.1.) Tratamiento de la enfermedad de Lyme temprana localizada.

Las tetraciclinas por vía oral se han demostrado eficaces al disminuir la duración de la sintomatología y prevenir las complicaciones posteriores ¹⁹⁷. Suele preferirse Doxiciclina al conseguir alcanzar mejores niveles tisulares, administrarse en 2 tomas diarias y producir mínima afectación gastrointestinal.

Amoxicilina es considerada un antibiótico de elección en niños con borreliosis de Lyme y una buena alternativa a Doxiciclina en adultos ¹⁹². Penicilina V presenta menos actividad y Penicilina G no tiene absorción por vía oral.

La duración terapéutica suele ser de 10 a 30 días según el régimen empleado y debe guiarse por la respuesta clínica al tratamiento, requiriendo a veces nuevos ciclos por vía oral o cambiar a administración intravenosa. Los antimicrobianos hacen desaparecer la respuesta específica de anticuerpos durante varios meses, manteniéndose la posibilidad de reinfección en veranos subsiguientes ²¹⁰.

Las pautas más empleadas durante este periodo de la infección son las que siguen ¹⁸⁶:

-Adultos: Doxiciclina 100 mgr. cada 12 horas o Clorhidrato de Tetraciclina 250-500 mgr./6 horas o Amoxicilina 250-500 mgr./6 horas, cualquiera de ellos durante 3-4 semanas.

-Niños: Amoxicilina 40 mgr. por kgr. de peso y día o Eritromicina 30 mgr./kgr./día o Fenoxi-metil-Penicilina 25-50 mgr./kgr./día, todos en dosis divididas.

Otros antimicrobianos han sido ensayados en el tratamiento de la borreliosis de Lyme, como Cefuroxima-axetil (al parecer más eficaz y con menores efectos adversos que Doxiciclina) y Azitromicina (mejor que Amoxicilina), pero los datos resultan todavía insuficientes para poder considerarlos terapéuticamente en primera línea.

I.9.2.) Tratamiento de la infección temprana diseminada y de la enfermedad tardía.

En esta fase de la enfermedad puede recurrirse a la terapia antimicrobiana intravenosa siempre que aparezcan alteraciones neurológicas objetivables, exceptuando la parálisis facial aislada y los casos sin alteración del LCR ¹⁹².

Posiblemente la droga de elección sea Ceftriaxona, pues cruza rápidamente la barrera hematoencefálica y puede administrarse en una única dosis diaria ⁶¹. La duración del tratamiento varía de 14 a 28 días. También son eficaces Penicilina y, en alérgicos a Betalactámicos, Doxiciclina o Cloramfenicol.

El tratamiento en esta fase de la enfermedad de Lyme resulta más problemático, con respuestas lentas y fracasos terapéuticos, quizá debido a daño orgánico previo e irreversible, a patología de causa inmunitaria o a infección persistente ¹⁹².

En un ensayo doble ciego se comparó con placebo la eficacia de Penicilina en pacientes con artritis de Lyme: 7 de 20 respondieron a Penicilina G benzatina intramuscular mientras que otros 20 tratados con placebo no mostraron mejoría y, por último, 11 de 20 que habían recibido Penicilina intravenosa curaron ¹⁹⁵.

Otro estudio posterior, conducido por Dattwyler et al. en 23 pacientes con alteraciones neurológicas tardías y artritis de Lyme, encontró que 5 de 10 enfermos tratados con Penicilina endovenosa no respondieron mientras que sólo 1 de 13 que recibieron Ceftriaxona no experimentó mejoría ⁶¹.

Más recientemente, un ensayo clínico realizado en enfermos con artritis de Lyme halló una tasa de fracaso terapéutico similar en todos los grupos estudiados, incluyendo los tratados con Doxiciclina oral, Amoxicilina.-probenecid, Penicilina intravenosa y Ceftriaxona. Los títulos de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* declinaron de 4 a 6 veces en el año siguiente al éxito terapéutico, aunque todos los pacientes permanecieron siendo seropositivos ¹²¹.

En caso de bloqueo atrioventricular de alto grado o cardiomegalia suelen emplearse Ceftriaxona o Penicilina intravenosas ¹⁹².

Las pautas terapéuticas de mayor uso en esta fase son ¹⁸⁶:

-Adultos: Ceftriaxona 2 gr./día (ó 1 gr./12 horas) o Cefotaxima 3 gr./12 horas o Penicilina G 20.000.000 U. cada 4 horas o Cloramfenicol 50 mgr./kgr./día en dosis divididas.

-Niños: Ceftriaxona 75-100 mgr./kgr./día o Cefotaxima 90-180 mgr./kgr./día o Penicilina G 300.000 U./kgr./día en dosis divididas.

I.9.3.) Papel de los Corticoides en el tratamiento de la Borreliosis de Lyme.

El uso de los esteroides en la terapéutica de la enfermedad de Lyme es un tema controvertido ¹⁹². Así un ensayo encontró que la administración de corticoides previa a la de antibióticos se asoció con fracasos terapéuticos. En cambio otro estudio similar obtuvo resultados diferentes. Un trabajo retrospectivo de 124 casos de parálisis facial por enfermedad de Lyme observó que la duración de este cuadro fue similar para el grupo que recibió antimicrobianos exclusivamente que para el de los que también recibieron esteroides y el de los que no siguieron ningún tratamiento.

En enfermos con carditis de Lyme con mala respuesta a antimicrobianos puede estar indicada la terapia esteroidea. Así mismo, en artritis de Lyme que no responde a antibióticos pueden emplearse los corticoides intraarticularmente ¹⁹².

I.9.4.) Respuestas pendientes.

Varios temas referentes al tratamiento de la enfermedad de Lyme permanecen sin resolver:

- La conveniencia de realizar o no profilaxis antibiótica en caso de picaduras por garrapatas en zonas endémicas de Lyme.

- En general existe consenso para monitorizar y no tratar de entrada la infección asintomática por *Borrelia burgdorferi*, pues no se dispone de estudios longitudinales que demuestren beneficios del tratamiento de seropositivos subclínicos.
- No hay una tendencia clara todavía respecto al tratamiento de esta borreliosis durante el embarazo.
- Persisten las dudas sobre dosis y duración terapéutica, especialmente en pacientes con mala respuesta al tratamiento. En cualquier caso debemos tener en cuenta la lenta resolución de la enfermedad pese a haberse instaurado una terapia adecuada ^{186,192}.

I.10.) CONTROL Y PREVENCIÓN.

I.10.1.) Conceptos generales.

La mayoría de medidas empleadas para la prevención de la Borreliosis de Lyme están destinadas al control del vector de la enfermedad. Para mantener controladas, especialmente en zonas geográficas con alta endemia de la infección, la población de garrapatas transmisoras de *B. burgdorferi* se han intentado diversos métodos ¹⁵². Así se ha actuado sobre hospedadores como los ciervos, desplazando los rebaños y tratándolos con acaricidas. En general los resultados fueron pobres, aunque disminuyó el número de larvas de *Ixodes* al verano siguiente, declinando posteriormente la cantidad de ninfas y formas adultas.

Mather y col., utilizando algodón tratado con permetrín (empleado por los ratones para construir sus nidos), observaron disminuciones de hasta el 90% en el número de garrapatas portadas por estos ratones respecto a los de otras áreas no tratadas. Schulze et al. comunicaron reducciones del 97 al 100% en las cifras de *I. scapularis* adultas, tras aplicar insecticidas al terreno después de la caída de la hoja en otoño. Sin embargo, parece que esta aplicación de insecticidas sólo es eficaz si se mantiene a lo largo del tiempo, puesto que el ciclo completo de las garrapatas dura más de dos años. La destrucción del hábitat de las garrapatas, mediante el fuego o siegas radicales, puede también reducir localmente la abundancia de formas adultas. Sin embargo el número de ninfas puede incrementarse posteriormente, una vez que la hierba fresca haya rebrotado. En cualquier caso, la diversidad de reservorios competentes de esta enfermedad hace que la utilidad de las medidas aplicadas sobre una sólo especie sea escasa ²⁵.

La efectividad potencial de la aplicación comunitaria de todas estas medidas para prevenir la enfermedad de Lyme, permanece desconocida hasta el momento.

En ausencia de recursos para controlar las garrapatas, la mejor profilaxis en las zonas endémicas de borreliosis de Lyme sigue siendo la prevención primaria ^{25,152}. Estas áreas endémicas son identificadas por los programas de seguimiento de los casos de Lyme, sus garrapatas vectoras o mediante seguimiento serológico en roedores, otros animales y humanos. Se trata fundamentalmente de establecer medidas de protección personal, entre las que tenemos:

- Evitar las áreas infectadas por garrapatas durante los meses cálidos.
- Usar ropas protectoras y repelentes de ácaros..
- Exámenes corporales diarios para descubrir la existencia de garrapatas fijadas en zonas corporales escondidas (axilas, pezones, hueco poplíteo,...). La eliminación de estos parásitos, realizada diariamente, disminuye el riesgo de transmisión de *Borrelia burgdorferi*, pues las garrapatas necesitan alimentarse durante al menos 24 horas para poder pasar las espiroquetas al huésped.

Por otra parte, el reconocimiento precoz de síntomas y signos de la enfermedad y una terapéutica antimicrobiana adecuada, pueden prevenir la aparición de manifestaciones tardías y complicaciones.

I.10.2.) Quimioprofilaxis.

La profilaxis antimicrobiana en sujetos mordidos por garrapatas no está recomendada formalmente , como ya dijimos antes ¹⁵². Falco y Fish estudiaron a 71 personas con

antecedentes documentados de picaduras por *Ixodes scapularis* en Westchester County (New York), zona donde casi la mitad de las ninfas y hembras de esta garrapata están infectadas por *B.burgdorferi*. 29 de un total de 49 individuos que consultaron al médico por mordedura de *Ixodes*, fueron tratados preventivamente con antibióticos. Ninguno de ellos desarrolló Eritema Migrans en el lugar de la picadura. Únicamente 2 personas de las 40 que no recibieron quimioprofilaxis presentaron lesiones de EM.

Por su parte Castello et al. en 1989 hallaron que el riesgo de reaccionar de forma adversa a un antimicrobiano era aproximadamente igual al riesgo de desarrollar la enfermedad de Lyme tras una picadura de garrapata. En general, aunque la quimioprofilaxis de la borreliosis de Lyme sigue siendo un tema de debate abierto, existe un consenso dirigido más hacia el tratamiento precoz de la enfermedad sintomática que a la prevención.

I.10.3.) Inmunoprofilaxis.

Actualmente no se dispone de vacunas aprobadas formalmente para prevenir la borreliosis de Lyme. Se han ensayado distintas inmunizaciones con resultados dispares. Johnson et al.¹⁰⁴ administraron a hamsters una vacuna de células completas de *Borrelia burgdorferi* inactivada en dosis única. Trás 30 días, hallaron protección frente a la infección entre el 86 y el 100% de los animales. Aunque estos resultados no pueden ser extrapolados a seres humanos, sirvieron de base para realizar una vacuna para inmunizar a perros, la cual en estudios experimentales resultó protectora¹²⁶.

El desarrollo de una vacuna eficaz para el hombre resulta complicado por varios factores

- La variabilidad antigénica entre distintas cepas de *Borrelia burgdorferi* y a lo largo de la evolución de la infección.
- La dificultad para diseñar un ensayo clínico para la vacuna de la borreliosis de Lyme. En primer lugar, la incidencia de esta enfermedad en áreas endémicas es del 1.5 al 3.3%, por lo que sería necesario enrrolar un gran número de participantes para el estudio y evaluar cada caso respecto a la exposición previa a *Borrelia burgdorferi*.
- Además la inmunización activa conduce a la producción de anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi*, impidiendo la posibilidad de medir los niveles de estos anticuerpos para valorar el curso de la infección.
- Por último, el control de la eficacia de la vacuna estaría basado en la prevención de la aparición de manifestaciones clínicas, incluyendo artritis y secuelas neurológicas tardías. Evaluar estos datos, en un ensayo clínico con numerosos sujetos, supone claramente importantes dificultades:
- La borreliosis de Lyme es una enfermedad transmitida por garrapatas, de importancia en determinadas áreas geográficas. El uso de una vacuna quedaría limitado a individuos con alto riesgo de exposición en zonas endémicas para la infección. Las casas comerciales pueden considerar que el mercado para esta vacuna es insuficiente en relación a los costes necesarios para su producción.
- El impacto de esta vacuna en Salud Pública puede ser también limitado, al ser la borreliosis de Lyme una enfermedad diagnosticada y tratada con éxito en la mayoría de casos.

De cualquier manera, la morbilidad de la borreliosis de Lyme en algunas zonas geográficas es elevada (hasta el 10% de la población puede estar infectada), lo que mantiene a la

vacunación como medida con futuro en la prevención de esta enfermedad.

Así, la mayor parte de los trabajos realizados se han centrado en el desarrollo de una vacuna resultado de productos recombinantes del DNA de *B.burgdorferi*, especialmente sobre las lipoproteínas de superficie externa ¹⁰⁶:

- estudios experimentales con animales han demostrado que la inmunización con Osp A y Osp B protegieron a ratones de la infección por cepas vivas de *B.burgdorferi* ⁷⁵. Otro trabajo similar, esta vez empleando Osp C, resultó igualmente eficaz ¹⁶⁸.

- también se han ensayado vacunas en humanos (voluntarios sanos y sujetos con enfermedad de Lyme previa) utilizando Osp A recombinante, obteniendo buena inmunogenicidad y seguridad ^{111,180}.

- otra vacuna en investigación se basa en una proteína de fusión de 100 kda., derivada de la porción terminal de la proteína de 70 kda. de *Borrelia burgdorferi* ³².

I.11.) CUESTIONES PENDIENTES DE RESOLUCION.

I.11.1.) Epidemiología y diagnóstico.

El mayor impedimento para conocer mejor la epidemiología de la borreliosis de Lyme es la carencia de criterios objetivos para definir los casos de esta enfermedad. Por un lado, las manifestaciones clínicas pueden desarrollarse a lo largo de varios meses e incluso años, debiendo realizarse diagnóstico diferencial con numerosas alteraciones neurológicas y reumatológicas. Por otra parte, la clínica es bastante inespecífica y tampoco disponemos de pruebas diagnósticas de laboratorio bien estandarizadas y concluyentes. La borreliosis de Lyme origina problemas epidemiológicos propios tanto de enfermedad infecciosa como de enfermedad crónica.

Por otra parte las pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico resultan ser poco sensibles durante la enfermedad temprana y poco específicas en estadios más tardíos. Además hay riesgo de reacciones cruzadas con otros microorganismos y células del propio huésped.

Por todo ello es necesario mejorar las técnicas diagnósticas, incorporando las pruebas de detección genética (PCR, LcR), la determinación de antígenos de *Borrelia burgdorferi* en tejidos o secreciones orgánicas y nuevos EIA y WB con mayor valor predictivo.

Es importante también, evaluar el impacto de esta infección en los animales domésticos y el ganado, tanto por la posible transmisión a humanos como por razones económicas.

Un problema que impide comprender mejor la enfermedad de Lyme en animales es la falta

de conocimientos sobre la distribución de otras borrelias en la naturaleza y su relación con *Borrelia burgdorferi*. El conocimiento detallado de la distribución geográfica de los vectores de la infección y su abundancia establecerá el riesgo que existe para contraerla por el ser humano ²⁵. En términos de seguimiento epidemiológico de la enfermedad, resulta mucho más eficaz aislar *B.burgdorferi* de las garrapatas o de sus reservorios que aislarla en el humano afectado, pues la endemia de esta antropozoonosis no depende del hombre (huésped no competente) si no de los reservorios animales (especialmente roedores) ¹⁶⁵. Además resulta más útil buscar *B.burgdorferi* por PCR que cultivarla, dada la mayor sensibilidad de la primera técnica ¹⁷⁴.

I.11.2.) Control y Prevención.

En este apartado existen varios puntos controvertidos y pendientes de solución:

- El control de áreas geográficas extensas infectadas por garrapatas resulta muy dificultoso.
- La eliminación de animales hospedadores de *Ixodes* en zonas endémicas de Lyme es poco rentable, ya que estos vectores cambian fácilmente de huésped. Así la reducción selectiva de animales habitualmente parasitados por garrapatas, podría aumentar el número de estos artrópodos a la búsqueda de un huésped alternativo, lo que supondría un mayor riesgo de transmisión de *Borrelia burgdorferi* al ser humano.
- Las estrategias de control de garrapatas, en zonas localizadas, mediante insecticidas han de ser evaluadas desde una perspectiva clínica. En algunos casos estos métodos consiguen eliminar las formas adultas de *Ixodes*, manteniéndose activas las ninfas, con lo que persistiría el riesgo de la infección.

- En general, el comportamiento humano y la respuesta medio ambiental deben considerarse siempre a la hora de diseñar estrategias de control de cualquier enfermedad infecciosa.

OBJETIVOS

II) OBJETIVOS.

II.1.) SITUACIÓN ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DE LYME EN ESPAÑA.

Tras lo expuesto en la introducción y lo publicado en los últimos años, podemos decir que la Borreliosis de Lyme es una enfermedad distribuída ampliamente por la geografía española. La bibliografía al respecto es abundante, abarcando la descripción de casos y algunas series, estudios de seroprevalencia realizados en grupos humanos sanos y enfermos, así como algunos trabajos en posibles reservorios animales y en vectores de *Borrelia burgdorferi*.

Los resultados publicados son diversos pero coinciden en que tanto los casos de enfermedad de Lyme como la seroprevalencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, muestran un claro predominio en la mitad norte peninsular, coincidiendo con la distribución del vector *Ixodes ricinus*⁵. De cualquier modo hemos de resaltar la escasez de datos disponibles en la zona sur e insular española, lo cual por supuesto no descarta la existencia de la infección en estas áreas.

Por otra parte, la variación en la prevalencia de la Borreliosis de Lyme en las distintas zonas geográficas de nuestro país, coexistiendo regiones con alta endemia y otras de muy baja incidencia, obliga a realizar estudios epidemiológicos mejor diseñados y más ambiciosos que valoren el impacto real de la infección en España.

En cuanto a los vectores de *Borrelia burgdorferi*, aún no conocemos la distribución exacta de *Ixodes ricinus* en nuestro medio, pese a que parece demostrado su papel en la transmisión de la espiroqueta tras los estudios realizados en La Rioja por Oteo y Estrada^{70,154} y también Barral et al. en El País Vasco²⁶.

Así mismo ya existen cepas españolas de *B. burgdorferi* caracterizadas (García Moncó et al.⁸⁰, Escudero et al.⁶⁸) y aisladas de *I. ricinus* y también de pacientes con Eritema migrans. Los conocimientos sobre otros posibles vectores de la enfermedad de Lyme en España tampoco son determinantes, habiéndose incriminado numerosas especies de *Ixodes*¹⁵⁴ e incluso *Rhipicephalus* spp.¹³⁸ en la transmisión de la infección.

Refiriéndonos a los reservorios de *Borrelia burgdorferi*, los datos españoles son muy escasos todavía, aunque podemos presuponer que los publicados en países de nuestro entorno son extrapolables. Estudios hechos en La Rioja¹⁵⁸ y Asturias¹⁶ han relacionado al ganado con el mantenimiento de la infección en estas áreas geográficas, pero también se ha incriminado al perro^{49,138} e incluso a los pájaros¹⁵⁷ en la epidemiología de la enfermedad.

Por último hemos de señalar las dificultades con que el médico se encuentra al intentar diagnosticar la Borreliosis de Lyme en nuestro país, debido a varias razones:

- el cuadro clínico de la enfermedad es proteiforme, a menudo insidioso y con evolución variable.
- las pruebas de laboratorio utilizadas para confirmar el diagnóstico no están suficientemente estandarizadas, existiendo gran variabilidad de resultados según las distintas técnicas, los distintos centros y su valoración.
- no se dispone de kits comerciales para diagnóstico serológico que empleen antígenos de las cepas de *B. burgdorferi* autóctonas de cada país.

- en el área mediterránea cexisten otras infecciones por *Borrelia hispánica*, hoy renombrada *B. iberica* ⁶⁸, e incluso por *Brucella* spp. con epidemiología, clínica y reacciones serológicas cruzadas que complican todavía más el diagnóstico de esta enfermedad.

II.2.) OBJETIVOS DE LA TESIS.

