

28
203



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



Borrelia burgdorferi, EL AGENTE ETIOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE LYME

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION QUE PARA
OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACENTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA ELENA CORONA ALCANTAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A LA MEMORIA DE
FRAY LORENZO MARÍA OCHOA.**

**A MI MADRE, MI AMIGA Y CONFIDENTE. POR SU AMOR
Y COMPENSIÓN, POR SUS NOCHES DE DESVELO,
POR SUS INTERMINABLES HORAS DE TRABAJO PARA
SACARNOS ADELANTE.**

**A MI PUCHUNGUITO. POR SU AMOR Y TERNURA,
POR SU INFINITA PACIENCIA. POR TODO SU
APOYO. POR COMPARTIR CONMIGO MOMENTOS
AMARGOS Y FELICES. POR ESTE LOGRO QUE ES
DE LOS DOS. TE AMO.**

A MI HERMANO LUIS.

**MI MÁS PROFUNDO AGRADECIMIENTO
A LA PROFESORA ELDA PENICHE POR
SU INFINITA PACIENCIA Y DEDICACIÓN.**

**A MI OTRA FAMILIA: SRA. ANITA, ANITA,
MARIO E ISAAC. POR SU VALIOSA AMISTAD.**

A ROCÍO LOPÉZ, MI CUATACHA.

Células, protozoarios, microbios..., más allá
de vosotros ¿hay algo?

Pronto nos lo dirá
el microscopio intruso, pertinaz y paciente.

Más tal vez la materia se empequeñecerá
tanto bajo su lente,
que un día, como espectro, se desvanecerá
ante el ojo del sabio, quedando solamente
la Fuerza Creadora, cuyo oleaje va
y viene omnipotente
y fuera de lo cual nada es ni será.

Amado Nervo

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof:	ELDA PENICHE QUINTANA
Vocal	Prof:	MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA
Secretario	Prof:	RAUL GARZA VELASCO
1er Suplente	Prof:	ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
2do Suplente	Prof:	MAITE ASTIGARRAGA ZAVALETA

Sitio donde se desarrolló el tema:

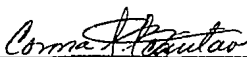
Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., Biblioteca del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, Hemeroteca del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del I.P.N., Hemerobiblioteca Dr. José Joaquín Izquierdo de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA



Q.F.B. ELDA PENICHE QUINTANA

SUSTENTANTE



MARIA ELENA CORONA ALCANTAR

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AGENTE ETIOLÓGICO	4
1.1. ANTECEDENTES	4
1.2. TAXONOMÍA	10
1.3. MORFOLOGÍA	14
1.4. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y ANTIGÉNICAS	22
1.5. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN.	30
2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE LYME	37
2.1. CICLO DE TRANSMISIÓN	37
2.2. CUADRO CLÍNICO	49
2.3. COMPLICACIONES	62
2.4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO	68
3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	80
3.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	81
3.2. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO	86
3.3. OTROS	99
ANEXO	104
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN

Este trabajo tiene como finalidad presentar un estudio lo más detallado posible sobre las características de *Borrelia burgdorferi* y la enfermedad que desencadena conocida como enfermedad de Lyme.

Al igual que otras enfermedades causadas por espiroquetas, la enfermedad de Lyme ocurre en estadios. Generalmente, inicia con una lesión roja en la piel, conocida como eritema migrante acompañada en la mayoría de los casos por malestar generalizado y fatiga. Semanas o meses más tarde, algunos pacientes pueden desarrollar complicaciones cardíacas y/o neurológicas como miocarditis y meningoencefalitis. Tiempo después algunos pacientes pueden desarrollar ataques intermitentes de artritis, los cuales pueden volverse crónicos dando como resultado destrucción de hueso, cartilago y articulaciones grandes particularmente de la rodilla.

Los principales vectores de *Borrelia burgdorferi* son garrapatas del género *Ixodes*: *Ixodes dammini*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ovatus*. Sin embargo, es posible que otros insectos hematógenos como jejenes, mosquitos y pulgas jueguen el papel de vectores biológicos.

La enfermedad de Lyme tiene una amplia distribución en el mundo: Norteamérica, Europa, Asia y Australia. En nuestro país y en Latinoamérica no existen reportes de su presencia y, aunque se ha observado que algunas garrapatas de la especie *Ixodes dammini* e *Ixodes pacificus* parasitan a algunas aves que migran hacia el sur en invierno, se tendrían que estudiar con más detenimiento algunos aspectos tales como, condiciones climáticas, características del agente vector, de los hospederos naturales y accidentales entre otros, para pensar en la posibilidad de que el padecimiento pudiera estar presente o presentarse a futuro.

OBJETIVOS

Describir las características morfológicas, químicas y antigénicas así como los requerimientos nutricionales y de cultivo de *Borrelia burgdorferi*

Describir los signos y síntomas de la enfermedad de Lyme. Enumerar sus estadios y las manifestaciones clínicas que se presentan en cada uno de ellos.

Informar sobre las metodologías actuales que permiten identificar a *Borrelia burgdorferi*.

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL AGENTE ETIOLÓGICO

1.1 ANTECEDENTES

La historia de la enfermedad de Lyme se remonta al año de 1909 en Europa, en donde un médico sueco llamado Arvid Afzelius describió una expansión roja (rash) en la piel de pacientes que habían sido picados por la garrapata *Ixodes ricinus*. Afzelius llamó al rash, eritema migrante. Años más tarde, en Viena se dió una descripción más detallada de otro caso usando la designación de eritema crónico migrante (ECM) (40, 95, 113).

En 1922, se describió un caso de meningopolineuritis en una mujer de 58 años de edad. Esta mujer presentaba un eritema alargado, dolor de ambos nervios isquiáticos, dolor de nervios intercostales, dolor del plexo braquial derecho y atrofia del músculo deltoide derecho. Todas estas molestias estuvieron precedidas por la picadura de una garrapata. Aún cuando no se reconoció al eritema como migrante crónico, se presentó la descripción clínica de una manifestación neurológica correspondiente a la enfermedad de Lyme. Continuando con sus investigaciones, encontraron que la neuralgia que presentaban los pacientes desaparecía después de que recibían tratamiento con novarsenobenzol, se supuso que la garrapata transmitía un virus que causaba un nuevo trastorno al cual ellos denominaron "paralysie par les tiques" (61).

En 1930, se reconoció la conexión entre el eritema migrante y la meningitis. Esta observación fue confirmada por otras publicaciones a fines de 1940 (61).

A principios de la década de los 40's, se reportó en 26 pacientes meningitis linfocítica crónica, neuropatía periférica y neuritis craneal. Sin embargo, no se había observado la relación que había con la picadura de la garrapata y el eritema migrante y se pensó que la afección era de etiología alérgica reumática. Los bien descritos casos del inicio de esta década representaron una entidad que más tarde se encontró en mayores grupos de pacientes que habían sido picados por una garrapata y que presentaban eritema migrante.

En 1951, se observó el efecto benéfico de la penicilina en pacientes con eritema migrante y meningitis. Basándose en este hecho y con las observaciones que otros

investigadores habían realizado, de elementos que semejaban espiroquetas en secciones de piel de pacientes con eritema migrante, se resumió que el eritema migrante con o sin meningitis lo causaba un agente infeccioso (una espiroqueta) con un comportamiento alérgico y que era transmitida por una garrapata y probablemente por otros insectos.

En 1960, se sabe que otros investigadores, observaron que en muchos pacientes, el dolor y la lesión radicular iniciales ocurrían con frecuencia en el mismo segmento de piel previamente picado por la garrapata. Asumieron que el agente etiológico estaba migrando a lo largo de los nervios y nódulos linfáticos perineurales hacia las raíces de los nervios y el sistema nervioso central (61).

Aunque en un principio se había postulado una etiología bacteriana para el síndrome anteriormente descrito, a partir de 1960 la mayoría de los neurólogos europeos pensó que el agente etiológico era un arbovirus, basándose en el hecho, o mejor dicho en el conocimiento de la etiología viral de la encefalitis de Europa Central, (otro trastorno neurológico cuyo agente vector también era una garrapata). Así que no es de extrañarse que todas las investigaciones para identificar al agente causal estuvieran encaminadas a la búsqueda de un virus. A pesar de esta nueva teoría sobre el agente causal, un dermatólogo de nombre Weber, enterado de los efectos exitosos de la antibióticoterapia en el tratamiento del eritema migrante y de la acrodermatitis crónica atrófica, continuó postulando que el agente etiológico era bacteriano y no viral (61).

Además del síndrome descrito para ese entonces y que más tarde muchos autores definieron con el nombre de sus investigadores, como meningopolineuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth (MPN-GBB) o síndrome de Bannwarth, se dió a conocer otro trastorno neurológico que en Europa se consideró como entidad clínica, la acrodermatitis crónica atrófica. En 1966 Hopt, influenciado por publicaciones previas sobre los síntomas neurológicos de la acrodermatitis crónica atrófica, examinó a 92 pacientes que presentaban dicho trastorno. Encontró lesiones neurológicas debidas a neuropatías en 40 % de los pacientes y con frecuencia observó deficiencias sensoriales. También encontró que algunos

de los pacientes respondían bien al tratamiento con antibióticos. Haciendo estudios histológicos observó que las alteraciones morfológicas que se presentaban en algunas biopsias de pacientes con acrodermatitis crónica atrófica eran casi idénticas a las alteraciones encontradas en biopsias de pacientes con síndrome de Bannwarth. Todo lo anterior hablaba de mecanismos patogénicos similares en ambos trastornos. Posteriormente, la acrodermatitis crónica atrófica se consideró una manifestación neurológica tardía de la enfermedad de Lyme (61).