II.2.1.) Valorar la presencia en suero de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en una población humana compuesta por voluntarios sanos residentes en la isla canaria de Lanzarote.

El estudio resulta de particular interés al no existir datos sobre la enfermedad de Lyme en esta zona insular española y al tratarse de un hábitat cerrado, con clima casi desértico y escasas flora y fauna. El estudio se realizó por grupos de edad, sexo y zona geográfica de residencia, separándose incluso un grupo de riesgo formado por pastores de cabras.

II.2.2.) Evaluar la seroprevalencia de anticuerpos frente a *B.burgdorferi* en el ganado local, compuesto casi exclusivamente por cabras, en un intento de buscar posibles reservorios de la infección.

El estudio se realizó valorando rebaños de cabras pertenecientes a las distintas áreas geográficas de Lanzarote.

II.2.3.) Correlacionar los distintos datos obtenidos del estudio entre sí y con los publicados en otras zonas.

Este último objetivo intenta concluir la existencia o no de la Borreliosis de Lyme en Lanzarote y si el ganado caprino es un posible reservorio de la infección en la isla.

II.2.4.) Estudiar las garrapatas de la isla.

Puesto que no se disponía de datos previos sobre las especies de garrapatas de Lanzarote, se intentó catalogar estos ácaros, vectores comprobados de la infección en numerosas zonas geográficas.

MATERIAL Y METODOS

III) MATERIAL Y METODOS.

III.1.) LOCALIZACION DEL ESTUDIO.

III.1.1.) Medio Físico ¹⁶¹.

Lanzarote es la isla más nororiental del archipiélago canario, el cuál consta de otras 6 islas (Tenerife, Gran Canaria, Fueteventura, La Palma, Gomera e Hierro) y varios islotes. Se halla situada en el océano Atlántico entre los 28° 50' y los 29° 15' de latitud Norte y entre los 13° 25' y los 13° 52' de latitud Oeste del meridiano de Greenwich, a 60 millas del continente africano.

El origen geológico de la isla es volcánico, procediendo la cuarta parte de su extensión de erupciones recientes acontecidas entre los siglos XVIII y XIX, especialmente la zona de Timanfaya.

Tiene una extensión de 846 Km² , incluidos islotes periféricos. Su morfología es ovalada con dos apéndices, uno nororiental y otro suroccidental (Figura 1). Se trata de una isla llana con alturas moderadas. La mayor de ellas es el macizo de Famara (670 m. sobre el nivel del mar), al Norte, conformado por el volcán de La Corona que generó un amplia zona de malpaís (cenizas y escorias volcánicas) en todo el extremo nororiental insular. Al Sur de la isla se localiza otro macizo volcánico, Los Ajaches, cuya cota máxima es la Atalaya de Femés con 608 m. de altitud.

III.1.2.) Clima y Flora ¹⁶¹.

El clima de Lanzarote es casi desértico debido a su emplazamiento cercano al Ecuador, a su orografía llana y las escasas lluvias recogidas (menos de 150 mm³ al año).

El viento predominante en la isla es el Alisio, que sopla de Nordeste a Suroeste barriendo Lanzarote a lo largo de su eje transversal. Demuestra una especial intensidad en los meses de Junio y Julio y, aunque es un viento húmedo, las escasas cotas montañosas de la isla impiden que resulte beneficioso. Otro viento frecuente es el aire sahariano (seco, caliente y con polvo en suspensión) que es frecuente y desigual, produciendo las máximas temperaturas anuales entre los meses de Julio a Septiembre. Existe una corta época de lluvias que se extiende de Noviembre a Enero, siendo las horas de sol contabilizadas en el año 1991 más de 3000.

Las temperaturas medias oscilan entre 15 y 25°C con mínimas superiores a los 10° y máximas inferiores a los 30°C. Las temperaturas más bajas se producen durante los meses centrales del invierno, debido a las borrascas que llegan del Norte, y durante el mes de Junio por el predominio de los Alisios. Esta estabilidad climática y la moderación en las temperaturas se debe fundamentalmente a la Corriente Fría de Las Canarias.

La vegetación de Lanzarote es xerófila, predominando en la zona Sur y Este las aulagas (*Launea arborescens*) y los matos. En la zona Norte abundan los arbustos del género *Euphorbia*, como tabaibas y cardones. Entre los árboles sólo citar la palmera canaria especialmente frecuente en el Norte.

III.1.3.) Fauna salvaje ¹⁶¹.

Entre la fauna lanzaroteña debemos diferenciar animales autóctonos, que colonizaron la isla hace miles de años, de animales importados, los cuales llegaron en épocas mucho más recientes. Únicamente nos referiremos a los animales salvajes que pudieran ser parasitados potencialmente por garrapatas, conocidos vectores de *Borrelia burgdorferi*.

Entre los reptiles destacan tres:

- Salamanesca (*Tarentola augustimentalis*), que se halla bajo las piedras en las zonas más áridas de la isla.
- Lagarto, variedad *Gallotia atlantica atlantica*.
- Lisa (*Chaloides occidentalis*), endémica de Fuerteventura y muy escasa en Lanzarote.

En cuanto a los mamíferos tenemos:

- Musaraña canaria (*Crocidura canariensis*), autóctona de esta isla.
- Erizo moruno (*Atelerix algirus*), introducido desde Fuerteventura aunque originario de Marruecos.
- Conejo (*Oryctolagus cuniculus*), llegado con la conquista de Canarias en los siglos XIV y XV.
- Múridos: ratón doméstico (*Mus musculus*), rata negra (*Rattus rattus*) y rata marrón (*Rattus norvegicus*), todos ellos habitantes urbanos y periurbanos.
- Murciélagos, de los cuales existen varias especies censadas.

Por último están las aves, muy numerosas, unas residentes de la isla y otras migradoras.

Más de 60 especies nidifican aquí y de ellas 3 invernan en Africa:

- Halcón de Eleonor (*Falco eleonorae*).
- Vencejo pálido (*Apus pallidus brehmorum*).
- Tórtola común (*Streptopelia turtur turtur*).

III.1.4.) Garrapatas.

En el momento del inicio de este trabajo las garrapatas de Lanzarote no habían sido estudiadas nunca, desconociéndose las especies habitantes de la isla. La revisión realizada por Baéz en 1986 de los artrópodos zooparásitos canarios, no menciona garrapatas del género *Ixodes* recolectadas en Lanzarote. Las garrapatas presentes en el archipiélago según este catálogo eran:

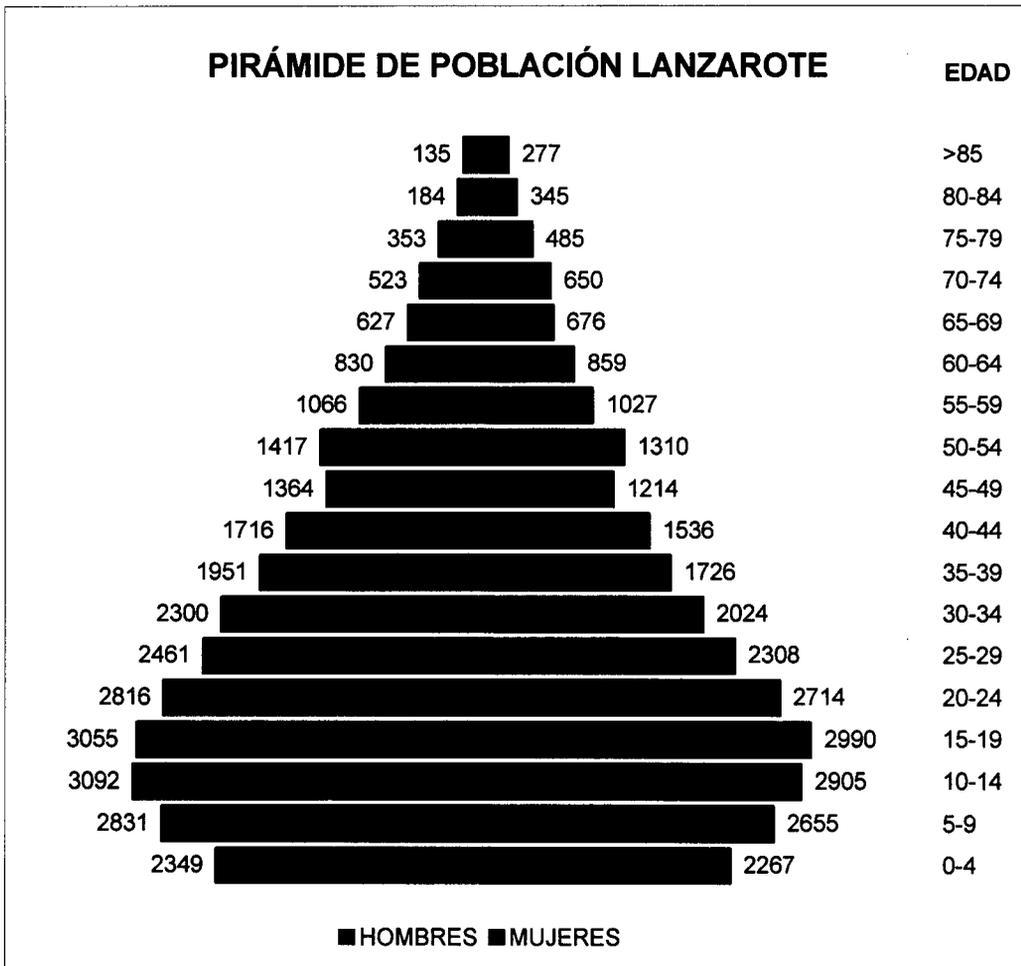
- *Rhipicephalus pusillus*, parásito del erizo de Gran Canaria.
- *Rhipicephalus sanguineus*, recogido en perros de Tenerife y erizo de Gran Canaria.
- *Haemaphysalis sulcata*, en la isla de Tenerife.
- *Haemaphysalis punctata*, parasitando lisas y salamanquesas en Tenerife.
- *Hyalomma detritum*, en Tenerife.
- *Hyalomma dromedarii*, en dromedarios.
- *Hyalomma lusitanicum*, en Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura.

Toda esta variedad de garrapatas fue recogida por la distintas islas del archipiélago canario sobre reptiles, mûridos y animales domésticos (perros, dromedarios). Hasta el momento de inicio de este trabajo no había datos concretos sobre las garrapatas de Lanzarote ni sobre las que parasitan aves en todas las islas Canarias.

III.1.5.) Población Humana.

Según el padrón municipal de 1986 la población de derecho de Lanzarote era de 57.038 habitantes ⁵⁷. Se trata de una población joven, repartida por sexos prácticamente al 50%, formando una pirámide simétrica con base ancha (figura 2).

Figura 2.



Está distribuída en 7 municipios (Figura 1). Uno de ellos, eminentemente urbano, es

Arrecife que agrupa más del 55% de la población total. Otros tres, de hábitat semiurbano y compuestos por pequeños núcleos turístico-residenciales costeros y casas de campo, son Tías, San Bartolomé y Teguisse. Por último están Tinajo, Haría y Yaiza, todos ellos rurales. Para nuestro estudio consideramos Arrecife como el único municipio perteneciente al medio urbano, agrupando al resto de las poblaciones insulares en el hábitat rural. En todos los municipios existen, además de las unidades poblacionales que les dan nombre, pequeñas agrupaciones de viviendas formando caseríos y aldeas . Finalmente destacaremos un amplia zona deshabitada, Timanfaya, con unos 200 Km² comprendidos enter los municipios de Tinajo y Yaiza, en la zona suroccidental de la isla.

La densidad de población es variable con cifras que oscilan desde los 1492 habitantes por Km² en Arrecife hasta los 24 ó 18 habitantes/Km² de Teguisse y Yaiza respectivamente (tabla número IV).

Tabla IV.

MUNICIPIO	Nº HABITANTES	DENSIDAD(habitantes/km ²)
ARRECIFE	31674	1492
TEGUISE	6447	24
TIAS	5724	88
SAN BARTOLOME	5231	127
TINAJO	3217	91
HARIA	2759	26
YAIZA	1986	18

III.1.6.) Ganadería ¹⁶¹.

El origen de la ganadería en Lanzarote se remonta a etapas prehistóricas en las que ya existían rebaños de cabras y ovejas. Las colonizaciones europeas introdujeron en el archipiélago canario nuevos animales y ganado que se cruzaron con las razas autóctonas.

La ganadería actual de la isla está formada casi exclusivamente por cabras, en concreto una variante de la cabra común (*Capra hircus*), que procede del cruce de la cabra autóctona lanzaroteña con otras procedentes de Europa y el norte de África. Esta cabra, que se encuentra en mucho mayor número en la isla de Fuerteventura, es denominada por ello cabra majorera y equivale en la práctica a la cabra canaria. Se halla muy adaptada a la aridez climática de esta zona y es una gran productora de leche.

III.1.6.1.) Censo caprino.

Los datos del censo caprino entre los años 1960 y 1984 tienen numerosas lagunas y proceden de fuentes sin contrastar. A partir de 1989 con la creación del Complejo Agroindustrial de Tegüise, dependiente del Cabildo Insular de Lanzarote, disponemos de datos más fieles sobre el número de cabezas caprinas municipio por municipio de la isla.

En 1960 aparecían censadas unas 12000 cabras, produciéndose un lento descenso hasta el año 1974 en el que la cifra era de 8500 cabezas. A partir de 1978 el declive es aún mayor (5300 animales) hasta 1984, año en el que el censo caprino insular se elevaba a sólo 4700 cabras. Este descenso en la actividad ganadera se produjo conforme aumentaba el turismo, desarrollándose sectores como la construcción, la hostelería y los servicios en general.

Entre los años 1989 a 1992 sí disponemos de un censo caprino exacto, reflejado por

municipios y con totales anuales (tabla V) .Así en el año de nuestro estudio, 1991, el censo ascendió a 9787 cabras. La recuperación de la cabaña ganadera hasta cifras similares a las de hace 30 años fue auspiciada por el Complejo Agroindustrial de Tegui se, creando una Central Lechera y Quesera a través de la cual se comercializa la producción láctea de casi todas las explotaciones ganaderas de la isla.

Tabla V.

MUNICIPIO/AÑO	1989	1990	1991	1992
ARRECIFE	190	145	513	504
TEGUISE	3819	5291	4996	6651
TIAS	179	391	260	195
S.BARTOLOME	299	188	1000	771
TINAJO	477	594	1112	1035
HARIA	502	335	661	765
YAIZA	528	774	1245	1655
TOTAL/AÑO	5994	7718	9787	11576

El aumento de animales se ha producido especialmente por la importación de cabras de Fuerteventura, elevando el censo sobre todo en rebaños de Yaiza, Arrecife, San Bartolomé, Tinajo, Tegui se y Haría, por este orden.

III.1.6.2.)Explotaciones ganaderas.

Según datos del año 1991 existían 117 explotaciones ganaderas en Lanzarote, casi todas con menos de 100 cabezas cada una. Solamente el 7.6% de estas explotaciones tenían más de 200 cabezas. Su localización es la que sigue: 63 pertenecían al municipio de Teguiise, 14 a Tinajo, 11 a San Bartolomé, 9 a Yaiza, 7 a Haría, 7 más a Tías y 6 a Arrecife. Algunas cabrerizas se localizaron cerca de las viviendas de los pastores y otras en descampados.

Todos los ganaderos habían realizado compras de nuevos animales durante la época de los 80, procedentes de Fuerteventura u otras explotaciones de Lanzarote. Esto resulta especialmente importante en el caso de un propietario de Teguiise, poseedor de casi 2000 cabezas en 1991, activo importador/exportador de animales en Fuerteventura, Lanzarote y ocasionalmente otras islas.

En zonas rurales lanzarotefías es práctica frecuente poseer un pequeño número de cabras (de 1 a 4) para uso particular, las cuales escapan al control del censo y suelen quedar al cuidado de las mujeres de la familia propietaria mientras que los grandes rebaños suelen pertenecer a los varones.

III.1.6.3.)Actividad ganadera por municipios.

La proporción de número de habitantes/ número de cabras en cada municipio permite establecer qué municipios tienen importante actividad ganadera y cuáles no la tienen.

Así son municipios ganaderos Teguiise, Yaiza y Tinajo con una proporción número de cabras/ número de habitantes \geq a 0.25. Por otra parte son municipios poco ganaderos, con una proporción menor de 0.25, Haría, San Bartolomé, Tías y Arrecife. Estas cifras se obtienen tomando como referencias el censo de habitantes de 1986 y el censo medio

caprino de los años 1989 al 1992.

También puede valorarse la actividad ganadera por municipios según el porcentaje de habitantes propietarios de ganado en cada pueblo. Así los municipios ganaderos tienen su población formada por al menos un 0.4% de propietarios de cabras.

III.1.6.4.)Sistemas de explotación.

El sistema tradicional de ganadería extensiva en la isla se basaba en la libertad de pasto de los animales. En zonas como el malpaís de La Corona las cabras se hallan sueltas extendidas por amplios territorios, incluso sin agruparse en rebaños. Únicamente vuelven a sus apriscos para abrevar, ser ordeñadas y comer forraje. Es una reminiscencia de las antiguas formas de explotación ganadera.

Más recientemente los sistemas de explotación son mixtos: régimen extensivo, pues el pastor lleva y cuida al rebaño en las zonas de pastos y régimen de estabulación, pues los animales reciben forraje, pernoctan, son ordeñados y crían en cabrerizas. La tendencia actual es modernizar e higienizar las instalaciones para que la estabulación sea cada vez más permanente. La mayoría de las explotaciones ganaderas de Lanzarote tienen un régimen mixto de estabulación y extensivo. En el caso de las pequeñas unidades familiares dedicadas a la cría caprina, los animales son estabulados en cabrerizas situadas junto a las viviendas de los propietarios.

La parasitación por garrapatas es frecuente en las cabras, en todos los municipios de la isla por igual, especialmente al final de invierno y principio de primavera. Al plantearse los objetivos del presente trabajo no se disponía de datos sobre las especies de garrapatas que habitan Lanzarote.

III.1.6.5.)Ganado no caprino.

Como ya dijimos, el resto de ganado presente en la isla es muy escaso, aunque existen algunas cabezas de ovejas (669 animales según el censo de 1991) mezcladas con cabras y sin formar rebaños separados, siendo la representación bovina prácticamente inexistente (5 vacas estabuladas permanentemente en Haría).

Por último reseñar que en el año 1991 se censaron unos 150 dromedarios que son utilizados por el sector turístico, estando estabulados permanentemente con cuidados y desparasitados regulares.

III.2.) ESTUDIO DE PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- *Borrelia burgdorferi* EN SUEROS HUMANOS Y CAPRINOS DE LANZAROTE.

Según los objetivos marcados para este trabajo, citados en el apartado “Planteamiento del problema”, describiremos a continuación el estudio de prevalencia de anticuerpos frente a *B.burdorferi* en suero, realizado en población sana (usuarios del INSALUD y donantes de sangre), en un grupo de riesgo formado por pastores de cabras y en el ganado caprino predominante en la isla.

III.2.1.) Seroprevalencia de anticuerpos anti- *Borrelia burgdorferi* en la población general.

La selección de la muestra se realizó entre sueros de Donantes de Sangre y Usuarios del INSALUD, excluidas enfermedades infecciosas, con los criterios que se especificarán después. Una vez determinado el tamaño muestral se realizó un muestreo aleatorio estratificado por edad, sexo y municipio, tomando como referencia el Censo de 1986⁵⁷.

III.2.1.1.)Tamaño muestral.

El tamaño de la muestra se determinó basándose en un estudio piloto previo sobre seroprevalencia de anticuerpos frente a *Coxiella burnettii* en la población de Lanzarote¹⁶². Estableciendo un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 2.5%, el tamaño

muestral se calculó aplicando la fórmula :

$$N = \{ Z^2 (P (1 - P)) / D^2$$

siendo N el tamaño de la muestra, Z el coeficiente de entorno (1.9595), P la prevalencia esperada (0.059) y D el máximo error tolerable (0.025).

El resultado obtenido fué de 339 sueros, aunque se decidió triplicar la cifra en un intento de mejorar la calidad estadística del trabajo. Así, finalmente, el tamaño muestral quedó fijado en 1016 sueros.

Una vez determinada la muestra objeto del estudio, se estratificó por edades, sexo y municipios de residencia, según el Censo de 1986.

III.2.1.2.)Selección de la muestra.