En 1973, se publicó un estudio retrospectivo y bien definido sobre la meningopolíneuritis. Estos autores definieron al trastorno como una enfermedad infecciosa con curso crónico, transmitida por una garrapata, presentándose después de su picadura, eritema, irritación sensorial, dolor permanente, meningitis linfocítica con síntomas meníngeos ocasionales y poco severos y, en la mayoría de los casos, lesiones asimétricas localizadas en el sistema nervioso periférico. Con frecuencia, los nervios craneales podían estar afectados. También podían presentarse (y con mayor frecuencia) parálisis facial unilateral o bilateral. Asentaron que el curso de la enfermedad tardaba en la mayoría de los casos algunos meses, y que solo excepcionalmente se daban casos con mielitis o encefalitis (61).

En noviembre de 1975, esta enfermedad se reportó por primera vez en Estados Unidos, en el pueblo de Lyme, Connecticut donde se había diagnosticado artritis reumatoide a un grupo de niños y adultos. El caso era verdaderamente preocupante ya que la ocurrencia normal de la artritis reumatoide juvenil había aumentado 100 veces, observándose una mayor incidencia en la población infantil (39 casos) que en la adulta (12 casos). Temerosos de que se tratara de una toxina ambiental o de una posible epidemia, se contactó a Allen Steere, quien junto con sus colegas descubrieron que la enfermedad estaba limitada a 3 municipios del este de Connecticut: Old Lyme, Lyme y East Haddam. La artritis reumatoide juvenil es un padecimiento raro que normalmente afecta a uno de cada 100,000 niños, pero en este caso tomando en cuenta la población total de los tres pueblos -en ese entonces de

12,000 habitantes- observaron que la ocurrencia normal había aumentado 100 veces e inclusive, en Old Lyme y en East Haddam la frecuencia de artritis en niños fue 10,000 veces más alta de lo normal, es decir, uno de cada 10 niños. También observaron que la mayoría de los enfermos vivía cerca de la zona boscosa y sólo pocos de ellos vivían en el centro de los pueblos (40).

Se concluyó que esta no era una forma ordinaria de artritis reumatoide y a pesar de las pocas pistas que se tenían para realizar las investigaciones, se pudieron hacer algunos hallazgos importantes (40):

1. La enfermedad no era contagiosa. puesto que individuos pertenecientes a la misma familia, a menudo contraían la enfermedad pero en diferentes años.

2. La mayoría de los casos presentaban los primeros síntomas durante los meses de junio a septiembre (verano).

3. El 25 % de los pacientes tuvieron un extraño salpullido en la piel (rash) una o varias semanas antes del ataque violento de los síntomas similares a la artritis.

Las descripciones que dieron los pacientes del rash eran casi idénticas: comenzaba como una pequeña pápula o hinchazón que gradualmente se iba extendiendo hasta formar una especie de "tiro al blanco" de 10 a 50 centímetros de diámetro. Por otro lado, el rash se presentaba con mayor frecuencia en pecho, abdomen, espalda o glúteos lo que sugería que se trataba de un insecto o arácnido rastrero el cual transmitía la enfermedad. Sin embargo, ninguno de los pacientes recordaba haber sufrido picadura alguna. Steere denominó a la enfermedad, artritis de Lyme o enfermedad de Lyme, por el pueblo en el cual se había observado por primera vez en Estados Unidos. De 1975 a 1976, se probaron sueros de pacientes con la enfermedad de Lyme, tratando de encontrar la presencia de anticuerpos específicos contra 38 garrapatas reconocidas como transmisoras de enfermedades y 178 artrópodos transmisores de virus, pero ninguna prueba dió positiva (40).

Continuando con las investigaciones, se encontró la información que describía los hallazgos de Arvid Åzelius, es decir, la expansión roja en la piel de ciertos individuos a la que llamó eritema migrante y que para sorpresa de los investigadores estadounidenses era muy similar al rash en forma de tiro al blanco que se había observado en pacientes con la enfermedad de Lyme. Con esta información se intuyó que tanto la enfermedad de Lyme como el eritema migrante debían estar estrechamente relacionados teniendo modos similares de transmisión. Con el conocimiento del éxito obtenido por médicos europeos en el tratamiento del eritema crónico migrante con penicilina, la probabilidad de que el agente infeccioso fuera una bacteria en lugar de un virus era muy alta. Sin embargo, el cultivo de líquido de las articulaciones de pacientes con la enfermedad de Lyme no había revelado microorganismo alguno (40).

En el año de 1977 uno de los pacientes pudo remover intacta a la garrapata del sitio de la picadura y la entregó para su identificación. La garrapata apenas era más grande que la cabeza de un alfiler, de color oscuro y de cuerpo duro, por lo que fácilmente podía confundirse con alguna costra. Andrew Spielman la identificó como *Ixodes dammini*. Esta especie estaba estrechamente relacionada con *Ixodes ricinus*, la garrapata responsable del eritema migrante europeo. Sin embargo, había que tener la certeza de que *Ixodes dammini*, era verdaderamente el vector de la enfermedad de Lyme. Para tal fin, biólogos de la Universidad de Yale colocaron trampas para animales en ambos lados del río Connecticut, de tal forma, que además de mapear su distribución en la naturaleza, se buscaba qué especies de mamíferos eran los hospederos. Al término de las investigaciones, los resultados fueron los siguientes: La garrapata del perro, *Dermacentor variabilis*, era igualmente común en ambos lados del río, pero *Ixodes dammini* era 12 veces más abundante en su lado Este, cerca de Lyme, Old Lyme y East Haddam (40).

Ya se conocía al agente transmisor, sin embargo el agente infeccioso continuaba desconocido. Fracasaron cultivos sucesivos y observaciones microscópicas de los órganos

internos de la garrapata ya que no revelaron la presencia de algún microorganismo patógeno.

En el otoño de 1981, ocurrió un caso curioso: en la isla Sheller, ubicada al final de la costa de Long Island, se reportó un caso fatal de fiebre manchada de las Montañas Rocallosas. El caso era curioso ya que se sabía que el vector normal de esta enfermedad, *Dermacentor variabilis*, no se encontraba en otoño, por lo que el Departamento de Salud del Estado de Nueva York envió un equipo de biólogos a la isla para que recolectaran garrapatas vivas. Sin embargo, las garrapatas recolectadas fueron de la especie adulta de *Ixodes dammini* en lugar de *Dermacentor variabilis*, mismas que se enviaron para su estudio a los laboratorios de las Montañas Rocallosas en Hamilton Mont. El responsable de dicho estudio fue Willy Burgdorfer, autoridad internacional en enfermedades transmitidas por garrapatas (40).

Burgdorfer, desintegró el tracto gastrointestinal de las garrapatas y las observó al microscopio de campo oscuro, para su sorpresa, encontró en el intestino abundantes espiroquetas de forma irregular en lugar de las rickettsias causantes de la fiebre manchada de las Montañas Rocallosas. Él sabía que *Ixodes dammini* había estado implicado como probable vector de la enfermedad de Lyme, también sabía que las espiroquetas que observó no eran el agente infeccioso de la fiebre manchada. Así que pensó, que estas bacterias podían ser las causantes de la enfermedad de Lyme (40). Alan G. Barbour, que en ese entonces estaba en los Laboratorios de las Montañas Rocallosas, fue capaz de hacer crecer a las espiroquetas en un cultivo puro, obteniendo una cantidad suficiente para su experimentación. Partiendo del hecho de que un individuo expuesto a un agente infeccioso posee en su suero anticuerpos en contra de dicho agente -siendo esto un buen indicador de la infección-, se enviaron a Burgdorfer muestras de sueros de pacientes con la enfermedad de Lyme, quién buscó en las mismas anticuerpos contra las espiroquetas encontradas. Esta vez las pruebas fueron positivas. Los sueros mostraron un título muy elevado de

anticuerpos, indicando que, en efecto, los pacientes habían sido infectados por la espiroqueta (40).

Una prueba más directa de la patogenicidad de la espiroqueta se llevó a cabo en conejos. Consistía en colocar en la piel rasurada de conejos albinos, garrapatas de la especie *Ixodes dammini* infectadas con la espiroqueta, de esta manera se pudo observar cómo la garrapata se alimentaba de la sangre de su hospedero. Después de algunas semanas aparecieron en el sitio de la picadura lesiones similares al eritema migrante. La observación microscópica de estos segmentos de piel revelaba la presencia de espiroquetas (40).

Para el verano de 1982, la espiroqueta se había aislado de sangre, piel y líquido cerebroespinal a partir de individuos que padecían la enfermedad. Esto lo realizaron investigadores del Departamento de Salud del Estado de Nueva York (40). Posteriormente, estudios hechos por Russel C. Johnson y cols en la Escuela de Medicina de la Universidad de Minnesota, determinaron, en base al ADN de la espiroqueta, que se trataba de una especie del género *Borrelia*. Y en 1984, en honor a su descubridor Willy Burgdorfer, se le dió a la espiroqueta el nombre de *Borrelia burgdorferi* (40).

1.2 TAXONOMÍA

Hasta antes de la década de los 80's, la taxonomía del agente etiológico de la enfermedad de Lyme se desconocía. Sin embargo, gracias a las observaciones realizadas por Burgdorfer en el microscopio de campo oscuro a partir de preparaciones de tracto gastrointestinal del vector desintegrado (*Ixodes dammini*), se sabía que se trataba de una espiroqueta (40).

De acuerdo al Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (60), el Orden *Spirochaetales* contiene dos familias y cinco géneros, de los cuales son patógenos al hombre: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*. (Tabla 1.1).

TABLA 1.1: CLASIFICACIÓN DE LAS ESPIROQUETAS

Orden	<i>Spirochaetales</i>
Familia	<i>Spirochaetaceae</i>
Género	<i>Cristispira</i>
	<i>Spirochaeta</i>
	<i>Treponema</i>
	<i>Borrelia</i>
Familia	<i>Leptospiraceae</i>
Género	<i>Leptospira</i>

El agente etiológico de esta enfermedad se parece en sus características morfológicas y de crecimiento a los géneros *Treponema* y *Borrelia*; sin embargo, la forma definitiva de identificar a un microorganismo y establecer su relación con otro, es determinando las similitudes entre los nucleótidos que constituyen el ADN (54). Para caracterizar a esta espiroqueta Hyde y Johnson determinaron el % de moles Guanina-Citosina de especies pertenecientes a los tres géneros del Orden *Spirochaetales* patógenos al hombre, así como su homología del ADN (52).

Los resultados obtenidos (por Hyde y Johnson) se muestran en la tabla 1.2. El % de moles de Guanina-Citosina del agente etiológico aislado de diversas fuentes, estuvo en un rango de 27.3 a 30.5 % lo que sugiere que son especies muy parecidas que poseen un genoma pequeño. Por otro lado, los valores obtenidos para *Borrelia hermsii*, *Borrelia turicatae* y *Borrelia parkeri* fueron de 28.0 a 30.5 %, muy similares a los anteriores pero diferentes a los obtenidos para las especies de los géneros *Leptospira* y *Treponema* que presentaron un rango de 35 a 53 % (52).

TABLA 1.2: CARACTERIZACIÓN DEL ADN DE LAS ESPIROQUETAS (52).

MICROORGANISMO	Tm °C ^a	% Mol G+C ^b
Espiroquetas aisladas de <i>Ixodes dammini</i>	81.8	30.5
Espiroquetas aisladas de <i>Ixodes ricinus</i>	80.9	28.3
Espiroquetas aisladas de fluido cerebroespinal humano	80.5	27.3
<i>Borrelia hermsii</i>	81.8	30.5
<i>Borrelia turicatae</i>	81.5	29.8
<i>Borrelia parkeri</i>	80.8	28.0
<i>Treponema denticola</i>	84.0	36.0
<i>Treponema vincentii</i>	88.5	46.8
<i>Treponema scollodontum</i>	84.0	36.0
<i>Treponema phagedenis</i>	84.0	36.0
<i>Treponema pallidum</i> (Nichols)	83.5-91.0	35.0-53.0
<i>Leptospira interrogans</i>	84.0-86.0	35.0-40.0
<i>Leptospira biflexa</i>	85.3	39.0

a Tm °C= temperatura a la cual el 50 % del ADN se encuentra desnaturalizado

b El % Moles G+C se calculó a partir de estudios de desnaturalización térmica, usando la fórmula: % Moles G+C=(Tm - 69.3) 2.44

El grado de relación entre las espiroquetas en estudio, sugerido por la determinación del porcentaje de moles G + C, se confirmó haciendo comparaciones en base a la homología del ADN. Se tomó como referencia el ADN radiactivo de espiroquetas aisladas a partir del vector *Ixodes dammini*, y se comparó con espiroquetas aisladas de *Ixodes ricinus*, de fluido cefaloraquídeo y de tres especies del género *Borrelia*, obteniéndose los resultados tabulados a continuación (tabla 1.3) (52):

TABLA 1.3: HOMOLOGÍA DEL ADN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE LYME AISLADO DEL VECTOR *Ixodes dammini*, CON OTRAS ESPECIES DEL ORDEN SPIROCHAETALES (52).

MICROORGANISMO	% HOMOLOGÍA (Relación relativa de unión)
Espiroquetas aisladas de <i>Ixodes dammini</i>	100
Espiroquetas aisladas de <i>Ixodes ricinus</i>	100
Espiroquetas aisladas de fluido cerebroespinal humano	76
<i>Borrelia hermsii</i>	59
<i>Borrelia turicatae</i>	46
<i>Borrelia parkeri</i>	37
<i>Treponema phagedenis</i>	2
<i>Treponema denticola</i>	2
<i>Leptospira interrogans</i> serotipo hardjo	1
<i>Leptospira biflexa</i> serotipo patoc	1

Brenner definió el término especie como "un grupo de cepas con 70 % o más de homología en condiciones óptimas, con 55 % o más de homología en condiciones no óptimas y con una estabilidad térmica de secuencias relacionadas de 6 °C de reasociación de ADN homólogos" (96).

Tomando en cuenta esta definición y basándose en los resultados obtenidos en la determinación del % de moles Guanina-Citocina y en los estudios de homología del ADN, Hyde y Jonnson (52) concluyeron que el agente etiológico de la enfermedad de Lyme constituía una nueva especie del género *Borrelia*. Los resultados de estos investigadores concordaban con los obtenidos por Schmid y cols (96).

Los análisis electroforéticos del ADN del agente etiológico de la enfermedad de Lyme y de las tres especies norteamericanas del género *Borrelia*, revelaron la presencia de plásmidos. El ADN de las espiroquetas aisladas de *Ixodes dammini* posee dos plásmidos, mientras que el de las espiroquetas aisladas de *Ixodes ricinus* y de líquido cefalorraquídeo humano solo tienen un plásmido (52, 54).

La enfermedad de Lyme en los Estados Unidos puede acompañarse de artritis, mientras que en Europa los síntomas tienden a ser neurológicos; Johnson propone, basándose en el hecho de que las espiroquetas aisladas de los vectores *Ixodes dammini* e *Ixodes ricinus* son genéticamente homólogas, que las diferencias observadas en los síntomas pueden estar mediadas por los plásmidos propios de estas espiroquetas (52).

1.3 MORFOLOGÍA

Morfológicamente, las espiroquetas son microorganismos helicoidales que presentan de 4 a 30 vueltas (del inglés coils). Miden de 0.2 a 0.5 micras de diámetro por 5 a 25 micras de largo, estas medidas pueden variar dependiendo de la cepa o de los métodos de tinción empleados (60).

Borrelia burgdorferi, el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, mide 0.2 a 0.3 micras de diámetro por 10 a 40 micras de largo. *In vitro* puede presentar diversas formas, la conformación helicoidal de las células puede presentar ondulaciones no simétricas, es decir, de diferente longitud; las células pueden estar enrolladas o entrelazadas unas con otras y algunas veces pueden estar formando agregados (1). Todas las espiroquetas comparten las siguientes características morfológicas: Presentan una envoltura externa (o membrana externa), un cilindro protoplásmico y flagelos periplásmicos o filamentos axiales (FIG. 1.1) (58).

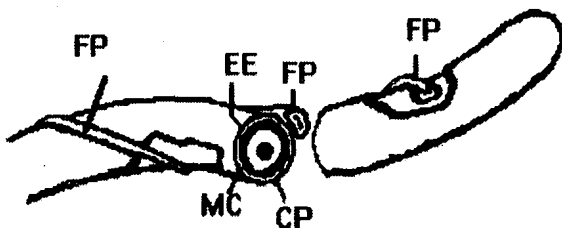


FIG. 1.1: a) Representación esquemática de una espiroqueta. La línea punteada representa a la envoltura externa. La línea más intensa, adyacente a la línea punteada delimita al cilindro protoplásmico. La línea delgada representa los flagelos periplásmicos.

b) Diagrama de la estructura celular de una espiroqueta: EE = envoltura externa, FP = flagelo periplásmico, MC = membrana citoplásmica, CP = capa de peptidoglicanos.

ENVOLTURA EXTERNA

Rodea al cilindro protoplásmico, es similar a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, es elástica y su integridad es indispensable para la viabilidad de la célula. Cuando ésta se encuentra en condiciones adversas, por ejemplo en un medio hipotónico, la envoltura externa se separa del cilindro protoplásmico con la formación de una especie de vejiga o ampolla y la célula adquiere una forma esférica; la envoltura externa de ésta última puede solubilizarse fácilmente en concentraciones muy bajas de dodecil sulfato de sodio (59).

La envoltura externa es resistente a la acción de la lisozima cuando se encuentra intacta, si pierde su integridad, permite su paso al interior de la célula y la enzima degradará la capa peptidoglicana (6, 28, 54).

CILINDRO PROTOPLÁSMICO

Está constituido por el contenido citoplásmico, por la membrana citoplásmica que rodea a dicho contenido y por una capa de peptidoglicanos (pared celular) que a su vez rodea al contenido y a la membrana citoplásmicos (FIG.1.1).

La capa de peptidoglicano es similar a la que presentan otras bacterias en su pared celular. Dependiendo de la especie puede estar constituida por lisina, ácido diaminopimélico u ornitina. El género *Borrelia* -y por consiguiente *Borrelia burgdorferi*- y el género *Treponema* contienen en su capa peptidoglicana ornitina; mientras que el género *Leptospira* contiene ácido- α,ϵ -diaminopimélico (6, 28, 54, 58).