Los 1016 sueros extraídos procedían de:

- Donantes de Sangre: se pretendió obtener la mayor parte de la muestra de este colectivo, considerado carente de enfermedades infecto-contagiosas. Sin embargo, al no incluir niños ni mayores de 65 años, además de componerlo un menor número de mujeres, sólo pudieron recogerse 207 sueros, 163 de hombres y 44 de mujeres.
- Usuarios del INSALUD: completaron la muestra. Sus datos demográficos y motivo de consulta fueron correctamente especificados, seleccionándose sueros de usuarios cuya causa de análisis no estuviera relacionada con epidemiología de enfermedad infecciosa. Se excluyeron también pacientes con alteraciones inmunitarias. Las muestras fueron seleccionadas al azar según eran recibidas en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General de Lanzarote (el cuál recibe muestras de todos los municipios insulares), hasta completar un sistema de cuotas ajustado según especificaciones de edad, sexo y municipio

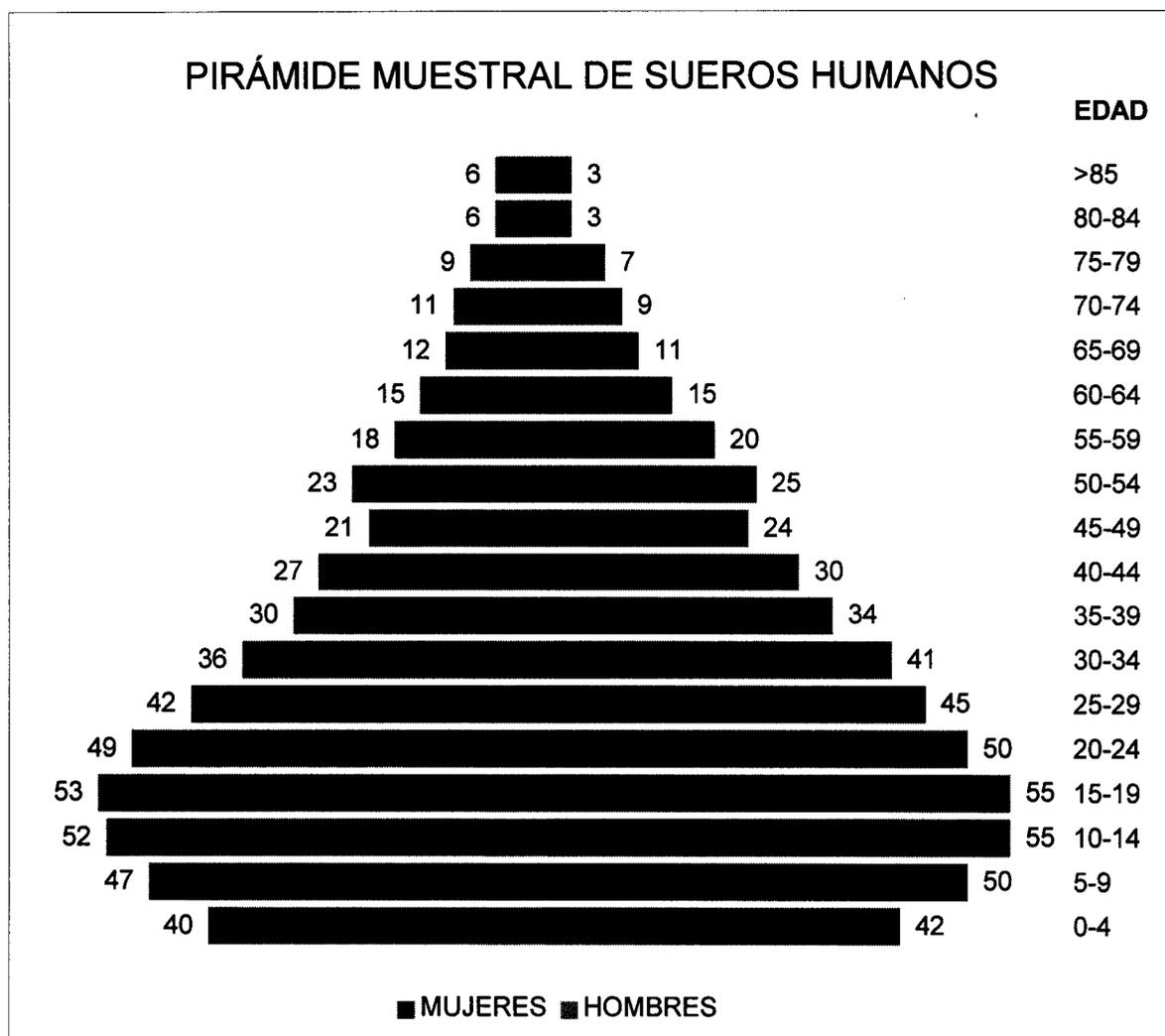
de origen, previamente establecidas a partir de datos censales de 1986 (tabla 4). En total se recogieron 809 sueros, 356 pertenecientes a varones y 453 a mujeres, con edades comprendidas entre 0 y 87 años (Media aritmética = 43.5 años). En todos los casos citados se requirió y consiguió la conformidad del paciente o donante.

Las muestras fueron recogidas a lo largo del año 1991, conservándose a -20°C hasta su estudio. Para evitar la duplicación de sueros, se supervisaron los datos de filiación de Donantes de Sangre y Usuarios del INSALUD.

En resumen, la muestra global ascendió a 1016 sueros, 519 pertenecientes a hombres y 497 a mujeres, con edades desde los 0 a los 87 años y agrupados en grupos con intervalos de edad de 10 años.

Por municipios los sueros procedieron 558 de Arrecife, 119 de Teguiise, 101 de Tías, 94 de San Bartolomé, 62 de Tinajo, 50 de Haría y 42 de Yaiza. La distribución por edades y sexo se expresa en una pirámide (Figura 3), reflejo de la pirámide poblacional original.

Figura 3.



III.2.1.3.)Análisis serológico.

Los sueros humanos fueron remitidos desde Lanzarote, en envase refrigerado y por transporte urgente, al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla .

El análisis serológico se realizó mediante Inmunofluorescencia Indirecta. Esta técnica detecta Anticuerpos séricos, los cuáles se unirán al Antígeno específico fijado previamente

sobre un portaobjetos. Tras poner en contacto el suero problema con este antígeno, se incuba durante un tiempo para permitir la reacción antígeno/anticuerpo si la hubiere.

Después de un lavado que retire el posible exceso de anticuerpos, se añade un Conjugado compuesto por un anticuerpo de origen animal dirigido frente a la Fracción constante de las Inmunoglobulinas séricas humanas y marcado con una sustancia fluorescente. Tras una nueva incubación y lavado la preparación se lleva al Microscopio de Fluorescencia observándose, si la reacción antígeno/anticuerpo se produjo, una fluorescencia en las partículas antigénicas.

En el presente estudio se realizó una Inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos de tipo Ig G específicos frente a antígenos de células bacterianas completas de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, cepa B 31, fijados en porta y provistos en un equipo comercial (Mardx Diagnostics Inc.^R, I.C., USA). En el año que realizamos este trabajo (1992) no se disponía de kits comerciales que valoraran otros genogrupos de *Borrelia burgdorferi* s.l.

Así mismo se empleó un conjugado de origen caprino, frente a Ig G humana, marcado con isotiocianato de fluoresceína y también perteneciente al mismo kit comercial. Para los lavados fueron utilizados tampón fosfato PBS (Mardx Diagnostics^R) y agua destilada. La visualización de la reacción se realizó mediante un microscopio de fluorescencia con objetivo de 20 aumentos.

Los sueros estudiados fueron diluidos en PBS al 1/16, título que sirvió para despistar la presencia o ausencia de anticuerpos anti- *Borrelia burgdorferi*. Seguidamente se distribuyeron las diluciones séricas realizadas, 20 µl en cada pocillo, sobre los portaobjetos con el antígeno prefijado suministrados en el kit. Después de incubar en cámara húmeda

durante 30 minutos a 37°C, se procedió a lavar los portas en un baño de PBS por espacio de 10 minutos. Tras pasar por agua destilada 30 segundos, se dejaron secar a temperatura ambiente.

El siguiente paso fue añadir 20 µl. por pocillo del conjugado fluorescente anti- Ig G humana, previamente diluído en Tween-80 (Difco^R, Detroit, Michigan, USA) al 2% al 1/600 (título obtenido tras ensayo de titulación previo). Tras realizar una nueva incubación y lavados similar a los anteriores se montaron las preparaciones con fluido de montaje y cubreobjetos, observándose en el microscopio de fluorescencia a 20 aumentos. Como controles positivos y negativos se utilizaron los provistos en el equipo comercial.

Consideramos sueros positivos (presencia de anticuerpos Ig G frente a *B.burgdorferi*) los que ofrecieron reacción fluorescente verdosa alrededor de las partículas antigénicas fijadas en los portas. Los casos que resultaron positivos para la dilución sérica ensayada de 1/16, fueron rediluídos en base 2 hasta conseguir su negativización.

Así se consideró como resultado para cada muestra el último título que mostró fluorescencia, valorando unicamente como positivos los sueros con reacción fluorescente para diluciones iguales o mayores a 1/128.

Las posibles reacciones cruzadas con *Treponema pallidum*, fueron excluídas empleando técnicas para el diagnóstico de sífilis:

- pruebas no treponémicas, RPR (Menarini Diagnostics^R, Barcelona),
- pruebas treponémicas, FTA-abs (Mardx Diagnostics^R, I.C., USA).

Por último, sobre todas las muestras séricas que resultaron positivas por IFI Ig G para *B. burgdorferi* para títulos iguales o superiores a 1/32, se realizó Western-blot para detectar anticuerpos Ig G frente a *B. burgdorferi* en un intento de obtener mayor especificidad en

nuestro estudio. Para ello se utilizó un kit comercial provisto por MRL Diagnostics^R (Cypress, California, USA) que emplea antígenos de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (genogrupo 1), separados en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidos a una tira de nitrocelulosa. La técnica de western-blot se realizó como sigue:

- En primer lugar se colocaron cada una de las tiras de nitrocelulosa con las distintas bandas antigénicas, provistas en el kit, en canales separados de una bandeja de incubación. Se llenó cada canal con 2 ml. de solución de lavado (PBS), de forma que cada tira quedase empapada por completo y se colocó la bandeja en una plataforma de agitación durante 5 minutos.

- Añadimos 20 µl. de cada muestra sérica a cada canal previamente identificado. Después de incubar durante 30 minutos, se procedió a retirar cuidadosamente el exceso de líquido y se incorporaron 2 ml. de PBS por canal, incubando en agitación 5 minutos más.

- Repetimos 2 veces más estos lavados, decantando el líquido al acabar.

- Se añadieron entonces 2 ml. del conjugado (anticuerpos caprinos frente a Ig G humanas con fosfatasa alcalina) a la dilución de trabajo 1/1500 por canal, incubando otros 15 minutos. Tras retirar el líquido sobrante, se lavó con 2 ml. de PBS cada canal durante 5 minutos en agitación.

- Después de 2 lavados más como el anterior, se procedió a aclarar con 2 ml. de agua destilada por canal durante 1 minuto más, decantando al final.

- Por último se adicionaron 2 ml. por canal de una solución para el desarrollo de color (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato nitroazul de tetrazolio), incubando la reacción en la plataforma de agitación durante 5 a 10 minutos, hasta que fueron revelándose las bandas.

- Decantamos el exceso de líquido y añadimos 2 ml. de agua destilada en cada canal, repitiendo esta operación 2 veces más. Para terminar se retiraron las bandas de la bandeja, ayudándonos con pinzas de plástico, y se dejaron secar al aire.

La interpretación de resultados del Western-blot se realizó siguiendo los criterios de Hauser, Wilske et al para Europa ⁹⁸, comparando las bandas aparecidas en las tiras analizadas con las de una tira control suministrada por la casa comercial.

III.2.2.) Estudio serológico en población de riesgo.

Como dijimos anteriormente se consideró población de riesgo para la Borreliosis de Lyme a un grupo de pastores de cabras, debido a su actividad laboral con el ganado y en general desarrollada en el ámbito rural. Se obtuvieron muestras de suero de estos pastores y otros trabajadores que tuvieran contacto asiduo con los animales (ordeñadores, limpiadores de establos). Únicamente se investigaron los propietarios de rebaños de más de 50 cabezas para que el factor de exposición fuera intenso.

Fueron analizadas 57 muestras, 53 de varones y 4 de mujeres con edades comprendidas entre 19 y 77 años (Media = 49.7). Por municipios 23 pertenecieron a Teguiise, 12 a Tinajo, 6 a Yaiza, 5 a Haría, 4 a San Bartolomé y 3 a Tías. Los sueros se recogieron en Agosto de 1991 siendo procesados y analizados como los de la población general.

III.2.3.) Estudio serológico en reservorios: ganado caprino.

III.2.3.1.) Selección de la muestra.

Se tomaron muestras de suero del ganado predominante en Lanzarote, el caprino, despreciando las pocas reses ovinas y bovinas, cuya consideración en este estudio haría difícilmente interpretables los resultados al tratarse de una población tan escasa. Tampoco se incluyeron animales silvestres, dada la dificultad para disponer de una muestra representativa de ellos, ni domésticos pues el hábitat de las garrapatas vectores de la enfermedad de Lyme es eminentemente rural.

La recogida de muestras se realizó durante el año 1991, aprovechando la Campaña de Saneamiento Ganadero de la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca del Cabildo Insular de Lanzarote. Los sueros fueron cedidos tras explicar el propósito del estudio.

La cabaña caprina de la isla ascendía en 1991 a 9787 reses de las que se muestrearon algunos rebaños en cada municipio, de forma aleatoria, analizando buena parte de sus componentes. Como la mayoría de los rebaños no tenían más de 100 cabezas, analizar una muestra de cada uno de ellos complicaría el estudio estadístico posterior. En total fueron analizados sueros de 15 rebaños o explotaciones que supusieron 1358 cabras, el 13.87% de la cabaña caprina lanzaroteña en 1991. De cada animal se extrajeron 20 cc. de sangre por punción yugular, separándose el suero después por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis.

Como la inmensa mayoría de los animales eran hembras (98.9%), no haremos distinción de sexo al analizar los resultados.

En cuanto a la edad de las cabras del estudio sucede otro tanto, pues casi todos eran

animales adultos excepto algunas crías de menos de 1 año (11.4%). Detallaremos a continuación los distintos rebaños investigados por localización geográfica, número de componentes, tipo de explotación ganadera y algunas características particulares (Figura 4):

- Rebaño número 1, del municipio de Orzola (Haría). Localizado a unos 500 metros al sur del pueblo, compuesto por 88 animales explotados en régimen extensivo en el malpaís de La Corona

- Rebaño 2, de Máguez (Haría). Situado dentro del pueblo y formado por 78 cabras en explotación mixta, que pastan por los alrededores y se estabulan de noche. Era frecuente la introducción de nuevos animales en este rebaño (la última vez 10 cabras procedentes de Tías en 1986).

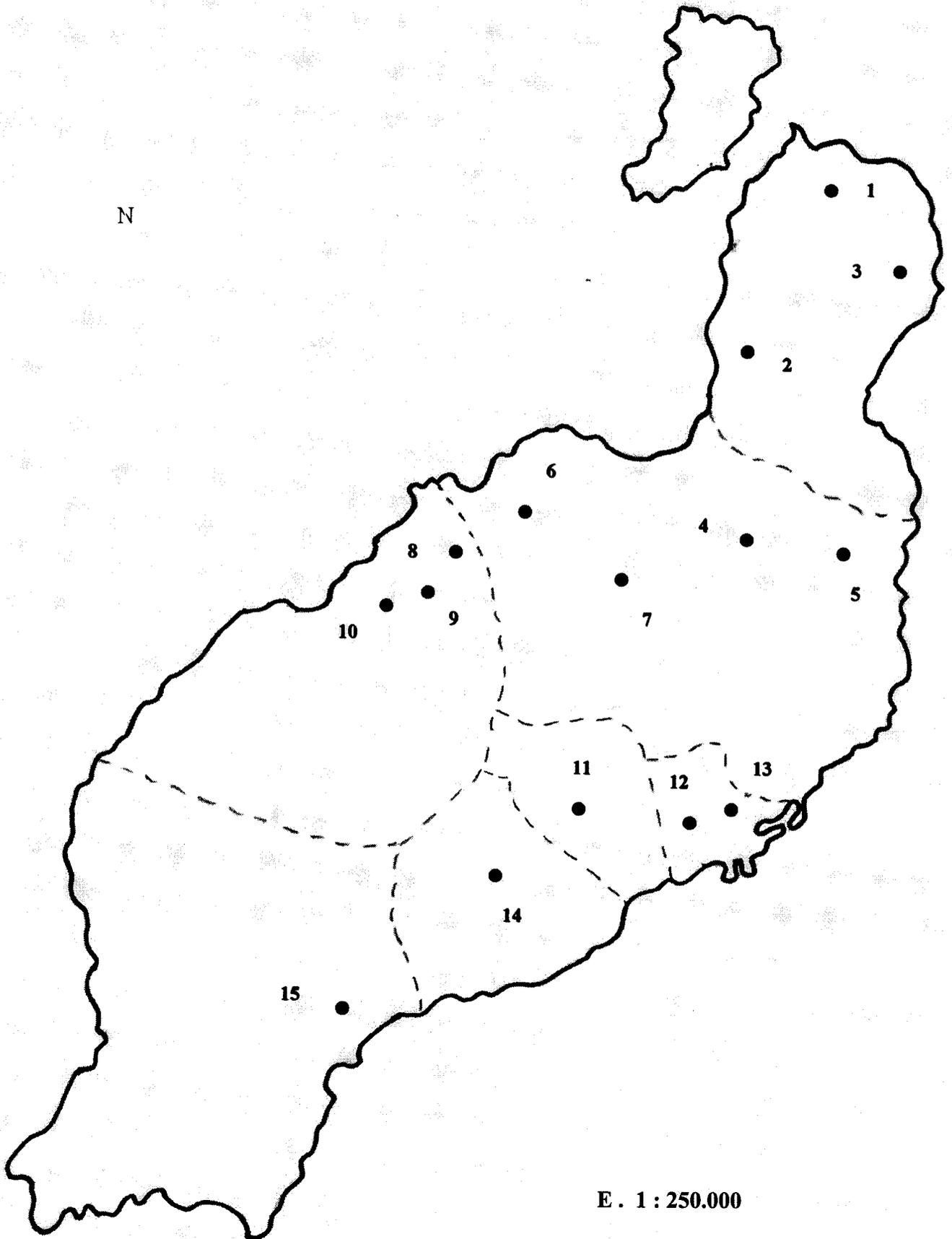
- Rebaño 3, Las Escamas (Haría), sito en pleno malpaís de La Corona sin relación con núcleos de población humanos. Lo componían 81 reses en régimen extensivo de explotación.

- Rebaño 4, de Los Valles (Tegüise) en las afueras del pueblo. Agrupaba 82 animales en régimen mixto. En el año 1987 se incorporaron 45 cabras originarias de Fuerteventura.

- Rebaño número 5, Guatiza (Tegüise) a la salida del pueblo, con 86 cabras en explotación mixta. Recibía unas 10 nuevas cabezas cada año procedentes de Fuerteventura.

- Rebaño 6, en Soo (Tegüise), localizado dentro del pueblo y también en las afueras, formado por 62 animales en explotación mixta. Incorporó algunas cabras de Fuerteventura en 1990.

Figura 4.