FLAGELOS PERIPLÁSMICOS O FILAMENTOS AXIALES

Los flagelos periplásmicos se encuentran insertados entre la envoltura externa y el cilindro protoplásmico (FIG.1.1) en el extremo terminal de la célula, los extremos libres de los flagelos se extienden hacia el polo opuesto de la célula envolviéndola, estas estructuras son las responsables del movimiento característico de las espiroquetas: girando sobre su propio eje, por flexión de sus movimientos axiales (elongación y contracción) y hacia adelante y hacia atrás (también llamado movimiento de sacacorchos). En medios viscosos, las espiroquetas pueden moverse con rapidez debido muy probablemente a la localización de los flagelos, ya que se ha observado que bacterias con flagelos externos disminuyen notablemente su velocidad en estas condiciones (28, 51, 54, 58).

El número de flagelos varía, dependiendo del género. Las especies patógenas del género *Treponema* presentan tres, mientras que las no patógenas poseen un número variable de 1 a 8 flagelos. El género *Borrelia* presenta de 5 a 20 y la especie *Borrelia burgdorferi* posee 7.

Por último, el género *Leptospira* posee únicamente un flagelo. Debido a que estas estructuras se traslapan, es difícil determinar con precisión el número de flagelos en cortes transversales, por lo que se recomienda enumerarlos en sus puntos de inserción (6, 28, 51, 54, 58).

La forma helicoidal de las espiroquetas varía dependiendo del género. Con anterioridad existían reportes de que la especie *Borrelia burgdorferi* aislada en forma reciente del vector *Ixodes dammini* presentaba una conformación helicoidal en el sentido contrario a las manecillas del reloj y, que después de cultivos sucesivos, dicha conformación cambiaba girando en el sentido de las manecillas del reloj. Sin embargo, Johnson y cols (54) encontraron que la misma especie, pero aislada ahora de líquido cefalorraquídeo humano, conservaba su conformación helicoidal en el sentido contrario a las manecillas del reloj aún después de seis meses de cultivos sucesivos. Por su parte, Aberer y Duray (1) mencionaron que cambios en las condiciones de cultivo, como por ejemplo alteraciones en el pH, pueden causar la disociación de la envoltura externa con el cilindro protoplásmico ocasionando formación de vejigas o ampollas y que en cultivos viejos, las células tienden a perder su forma helicoidal hasta tornarse totalmente elongadas (1, 54).

1.3.1 CITOMORFOLOGÍA DE *Borrelia burgdorferi* EN BASE A DIVERSOS MÉTODOS DE TINCIÓN.

Borrelia burgdorferi, puede observarse mediante la ayuda de numerosas técnicas de tinción. Sin embargo, no todas pueden aplicarse a la búsqueda de este microorganismo en cortes de tejido. Aberer y Duray (1) realizaron una serie de estudios comparativos entre varios métodos de tinción que pueden utilizarse para tal fin (1).

Los resultados de la tinción de Gram realizada a las cepas en estudio identificadas como el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, son una evidencia insuficiente para clasificarlo como Gram-negativo ya que las células se tiñen en forma incompleta o no se tiñen. La tinción con anilina de preparaciones de sangre periférica y de fluidos biológicos

tales como orina, líquido ascítico, líquido pleural, sinovial, pericardial y líquido cefalorraquídeo, permite observar en forma nítida a las células y con sus contornos bien definidos. Las tinciones de Wright, Wright-Giemsa, May-Grünwald y la tinción con eosina-tiacina, también proporcionan buenos resultados. Los métodos fluorescentes e inmunofluorescentes no son muy adecuados, ya que la fluorescencia que se produce se extingue rápidamente (en segundos) por lo que se requiere el uso de microfotografías para poder llevar a cabo estudios citomorfológicos (tabla 1.4) (1).

TABLA 1.4: TINCIONES HISTOQUÍMICAS, CITOQUÍMICAS Y FLUOROCRÓMICAS DE DIVERSAS CEPAS DE *Borrelia burgdorferi* (1)

MÉTODO DE TINCIÓN	CEPAS EMPLEADAS					
	B31	FM323	BAPA	SON	DN	MM
Wright	3	3	2	3	2	3
Giemsa	2	2	3	2	2	2
May-Grünwald	2	3	3	3	2	3
Gram	1*	0	0	1*	0	0
Eosina-tiacina	3	3	3	2	3	3
Tioflavina-T	1	0	2	1	1	2
Naranja de acridina	2	2	2	2	1	2
Auramina-rodamina	1	1	0	0	0	1

a El grado de tinción se registró como sigue: 0, no hubo tinción; 1, tinción incompleta y débil; 1*, reacción Gram-negativa muy débil; 2, tinción incompleta y débil; 3, buena tinción.

b Cepas empleadas:

B31, ATCC 35210, cepa original aislada por primera vez en la isla de Sheller, Nueva York.

FM323, cepa aislada del ratón de pata blanca *Peromyscus leucopus* en Wisconsin.

BAPA, aislado de *Ixodes dammini* en estadio de ninfa.

MM, cepa aislada de ratón por R. Johnson, Universidad de Minnesota Minneapolis.

SON y DN, California; C. Moody, Universidad de Yale, New Haven Conn.

Los métodos de impregnación argéntica probados permiten un estudio citomorfológico detallado ya que producen reacciones más francas que los métodos de tinción

inmunoquímicos, son adecuados para la observación de *Borrelia burgdorferi* en cortes de tejido; sin embargo, definen mejor la estructura de células individuales que de células agrupadas (1).

Las características citomorfológicas de *Borrelia burgdorferi*, muestran un marcado polimorfismo, hecho que dificulta su detección en biopsias y en fluidos biológicos si no se cuenta con la experiencia necesaria. En la FIG. 1.2, se muestran las diversas morfologías que presenta *Borrelia burgdorferi* cepa B31 cultivada en el medio Barbour-Stoenner-Kelly (medio BSK). Las formas que presenta esta cepa son muy variadas, desde la apariencia de bacilos muy cortos y curvos similares a las vibriobacterias, hasta células muy largas que muchas veces son el resultado de dos células unidas "cabeza con cabeza" (1)

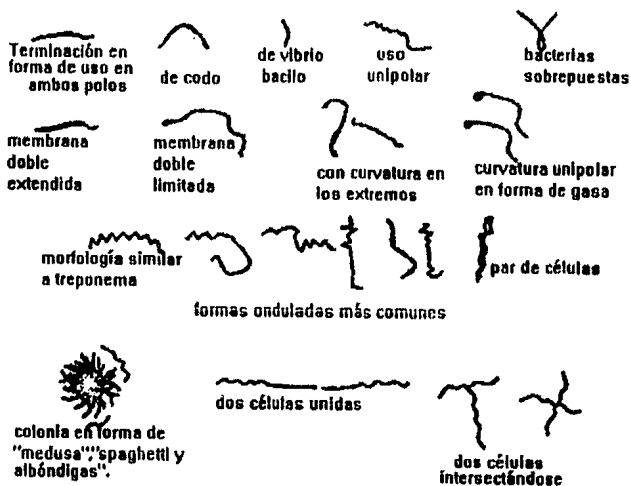


FIG. 1.2 MORFOLOGÍAS MÁS COMUNES DE *Borrelia burgdorferi* CEPA B31.

Por lo que respecta a los métodos de tinción inmunocitoquímicos, la intensidad de la reacción y el delineamiento de la morfología celular dependen del método de fijación, o mejor dicho del fijador celular empleado, del tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal), del tipo de antígeno (proteína de superficie o proteína flagelar) y de la edad del cultivo. Generalmente, las células fijadas con acetona se observan más hinchadas y las vejigas o ampollas entre la envoltura externa y el cilindro periplásmico se observan más prominentes que si la fijación se hubiera hecho con metanol o formalina. Por otro lado, las preparaciones fijadas con metanol producen un decremento en la intensidad de la tinción y más aun si los fijadores empleados son formalina y paraformaldehído. Sin embargo, con estos dos últimos, el número de células que queda sobre el portaobjetos después de la fijación es mayor que con metanol o acetona. Los anticuerpos monoclonales dan reacciones menos intensas, ya que éstos reaccionan con pocos o un solo determinante antigénico, mientras que los anticuerpos policlonales reaccionan con muchos más determinantes antigénicos produciendo reacciones muy intensas y observándose la formación de vejigas muy prominentes entre la envoltura externa y el cilindro protoplásmico (1).

En las siguientes tablas, 1.5 y 1.6 se muestran las variaciones en la intensidad y en el delineamiento de la morfología celular dependiendo del fijador usado antes de la incubación con el anticuerpo en las técnicas inmunocitoquímicas.

TABLA 1.5: TINCIÓN DE *Borrelia burgdorferi* B31 CON DIFERENTES ANTICUERPOS Y DISTINTOS TIPOS DE FIJADORES (1)
FIJADORES EMPLEADOS

ANTICUERPO	DILUCIÓN DEL ANTICUERPO	ACETONA	METANOL	FORMALINA	PARAFORMALDEHIDO
MONOCLONAL					
H9724	1:100	3-4 (h,g)	3-4	2-4	3-4
H604	1:50	1-2 (s)	2-3 (s)	1-2	1-3
H6TS	1:50	2 (s,b)	1-2	1-2	1-2
H3TS	1:50	3-4 (s,b)	3-4 (s,b)	2-4	3-4
H5332	1:100	4 (s,b)	3-4 (s,b)	1-2	2-4
H6831	1:50	4 (s,b)	3-4 (s,b)	0-2	1-2
H63	1:50	1-2 (h,g)	1-2 (h,g)	0-2	0-1
H68	1:50	2-3 (g)	2-3 (h)	1-2	1-2
H614	1:50	3-4 (s,h,g)	3 (s,h,g)	2-3	2-3
H9E11	1:50	0	0	0	0
H10022	1:50	0	0	0	0
POLICLONAL					
Conejo W	1:50	3-4 (s)	3-4 (g)	2-3	3-4
Conejo B31	1:100	3-4 (s)	3-4 (s,g)	3-4 (g)	3-4 (g,s)
Humano	1:20	4 (s)	3-4 (g)	3-4 (g)	3-4
CONTROL NEGATIVO					
PBS		0	0	0	0

El grado de tinción se registró en base a la siguiente escala:

0, no hubo tinción; 1, tinción incompleta y débil; 2, tinción completa y débil; 3, buena tinción; 4, tinción intensa.

ABREVIATURAS: b. del inglés blebs vejiga o ampolla; g. granular; s. hinchados.

ANTICUERPOS EMPLEADOS:

H9724, H604, H6TS: anticuerpos específicos contra la proteína de 41 K-Da (flagelina).

H3TS, H5332: anticuerpos específicos contra la proteína de superficie de 31 K-DA (Osp A).

H63, H68, H6831, H614: anticuerpos contra la proteína de superficie de 34 K-Da (Osp B).

H10022: contra la proteína de 38 K-Da.

H9E11: anticuerpo contra la proteína de 20 K-Da de *B. hermslii*.

W: cepa de *B. burgdorferi* aislada de fluido cerebroespinal por G. Stanek en Viena, Austria.

TABLA 1.6: TINCIÓN CON INMUNOPEROXIDASA DE TRES CEPAS AISLADAS EN VIENA, Y FIJADAS CON FORMALINA (1).

ANTICUERPO	CEPAS EMPLEADAS		
	H-2	H-1	W
I19274	2-3 (g)	2-3 (g)	2-3 (g)
I1604	0-2 (g)	0	0-2
I1675	0-2 (g)	0	2-4
I1375	0	0	0
I15332	0	0	0
I16831	0	0	0-1
I163	0	0	0
I168	0	0	0-2
I1614	0	0	0-2
I19E11	0	0	0
CONTROL NEGATIVO	0	0	0

El grado de tinción se registró en base a la siguiente escala: 0, no hubo tinción; 1, tinción incompleta y débil; 2, tinción completa y débil; 3, buena tinción; 4, tinción intensa.

CEPAS: H-1 y H-2, ambas aisladas de piel por C. Pertschek, Viena, Austria. La cepa W fue aislada de fluido cefalorraquídeo; Viena, Austria.

ABREVIATURAS: g, granular; s, hinchado.

1.4 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y ANTIGÉNICAS.

1.4.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.

En condiciones hipotónicas, la envoltura externa de las células de *Borrelia burgdorferi* se separa del cilindro protoplásmico dando lugar a la formación de pequeñas vejigas o ampollas, adquiriendo posteriormente la célula una forma esférica. Esta separación también puede ser causada por alteraciones en el pH del medio de cultivo (1, 54).

La formación de estas vejigas es en forma más prominente, cuando las células se tratan con acetona que cuando se tratan con metanol o formalina (1).

La envoltura externa de las células esféricas puede solubilizarse sin ningún problema en bajas concentraciones de dodecil sulfato de sodio (54). Esta misma estructura protege a la capa peptidoglicana de la acción de la lisozima cuando se encuentra íntegra (6, 28, 54).

El género *Borrelia* y, por lo tanto *Borrelia burgdorferi*, presenta una gran susceptibilidad a los detergentes (8).

1.4.2 CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS

El conocer las características moleculares e inmunológicas de las proteínas antigénicas de *Borrelia burgdorferi* permite: (7, 10, 33, 39, 102, 115, 120).

- Dilucidar la inmunopatogénesis de la enfermedad
- Seleccionar las cepas apropiadas, o los péptidos adecuados como vacunas
- Determinar cuáles fungen como marcadores biológicos del microorganismo
- Desarrollar técnicas de diagnóstico más confiables

Sin embargo, para poder caracterizar a los microorganismos es necesario obtenerlos en forma pura. Para este fin se pueden emplear la inmunoprecipitación, la extracción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) y la clonación y expresión molecular. Siendo ésta última la más empleada (25).

El genoma de *Borrelia burgdorferi* se ha estudiado ampliamente y se ha observado que está constituido por un cromosoma de aproximadamente 1.000 kilobases (kb), y de varios plásmidos lineales y circulares cuyo tamaño varía de 8.5 a 6.0 kb (102).

Muchos investigadores han realizado un examen detallado de las fracciones que constituyen a este genoma, con el fin de localizar aquellos genes que codifican para los antígenos específicos y serotípicos del microorganismo (9, 25, 37, 69, 90, 98, 103, 104).

Las técnicas de PAGE-SDS y de Westernblot con las numerosas bandas inmunorreactivas obtenidas, han revelado que muchas estructuras celulares de *Borrelia burgdorferi* son inmunogénicas. Estas técnicas han empleado sueros de humanos infectados y de animales domésticos y salvajes. Las estructuras inmunogénicas se han clasificado, generalmente, en base a su peso molecular aproximado, el cual varía para el mismo antígeno entre cepas diferentes (7, 10, 39, 120).

A continuación se enlistan las proteínas celulares más frecuentemente observadas en los modelos de bandas en PAGE-SDS y Western-blot:

PROTEÍNA DE 20 A 23 kDa

Es específica de la especie *Borrelia burgdorferi*. Wilske y cols (116) designaron a esta proteína como Pc y reportaron que presentaba variación antigénica, esto es, diferentes pesos moleculares entre las cepas empleadas, además de que algunas no reaccionaban con el suero específico contra este antígeno. A causa de esta variación, los investigadores citados no la consideran como un marcador biológico del microorganismo, aunque al observar que reaccionaba con un número significativo de sueros de pacientes con enfermedad de Lyme, pensaron que en combinación con otro antígeno podría ser de ayuda para mejorar la especificidad de las pruebas de laboratorio.

En estudios posteriores, Simpson y cols (103) empleando la clonación del genoma de *Borrelia burgdorferi* en células de *Escherichia coli*, expresaron el antígeno de 22 kDa al cual designaron como P22-A y observaron que este antígeno se encontraba en el espacio periplásmico junto a los flagelos pero sin ser parte de ellos ni de la membrana externa e interna de la espiroqueta, suponiendo que se trataba de una proteína periplásmica soluble. Todas las cepas empleadas en el trabajo de estos investigadores (3 cepas europeas y 13 norteamericanas) mostraron variación en el tamaño del antígeno -de 20 a 23 kDa-. Sin embargo, no consideraron a esto una variación antigénica, ya que el suero anti-P22-A empleado, reaccionó por igual con todos los antígenos P22-A de diferentes pesos moleculares. Por otro lado, este antígeno no lo encontraron en otras especies del género *Borrelia* por lo que se consideró como marcador biológico potencial para identificar a los aislamientos de *Borrelia burgdorferi*.

PROTEÍNAS DE LA SUPERFICIE EXTERNA (Osp) de 31 y 34 kDa

Las proteínas de 31 y de 34 kDa, se designan como OspA y OspB, respectivamente y se encuentran expuestas en la superficie de la célula bacteriana (10, 18, 102).

De acuerdo a estudios serológicos en pacientes con enfermedad de Lyme realizados por Barbour (10), la proteína OspA es la que presenta menor variabilidad que la proteína OspB

en cuanto a peso molecular entre las cepas norteamericanas así como menor variabilidad en la reactividad con anticuerpos monoclonales. También observaron que algunas cepas no presentaron a la proteína OspB. En este punto, es importante tomar en cuenta que las cepas pueden alterar la expresión de estas proteínas de superficie externa durante muchos pases *in vitro*, esto es en cultivos viejos (18, 100).

Al contrario de lo que se esperaría, la mayoría de los pacientes no desarrolla anticuerpos contra estas proteínas en forma temprana, sino durante los estadios tardíos de la enfermedad a pesar de que por su posición anatómica en la célula deberían ser las primeras estructuras celulares que entraran en contacto con el sistema inmune del individuo afectado (26).

Ambas proteínas son fácilmente identificables en la fracción de la envoltura externa mediante PAGE-SDS, sin embargo, a causa de su proximidad entre ellas, con frecuencia eluyen juntas como un polipéptido doble, lo que ha dado lugar a que algunos investigadores las designen como el complejo 31/34 kDa (26).

Estas proteínas, han sido clonadas, secuenciadas y caracterizadas; observándose que la expresión de ambas está controlada por un promotor simple que se localiza en un plásmido lineal. De ambos antígenos, la proteína OspA es la que más se ha considerado para el desarrollo de vacunas empleándose como modelo animal el ratón de patas blancas *Peromyscus leucopus*. Un requisito para elaborar una vacuna contra cualquier microorganismo, es que posea la capacidad de inducir una respuesta inmune fuerte que conduzca a la generación de anticuerpos protectores. La proteína OspA cumple con este criterio, al menos en el modelo del ratón con enfermedad de Lyme (33, 102).