- Rebaño 7, en un despoblado a 4 km. de Teguiise, cerca del Complejo Agroindustrial. Se trata de una explotación mixta y grande, compuesta por 449 reses de las que se analizaron 250. Importa todos los años al menos 100 animales de Fuerteventura.
- Rebaño número 8, El Cuchillo (Tinajo), a la entrada de la aldea. 81 animales en régimen mixto de explotación. Se originó en 1989 a partir de cabras de Tinajo y Teguiise.
- Rebaño 9, correspondiente a una mezcla aleatoria de cabras procedentes de rebaños de El Cuchillo, Tajaste y el propio Tinajo, todos ellos pueblos pertenecientes al último municipio citado. Se trataba de explotaciones ganaderas mixtas de las que fueron analizados un total de 200 animales. En todos los rebaños se habían introducido cabras de Fuerteventura, Teguiise y Yaiza.
- Rebaño 10, sito en Tajaste (Tinajo), formado por 128 animales en régimen mixto de explotación. Se constituyó en 1988 a partir de cabras de Haría, no habiendo recibido nuevas incorporaciones desde entonces.
- Rebaño 11, de San Bartolomé, a unos 2 km. al sur de Güime. Explotadas en régimen mixto con establos modernos. Lo componían 52 animales con un grupo reciente importado de Fuerteventura.
- Rebaño 12, en Argama Baja, barrio del extrarradio de Arrecife, con 19 cabras estabuladas. Se formó en 1990 con reses procedentes de distintos puntos de la isla de Lanzarote, sobre todo de San Bartolomé.
- Rebaño número 13, de Argama Alta, un suburbio a 2 km. al norte de Arrecife. Agrupaba 51 animales en explotación mixta, originarios de otros rebaños de la isla.
- Rebaño 14, en Tías hacia las afueras del municipio, con 46 cabras. Incorporó algunas cabezas de Fuerteventura y Teguiise en 1989.

- Rebaño 15, de Playa Quemada (Yaiza). Régimen mixto de explotación con 54 cabras, formado en 1985 a partir de un lote de animales original de Fuerteventura.

III.2.3.2.)Análisis serológico.

Se realizó empleando una técnica de Inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos del tipo Ig G frente a antígenos de células completas de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cepa B 31. El antígeno fué el mismo que el utilizado para analizar los sueros humanos, provisto en un equipo comercial (Mardx Diagnostics^R, I.C., USA). El conjugado usado contenía inmunoglobulinas de conejo dirigidas frente a Ig G caprina, estando marcado con isotiocianato de fluoresceína (Dako^R).

Partimos igualmente de una dilución sérica de 1/16, diluyendo posteriormente las muestras positivas en base 2 hasta que resultaron negativas. El procedimiento técnico fué similar al descrito para los sueros humanos, utilizando el conjugado a una dilución 1/100, tras haber realizado un ensayo de titulación previo.

Como sueros testigos positivos se consideraron los obtenidos de cabras que resultaron tener anticuerpos Ig G anti-*B. burgdorferi*, determinados con un análisis previo mediante Western-blot. Este estudio se hizo de forma aleatoria en algunos de los sueros de las cabras investigadas, empleando un western-blot comercial modificado (MRL Diagnostics, California, USA) indicado para el diagnóstico de la borreliosis de Lyme en muestras de suero humano y que ya utilizamos anteriormente para confirmar los seropositivos humanos. Para adaptar la técnica a nuestros fines sustituimos el conjugado provisto en el kit por otro procedente de conejo, dirigido frente a Ig G de cabra y unido a fosfatasa alcalina (Dako^R).

Las muestras séricas caprinas, elegidas al azar, se analizaron sin diluir siguiendo las

instrucciones del equipo comercial. Los antígenos provistos por el kit pertenecían al genogrupo 1 de *Borrelia burgdorferi*. La técnica se ensayó como citamos previamente en el apartado de análisis serológico de sueros humanos.

La interpretación de los resultados del western-blot se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante. Así se consideraron positivas las muestras que presentaron al menos 5 de las siguientes bandas: 18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 93 kda. (Criterios de Dressler para Western-blot Ig G) ⁶⁰. Se utilizó este criterio interpretativo restrictivo en un intento de conseguir sueros testigos positivos fuertes y claros.

Se obtuvieron de esta forma sueros con presencia de anticuerpos Ig G frente a *Borrelia burgdorferi*, determinados por western-blot, y que fueron considerados controles positivos al realizar posteriormente las técnicas inmunofluorescentes.

Las posibles reacciones cruzadas con otras espiroquetosis (*Treponema* spp., *Leptospira* spp.) se descartaron empleando RPR (Menarini Diagnostics) y técnicas de Hemaglutinación (*Leptospira* species Haemagglutination test, Bios- GmbH^R), respectivamente.

III.3.) ESTUDIO DE VECTORES DE LA BORRELIOSIS DE LYME: GARRAPATAS.

La recogida y estudio de los ácaros se realizó entre los meses de Febrero y Mayo de 1992, tras un corto período lluvioso que produjo un brote de vegetación herbácea inhabitual en la isla con una parasitación importante por garrapatas en el ganado caprino. En Diciembre del año 1991 se recogieron en pocos días más de 150 litros de lluvia por m² en Lanzarote. Al mes siguiente se produjo el citado brote vegetal inusual y en Febrero, los pastores alertaron de una elevada parasitación por garrapatas en sus cabras.

Los ganaderos accedieron a colaborar en la recogida de los ácaros, consiguiendo obtener en un período de 4 meses 442 ejemplares recolectados por toda la isla de forma aleatoria. Así, se obtuvieron garrapatas que parasitaban los distintos rebaños de cabras previamente estudiados:

- 60 ácaros de un rebaño de Máguez en Haría.
- 20 obtenidas de un rebaño de Guatiza (Teguise).
- 50 garrapatas de un rebaño de Los Valles en Teguise.
- 60 de Soo (Teguise).
- 160 ejemplares del rebaño número 7 de Teguise.
- 50 del rebaño de Argama Baja (Arrecife).
- 30 de un rebaño de cabras de Yaiza.
- 50 del rebaño de Argama Baja (Arrecife).
- 30 de un rebaño de cabras de Yaiza.

- Y 12 garrapatas más procedentes del rebaño número 10 de Tinajo.

Los parásitos fueron conservados en etanol de 70° hasta su remisión al Departamento de Zoología de la Universidad de Zaragoza, a la atención del Dr. Estrada Peña. Allí se realizó la determinación de especies según las claves para la identificación de ixódidos españoles publicados por Gil Collado y colaboradores.

III.4.) ESTUDIO ESTADISTICO DE RESULTADOS.

Se realizó empleando el programa informático EPI-INFO versión 6.01 de Agosto de 1994, Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Georgia, U.S.A.) y Organización Mundial de la Salud (Ginebra, Suiza). Se compararon variables cualitativas mediante tablas de contingencia nxn, usando el estadístico Ji cuadrado (χ^2). Se consideró significativo el valor de $p < 0.05$ y muy significativo el valor de $p < 0.001$. Cuando el valor total de los efectivos de la tabla de contingencia fue inferior a 200 elementos se aplicó la corrección de Yates y si el valor de algunas de las casillas resultó menor de 5, el test exacto de Fisher. Incidentalmente se aportan también los datos de Odds ratio e intervalos de confianza aunque, en general, se ha preferido obviarlos al no aportar al estudio mayor información.

Se compararon las muestras séricas de personas que resultaron positivas (presencia de anticuerpos Ig G anti- *Borrelia burgdorferi* por inmunofluorescencia indirecta a títulos suficientes) por intervalos de edad, sexo, hábitat de residencia y respecto a un grupo de riesgo (pastores de cabras). Así mismo, se compararon los resultados del Western-blot obtenidos en los distintos grupos de edad, sexo, residencia y respecto al grupo de pastores de cabras. Finalmente comparamos los seropositivos hallados en las muestras del ganado caprino, según los distintos rebaños y su localización por municipios.

RESULTADOS

IV) RESULTADOS.

Los resultados de nuestro estudio serán desglosados a continuación por apartados que agrupen los datos de la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* hallados en las muestras humanas y del ganado caprino. Así mismo se detallarán las conclusiones del estudio realizado para identificar las especies de garrapatas que fueron recogidas sobre los distintos rebaños de cabras de la isla.

IV.1.) SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- *Borrelia burgdorferi* EN MUESTRAS HUMANAS.

De los 1016 sueros analizados pertenecientes a población residente en Lanzarote, donantes de sangre o usuarios del INSALUD sin patología infecciosa, 232 (21.62%) resultaron positivos en la detección de Ig G frente a *B.burgdorferi* por inmunofluorescencia indirecta. Como se cita en el apartado “Material y Métodos”, se partió de una dilución 1/16 de las muestras que sirviera como despistaje inicial, diluyendo posteriormente en base 2 los seropositivos hasta conseguir negativizar la prueba. Finalmente se consideraron valorables los sueros que fueron positivos para la dilución 1/128 y superiores, ascendiendo a un total de 17 casos (1.58%).

Por diluciones los resultados se reparten como siguen: 103 (9.59%) muestras positivas para la dilución 1/16, 74 (6.89%) para 1/32, 38 (3.54%) para 1/64, 13 (1.21%) para 1/128 y 4

(0.37%) para la dilución sérica 1/256.

Previamente se descartaron 2 sueros con anticuerpos anti- *B.burgdorferi* (títulos 1/64 y 1/128), al resultar positivos por RPR y FTA-abs.

IV.1.1.) Resultados por edad.

Los resultados por edad se reflejan detalladamente en la tabla VI. Para simplificar el trabajo estadístico se estratificaron los individuos estudiados en 7 grupos de edad correspondientes a los siguientes intervalos: menores o iguales a 15 años, de 16 a 25, de 26 a 35, de 36 a 45, de 46 a 55, de 56 a 65 y mayores de 65 años.

Tabla VI.

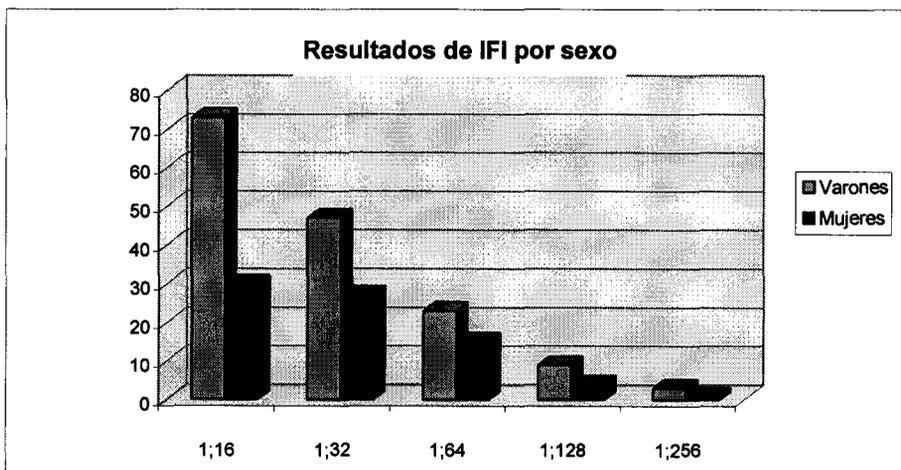
Edad	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	Total
<15 años	13	17	5	2	0	37
16-25	20	22	6	1	0	49
26-35	17	15	10	2	1	45
36-45	22	13	9	3	1	48
46-55	16	3	4	4	1	28
56-65	10	0	1	1	0	12
> 65	5	4	3	0	1	13
Total	103	74	38	13	4	232

IV.1.2.) Resultados por sexo.

Por sexo, los resultados se reseñan en la tabla número VII. Fueron positivas para la dilución 1/16 y superiores 155 muestras (14.44%) pertenecientes a varones y 77 (7.17%) de mujeres. Para diluciones iguales o mayores a 1/128 resultaron seropositivos para *B. burgdorferi* 12 casos en hombres (1.11%) y 5 en mujeres (0.46%).

Tabla VII.

SEXO	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	Total
Varones	73	47	23	9	3	155
Mujeres	30	27	15	4	1	77
Total	103	74	38	13	4	232

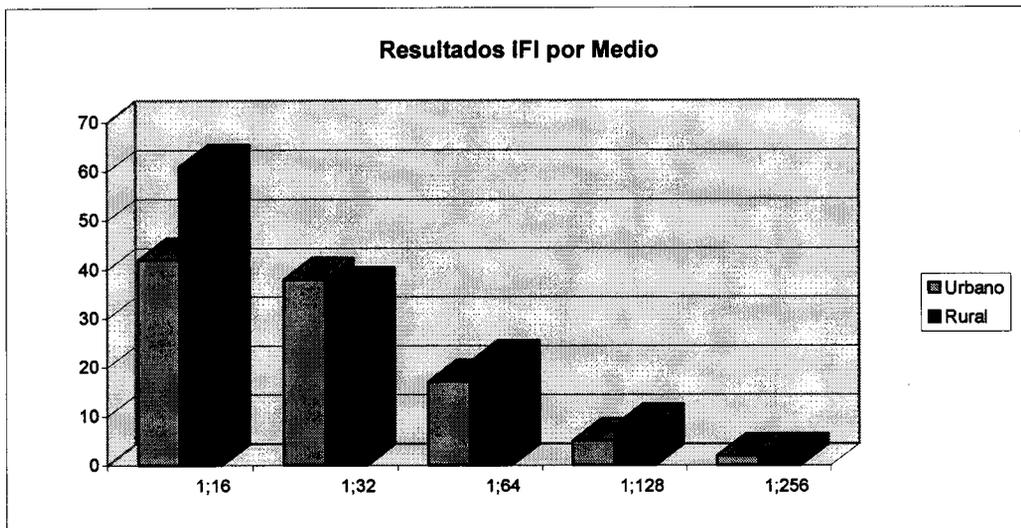


IV.1.3.) Resultados por medio de residencia.

En cuanto al medio de residencia habitual, 104 casos (9.69%) resultaron positivos para diluciones $\geq 1/16$ en el medio urbano, de los cuales 7 (0.65%) presentaron un título $\geq 1/128$. Respecto al medio rural, 128 muestras (11.92%) fueron positivas para la dilución $1/16$ y superiores y sólo 10 de ellas (0.93%) para títulos $\geq 1/128$. Estos datos se detallan en la tabla adjunta número VIII:

Tabla VIII.

MEDIO	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	Total
Urbano	42	38	17	5	2	104
Rural	61	36	21	8	2	128
Total	103	74	38	13	4	232

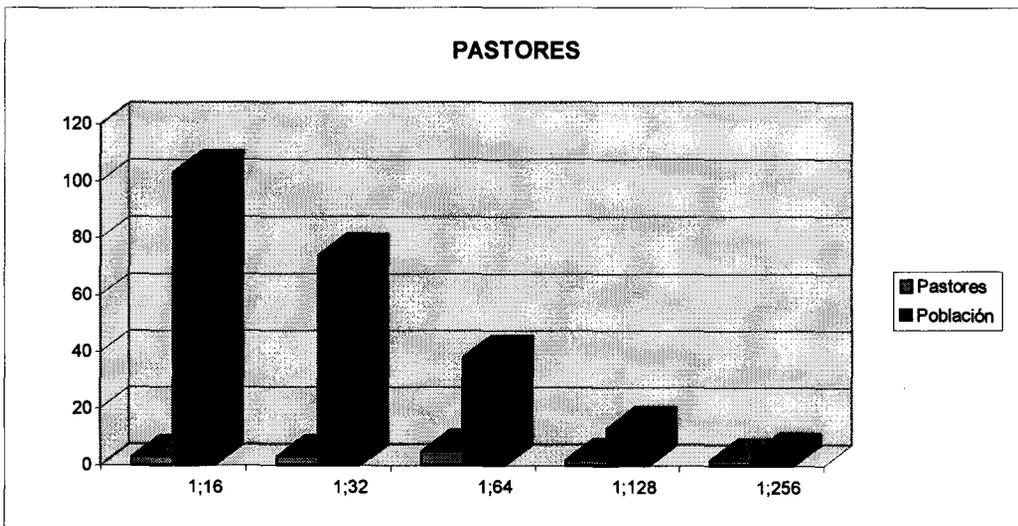


IV.1.4.) Resultados en la población de riesgo.

Por último se estudió la seroprevalencia de anticuerpos frente a *B.burgdorferi* en un grupo de riesgo formado por 57 pastores de cabras, de los cuales 15 resultaron positivos para la dilución 1/16 y superiores y 4 de ellos presentaron títulos \geq 1/128. Respecto al total de 247 seropositivos hallados entre la población general y éste grupo de riesgo, los pastores con anticuerpos frente a la borreliosis de Lyme supusieron el 6.07% para títulos \geq 1/16 y el 19.04% para títulos \geq 1/128. Estos resultados se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla IX.

GRUPO	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	Totales
Pastores	3	3	5	2	2	15
Población	103	74	38	13	4	232
Total	106	77	43	15	6	247



IV.1.5.) Resultados del Western-blot.

Por último, se realizó un Western-blot para detectar anticuerpos de tipo Ig G frente a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Genotipo I) y *Borrelia garinii* (Genotipo II), sobre las muestras que resultaron positivas por Inmunofluorescencia indirecta para títulos iguales o superiores a 1/32. Se descartó confirmar por inmunoblotting los seropositivos a diluciones inferiores por falta de disponibilidad económica. Para la interpretación de resultados se siguieron los criterios europeos publicados por Hauser, Wilske et al ⁹⁸.

De los 129 sueros positivos por inmunofluorescencia indirecta para títulos iguales o mayores a 1/32, resultaron un total de 50 muestras (38.75%) positivas por Western-blot, 31 de ellas (62%) para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto y las 19 restantes (38%) para *Borrelia garinii*. Además 8 (16%) de estos sueros presentaron simultáneamente anticuerpos frente a los genotipos I y II de *B. burgdorferi* sensu lato. Al evaluar separadamente las muestras positivas por inmunofluorescencia indirecta a títulos iguales o superiores a 1/128 (17 sueros), 10 de ellas (58.82%) fueron positivas por Western-blot, 7 para el genotipo I, 3 para el genotipo II y 1 para ambos.

Por grupos de edad, 4 seropositivos por Western-blot (8%) pertenecieron a los mayores de 65 años; 5 (10%) al grupo de pastores, todos comprendidos entre los 15 y 65 años; 11 (22%) a los menores de 15 años; y 30 (60%) al grupo de adultos (entre los 15 y los 65 años), 19 del genotipo I y 11 del genotipo II.

Separando la muestra por sexos, de los 50 seropositivos, 30 (60%) pertenecieron a varones y 20 (40%) a mujeres.

Por medio de residencia, 27 positivos por Western-blot (54%) fueron de ambiente rural y 23 (46%) de hábitat urbano.

En cuanto a los resultados del Western-blot con respecto a los títulos obtenidos en la inmunofluorescencia indirecta, se desglosan como sigue:

- del total de las 74 muestras que presentaron un título por IFI de 1/32, 15 (20.27%) fueron positivas por W-B, 8 para el genogrupo I y 7 para el II y 4 de los anteriores para ambos genogrupos.

- de las 38 con título 1/64 por IFI, 25 (65.78%) resultaron positivas por W-B, 16 para el genogrupo I y 9 para el II y 3 para ambos.

- de las 13 con título 1/128, 6 (46.15%) fueron W-B positivas, 4 del genogrupo I, 2 del II y por tanto 1 de ambos.

- de las 4 con título 1/256 por IFI, las 4 (100%) resultaron W-B positivas, 3 del genogrupo I y 1 del II.

Por último reseñaremos las bandas significativas del Western-blot (Criterios de Hauser y Wilske)⁹⁸ más frecuentemente halladas en nuestro estudio:

- para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Genotipo I): p 58 apareció en el 69.23% de casos, p 93 en el 15.38%, p 17-18 en el 12.82% y p 23 en el 2.56%.

- para *Borrelia garinii* (Genotipo II): p 93 se repitió en 52.17% de las ocasiones, p 39 en el 39.13% y p 23 en el 8.69%.

IV.2.) ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS EN SUEROS HUMANOS

En cuanto a la valoración estadística de los resultados obtenidos , se realizó comparando los distintos grupos por edad, sexo, medio habitual de residencia y al grupo de pastores con el de población general. En el estudio estadístico unicamente fueron considerados los sueros con títulos de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* iguales o superiores a 1/128 por inmunofluorescencia indirecta, punto de corte establecido habitualmente para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme.

V.2.1.) Análisis estadístico de resultados por edad.

Al comparar en una tabla n x n los distintos estratos de edad, resulta una χ^2 de 11.04 para 6 grados de libertad, con un valor de p = 0.087 (no significativo). Estos datos quedan reflejados en la tabla número X.

Tabla X.

Edad/Título	=>1/128	<128	Totales
<=15 años	2	286	288
16-25 años	1	214	215
26-35 años	3	173	176
36-45 años	4	127	131
46-55 años	5	107	112
56-65 años	1	73	74
> 65 años	1	76	77
Totales	17	1056	1073

Pese a no encontrarse diferencias estadísticamente significativas por edad, si agrupamos los individuos de entre 26 y 55 años y los comparamos con el resto, observaremos un acúmulo de seropositivos con títulos $\geq 1/128$ en la edad media de la vida. En este caso la χ^2 fue 7.21 y $p = 0.0072$, con Odds ratio de 3.83 para unos límites de confianza del 95% (tabla XI).

Tabla XI.

Edad/Título	$\Rightarrow 1/128$	$< 1/128$	Totales
26-55 años	12	407	419
Otras	5	649	654
Totales	17	1056	1073

IV.2.2.) Análisis estadístico de resultados por sexo.

Por grupos de sexo tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas, con una χ^2 de 2.07 y $p = 0.15$. La razón de casos seropositivos fué de dos varones por cada mujer (tabla XII).

Tabla XII.

Sexo/Título	$\Rightarrow 1/128$	$< 1/128$	Totales
Varones	12	560	572
Mujeres	5	496	501
Totales	17	1056	1073

IV.2.3.) Análisis estadístico de resultados por medio de residencia.

Otro tanto sucedió al comparar por medio de residencia, no hallándose diferencias significativas entre casos urbanos y rurales ($\chi^2 = 0.81$; $p = 0.36$). Estos datos se detallan en la tabla adjunta:

Tabla XIII.

Medio/Título	=> 1/128	< 1/128	Totales
Urbano	7	551	558
Rural	10	505	515
Totales	17	1056	1073

IV.2.4.) Análisis estadístico de resultados en el grupo de riesgo: pastores.

En cambio comparando los resultados obtenidos en la población estudiada con respecto al grupo de pastores con supuesto mayor riesgo para la infección por *B.burgdorferi*, vemos como de los 21 seropositivos totales encontrados 4 pertenecen al grupo de pastores, suponiendo como ya dijimos el 19.04%.

Dado que el tamaño muestral del grupo de riesgo es mucho menor que el del grupo control, el estudio estadístico debe realizarse aplicando el test exacto de Fisher, que resulta para test de 1 cola $p = 0.021$ y para test de 2 colas $p = 0.021$, ambos valores muy significativos. La Odds ratio fué de 4.44 para unos límites de confianza del 95%. Todo ello se refleja en la tabla número XIV:

Tabla XIV.

Grupos/Título	=> 1/128	< 1/128	Totales
Pastores	4	53	57
Población general	17	999	1016
Totales	21	1052	1073

IV.2.5.) Estadística de resultados de Western-blot.

Comparamos, como anteriormente, los resultados obtenidos en los distintos grupos de edad, sexo, medio de residencia y pastores. No se pudieron correlacionar las dos técnicas de diagnóstico serológico empleadas (Inmunofluorescencia indirecta y Western-blot), pues sólo se realizó la segunda de ellas a las muestras que resultaron positivas por IFI y no disponíamos de otros métodos de confirmación diagnóstica. De cualquier manera, hay que recordar las indicaciones del WB en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, quedando reservado su uso a la confirmación de resultados positivos obtenidos previamente por pruebas serológicas de “screening” (IFI o ELISA).

Por tanto, si comparamos en una tabla 2xn los distintos grupos de edad, se obtiene una χ^2 de 1.22 para 2 grados de libertad, con una $p = 0.54$, no significativa (tabla XV).

Tabla XV.

Edades	W-B positivo	W-B negativo	Totales
>65 años	4	4	8
15-65 años	35	62	97
<15 años	11	13	24
Totales	50	79	129

Por sexo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, con χ^2 de 0.44 y $p = 0.50$. Se repite el acúmulo de seropositivos para los varones encontrado tras la IFI.

Estos datos quedan reflejados en la tabla XVI.

Tabla XVI.

Sexo	WB positivo	WB negativo	Totales
Varones	30	52	82
Mujeres	20	27	47
Totales	50	79	129

En cuanto al medio de residencia, tampoco hallamos diferencias significativas al comparar hábitat urbano y rural, con una χ^2 de 0.14 y $p = 0.71$ (tabla XVII).

Tabla XVII.

Medio	WB positivo	WB negativo	Totales
Urbano	23	39	62
Rural	27	40	67
Totales	50	79	129

Al comparar el grupo de pastores de cabras con el resto de la muestra, no encontramos significación estadística, resultando el test de Fisher para 1 cola $p = 0.52$ y para 2 colas $p = 1.00$ (tabla XVIII).

Tabla XVIII.

Grupos	WB positivo	WB negativo	Totales
Pastores	5	7	12
Resto	45	72	117
Totales	50	79	129

IV.3.) RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN SUEROS HUMANOS.

- La tasa global de seroprevalencia de anticuerpos por Inmunofluorescencia indirecta frente a *Borrelia burgdorferi* en la población general de Lanzarote fue 1.58%.
- Del total de seropositivos por IFI a títulos => 1/32, el 38.75% lo fueron también por WB, elevándose este porcentaje al 58.88% para títulos => 1/128 y hasta el 100% en muestras positivas para la dilución 1/256.
- Por edades se aprecia un acúmulo de casos seropositivos por IFI en la edad media de la vida, entre los 26-55 años.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sexo, aunque las tasas son 2 veces superiores en hombres que en mujeres.
- Tampoco hallamos diferencias significativas en cuanto al hábitat de residencia, rural o urbano.
- Sí aparecieron diferencias estadísticamente significativas al comparar a un grupo de pastores de cabras con el resto de la población estudiada, perteneciendo el 19.04% del total de seropositivos por Inmunofluorescencia indirecta a este grupo de riesgo. Tal hallazgo no se confirmó posteriormente al realizar Western-blot.
- *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (62%) fué más prevalente que *Borrelia garinii* (38%), apareciendo ambos genogrupos simultáneamente en el 16% de casos.
- Las bandas significativas más repetidas en el Western-blot fueron para *B.burgdorferi* sensu stricto la p 58 (69.23%) y para *B.garinii* p 93 (52.17%) y p 39 (39.13%).

IV.4.) SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- *Borrelia burgdorferi* EN SUEROS DE CABRAS.

De los 1358 sueros de cabras estudiados por inmunofluorescencia indirecta 143 fueron negativos (10.53%), 187 positivos para la dilución 1/16 (13.77%), 315 para la dilución 1/32 (23.19%), 374 para la dilución 1/64 (27.54%), 256 presentaron un título de anticuerpos de 1/128 (18.85%), 67 de 1/256 (4.93%), 14 de 1/512 (1.03%) y 2 de 1/1024 (0.14%). En total resultaron positivas para diluciones iguales o superiores a 1/16, 1215 muestras (89.46%) y tuvieron títulos => 1/128, 339 sueros (24.96%).

Como en el caso de las muestras humanas se partió de una dilución de “screening” de 1/16, diluyendo después los sueros positivos en base 2 hasta que se negativizó la fluorescencia.

Descartamos previamente 12 sueros que fueron positivos por RPR y/o microhemaglutinación para leptospira.

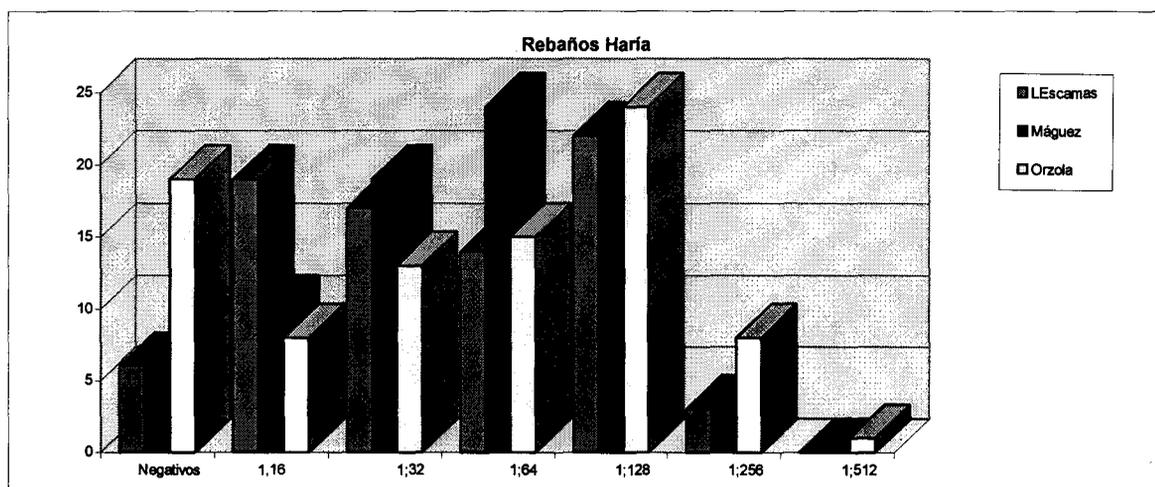
Los resultados de cada rebaño, agrupados por municipios, se detallan a continuación en tablas, destacándose en el texto los datos de mayor interés.

IV.4.1.) Municipio de Haría.

Comprende los rebaños de cabras de Las Escamas, Máguez y Orzola. En total se estudiaron 247 muestras, de las cuales 220 fueron positivas para títulos => 1/16 (89.06%) y 81 para títulos => 1/128 (32.79%). La tabla XIX detalla estos resultados:

Tabla XIX

HARIA	Negativos	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	1;512	Totales
LEscamas	6	19	17	14	22	3	0	81
Máguez	2	10	19	24	21	2	0	78
Orzola	19	8	13	15	24	8	1	88
Totales	27	37	49	53	67	13	1	247

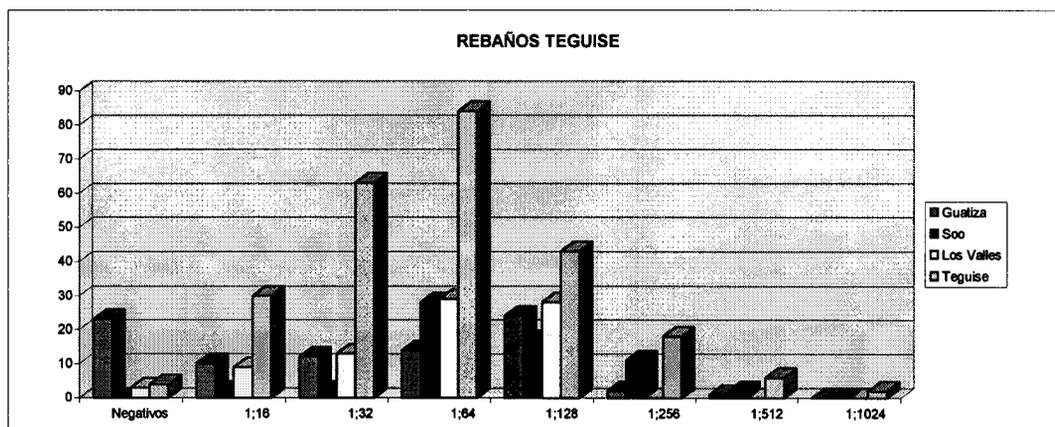


IV.4.2.) Municipio de Teguisse. (Tabla XX).

Agrupa los rebaños de Guatiza, Soo, Los Valles y Teguisse. Se investigaron 480 sueros, resultando 450 positivos para diluciones iguales o mayores a 1/16 (93.75%) y 154 para la dilución 1/128 y superiores (32.08%).

Tabla XX.

TEGUISE	Negativos	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	Totales
Guatiza	23	10	12	14	24	2	1	0	86
Soo	0	2	2	28	17	11	2	0	62
Los Valles	3	9	13	29	28	0	0	0	82
Teguisse	4	30	63	84	43	18	6	2	250
Totales	30	51	9	155	112	31	9	2	480

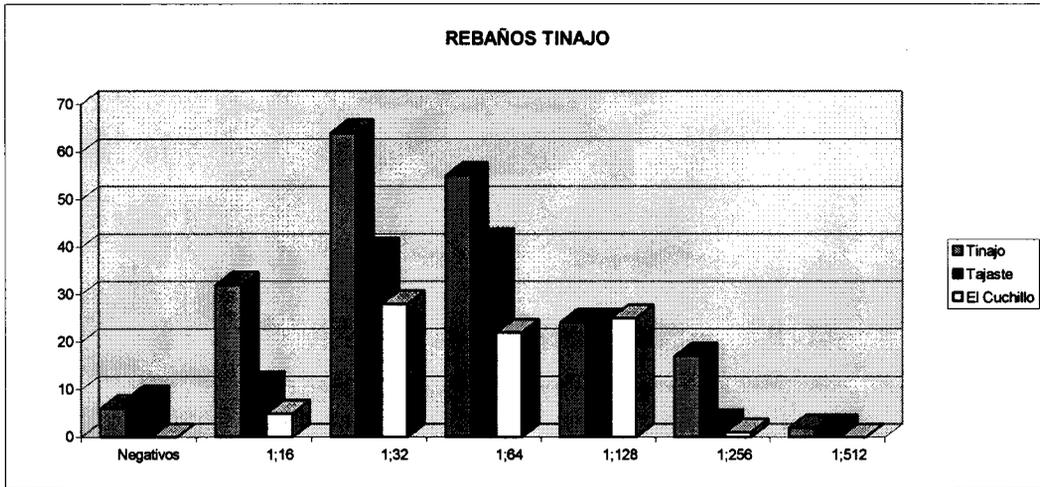


IV.4.3.)Municipio de Tinajo.

En él estudiamos los rebaños caprinos de Tinajo, Tajaste y El Cuchillo, en total 409 muestras de las que 395 fueron positivas para títulos => 1/16 (96.57%) y, de ellas, 98 presentaron títulos => 1/128 (23.96%). Para mayor detalle consultar la tabla XXI.

TablaXXI.

TINAJO	Negativos	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	1;512	Totales
Tinajo	6	32	64	55	24	17	2	200
Tajaste	8	11	39	41	24	3	2	128
El Cuchillo	0	5	28	22	25	1	0	81
Totales	14	48	13	118	73	21	4	409

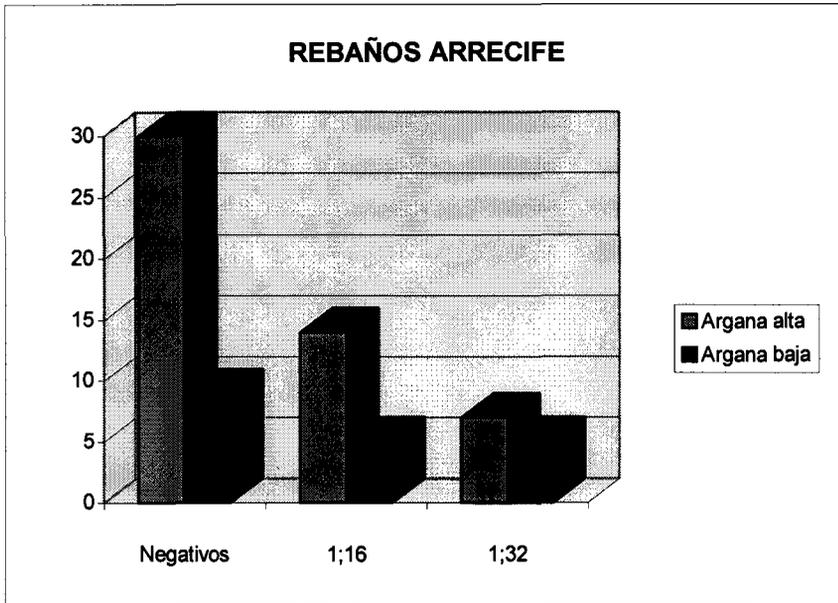


IV.4.4.) Municipio de Arrecife. (Tabla XXII).

Recoge los rebaños de las poblaciones suburbanas de Argana Alta y Argana Baja. Se estudiaron 70 sueros, resultando la detección de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* positiva, para diluciones iguales o superiores a 1/16, en 31 casos (44.28%) y, para diluciones iguales o mayores a 1/128, en ninguno.

Tabla XXII.

ARRECIFE	Negativos	1;16	1;32	Totales
Argana alta	30	14	7	51
Argana baja	9	5	5	19
Totales	39	19	12	70

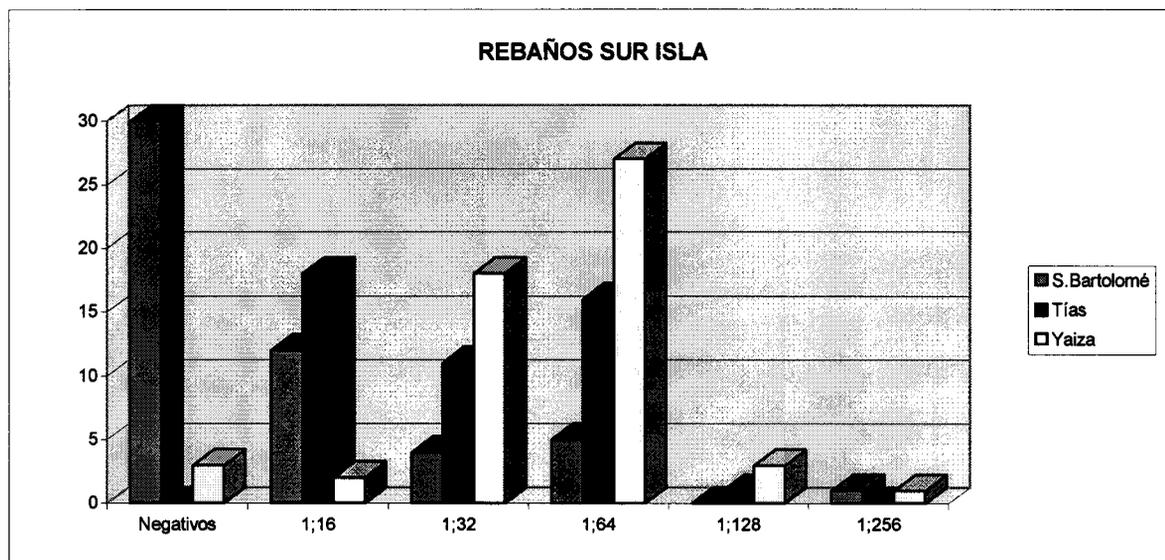


IV.4.5.) Municipio de San Bartolomé. (Tabla XXIII).

En él se estudió un único rebaño formado por 52 cabras de la población de Güime. Fueron positivas 22 muestras (42.30%) para diluciones => 1/16 y 1 sólo muestra para diluciones => 1/128 (1.92%). Los datos de este municipio, conjuntamente con los de Tías y Yaiza, se resumen en la tabla siguiente:

Tabla XXIII.

SUR ISLA	Negativos	1;16	1;32	1;64	1;128	1;256	Totales
S.Bartolomé	30	12	4	5	0	1	52
Tías	0	18	11	16	1	0	46
Yaiza	3	2	18	27	3	1	54
Totales	33	32	33	48	4	2	152



IV.4.6) Municipio de Tías. (Tabla XXIII).

Como el anterior, formado por un sólo rebaño de 46 animales. De ellos resultaron seropositivos para *B.burgdorferi*, las 46 cabras (100%) para títulos => 1/16 y 1 de ellas, además, para diluciones => 1/128 (2.17%).

IV.4.7.) Municipio de Yaiza. (Tabla XXIII).

Compuesto por 54 cabras agrupadas en un mismo rebaño en el núcleo poblacional de Yaiza. 51 muestras presentaron títulos iguales o superiores a 1/16 (94.44%), con títulos => 1/128 en 4 casos (7.40%).

IV.5) ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS EN SUEROS CAPRINOS.

Se realizó correlacionando los distintos rebaños y también los resultados globales de éstos, agrupados por municipios. Consideramos unicamente los sueros que fueron positivos para las diluciones iguales o superiores a 1/128. La valoración estadística fué similar a la realizada con las muestras humanas. Los datos han sido tabulados por rebaños y por municipios, resumiéndose los resultados a continuación en las tablas XXIV (Rebaños; consultar Anexo) y XXV (Municipios):

Tabla XXV.

Municipio	Harta	Teguisse	Arrecife	Tías	Tinajo	SBartolomé	Yaiza
Harta							
Teguisse	n.s.						
Arrecife	p<0.05	p<0.05					
Tías	p<0.05	p<0.05	n.s.				
Tinajo	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05			
S.Bartolomé	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05		
Yaiza	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	

Los resultados no significativo (n.s.) y significativo ($p < 0.05$) proceden de la comparación de los distintos rebaños y municipios empleando la prueba χ^2 con corrección de Yates para un intervalo de confianza del 95%.