El hecho de que los pacientes enfermos desarrollen anticuerpos contra esta proteína, durante los estadios tardíos de la enfermedad de Lyme, sugeriría que es débilmente inmunogénica, sin embargo, es posible que esto sólo suceda cuando la proteína OspA se introduce como una parte integral de las espiroquetas en una infección natural, pero al usar la proteína recombinante (OspA e incluso OspB) o el péptido apropiado, podría aumentar

considerablemente la inmunogenicidad y todavía más si se hace en conjunto con un régimen adecuado y empleando un adyuvante (33, 102).

La proteína OspA también se ha empleado para serotipificar a *Borrelia burgdorferi* mediante PAGE-SDS y Western-blot empleando un panel de anticuerpos monoclonales en contra de los diferentes epitopes de esta proteína. Este trabajo fue realizado por Wilske y cols (115). Ellos encontraron que 128 cepas de las 136 estudiadas presentaban la proteína OspA y que eran reconocidas por un anticuerpo monoclonal que se unía al sitio antigénico ubicado entre el aminoácido 102 y el aminoácido 111. También observaron que para los 7 serotipos que encontraron, la secuencia de aminoácidos era la misma.

PROTEÍNA DE 39 kDa

Esta proteína se identificó y designó como P39 por Simpson y cols, su gen fue clonado en células de *Escherichia coli*. Aunque su función es desconocida, este antígeno es específico para *Borrelia burgdorferi* y se ha encontrado en cepas norteamericanas y en cepas europeas, lo que lo convierte en un marcador biológico importante de este microorganismo. Por otro lado induce una respuesta inmune tanto en animales infectados en forma natural y experimental como en humanos enfermos (104).

Dada su cercanía con la proteína de 41 kDa, en ocasiones se ha confundido con ella. Sin embargo, empleando los anticuerpos monoclonales H5332 (específico para OspA), H5TS (específico para OspB) y H9724 (específico para la flagelina, proteína de 41 kDa), la banda correspondiente al antígeno P39 puede distinguirse sin ningún problema. Por otro lado, no se ha observado que presente reacciones cruzadas ni con *Treponema pallidum* ni con *Borrelia hermsii* (104).

PROTEÍNA DE 41 kDa

Este antígeno es la proteína flagelar, altamente inmunogénica y que generalmente despierta una respuesta inmune temprana, a pesar de que los flagelos de la espiroqueta se encuentran totalmente inmersos en la envoltura externa. Este reconocimiento temprano de la flagelina por los anticuerpos del hospedero, sugieren que de alguna manera, la envoltura externa es dañada o removida permitiendo su expresión y que sea reconocida como antígeno (26).

El antígeno purificado, así como fracciones enriquecidas del mismo, son de gran utilidad en las técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme; sin embargo, este antígeno muestra secuencias homólogas de aminoácidos con otras espiroquetas y aún con microorganismos de otros géneros bacterianos como *Salmonella tiphimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* (26, 75, 77, 90, 120).

Robinson y cols (90) y Schneider y cols (98) coinciden en que la región central de la flagelina mejora sustancialmente el serodiagnóstico de la enfermedad de Lyme. Los hallazgos de estos investigadores también coinciden con los encontrados por Fikrig y cols (34).

Schneider y cols sugieren excluir la secuencia de aminoácidos del 121 al 148 y del 255 al 280 ya que son los principales epitopes que causan reactividad cruzada sobretodo con la especie *Treponema pallidum*. A continuación, se enlistan las características más importantes de la proteína flagelar de *Borrelia burgdorferi* y la secuencia de aminoácidos en la cual se encuentran:

- | | |
|---------------------------------------|---|
| - Secuencia del aminoácido 44 al 68 | Causa unión inespecífica de las inmunoglobulinas. |
| - Secuencia del aminoácido 121 al 148 | Extremo N terminal, causa reacciones cruzadas. |

- Secuencia del aminoácido 151 al 166 Epitope reconocido en sueros de pacientes en el estadio I y II de la enfermedad de Lyme.

- Secuencia del aminoácido 205 al 226 Epitope específico del género *Borrelia*, reconocido en sueros de pacientes en el estadio II de la enfermedad.

- Secuencia del aminoácido 208 al 224 Epitope reconocido por el anticuerpo monoclonal de ratón H9724.

- Secuencia del aminoácido 255 al 280 Extremo C terminal, causa reactividad cruzada.

PROTEÍNA DE 60 kDa.

Esta proteína se conoce como el antígeno común ya que se ha encontrado que muestra epítopes similares con un amplio rango de bacterias, incluyendo a *Pseudomonas* y *Legionella spp.* Por lo que este antígeno no aporta ningún beneficio en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme (25, 45, 73, 120).

PROTEÍNA DE 75 kDa.

Caputa y cols (25) también han empleado la clonación para expresar antígenos de *Borrelia burgdorferi* en *Escherichia coli*. Detectaron una proteína de 110 kDa. que reaccionaba con muestras de sueros humanos, de perros y de caballos con enfermedad de Lyme. Posteriormente, procedieron a identificar la proteína de *Borrelia burgdorferi* que correspondía con el antígeno clonado empleando un suero monoespecífico contra esta proteína recombinante de 110 kDa. Sorpresivamente, el suero reconoció a la proteína de 75 kDa. en el lisado de células de *Borrelia burgdorferi*. El por qué de esta diferencia de

tamaño no pudo ser determinado por Caputa y cols. Sin embargo, las evidencias de que ambos antígenos son equivalentes se mencionan enseguida:

1) La capacidad del suero monoespecífico contra la proteína recombinante de 110 kDa. para reconocer a la proteína de 75 kDa. de *Borrelia burgdorferi*.

2) Los sueros positivos de individuos con enfermedad de Lyme reaccionaron con el antígeno de 110 kDa. y con el de 75 kDa.

En base a estos resultados, Caputa y cols consideran que la proteína recombinante de 110 kDa. tiene utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.

PROTEÍNA DE 83 kDa.

Fue descrita por Greene y cols (37) como un marcador importante en el tercer estadio de la enfermedad de Lyme y por Lefebvre y cols (69) como el principal antígeno que induce una respuesta inmune en el hospedero humano. Este antígeno es el que posee el mayor peso molecular. Zöller y cols (120) sugieren que este componente tiene una función antigénica similar a la de la proteína de 94 kDa. descrita por ellos y no excluyen la posibilidad de que ambos antígenos sean los mismos y que se le hayan asignado diferentes pesos moleculares debido a la preparación de las muestras y/o a diferencias analíticas. Lefebvre y cols identificaron al gen cromosomal que expresa a esta proteína y observaron que despierta una respuesta temprana con anticuerpos clase IgM e IgG durante la enfermedad de Lyme y que estos anticuerpos se mantienen durante periodos prolongados (69).

1.5 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN

1.5.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Johnson y colaboradores realizaron una serie de estudios comparativos entre *B. burgdorferi* y *B. hermsii* para conocer los requerimientos nutricionales de esta nueva especie, causante de la enfermedad de Lyme. En estos estudios se evaluó la incorporación celular de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos marcados radiactivamente (54).

Gracias a estos estudios, encontraron que ambos microorganismos incorporaban una cantidad similar de glucosa, presentando radiactividad en todas las fracciones celulares (tabla 1.7) con lo que confirmaron el papel de la glucosa como fuente principal de carbono. Por lo que respecta a los ácidos grasos, éstos se incorporaron casi totalmente (93 - 98 %) a los lípidos celulares sin sufrir alteración alguna, lo que sugiere que *B. burgdorferi* no es capaz de degradar a estos compuestos; la radiactividad solo se presentó en las fracciones lipídicas de las células (tabla 1.7). En cuanto a los aminoácidos, se observó que éstos no sirven como fuente de energía a estas especies, ya que el 70 - 100 % de los estudiados se incorporaron a la proteína celular y poco o ningún porcentaje de radiactividad estuvo presente en la fracción lipídica o en la fracción de los ácidos nucleicos (tabla 1.7) (54).

TABLA 1: Incorporación de varios sustratos por *Borrelia burgdorferi* y *Borrelia hermsii* (58).

Distribución de radiactividad en fracciones celulares: % total de células

Compuestos Radiactivos	<i>Borrelia burgdorferi</i>				<i>Borrelia hermsii</i>			
	Fracc. Ac. nucleicos soluble en frío	Fracción lipídica	Fracc. Ac. nucleicos soluble en caliente	Residuo (proteína)	Fracc. Ac. nucleicos soluble en frío	Fracción lipídica	Fracc. Ac. nucleicos soluble en caliente	Residuo (proteína)
Glucosa	9.60	65.10	22.10	4.20	2.50	74.80	20.70	1.90
Ac. mirístico	2.80	95.40	0.10	1.80	0.20	98.10	0.10	1.70
Ac. palmítico	4.60	92.60	0.90	1.90	0.20	92.70	0.10	7.00
Alanina	11.50	7.90	0.00	80.60	0.00	0.00	0.00	100.00
Arginina	2.40	0.00	14.00	83.60	8.80	0.60	0.00	90.60
Ac. aspártico	0.00	3.90	0.00	96.10	22.60	0.00	0.00	77.40
Ac. glutámico	0.00	0.00	2.40	87.60	23.40	0.00	0.00	76.60
Glicina	5.30	0.00	12.10	82.60	0.50	0.00	0.00	99.50
Isoleucina	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00
Leucina	11.10	0.00	0.00	88.90	0.00	0.00	0.00	100.00
Lisina	0.00	0.00	4.00	96.00	1.80	0.00	0.00	98.20
Fenilalanina	2.90	3.60	2.80	90.70	0.00	0.00	0.00	100.00
Prolina	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00
Serina	4.50	0.00	0.00	95.50	0.60	0.00	0.00	99.40
Treonina	6.20	0.00	0.00	93.80	2.00	0.00	0.00	98.00
Tirosina	2.40	9.20	0.00	88.40	1.50	1.80	0.00	96.70
Valina	0.00	0.00	0.00	100.00	4.50	0.00	2.50	93.10

La utilización de la glucosa como fuente principal de energía en lugar de los aminoácidos, se confirmó al analizar los productos metabólicos finales de estas dos especies. *B. burgdorferi* y *B. hermsii* son homofermentativos, teniendo como producto metabólico final ácido láctico (54).