Al analizar los datos obtenidos se observa una tendencia al agrupamiento de resultados positivos en la mitad nororiental de Lanzarote. Por ello se procedió a comparar después, las cifras globales de seropositividad (títulos $\Rightarrow 1/128$) de la mitad norte insular, comprendiendo los municipios de Haría, Teguise y Tinajo, con las de la mitad suroccidental (Arrecife, San Bartolomé, Tías y Yaiza). Así, en la zona norte de Lanzarote se investigaron un total de 1136 sueros de cabras, de los cuales 333 (29.31%) fueron positivos para diluciones $\Rightarrow 1/128$ (tabla número XXVI). En la mitad sur de la isla se hallaron solamente 6 muestras positivas de las 222 estudiadas (2.70%).

El valor de χ^2 aplicando la corrección de Yates fue de 68.79, con una Odds ratio de 14.93 y una $p < 0.01$ (muy significativa):

Tabla XXVI.

Zona/Título	$\Rightarrow 1/128$	$< 1/128$	Totales
Norte	333	803	1136
Sur	6	216	222
Totales	339	1019	1358

No se encontraron diferencias significativas al comparar las tasas de seropositividad de los rebaños pertenecientes a un mismo municipio.

IV.6.) RESUMEN DE RESULTADOS EN LAS MUESTRAS DE CABRAS.

- La seroprevalencia de anticuerpos Ig G frente a *Borrelia burgdorferi* en cabras de Lanzarote, partiendo de la dilución de cribaje 1/16, resultó del 89.46%.
- La tasa de seropositivos con títulos iguales o superiores a 1/128 fué de 24.96 %.
- No se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los rebaños pertenecientes al mismo municipio.
- Por último se observó un agrupamiento de casos seropositivos en los municipios de la zona norte de la isla (Haría, Teguiise y Tinajo), existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los rebaños de las poblaciones meridionales (Arrecife, S. Bartolomé, Tías y Yaiza).

IV.7.) RESULTADOS DEL ESTUDIO DE GARRAPATAS RECOGIDAS EN LANZAROTE.

Las 442 garrapatas recolectadas del ganado caprino insular fueron identificadas como formas adultas de *Rhipicephalus turanicus*. De ellas 228 (51.5%) fueron machos y 214 (48.4%) hembras.

Las 24 garrapatas recogidas sobre perros de la isla resultaron ser formas adultas de *Rhipicephalus sanguineus*, repartidas al 50% para cada sexo.

Haremos a continuación una breve referencia a ambas especies de ácaros, pues no pudo hacerse previamente al no disponer de datos sobre las garrapatas de Lanzarote con anterioridad a nuestro estudio.

Parece que *Rhipicephalus* es el género predominante en Lanzarote, aunque nuestro estudio resulta incompleto al no abarcar otras especies de mamíferos, aves y reptiles susceptibles de ser parasitadas por garrapatas. *R. sanguineus* es la especie que parasita al perro en todo el mundo, por lo que no insistiremos más en ella. *R. turanicus* se encuentra extendida por Africa y zonas del sur de Europa y Asia, parasitando numerosos animales domésticos y salvajes. Es especialmente activa tras épocas lluviosas y al inicio de las estaciones cálidas y secas. Cerca de Canarias ha sido hallada en Marruecos, parasitando un rebaño de ovejas próximo a Rabat.

DISCUSSION

V) DISCUSION.

V.1.) RESULTADOS GLOBALES.

Al plantearnos el presente estudio lo primero que establecimos fué la necesidad de disponer de una muestra suficientemente representativa de la población de la isla Canaria de Lanzarote, que permitiera valorar debidamente la seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en una zona geográfica donde se desconocía por completo la situación de esta infección e incluso su existencia. Otro tanto sucedió a la hora de buscar un posible reservorio de la borreliosis en mamíferos de la isla, eligiendo al ganado caprino por ser el único con entidad y número suficiente para realizar con garantía y validez estadística nuestro estudio.

Para ello se estimó un tamaño muestral que supuso investigar los sueros del 1.88% de los habitantes de Lanzarote, de acuerdo al censo de 1986. Además de realizar la selección de la muestra de forma aleatoria, se estratificó por edades, sexo y medio de residencia, urbano o rural, excluyendo enfermedades infecciosas e inmunodeficiencias. Por último se evaluó la presencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en un grupo formado por pastores de cabras, cuyo contacto con el ganado, el hábitat rural y los posibles vectores y reservorios de esta zoonosis, lo hacían candidato adecuado a constituir un grupo de riesgo para la enfermedad .

El estudio realizado en los rebaños de cabras supuso evaluar al 13.87% de la cabaña caprina de la isla de acuerdo al censo de 1991.

En nuestros resultados no aportamos diferencias por edad, pues casi todo el ganado eran animales adultos, ni sexo, ya que casi el 99% eran hembras.

Se compararon las cifras de seropositividad para la borreliosis de Lyme entre los distintos rebaños de cada municipio insular y también correlacionamos los datos resultantes de cada población con las restantes, en un intento de hallar posibles diferencias por zonas geográficas.

Los resultados de nuestro trabajo permiten establecer la presencia de *Borrelia burgdorferi* en Lanzarote, con baja prevalencia de la infección (1.58% por Inmunofluorescencia indirecta) en la población humana residente y cifras bastante más elevadas (22.01%) en cabras, el ganado predominante en la isla y por tanto posible reservorio de la enfermedad.

V.2.) RESULTADOS EN MUESTRAS HUMANAS.

Refiriéndonos a los resultados en sueros humanos, encontramos una tasa global de prevalencia de anticuerpos por Inmunofluorescencia indirecta frente a *Borrelia burgdorferi* bastante alta (21.62%), pues se partió de una dilución sérica de despistaje de 1/16 para obtener una buena sensibilidad en el estudio. Sin embargo, al valorar seropositivos iguales o por encima del título 1/128 (usado habitualmente como punto de corte para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme en humanos) las cifras descienden hasta el 1.58%, correspondiéndose con las halladas en numerosos trabajos. Así, en investigaciones realizadas en Estados Unidos de América sobre individuos asintomáticos considerados de bajo riesgo para contraer la borreliosis de Lyme, los seropositivos variaron entre 0 y 10%, dependiendo del área geográfica evaluada ¹⁹⁹.

En Europa los resultados también son variables, oscilando entre las bajas prevalencias publicadas en individuos carentes de factores de riesgo para la infección y las más elevadas de personas con ocupaciones o hábitos más expuestos. De este modo, en Inglaterra se han obtenido seroprevalencias para la enfermedad de Lyme de entre el 1 al 7% dependiendo de las zonas ¹⁴³. En Suiza las cifras variaron desde 3.9-6% en controles hasta 26% en población de riesgo ¹²⁹, mientras que en Alemania estuvieron entre el 8 y el 18% en trabajadores forestales de Brandemburgo y 4-5% del grupo control ¹⁶⁹. En Suecia se hallaron hasta un 25% de seropositivos para la borreliosis de Lyme en una zona de alta endemia ²⁹.

Si nos centramos en nuestro país, parece clara la diferencia entre la mitad norte peninsular y el resto ⁵. Así Oteo et al en La Rioja publican tasas de prevalencia para la antropozoonosis

que nos ocupa de entre 3 y 30% según la zona estudiada, con mayores cifras en la Sierra donde la distribución del vector *Ixodes ricinus* es más abundante ¹⁵⁸. Tamayo y colaboradores en Valladolid encuentran que un 10.5% de trabajadores con factores de riesgo presentaban anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* ²⁰⁵. Igualmente un trabajo realizado en la provincia de Soria por Saz et al. concluye en tasas del 13% de prevalencia de la infección en población asintomática ¹⁷⁷. En Asturias las cifras varían entre 0 y 24% según comarcas y medio urbano o rural según datos de Asensi y colaboradores ¹⁶. Por otro lado, se han publicado tasas de seroprevalencia inferiores en Barcelona ⁵¹ y Sevilla, provincia esta última en la que López Prieto y Borobio demuestran la existencia de anticuerpos para la borreliosis de Lyme en el 1.3% de una serie de individuos sin clínica sugestiva ¹²³.

En la revisión de Anda y colaboradores hecha por el Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda, se aprecia una tendencia al acúmulo de casos de enfermedad de Lyme en el norte (40%) y centro (36%) de España, con sólo un 24% hallado en el sur ⁵. Como podemos ver a la luz de todos estos datos, nuestros resultados se aproximan a los obtenidos en la zona sur peninsular y el área mediterránea.

Hasta aquí nos hemos referido a los resultados globales obtenidos en muestras séricas de la población lanzaroteña, tras emplear una técnica serológica (inmunofluorescencia indirecta) utilizada habitualmente como método de "screening". Actualmente se aconseja para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme realizar un Western-blot sobre los sueros que resultaron positivos por IFI o ELISA ⁵⁵. Además, para muestras con títulos bajos de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* los CDC americanos recomiendan retestar por WB dichos sueros, en un intento de mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico. En nuestro estudio, la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*

disminuyó tras efectuar el Western-blot, de forma que únicamente el 38.75% de las muestras con títulos $\geq 1/32$ por IFI resultaron WB positivas. Sin embargo este porcentaje se elevó hasta el 58.82% al evaluar diluciones séricas iguales y superiores a 1/128, considerado, como ya hemos dicho, punto de corte en la inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Finalmente, la correlación IFI/WB sólo resultó buena (100%) para las escasas muestras con títulos de 1/256 por inmunofluorescencia indirecta.

Todo ello nos lleva a pensar que, uniendo una técnica serológica de cribado (IFI o ELISA) a una confirmatoria (WB), podemos aquilatar bastante mejor el diagnóstico de esta espiroquetosis, aún no disponiendo de información sobre las cepas autóctonas de *Borrelia burgdorferi* ni de la situación epidemiológica de la infección en una zona determinada y siempre que las tasas de anticuerpos determinadas por la técnica de “screening” sean suficientemente elevadas.

Pese a la falta de estudios mejor diseñados epidemiológicamente y que empleen técnicas de diagnóstico serológico similares, se observa una correlación entre prevalencia alta de borreliosis de Lyme y presencia en el área de la garrapata vector *Ixodes ricinus*⁵. Como citamos en el apartado de “Resultados”, las únicas garrapatas que encontramos en Lanzarote fueron del género *Rhipicephalus*, ácaros menos sensibles a la sequedad ambiental y por ello mejor adaptados al clima semidesértico de la isla. Por tanto, podemos concluir que las cifras de seroprevalencia para *Borrelia burgdorferi* fruto de nuestro estudio en la isla Canaria de Lanzarote son bajas, concordantes con las publicadas por otros autores en el sur de España y con la ausencia del vector reconocido de esta infección en este área geográfica, *Ixodes ricinus*.

En cuanto a los resultados por edad, en nuestra serie no aparecen diferencias significativas al comparar los distintos grupos etarios establecidos. No obstante, sí observamos un acúmulo de seropositivos, especialmente por IFI, para la enfermedad de Lyme entre los 26 y 55 años. En la literatura publicada al respecto suele repetirse una mayor incidencia de la espiroquetosis en edades infantiles, tanto en Estados Unidos como en Europa ^{73,82,152}. Nuestro estudio, quizás debido al pequeño tamaño muestral correspondiente a niños respecto a la muestra total, no aprecia éste resultado. Además parece que el número de seropositivos es mayor en la población infantil expuesta a picaduras de garrapatas, premisa que no incluye nuestra serie. Sin embargo, un trabajo de Steer et al. hallaba que la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* iba incrementándose con la edad, lo que sí podría correlacionarse mejor con nuestros valores ¹⁹⁹. En cualquier caso se requieren más estudios que permitan concretar la importancia del factor edad en la epidemiología de esta enfermedad.

Al analizar los resultados por sexos, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, aunque sí aparece un predominio en hombres a razón 2:1, especialmente evidente por IFI. Esto mismo ha sido publicado en numerosas series, incluida la de Anda y colaboradores de 1993 en España ⁵. Una posible explicación aportada es la mayor exposición de los varones a los vectores de la borreliosis de Lyme, al desempeñar actividades al aire libre.

En cuanto a la comparación realizada por medio de residencia, no se hallaron diferencias significativas entre los habitantes del medio urbano (como dijimos sólo pueden ser considerados como tales los vecinos de Arrecife) y los del medio rural. Si confrontamos estos datos con los de otros trabajos ^{146,188}, vemos que se ha demostrado un riesgo

ocupacional para contraer la enfermedad de Lyme, siendo los trabajadores que desarrollan su actividad al aire libre los más expuestos. Así mismo los residentes en áreas semiurbanas de E.E.U.U., cercanas al campo y con viviendas con jardín pueden sufrir mayor incidencia de picaduras de garrapatas y por ello tener una mayor probabilidad de padecer la infección ¹³⁰. En Europa varios estudios al respecto también concluyen un riesgo más acusado de seropositividad para esta borreliosis en la población rural ^{71,169}.

Centrándonos en nuestro país, Asensi et al. publican prevalencias del 24% en campesinos de comarcas de la sierra asturiana frente a las obtenidas en otras áreas rurales (6%) y urbanas (0%) de esta provincia ¹⁶. También Oteo y colaboradores hallan serorreactividad para *B. burgdorferi* en el 38% de los trabajadores del campo riojanos, especialmente en parajes de la sierra, siendo muy inferior en La Rioja Baja (3%) ¹⁵⁴. De cualquier forma, en Lanzarote las diferencias entre hábitat rural y urbano están poco claras, al tratarse de núcleos de población pequeños (con la excepción de la capital, Arrecife) y muy influenciados por actividades laborales que suponen un contacto cercano con el campo.

Un dato a destacar es la elevada prevalencia de anticuerpos anti- *Borrelia burgdorferi* encontrados en nuestro grupo de pastores de cabras, que supuso un 19.04% del total de los seropositivos, para títulos iguales o superiores a 1/128 por IFI, de todas las muestras humanas evaluadas. Otras publicaciones coinciden en el hallazgo de resultados serológicos positivos para la enfermedad de Lyme en trabajadores al aire libre. Así estudios realizados en Estados Unidos por Smith et al. aprecian diferencias significativas al comparar una población de riesgo con otra de donantes de sangre del mismo área geográfica. Por su parte el ya citado trabajo suizo demostró reactividad serológica frente a la borreliosis en el 26% de un grupo de riesgo, siendo de tan sólo el 6% para los individuos considerados como

controles ⁷¹. También en España se ha relacionado la enfermedad de Lyme con trabajadores del campo y habitantes de zonas rurales, coincidiendo nuestros resultados con los ya referidos. Resulta evidente que el elevado porcentaje de seropositivos por IFI para *B. burgdorferi* encontrado en los pastores de cabras de Lanzarote respecto al resto de la población evaluada, sugiere una actividad laboral de riesgo para contraer esta antropozoonosis. De cualquier modo, este hallazgo no se vió confirmado al emplear la técnica de Western-blot en un intento de mejorar la especificidad diagnóstica de los tests serológicos utilizados.

En cuanto a las distintas especies de *Borrelia burgdorferi* sensu lato sólo hemos podido valorar, mediante el Western-blot realizado en los seropositivos por IFI, dos genotipos: *B. burgdorferi* sensu stricto (I) y *B. garinii* (II). Contrariamente a lo publicado por otros autores europeos ⁹⁸, hallamos en nuestra serie mayor porcentaje de anticuerpos frente al Genotipo I (62%) que frente al II (38%). Además el 16% de los sueros evaluados presentaron simultáneamente bandas antigénicas de ambas genoespecies. Los criterios seguidos para la interpretación del WB han sido los recomendados por Hauser, Wilske et al., pues son autores europeos versados en el tema y su publicación es muy reciente (1997) ⁹⁸. De cualquier modo no existen reglas estandarizadas para valorar el WB en la borreliosis de Lyme y abundan los trabajos y recomendaciones al respecto. Así, en USA los CDC establecieron en 1996 criterios interpretativos del WB basados en estudios previos efectuados por Engstrom y Dressler para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ⁵⁵. En Europa, la gran variabilidad genética, y por tanto antigénica, de las distintas especies de *B. burgdorferi* sensu lato imposibilita, hoy por hoy, unificar estos criterios para llegar a un consenso en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme. Además otras borrelias y

en general espiroquetas comparten numerosos antígenos con *B.burgdorferi*, de modo que la posibilidad de reacciones serológicas cruzadas es un hecho habitual ²⁰¹. En cualquier caso, mientras no se disponga de un mapa epidemiológico con la distribución de los vectores y las distintas genoespecies de *Borrelia* productoras de la enfermedad de Lyme y, consecuentemente, de kits comerciales con antígenos propios de las cepas autóctonas la serología de esta zoonosis permanecerá confusa.

Un posible factor de distorsión en nuestro estudio sería el haber cribado las muestras únicamente para anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, sin incluir en la determinación otras genoespecies patógenas prevalentes en Europa. En el momento en que realizamos nuestro trabajo no existían kits comercializados para estas cepas, hallándose en fase experimental dichas técnicas. No obstante, es posible que las numerosas reacciones cruzadas existentes entre los distintos genogrupos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato y la evaluación efectuada posteriormente por WB sobre seropositivos por IFI a títulos bajos, remedien el problema. En este sentido, hallamos mayor proporción de muestras con anticuerpos frente a *Borrelia garinii* entre los sueros que presentaron títulos Bajos en la IFI, al compararlos con el resto.

Refiriéndonos a las bandas antigénicas del WB que se valoraron como significativas para el diagnóstico, según los citados criterios de Hauser y colaboradores, añadiremos que nuestros resultados no son equiparables con los publicados por estos autores en su grupo control ⁹⁸. Mientras en nuestra serie las bandas significativas más repetidas fueron para *B.burgdorferi* p 58, p93 y p17, ellos detectan Osp C y p58 únicamente.. En el caso de *B.garinii* sí existe correspondencia para p93 pero no para p39. De cualquier modo, no se dispone de trabajos que permitan comparar frente a un estándar adecuado los resultados del WB para el

diagnóstico de la Borreliosis de Lyme. Esto es especialmente cierto en Europa, donde la gran variabilidad antigénica de las distintas genoespecies de *Borrelia burgdorferi* s.l. complican aún más esta cuestión.

Para finalizar la discusión sobre los resultados obtenidos en las muestras séricas humanas, hemos de referirnos al problema de las reacciones cruzadas en la serología de la borreliosis de Lyme. En nuestro caso todos los sueros que presentaron reactividad por inmunofluorescencia indirecta para *Borrelia burgdorferi* fueron testados también mediante una prueba no treponémica para descartar sífilis: RPR. Las muestras que resultaron positivas por ambas técnicas serológicas fueron descartadas de nuestro estudio.

V.3.) RESULTADOS EN MUESTRAS CAPRINAS.

Las cifras de prevalencia de anticuerpos séricos frente a *Borrelia burgdorferi* en la muestra del ganado caprino lanzaroteño fueron muy elevadas, tanto al considerar la dilución inicial de despistaje 1/16 (89.46%) como al valorar los títulos iguales o superiores a 1/128 (24.96%), establecidos como punto de corte para el diagnóstico serológico de la infección. Estos resultados apuntan a las cabras como posible reservorio de la enfermedad de Lyme en esta isla Canaria.

Si evaluamos nuestros datos respecto a los publicados en la literatura médica hasta el momento, encontraremos una gran diversidad de reservorios comprobados o sugeridos de la borreliosis de Lyme.

De este modo en Estados Unidos de América se ha demostrado la eficacia del ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) como huésped intermediario de *Borrelia burgdorferi*, conociéndose que en zonas de fuerte endemia para esta espiroqueta, se halla infestado por la garrapata *Ixodes scapularis* en el 80-90% de casos ⁷. Sin embargo otros hospedadores de *B. burgdorferi* son considerados incompetentes para transmitir la infección, como el ciervo americano ⁷ (pese a que el 80% resultaron seropositivos en zonas endémicas para *I. scapularis* y sólo el 5% en regiones carentes de esta garrapata), o su papel epidemiológico está aún poco claro, como en el caso del perro. Este último animal, en un trabajo realizado en un área endémica para la enfermedad de Lyme en Estados Unidos, ofreció tasas de anticuerpos muy variables desde 6.5 hasta 85.2% según las zonas investigadas ⁷². Un estudio de especial interés llevado a cabo en Monhegan Island (Maine, USA), demostró la capacidad de las ratas noruegas para hospedar *Ixodes scapularis* en ausencia del ratón de

patas blancas, resultando seropositivos para la borreliosis de Lyme el 23% de los perros y gatos evaluados en la isla ¹⁸⁹.