Productos metabólicos finales, principales de las espiroquetas (54).	
<i>Borrelia hermsii</i>	Ácido láctico
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Ácido láctico
<i>Treponema</i>	Heterofermentativo
<i>Leptospira</i>	Ácido acético

Por lo que se refiere a los requerimientos de oxígeno, las dos especies estudiadas son microaerófilas. El metronidazol es una droga que inhibe el crecimiento de los microorganismos anaerobios, si se agrega a cultivos de microorganismos aerobios, el crecimiento de éstos no se verá afectado. *Borrelia burgdorferi* resiste concentraciones de esta droga de hasta 100 microgramos por mililitro (54), lo cual muestra su condición microaerófila.

SENSIBILIDAD AL METRONIDAZOL (100 MICROGRAMOS POR MILILITRO) DE LAS ESPIROQUETAS (54).		
MICROORGANISMO	CRECIMIENTO	METABOLISMO
<i>Leptospira interrogans</i> serotipo <i>canicola</i>	+	Microaerófilo
<i>Treponema denticola</i>	-	Anaerobio
<i>Borrelia hermsii</i>	+	Microaerófilo
<i>Borrelia burgdorferi</i>	+	Microaerófilo

Borrelia burgdorferi, carece de la enzima que degrada al peróxido de hidrógeno, la catalasa. Esto explica porque esta especie aislada de fluido cefalorraquídeo humano es rápidamente destruida por los neutrófilos polimorfonucleares de pacientes con enfermedad

granulomatosa crónica, ya que al producir peróxido de hidrógeno destruye a los microorganismos catalasa negativa.

En la tabla 1.8, se resumen las características fenotípicas de los géneros *Borrelia*, *Treponema* y *Leptospira*, en especial de *Borrelia burgdorferi* (54)

TABLA 1.8: Características fenotípicas de las espiroquetas

	<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Treponema</i>	<i>Leptospira</i>
Diámetro celular	0.18-0.25 µm	0.2-0.5 µm	0.1-0.4 µm	0.1 µm
Largo	4-30 µm	3-20 µm	5-20 µm	4-20 µm
No. de flagelos periplásmicos	7	15-20	1-8	1
Sobreposición de flagelos periplásmicos	presente	presente	presente	presente
Tubos citoplásmicos	ausentes	ausentes	presentes	presentes
Diamino aminoácido presente en la capa peptidoglicana	ornitina	ornitina	ornitina	α, ε-ácido diaminopimélico
Condiciones para conservar la forma esférica	hipotonicidad	hipotonicidad	hipotonicidad	hipertonicidad
Requerimientos de O ₂	microaerófilos	microaerófilos	anaerobio	aerobio
Fuente principal de carbono y energía	carbohidratos	carbohidratos	carbohidratos y/o aminoácidos	ácidos grasos de cadena larga
Requerimientos de ác. grasos de cadena larga	presente	presente	presente	presente
Capacidad para degradar ác. grasos de cadena larga	ausente	ausente	presente	presente
metabolitos finales	ác. láctico	ác. láctico	varios	ác. acético

1.5.2. CULTIVO

El cultivo *in vitro* de las muestras aisladas a partir del agente vector, de hospederos vertebrados y del hombre, ha permitido conocer a esta nueva especie del género *Borrelia*. El desarrollo de este microorganismo en medios de cultivo, es el resultado de un trabajo arduo de diversos investigadores que han aportado sus hallazgos y observaciones para lograr su crecimiento óptimo (8, 24, 63).

El primer intento para cultivar espiroquetas patógenas se atribuye a Noguchi. El medio que empleó para cultivar especies del género *Borrelia* tenía como base líquido ascítico humano libre de bilis, además de un alto contenido proteico. En este medio de cultivo se podía producir una red de fibrina cuando la muestra era sangre citratada. Gracias a los trabajos de Noguchi se conoció la gran susceptibilidad del género *Borrelia* hacia los detergentes y la necesidad de albúmina así como de un agente espesante como la gelatina en los medios de cultivo empleados para el crecimiento de estos microorganismos (8).

En 1922 Kligler y Robertson realizaron una extensa investigación sobre el cultivo de *Borrelia*, definiendo las condiciones para hacer crecer y mantener a estos microorganismos en medios de cultivo derivados del medio de Noguchi. Estos investigadores, encontraron que el suero de conejo o de caballo, aún diluido podía sustituir al líquido ascítico humano, produciéndose un crecimiento efectivo a un pH entre 7 y 8. Para estabilizar el pH, adicionaron agua peptonada o albúmina de huevo como amortiguador. Asimismo, identificaron al género *Borrelia* como aerobio notando que era muy importante mantener constante la concentración de CO₂ en el medio (8).

A pesar de estos intentos infructuosos y de otros muchos para propagar continuamente al género *Borrelia* durante la siguiente mitad del siglo, hasta la década de los 70's Kelly reportó la propagación satisfactoria de *Borrelia hermsii* durante muchos subcultivos. El medio de Kelly tenía algunos de los componentes de las fórmulas anteriores, un sistema amortiguador adecuado, otras sales, glucosa, gelatina, bicarbonato de sodio, piruvato y lo que Barbour consideró es el ingrediente crítico: la N-acetil glucosamina, el "bloque constructor" de la capa peptidoglicana bacteriana (8).

Aunque el medio de cultivo de Kelly resultó conveniente para propagar cientos de generaciones de *Borrelia*, Stoenner notó que este medio no podía mantener el crecimiento de inóculos de sangre conteniendo menos de 800 espiroquetas, por lo que enriqueció la fórmula básica del medio de Kelly para que, a partir de una célula de *Borrelia* virulenta se produjera una población grande. Este medio contenía extracto de levadura, neopeptona,

albúmina sérica bovina (Fracción V), N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-ácido-etano sulfónico, glucosa, citrato de sodio, N-acetilglucosamina y bicarbonato de sodio, así como vitaminas y ciertos factores de crecimiento (8)

En 1981, Barbour sembró en el medio fortificado de Kelly (modificado por Stoenner) una mezcla de muestras de tracto gastrointestinal de *Ixodes dammini* recolectadas en la Isla Sheller, Nueva York. Después de 6 días de incubación a 35 °C observó el crecimiento de espiroquetas similares a *Borrelia*. En un intento por mejorar y facilitar la producción del medio de cultivo, Barbour le hizo algunos cambios hasta llegar a la fórmula del medio que ahora se denomina Medio de Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) modificado o medio BSK II (8).

La cepa aislada se designó como cepa B31 (ATCC 35210) (1, 8). Cuando se sembró en el medio BSK I con 0.8 % de agarosa, se observó un crecimiento sobre la superficie que semejaba una capa de césped así como un crecimiento en el interior del medio (8). Barbour observó que la temperatura óptima de crecimiento se encontraba en el rango de 30 a 37 °C. Cuando los medios de cultivo se incubaron a 39 °C, se observó un crecimiento pobre de apariencia filamentososa. A temperaturas de 40 °C o mayores no se observó crecimiento. En el medio de cultivo BSK líquido, durante el aislamiento inicial y en pases tempranos se formaron agregados grandes, los cuales volvían a formarse aún después de su dispersión con ayuda de un vortex o simplemente pipeteando (8).

Si bien Barbour describió el crecimiento de *B. burgdorferi* en forma de una capa de césped en medio BSK sólido con 0.8 % de agarosa, no reportó la formación de colonias. Kurtii y colaboradores diseñaron un sistema de cultivo que permitió el crecimiento de colonias. El hecho de que el crecimiento de *Borrelia burgdorferi* no hubiera logrado la producción de colonias discretas, sugería que podía necesitar de un medio más firme que restringiera sus movimientos; por otro lado, hay que considerar que esta especie requiere de condiciones microaerófilas para su crecimiento. Kurtii y cols hicieron frente a estos problemas doblando la concentración de gelatina en el medio BSK e incrementando la

concentración de agarosa de 0.8 % a 1.3 % y para proveer la atmósfera adecuada, las placas de cultivo se incubaron en un recipiente con vela para proporcionar una atmósfera húmeda con reducción de oxígeno e incrementando el dióxido de carbono (63).

Al cabo de dos semanas de incubación, el crecimiento de las colonias fue visible, pero fueron necesarias de 3 a 4 semanas para poder determinar su número y evaluar su morfología. Kurtii y cols inocularon en las cajas de Petri con medio BSK las cepas B31 y 297. La primera desarrolló dos tipos de colonias: unas eran pequeñas, compactas, con un diámetro promedio de 0.43 ± 0.03 mm y su crecimiento estuvo restringido a la superficie del medio de cultivo. Los bordes de estas colonias fueron nítidos y bien definidos, no se observaron células aisladas en la superficie del medio. El otro tipo de colonias fueron grandes y difusas, con un diámetro de 1.8 ± 0.57 mm, estas colonias penetraban en el medio con una profundidad promedio de 0.60 ± 0.24 mm (63).