Refiriéndonos a Europa, es bien sabida la mayor variabilidad de las cepas autóctonas de *Borrelia burgdorferi* y también de sus vectores y reservorios. Si el papel de *Ixodes ricinus* y sus hospedadores como los ratones del género *Apodemus* parece fuera de toda duda en nuestro continente, no sucede otro tanto con numerosos animales que podrían ser transmisores de esta espiroquetosis. Así, centrándonos en los trabajos publicados en el ganado como posible reservorio de la enfermedad de Lyme, tenemos que la seroprevalencia hallada en ovejas escocesas fué del 2.7 al 24.4% ¹³⁹, mientras otro estudio llevado a cabo en corderos en Noruega resultó en un valor medio de seropositivos del 10%, oscilando entre 0 y 20%, según regiones y en concordancia con la distribución de *Ixodes ricinus* ⁷⁷.

En el caso de España este tema continúa en discusión y los datos disponibles se encuentran en gran parte pendientes de confirmar. Si bien ha quedado definitivamente establecida la presencia de la enfermedad de Lyme en nuestro país, con los aislamientos de las primeras cepas autóctonas de *Borrelia burgdorferi* tanto a partir de garrapatas vector ^{26,80} como de pacientes con Eritema Crónico Migrans ⁶⁸, quedan aún por concretar posibles reservorios y otros vectores de esta espiroqueta.

Algunos trabajos españoles han intentado buscar , básicamente mediante estudios de seroprevalencia, posibles reservorios de la infección en animales salvajes y domésticos. De esta forma, en la provincia de Zaragoza un 13% de los zorros investigados resultaron seropositivos por inmunofluorescencia indirecta ¹⁵¹. Un par de estudios realizados en perros de la Comunidad de Madrid hallaron entre 11.5 y 35% de seropositivos según la técnica empleada ⁴⁹. También Merino et al. observan en Soria porcentajes considerables de perros

con serologías positivas para la enfermedad de Lyme ¹³⁵. En la provincia de Huesca se han publicado cifras del 52.2% de ovejas con anticuerpos anti- *Borrelia burgdorferi*, bajando hasta el 30.6% cuando se valoraron sueros de vacas ⁷⁴. Nuestro trabajo en el ganado caprino de la isla de Lanzarote supone una aportación más a la escasa bibliografía sobre los posibles reservorios de la enfermedad de Lyme en España.

La serie presentada aquí, constituye posiblemente la más numerosa de todas las referidas al ganado, no solamente en nuestro país sino en la literatura médica mundial. En ella no se aprecian diferencias significativas al comparar los distintos rebaños pertenecientes a un mismo municipio de la isla canaria.

En cambio sí hallamos significación estadística al correlacionar las tasas de animales seropositivos de unos municipios con otros. De tal modo, observamos que la mitad norte de Lanzarote ofrece unos valores (29.3%) de positividad para anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en sueros de cabras muy superiores a los obtenidos en la mitad meridional de la isla (2.7%). Una posible explicación podríamos encontrarla en cierta diferencia climática existente entre una y otra zona geográfica de Lanzarote. Aunque no existen variaciones importantes de altitud, pues todos los rebaños se localizaron entre los 0 y 500 metros, la cadena montañosa de Guardilama, de origen volcánico, separa ambas regiones. Los vientos alisios, cuya componente norte traen humedad a Canarias, podrían afectar con mayor intensidad a la mitad septentrional insular, que quedaría en la zona de barlovento y por tanto tendría menor sequedad que la zona localizada al Sur del macizo de Guardilama, mejor resguardada de estos vientos húmedos. Así mismo los riscos de Famara, al Norte de la isla, presentan un mayor índice de pluviosidad que favorecería, quizá, la actividad de las garrapatas, artrópodos sensibles a la desecación. Resultaría de este modo que la mitad Sur

insular ofrecería menores tasas de seroprevalencia para *Borrelia burgdorferi* en el ganado caprino, debido a la menor actividad de las garrapatas de la zona, consecuencia a su vez del menor grado de humedad ambiental. Evidentemente estos datos requieren de un estudio posterior que pudiera confirmarlos, valorando la existencia de *B. burgdorferi* en las garrapatas canarias. Pese a que en el trabajo realizado para catalogar las garrapatas de Lanzarote, no se hallaron *Ixodes* spp. ni otros géneros descritos habitualmente como transmisores de la enfermedad de Lyme, los ácaros de esta isla (del género *Rhipicephalus*) podrían suplantar a *Ixodes ricinus* en su papel de vector habitual de esta infección.

De este modo las cabras, único ganado relevante en Lanzarote, podría constituir un reservorio para la borreliosis de Lyme. Este dato encuentra también apoyo en la elevada tasa de seropositividad observada en los pastores de cabras de la isla, significativamente superior a la demostrada en el grupo de población general seleccionado.

En cualquier caso, son necesarios estudios que confirmen definitivamente la presencia de *Borrelia burgdorferi* en las garrapatas del archipiélago canario, idealmente por cultivo y caracterización genética del aislado. Además queda pendiente la búsqueda de nuevos reservorios para la infección (ganado, mamíferos domésticos y salvajes, aves, reptiles,..) y también de otros posibles vectores, ácaros o no.

CONCLUSIONES

VI) CONCLUSIONES.

1.- Nuestro estudio demuestra la presencia de *Borrelia burgdorferi* en Lanzarote, con escasa prevalencia en la población humana asintomática (1.58%) y cifras bastante más elevadas en el ganado caprino (24.96%), predominante en la isla.

2.- No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la seroprevalencia de la infección al comparar distintos grupos de edad, sexo y medio de residencia.

3.- En un grupo de pastores de cabras, la seroprevalencia fue significativamente superior (19.04%) respecto a la de la población general, lo cual apunta al ganado caprino como posible reservorio de la enfermedad de Lyme.

4.- Los genogrupos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, determinados mediante Western-blot sobre sueros humanos, fueron *B.burgdorferi* sensu stricto (62%) con mayor prevalencia que *B.garinii* (38%).

5.-La utilización de dos técnicas serológicas, una de cribado y otra confirmatoria, nos permitió aquilatar en mayor grado el diagnóstico pese a no disponer de información sobre las cepas autóctonas de *Borrelia burgdorferi* en la zona ni la situación epidemiológica de la infección.

6.- Se comprobó una muy buena correlación entre ambas técnicas serológicas (Inmunofluorescencia y Western-blot) para títulos elevados de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*, que resultó ser del 100% para las diluciones 1/256, descendiendo al 56% para las diluciones 1/128 y 1/64..

7.- Las elevadas tasas de seroprevalencia para la enfermedad de Lyme en el ganado caprino insular sugieren que este puede constituir un reservorio de esta zoonosis.

8.- La mayor prevalencia de anticuerpos séricos frente a *Borrelia burgdorferi* en las cabras de la mitad Norte de Lanzarote (29.31% frente a 2.70% en la mitad sur insular) pudiera explicarse por el mayor grado de humedad y el régimen de vientos que hacen de la zona septentrional de la isla un hábitat más adecuado para las garrapatas, ácaros sensibles a la sequedad ambiental.

9.- El estudio de garrapatas de Lanzarote concluyó en que todas eran *Rhipicephalus* spp., vector implicado sólo ocasionalmente en la transmisión de la Borreliosis de Lyme. Sin embargo la inexistencia en la isla de *Ixodes* spp. podría suponer que las garrapatas locales vehiculen la infección por *B.burgdorferi*.

10.- De cualquier modo se requieren nuevos estudios que confirmen la presencia de *Borrelia burgdorferi* en las garrapatas canarias y la búsqueda de nuevos reservorios y vectores para establecer el ciclo de esta infección en el archipiélago.

ANEXO

VII) ANEXO

REBAÑO	Orzola	Soo	L.Valles	Tías	Teguisse	Tinajo	L.Escamas	Tajaste	E.Cuchillo	Yaiza	Máquez	Argana alta	Argana baja	Güime	Guatiza
Orzola															
Soo	n.s.														
L.Valles	n.s.	n.s.													
Tías	p<0.05	p<0.05	p<0.05												
Teguisse	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05											
Tinajo	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.										
L.Escamas	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.									
Tajaste	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.								
E.Cuchillo	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.							
Yaiza	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05						
Máquez	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05					
Argana alta	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05				
Argana baja	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.			
Güime	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.		
Guatiza	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05	p<0.05	

BIBLIOGRAFIA

II) BIBLIOGRAFIA.

1. Ackermann R, Rehse-Kupper B, Gollmer E, Schmidt R. Chronic neurologic manifestation of erythema migrans borreliosis. *Ann NY Acad Sci* 1988; 539:16-23.
2. Aeschlimann A, Chamon E, Gigon F, et al. *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1986; 263:450-458.
3. Afzelius A. Erythema chronicum migrans. *Derm Venereol (Stockh)* 1921; 2:120-125.
4. Allen C, Steere AC, Taylor E, McHugh GL, Logigian EL. The overdiagnosis of Lyme disease. *JAMA* 1993; 14:1812-1816.
5. Anda P, Rodríguez I, de la Loma A, et al. A serological survey and review of clinical Lyme borreliosis in Spain. *Clin Infect Dis* 1993; 16:310-319.
6. Anderson JF. Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. *Rev Infect Dis* 1989; 11:S1451-S1459.
7. Anderson JF. Epizootiology of Lyme Borreliosis. *Scand J Infect Dis* 1991; Suppl. 77:23-34.

8. Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA, Hyde FW. Identification of endemic foci of Lyme disease: isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks. J Clin Microbiol 1985; 22:36-38.
9. Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA, Hyde FW. Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. Infect Immunol 1986; 51:394-396.
10. Anderson JF, Magnarelli LA. Avian and mammalian hosts for spirochete- infected ticks and insects in Lyme disease focus in Connecticut. Yale J Biol Med 1984; 57:627-641.
11. Anderson JF, Magnarelli LA, Burgdorfer W, Barbour AG. Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals in Connecticut. Am J Trop Med Hyg 1983; 32:818-824.
12. Anderson JF, Magnarelli LA, LeFebvre RB. Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cotton-tail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. J Clin Microbiol 1989; 27:13-20.
13. Artero JM, Mellado M, Martín Luengo F. Estudio de reacciones cruzadas mediante técnicas serológicas entre *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1991; 9:127

14. Asbrink E, Hovmark A. Comments on the course and classification of Lyme Borreliosis. *Scand J Infect Dis* 1991; Supp 77:41-43.
15. Asbrink E, Hovmark A. Classification, geographic variations, and epidemiology of Lyme borreliosis. *Clin Dermatol* 1993; 11:353-357.
16. Asensi JM, Martínez AM, Guerrero A, et al. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Lyme en Asturias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11:420-423.
17. Assous MV, Postic D, Paul G, Nénot P, Baranton G. Western blot analysis of sera from Lyme Borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:261-268.
18. Bakken L, Cade K, Callister S. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. *JAMA* 1992; 268:851-895.
19. Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol* 1995; 146:329-340.
20. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS 461 associated with Lyme Borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:378-383.

21. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yall J Biol Med* 1984; 57:521-525.
22. Barbour AG. Laboratory aspects of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:399-414.
23. Barbour AG. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* 1988; 26:475-478.
24. Barbour AG. Molecular biology of antigenic variation in Lyme Borreliosis and Relapsing Fever: a comparative analysis. *Scand J Infect Dis* 1991; Suppl. 77:88-93.
25. Barbour AG, Fish D. The biological and social phenomenom of Lyme disease. *Science* 1993; 260:1610-1616.
26. Barral M, García Pérez AL, Vitutia MM, Anda P. Aislamiento y identificación de *Borrelia burgdorferi* en *Ixodes ricinus* del País Vasco. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas 1995; Libro de Abstracts:88
27. Benach JL, Fernández B, Szczepanski A, García-Moncó JC. Lyme borreliosis: non-specific interactions of the organism with the host. *Scand J Infect Dis* 1991; Suppl. 77:130-135.

28. Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol* 1992; 30:359-361.
29. Berglund J, Eitrem R, Norrby SR. Long-term study of Lyme Borreliosis in a highly endemic area in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1996; 28:473-478.
30. Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, et al. An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N Engl J Med* 1995; 333:1319-1324.
31. Bergström S, Barbour AG, Garon CF, Hinderesson P, Girons IS, Schwan TG. Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Scand J Infect Dis* 1991; Suppl. 77:102-107.
32. Bey RF, Larson ME, Lowery DE, et al. Protection of C3H/He mice from experimental *Borrelia burgdorferi* infection by immunization with a 110 kDa fusion protein. *Infect Immun* 1995; 63:3213-3217.
33. Bosler EN, Ormiston BG, Coleman JL, et al. Prevalence of the Lyme disease spirochete in populations of white tailed deer and white footed mice. *Yale J Biol Med* 1984; 57:651-659.
34. Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:224-232.

35. Brunner M, Stein S, Mitchell PD, Sigal LH. Immunoglobulin M capture assay for serologic confirmation of early Lyme disease: analysis of immune complexes with biotinylated *Borrelia burgdorferi* sonicate enhanced with flagellin peptide epitope. J Clin Microbiol 1998; 36:1074-1080.
36. Buechner SA, Ruffli T. Atrophoderma of Pasini and Pierini. J Am Acad Dermatol 1994; 30:441-446.
37. Bunikis J, Olsen B, Westman G, Bergström S. Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for and patients with Lyme disease. J Clin Microbiol 1995; 33:1473-1478.
38. Burgdorfer W. Vector/host relationship of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Rheum Dis Clin North Am 1989; 15:775-777.
39. Burgdorfer W, Anderson JF, Gern L, Lane RS, Piesman J, Spielman A. Relationship of *Borrelia burgdorferi* to its arthropod vectors. Scand J Infect Dis 1991; Suppl. 77:35-40.
40. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease a tick- borne spirochetosis ? Science 1986; 216:1317-1319.

41. Burgdorfer W, Hayes SF, Corwin D. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in *Ixoid* ticks. Rev Infect Dis 1989; 11:S1442-S1450.
42. Burgess EC. Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow. J Am Vet Med Assoc 1987; 191:1468-1460.
43. Burgess F, Windberg LA. *Borrelia* spp. infection in coyotes, black tailed jack rabbits and desert cottontails in southern Texas. J Wildl Dis 1989; 25:47-51.
44. Burmester GR. Immunology of reactive arthritides. Ann Rev Immunol 1995; 13:229-250.
45. Busch U, Hizo-Tenfel C, Böhner R, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from cutaneous Lyme Borreliosis biopsies differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. Scand J Infect Dis 1996; 28:583-589.
46. Callister S, Schell R, Cade K. Characterization of the Borreliosis antibody response to *Borrelia burgdorferi* in humans: a serodiagnosis test. J Infect Dis 1993; 167:158-164.
47. Campbell GL, Paul WS, Schriefer ME, Craven RB, Robbins KE, Dennis DT. Epidemiologic and diagnostic studies of patients with suspected early Lyme disease, Missouri, 1990-1993. J Infect Dis 1995; 172:470-480.

48. Canica MM, Nato F, du Merle L, Maizie JC, Baranton G, Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestation of Lyme Borreliosis. Scand J Infect Dis 1993; 25:441-448.
49. Caride E, Rodriguez JA, Martín Espada MC, Olmeda AS, Solana A. Prevalencia de la Borreliosis canina en Madrid. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas 1995; Libro de Abstracts:93
50. Carranza R, Borobio MV, Pascual F, Perea EJ. Seroprevalencia de anticuerpos frente a la Borreliosis de Lyme en población sana de la Isla de Lanzarote. Med Clin (Barc) 1995; 104:38
51. Carrasco I, Cardom MJ, Sabria M, Pedro-Botet ML. Prevalencia de infección por *Borrelia burgdorferi* en un área de Barcelona. Enf Infecc Microbiol Clin 1992; 10:242
52. Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease- Unites States, 1980. Morbid Mortal Wkly Rep 1981; 30:489-497.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for public health surveillance. Morbid Mortal Wkly Rep 1990; 39:19-21.
54. Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease- United States, 1991-92. Morbid Mortal Wkly Rep 1993; 42:345-348.

55. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for tests performance and interpretation from the 2th National Conference on serologic diagnosis of Lyme disease. *Morbid Mortal Wkly Rep* 1995; 44:590-591.
56. Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease-United States, 1994. *Morbid Mortal Wkly Rep* 1995; 44:459-462.
57. Centro de Estadística y Documentación de Canarias. Padrón Municipal: Habitantes de Canarias. Consejería de Economía y Comercio del Gobierno de Canarias 1986;
58. Ciesielski CA, Markowitz LE, Horsley R, Hightower AW, Russell H, Broome CV. Lyme disease surveillance in the United States, 1983-1986. *Rev Infect Dis* 1989; 11:S1435-S1441.
59. Coleman JL, Benach JL. Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Invest* 1989; 84:322
60. Craft J, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis* 1984; 149:789-795.
61. Dattwyler RJ, Halperin JJ, Volkman DJ, Luft BJ. Treatment of late Lyme borreliosis-randomised comparison of Ceftriaxone and Penicillin. *Lancet* 1988; 1:1191-1194.

62. Dattwyler RJ, Luft BJ. Immunodiagnosis of Lyme borreliosis. *Rheum Dis Clin N Am* 1989; 15:727-734.
63. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ. Lyme disease in Europe and North America. *Lancet* 1987; 1:681
64. Dekonenko EJ, Steere AC, Berardi VP, Kravchuk LN. Lyme borreliosis in the Soviet Union: a cooperative USA- USSR report. *J Infect Disc* 1988; 158:748-753.
65. Dressler F, Whelan JA, Reinhart BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993; 167:392-400.
66. Duffey PS, Salugsugan BS. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Newsletter* 1993; 15:81-88.
67. Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33:419-422.
68. Escudero R, Barral M, García AL, et al. Borreliosis en España. Distribución de cepa y especies de *Borrelia*. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas 1995; Libro de abstracts:69

69. España A, Torelo A, Guerrero A, Suárez J, Rocamora A, Ledo A. Periarticular fibrous nodules in Lyme Borreliosis. *Br J Dermatol* 1991; 125:68-70.
70. Estrada-Peña A, Oteo JA, Estrada-Peña R, et al. *Borrelia burgdorferi* in ticks (*Acari: Ixodidae*) from two different foci in Spain. *Exp Acarol* 1998; In press.
71. Fahrner H, Van der Linden SM, Sauvain MJ, Gern L, Zhioua E, Aeschlimann A. The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* 1991; 163:305-310.
72. Falco RC, Smith HA, Fish D, et al. The distribution of canine exposure to *Borrelia burgdorferi* in a Lyme-disease endemic area. *Am J Public Health* 1993; 83:1305-1310.
73. Feder Hm, Gerber MA, Cartter ML, Sikand V, Krause PJ. Prospective assessment of Lyme disease in a school-aged population in Connecticut. *J Infect Dis* 1995; 171:1371-1374.
74. Ferrero M, Luis A, González C. Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en vacas y ovejas de la provincia de Huesca. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas 1995; Libro de Abstracts:96
75. Fikrig E, Bockenstedt LK, Barthold SW, et al. Sera from patients with chronic Lyme disease protect mice from Lyme Borreliosis. *J Infect Dis* 1994; 169:568-574.

- +76. Font A, Closa JM, Mascort J. Lyme disease in dogs in Spain. *Vet Rec* 1992; 130:227-228.
77. Fridriksdottir V, Nesse L, Gudding R. Seroepidemiological studies of *Borrelia burgdorferi* infection in sheep in Norway. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1271-1277.
78. Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. The Osp A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:594-598.
79. Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from Ixodes ticks in Japan: rapid species identification by 16 S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* 1996; 40:877-881.
80. García-Moncó JC, Benach JL, Coleman JL, et al. Caracterización de una cepa española de *Borrelia burgdorferi*. *Med Clin (Barc)* 1992; 98:89-93.
81. García-Moncó JC, Miró-Jornet J, Fernández-Villar B, Benach JL, Guerrero A, Berciano JA. ¿Esclerosis múltiple o enfermedad de Lyme? Un problema diagnóstico. *Med Clin* 1990; 94:685-688.
82. Gerber MA, Shapiro ED, Burke GS, and the Pediatric Lyme disease study group. Lyme disease in children in southeastern Connecticut. *N Eng J Med* 1996; 335:1270-1277.

83. Gila L, Guerrero A, Astarloa R, Martí P, Gutiérrez JM. Distrofia simpática refleja. ¿Nueva manifestación de la enfermedad de Lyme? *Enf Infecc Microbiol Clin* 1990; 8:32-35.
84. Gill JS, McLean RG, Shriner RB, Johnson RC. Serologic surveillance for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals. *J Clin Microbiol* 1994; 32:444-451.
85. Gómez Díez S, Asensi JM, Soler T, Fernández Pérez JC. ¿ Linfocitoma cutáneo por *Borrelia* ? *Med Clin* 1993; 100:78
86. Gómez-Mateos JM, Sánchez-Porto A, Lozano de León F, López-Cortés L. Enfermedad de Lyme en la provincia de Sevilla. *Med Clin (Barc)* 1990; 94:236-237.
87. Granter SR, Barnhill RL, Hewins M, Duray PH. Identification of *Borrelia burgdorferi* in diffuse fascitis with peripheral eosinophilia: borrelial fascitis. *JAMA* 1994; 272:1283-1285.
88. Guerrero A. Infección por *Borrelia burgdorferi*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1988; 6:314-320.

89. Guerrero A, Quereda C, Martí-Belda P, Escudero R. Borreliosis de Lyme: ¿cómo se manifiesta en España? *Med Clin (Barc)* 1993; 101:5-7.
90. Guerrero A, Serrano MJ, García-Moncó JC, y Grupo de Estudio para la Enfermedad de Lyme en España. Borreliosis de Lyme en España. *Med Clin (Barc)* 1988; 90:434
91. Guerrero A, y Grupo de Estudio para la Enfermedad de Lyme en España. Frecuencia y espectro clínico de la infección por *Borrelia burgdorferi* en España. *Med Clin (Barc)* 1989; 92:438-439.
92. Gutiérrez J, Maroto MC, De la Higuera A. Three years study of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:542-545.
93. Haas H, Treib J. Neurological manifestations and classification of Borreliosis. *Infection* 1996; 24:467-469.
94. Habicht G, Beck G, Benach JL, Coleman JL, Leichthing K. Lyme disease spirochetes induce human and murine IL-1 production. *J Immunol* 1985; 134:3147-3154.
95. Hamilton DR. Lyme disease: the hidden pandemic. *Posgrad Med* 1989; 85:304-314.
96. Hanrahan J, Benach JL, Coleman JL, et al. Incidence and comulative frecuenci of endemic Lyme disease in a comunity. *J Infect Dis* 1984; 150:489-496.

97. Hansen K, Pii K, Lebech AM. Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme Borreliosis by using a capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella. J Clin Microbiol 1991; 29:166-173.
98. 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; 35:1433-1444.
99. Hedberg CW, Osterholm MT, MacDonald KL, White KE. An interlaboratory study of antibody to *Borrelia burgdorferi*. J Infect Dis 1987; 155:1325-1327.
100. Hoffman H. Lyme Borreliosis. Problem of serological diagnosis. Infection 1996; 24:470-471.
101. Hovind-Hongén K, Asbrink E, Stiernstedt G, Steere AC, Hovmark A. Ultrastructural differences among spirochetes isolated from patients with Lyme disease and related disorders, and from *Ixodes ricinus*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg 1986; 263:103-111.
102. Izquierdo G, Aguilar J, Barranquero A, Navarro G, Borovio MV. Anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi* positivos en pacientes con manifestaciones clínicas compatibles con neuroborreliosis. Neurología 1992; 7:50-54.

103. Johnson BJ, Robbins KE, Bailey RE. Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996; 174:346-353.
104. Johnson RC, Kodner C, Russell M. Active immunization of hamsters against experimental infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1986; 54:897-898.
105. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov. etiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34:496-497.
106. Kantor FS. Disarming Lyme disease. *Sci Am* 1994; 271:34-39.
107. Karabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 1993; 37:843-848.
108. Karlsson M, Mollegard I, Stiernstedt G, Wrethin B. Comparison of Western-blot and ELISA for diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur J Clin Microbiol* 1989; 8:871-877.
109. Karlsson M, Granström M, Stiernstedt G, Asbrink E, Wretling B. Comparison of flagellum and sonicate antigens for serological diagnosis of Lyme Borreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:169-177.

110. Keane-Myers A, Nickell SP. Role of IL-4 and IFN-gamma in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol* 1995; 155:2020-2028.
111. Keller D, Koster FT, Marks DH, Horbach P, Erdile LF, Mays JP. Safety and immunogenicity of a recombinant Osp A Lyme vaccine. *JAMA* 1994; 271:1764-1768.
112. Krampitz HE. In vivo insolation and maintenance of some wild strains of European hard tick spirochetes in mammalian and arthropod hosts: a parasitologist's view. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1986; 263:21-28.
113. Kristoferich W. Lyme Borreliosis in Europe: neurologic disorders. *Rheum Dis Clin North Am* 1989; 15:767-774.
114. Kuiper H, van Dam AP, van Charante AW, Nauta NP, Dankert J. One year follow-up study to assess the prevalence and incidence of Lyme borreliosis among Dutch forestry workers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:413-418.
115. Lafarga B NF, Bolaños M. Experiencia en las Islas Canarias orientales en la búsqueda de la enfermedad de Lyme. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1998; 16:70-74.
116. Lane RS. Susceptibility of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*) to the Lyme borreliosis spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42:75-82.

117. Lane RS, Burgdorfer W. Spirochetes in mammals and ticks (*Acari: Ixodidae*) from a focus of Lyme Borreliosis in California. *J Wildl Dis* 1988; 24:1-9.
118. Lane RS, Piesman J, Burgdorfer W. Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Anun Rev Entomol* 1991; 36:587-609.
119. Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16 S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:921-925.
120. Lissman BA. Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185:219-220.
121. Liu NY, Dinerman H, Levin RE, et al. Randomized trial of Doxycycline vs. Amoxicillin/probenecid for the treatment of Lyme arthritis: treatment of non-responder with IV Penicillin or Ceftriaxone. *Arthritis Rheum* 1989; 32:546
122. López de Munain A, Espinal JB, Martí-Massó JF, Pérez-Trallero E, García-Arenzana JM. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 1990; 335:1168
123. López-Prieto MD, Borobio MV. Prevalencia de anticuerpos de *Borrelia burgdorferi* en la población de Sevilla. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989; 7:489-490.

124. Luft BJ, Gorevic PD, Jiang W, et al. Immunologic and structural characterization of the dominant 66 to 73 kDa antigens of *Borrelia burgdorferi* . J Immunol 1991; 146:2776
125. Luft BJ, Mudri S, Jiang W, et al. The 93-kDa protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. Infect Immun 1992; 60:4309
126. Ma J, Buller PA, Dante S, Davis DR, Perilli-Palmer B, Coughlin RT. Characterization of canine humoral immune responses to Osp subunit vaccines and to natural infection by Lyme disease spirochetes. J Infect Dis 1995; 171:909-915.
127. Maestre JR, Almagro M, Martínez P.de Casas R, Quesada R, Egido J. Esclerodermia localizada (morfea) y artritis séptica. Manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme observadas en El Ferrol. Enf Infecc Microbiol Clin 1991; 9:394-398.
128. Magnarelli LA, Anderson JF, Apperson CS, Fish D, Johnson RC, Chappell WA. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white-tailed deer from Connecticut, New York state and North Carolina. J Wildl Dis 1986; 22:178-188.
129. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J Infect Dis 1987; 156:183-188.

130. Magnarelli LA, Denicola A, Stafford KC, Anderson JF. *Borrelia burgdorferi* in an urban environment: white-tailed deer with infected ticks and antibodies. *J Clin Microbiol* 1995; 33:541-544.
131. Magnarelli LA, Fikrig E, Berland R, Anderson JF, Flavell LA. Comparison of whole-cell antibodies and an antigenic flagellar epitope of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme Borreliosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3158-3152.
132. Magnarelli LA, Meegan JM, Anderson JF, Chappell WA. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with a ELISA for serological studies of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1984; 20:181-184.
133. Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23 S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analysis of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2427-2434.
134. Maroto MC, Gutiérrez J. Diagnóstico de laboratorio de la infección por *Borrelia burgdorferi*. *Boletín de Control de Calidad SEIMC* 1997; 9:27-37.
135. Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Richter M, Spielman A. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* 1992; 165:479-483.

136. Matuschka FR, Lange R, Spielman A, Richter D, Fisher P. Subadult *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) on rodents in Berlin, West Germany. *J Med Entomol* 1990; 27:385-390.
137. Matuschka FR, Spielman A. Lyme krankheit durch Zecken: der verhangnisvolle Biss. *Bild Wissenschaft* 1989; 8:54-64.
138. Merino FJ, Saz JV, Nuncio S, Gegúndez MI, Beltrán M, Filipe A VI Congreso Sociedad Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 1994; Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en perros.
139. Mitchell GB, Smith IW. Lyme disease in Scotland: results of a serological study in sheep. *Vet Rec* 1993; 133:66-67.
140. Mitchell PD. Lyme Borreliosis: a persisting diagnostic dilemma. *Clin Microbiol Newsletter* 1993; 15:57-64.
141. Monteil H, Jaulhac B, Piemont Y. Maladie de Lyme et infections à *Borrelia burgdorferi* en Europe. *An Biol Clin* 1989; 47:428-437.
142. Muenchoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, et al. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers. *Zentralbl Mikrobiol* 1986; 263:412-419.

143. Muhleman MF, Wright DJ. Emerging pattern of Lyme disease in United Kingdom and Irish Republic. *Lancet* 1987; 1:260-262.
144. Muñoz A, Cardesa JJ, Zarallo L, et al. Infección por *Borrelia burgdorferi* en Extremadura. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 9:125-127.
145. Nelson JA, Bankowski J, Newton BJ, et al. Detection of antibodies in late Lyme disease. *J Infect Dis* 1990; 161:1034-1035.
146. Neubert U, Munchoff P, Volker B, Reimers C, Pfuger K. *Borrelia burgdorferi* infection in Bavarian forest workers: a follow-up study. *Ann NY Acad Sci* 1988; 539:476-479.
147. Nocton J, Bloom BJ, Rutledge BJ, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by PCR in CSF in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1996; 174:623-627.
148. Nogueras A, Pouplana M, Galbe J, Segura F. Lyme arthritis in Spain. *Ann Rheumatol Dis* 1989; 48:82-83.
149. Norgard MV, Riley BS, Richardson JA, Radolf JD. Dermal inflammation elicited by synthetic analogs of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect Imm* 1995; 63:1507-1515.

150. Oliver JH, Owsley M, Hutheson H, et al. Cospecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) . J Med Entomol 1993; 30:54-63.
151. Ortuño A, Gortázar C, Estrada A, Casal J, Castellá J. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia conorii* en zorros de la provincia de Zaragoza. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas 1995; Libro de Abstracts:95
152. Osterholm MT, MacDonald KL, Hedberg CW. Lyme disease. In: Evans AS, Brachman PS, editors. Bacterial infections of humans. Epidemiology and control. 2d ed. Ed. Plenum Medical, 1991:403-423.
153. Oteo JA, Estrada-Peña A. *Ixodes ricinus*, vector comprobado de *Borrelia burgdorferi* en España. Enferm Infecc Microbiol Clin 1990; 8:599
154. Oteo JA, Estrada-Peña A. Garrapatas infectadas por *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme). Estudio de 4662 garrapatas (*Ixodoidea*) en la Comunidad Autónoma de La Rioja. Enferm Infecc Microbiol Clin 1992; 10:139
155. Oteo JA, Guerrero A. Propuesta de definición de zona endémica de Borreliosis de Lyme. Enf Infecc Microbiol Clin 1996; 14:517

156. Oteo JA, Martínez de Artola V. Borreliosis de Lyme: aspectos epidemiológicos y etiopatogénicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13:550-555.
157. Oteo JA, Martínez de Artola V, Casas JM, Estrada-Peña A. Enfermedad de Lyme en la Rioja. *Med Clin (Barc)* 1991; 96:599
158. Oteo JA, Martínez de Artola V, Fernández-Calvo JL, Casas JM, Rivero A, Grandival R. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en una población de riesgo. *Rev Clin Esp* 1990; 187:215-217.
159. Oteo JA, Martínez de Artola V, Maraví E, Eiros JM. Lyme disease and uveitis. *Ann Int Med* 1990; 112:883
160. Oteo JA, Osácar JJ, Estrada-Peña A, Martínez de Artola V. Lyme disease epidemiology in La Rioja (Spain). 6th Europ Congr Clin Microbiol Infect Dis 1993; Abstr 344:128
161. Pascual F. Estudio epidemiológico de la Fiebre Q en la isla de Lanzarote (Canarias). Tesis Doctoral Universidad de Las Palmas de Gran Canaria 1994;
162. Pascual F, Rodríguez JC, Otero I, Borobio MV. Seroprevalencia de la Fiebre Q en la población adulta de Lanzarote (Islas Canarias). *An Med Intern* 1992; 9:428-432.

163. Picken RN, Cheng Y, Strle F, Picken MM. Patients isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strains 25015. *J Infect Dis* 1996; 174:1112-1115.
164. Piesman J, Donahue JG, Mather TN, Spielman A. Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field-collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1986; 23:219
165. Piesman J, Maupin GO, Campos EG, et al. Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J Infect Dis* 1991; 163:895-897.
166. Piesman J, Sinsky RJ. Ability of *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis* and *Amblyoma americanum* (Acari: Ixodoidea) to acquire, maintain, and transmit Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J Med Entomol* 1988; 25:336-339.
167. Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, et al. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 1989; 17:355-359.
168. Probert WS, Lefevbre RB. Protection of C3H/ HeN mice from challenge with *Borrelia burgdorferi* through active immunization with OspA, OspB, or OspC but not with OspD or the 83 kDa antigen. *Infect Immun* 1994; 62:1920-1926.

169. Rath PM, Ibershoff B, Mohnhaupt A, et al. Seroprevalence of Lyme Borreliosis in forestry workers from Brandenburg, Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:372-377.
170. Rauser S, Kayser M, Neubert U, Rasiyah C, Vogt A. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant 83 kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* for serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2596-2600.
171. Rauser S, Spohn N, Rasiyah C, Neubert U, Vogt A. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant OspC and the internal 14-kDa flagellin fragment for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36:857-861.
172. Robinson J, Pilot-Matias T, Pratt S, Pates B, Bevit T, Humt J. Analysis of the humoral response to the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1993; 31:629-635.
173. Rodríguez- Torres A, Miranda A, Quiñones PA, et al. Eritema Crónico Migrans por *Borrelia burgdorferi*. *Med Clin* 1988; 91:297-299.
174. Rosa PA, Schwan TG. Molecular biology of Lyme disease. In: Coyle PK, editor. Lyme disease. Chicago: Mosby- Year Book, 1993:8-17.

175. Saz JV, Merino FJ, Beltrán M. Situación actual de la enfermedad de Lyme en España: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Rev Clin Esp* 1995; 195:54-59.
176. Saz JV, Merino FJ, Gegúndez MI. Enfermedad de Lyme: relación entre poblaciones humana y canina en la provincia de Soria. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas 1995; Libro de Abstracts:94
177. Saz JV, Nuncio S, Merino FJ, Aquisé M, Medina J, Filipe AR. Enfermedad de Lyme en la provincia de Soria: estudio clínicoepidemiológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:52-59.
178. Sáez S, Sánchez A, Guerrero A. Garrapatas y enfermedad de Lyme. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 9:111-115.
179. Schmid GP. The global distribution of Lyme disease. *Rev Infect Dis* 1985; 7:41-50.
180. Schoen RT, Meurice F, Brunet CM, et al. Safety and immunogenicity of an Osp A vaccine in subjects with previous Lyme disease. *J Infect Dis* 1995; 172:1324-1329.
181. Schulze TL, Bowen GS, Bosler EM, et al. *Amblyoma americanum* a potential vector of Lyme disease in New Jersey. *Science* 1984; 224:601-603.

182. Schwan TG, Schrumpf ME, Glinnebusch BJ, Anderson DE, Konkel NE. GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme Borreliosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2483-2492.
183. Schwan TG, Simpson WJ. Factors influencing the antigenic reactivity of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Scand J Infect Dis* 1991; Suppl. 77:94-101.
184. Seltzer EG, Shapiro ED. Misdiagnosis of Lyme disease: when not to order serological tests. *Pediatric Infect Dis J* 1996; 15:762-763.
185. Sigal LH. Summary of the fifth international congress on Lyme borreliosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:10-14.
186. Sigal LH. The Lyme disease controversy. *Arch Intern Med* 1996; 156:1493-1500.
187. Simpson W SM, Schwan TG. Reactivity of human Lyme Borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi* . *J Clin Microbiol* 1990; 28:1329-1337.
188. Smith P, Benach JL, White D, Stroup D, Morse D. Occupational risk of Lyme disease in endemic areas of New York state. *Ann NY Acad Sci* 1988; 539:289-301.
189. Smith RP, Rand PW, Lacombe EH, et al. Norway rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes on Monhegan Island, Maine. *J Infect Dis* 1993; 168:687-691.

190. Spielman A. The biology of parasitism. In: Englund PT, Sher A, editors. New York: 1988:147-165.
191. Stanek G, Pleschette M, Flamm H, et al. European Lyme Borreliosis. *An N Y Acad Sci* 1988; 539:274-282.
192. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 1989; 321:586-596.
193. Steere AC. *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme Borreliosis). In: Mandell GL BJ, Dolin R, editor. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:2143-2155.
194. Steere AC, Broderick TF, Malawista SE. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am J Epidemiol* 1978; 108:312-321.
195. Steere AC, Green J, Schoen RT, et al. Successful parenteral Penicillin therapy of established Lyme arthritis. *N Engl J Med* 1985; 312:869-874.
196. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AL, et al. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 1983; 308:733-740.

197. Steere AC, Hutchinson GJ, Rhau DW, et al. Treatment of early manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1983; 99:22-26.
198. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 1977; 20:7-17.
199. Steere AC, Taylor E, Wilson M, Levine J, Spielman A. Longitudinal assesment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a community. *J Infect Dis* 1986; 154:295-300.
200. Stewart A, Glass J, Patel A, Watt G, Cripps A, Clancy R. Lyme arthritis in the Hunter valley. *Med J Aust* 1982; 1:139
201. Stiernstedt G, Dattwyler R, Duray PH, et al. Diagnostic tests in Lyme disease. *Scand J Infect Dis* 1991; Suppl. 77:136-142.
202. Strle F, Nelson JA, Ruzic-Sabljić E. European Lyme Borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis* 1996; 23:61-65.
203. Sullivan T, Hechemy K, Harris H. Monoclonal antibody to native p 39 protein from *Borrelia burgdorferi* . *J Clin Microbiol* 1994; 32:423-429.

204. Szczepanski A, Benach JL. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. *Microbiol Rev* 1991; 55:21-34.
205. Tamayo L, García-Moncó JC, Bratos MA, et al. Anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en un grupo de población de Valladolid. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8:663-664.
206. Tilton R. Laboratory aids for the diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection. *J Spiroch Tick-borne Dis* 1994; 1:18-23.
207. Vala F, Live LN, Roar G. Seroepidemiological studies of *Borrelia burgdorferi* infection in sheep in Norway. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1271-1277.
208. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme Borreliosis. *Clin Infect Dis* 1993; 17:708-717.
209. Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS 116 and M 19). *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:926-932.
210. Weber K, Schierz G, Wilske B, et al. Reinfection with erythema migrans disease. *Infection* 1986; 14:32-35.

211. Wilske B, Anderson JF, Baranton G, Barbour AG, Hovind-Hougen K, Johnson R, et al. Taxonomy of *Borrelia* spp.. Scand J Infect Dis 1991; Suppl. 77:108-129.
212. Wilske B, Preac-Mursic R, Fuchs H. Immunodominant proteins to *Borrelia burgdorferi*: implications for improving serodiagnosis of Lyme Borreliosis. In: Churchill Livingstone, editor. New antibacterial strategies. 1990:47-63.
213. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kühbeck R, Barbour AG, Kramer M. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi* . Ann NY Acad Sci 1988; 539:126-143.

Rafael Carranza Guevara
seguimiento de anticuerpos frente a
Bovelia buphiferi en población sana y
ganado apícola de la zona
SOBRESALIENTE CUM LAUDE

POR UNANIMIDAD
4

Abril

2000



~~Handwritten signature~~