Las colonias formadas por la cepa 297 presentaron mayor variedad en cuanto a morfología, sin embargo, fueron más notorios dos tipos de colonias: unas difusas con o sin centro elevado, rodeado por un anillo difuso de espiroquetas; y otras que comprendían numerosos agregados de espiroquetas (tipo granular) (63).

Es interesante mencionar el estudio realizado por Callister y cols, el cual consistió en agregar al medio BSK modificado diversos lotes de albúmina sérica bovina (fracción V) encontrando que este componente es un factor significativo que afecta la capacidad de *Borrelia burgdorferi* para crecer cuando el número de células presentes en el inóculo es muy pequeño, así como las características morfológicas de la especie, tales como tamaño, grosor, largo, movilidad, etc. (24).

2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE LYME

2.1. CICLO DE TRANSMISIÓN

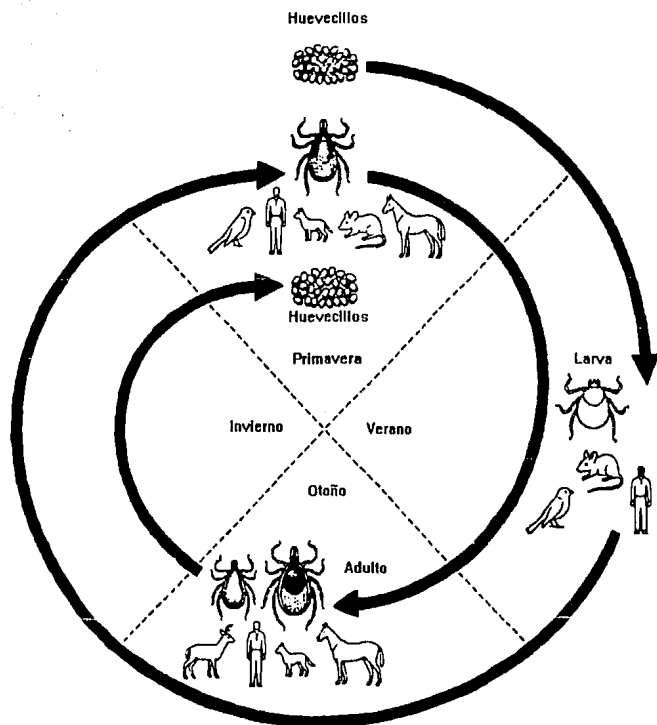
El ciclo de vida del vector de *B. burgdorferi*, dura normalmente dos años. El ciclo inicia cuando los huevecillos son depositados -se desconoce en que sitio- en primavera, semanas más tarde emergen las larvas de vida libre las cuales poseen 6 patas largas, estas larvas son tan pequeñas que no es posible observarlas a simple vista. Las larvas se alimentan de la sangre del hospedero -que generalmente es un mamífero pequeño- por un periodo de dos días para, posteriormente, entrar en una etapa de "descanso" que coincide con el inicio del clima frío en otoño (40).

Al llegar la primavera, las larvas sufren un cambio morfológico y entran a un segundo estadio inmaduro llamado estadio de ninfa. La ninfa presenta 8 patas, y también se alimenta durante el verano de la sangre de ratones o de mamíferos más grandes como perros, venados o seres humanos.

Al final del verano las ninfas cambian morfológicamente y entran al estadio adulto. Las garrapatas adultas se encuentran en la maleza y fácilmente pueden adherirse a una gran variedad de mamíferos, generalmente grandes, en donde ocurre el apareamiento. El macho muere en un tiempo muy corto (después de que ha ocurrido el apareamiento), mientras que la hembra sobrevive hasta que termina el invierno, para de esta manera poder obtener los nutrimentos necesarios para el desarrollo de los huevecillos.

Como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, aún se desconoce el sitio en el cual son depositados los huevecillos y el ciclo completo se repite (fig. 2.1) (40).

FIGURA 2.1 CICLO DE TRANSMISIÓN



En estudios realizados en garrapatas de las especies *Ixodes ricinus*, *Ixodes pacificus* e *Ixodes dammini*, se ha observado que las espiroquetas permanecen en el tracto gastrointestinal -en forma masiva- y sólo un pequeño porcentaje presenta infecciones sistémicas, ya que la hemolinfa de las garrapatas del género *Ixodes* no es un medio óptimo para que las espiroquetas se reproduzcan (21, 23).

Una vez que la garrapata parasita a su hospedero, parece ser que la transmisión de las espiroquetas se demora hasta que éstas empiezan a diseminarse del tracto gastrointestinal y alcanzan las glándulas salivales. Tratando con más detenimiento este proceso, las espiroquetas sufren una multiplicación intensiva para luego penetrar a la pared gástrica y por vía hemolinfática invadir varios tejidos incluyendo aquéllos de las glándulas salivales. Esto se demostró con dos experimentos:

a) Al analizar la saliva de garrapatas que se alimentaron de su hospedero, no se detectó a *Borrelia burgdorferi* sino hasta tres días después de iniciada la picadura al hospedero.

b) Con garrapatas infectadas que parasitaban a un grupo de 6 hámsters y 8 ratones de patas blancas, cuando se les permitió a éstas alimentarse sólo por 24 horas únicamente un hámster y ningún ratón resultaron infectados. Al dejar que las garrapatas se alimentaran durante 48 horas, se observó que se infectaron 5 de los 6 hámsters y todos los ratones.

Estos hallazgos sugieren que una pronta remoción de la garrapata disminuye el riesgo de que los humanos contraigan la enfermedad (2, 20).

No hay duda de que durante el proceso de alimentación de la garrapata, las espiroquetas se transmiten vía saliva. Sin embargo, Burgdorfer considera que la transmisión también podría ocurrir por la regurgitación del contenido gástrico infectado y que no se debe excluir la posibilidad de la transmisión a través de la materia fecal contaminada (21, 23).

A pesar de que en la epidermis, ganglio central, glándulas salivales, ovarios y tejido conectivo alrededor de los túbulos de Malpighian y de la tráquea se presentan infecciones moderadas a leves en un bajo porcentaje de las garrapatas, en algunas hembras el número de espiroquetas se incrementa en el ovario, especialmente en aquéllas que no han depositado

huevoillos o que han depositado una cantidad muy pequeña. En estos casos las espiroquetas invaden los tejidos de soporte del ovario así como a los oocitos; aquí, las espiroquetas destruyen la fosfoproteína de la yema -ovovitelina- afectando la formación de la cáscara que protege al huevoillo. Es por eso que estos huevoillos tan infectados no maduran y el número que normalmente deposita la hembra se ve afectado (23).

No hay que pasar por alto la transmisión transovárica, existen estudios que indican que ésta se registró en 4 de 5 hembras de la especie *Ixodes dammini* infectadas experimentalmente.

También se ha reportado en las especies *Ixodes pacificus* e *Ixodes ricinus* (21, 24, 106).

AGENTES VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE LYME

Los principales vectores de la enfermedad de Lyme son las garrapatas del género *Ixodes*: *Ixodes dammini*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes dentatus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ovatus* (2, 4, 23). Sin embargo, en otras especies de garrapatas y piojos también se ha detectado a *Borrelia burgdorferi*. Estas son (3, 4, 23):

En Estados Unidos

<i>Amblyomma americanum</i>	(garrapata en forma de estrella)
<i>Dermacentor variabilis</i>	(garrapata que parasita al perro)
<i>Dermacentor parumapertus</i>	(garrapata que parasita al conejo)
<i>Haemaphysalis leporispulustris</i>	(garrapata que parasita al conejo)
<i>Dermacentor albipictus</i>	(garrapata de invierno)
<i>Ixodes neotomae</i>	(garrapata del ratón <i>Neotoma cinereo</i>)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(garrapata del perro)
<i>Ornithodoros coriaceus</i>	(garrapata de la familia <i>Argasidae</i>)
<i>Orchopeas leucopus</i>	(piojo del ratón de patas blancas)

Cuterebra fontinella

(insecto díptero que parasita al ratón de patas blancas)

En Europa

Argas reflexus

(garrapatas de la familia *Argasidae* asociadas comunmente con los piojos, ocasionalmente se alimenta en humanos. Se consideró el agente transmisor en un brote al norte de Italia)

Como puede verse, no se debe pasar por alto que varias especies de garrapatas comparten al mismo hospedero. También hay la posibilidad de que otros insectos hematófagos como jehenes, mosquitos y pulgns jueguen un papel como vectores biológicos, por lo que deben tomarse en consideración en la epidemiología de la enfermedad de Lyme. Por ejemplo, un caso de eritema migrante ocurrido en Suecia se atribuyó a la picadura de un mosquito, y en los casos ocurridos en Australia, se cree que otros vectores diferentes al género *Ixodes* podían ser los causantes (4, 21, 23, 95).

HOSPEDEROS DEL VECTOR

Una gran variedad de animales suelen servir como hospederos a las garrapatas en su estadio inmaduro y adulto, desde animales salvajes, domésticos y aves, hasta incluso el hombre (4, 23, 106). Aunque en todos los estadios de vida de la garrapata se alimenta en una gran variedad de especies de mamíferos y aves, cada uno de éstos tiene preferencia específica por su hospedero. Así, el estadio post-embriionario prefiere alimentarse de hospederos de tamaño grande. Las larvas que abundan a fines de verano y principios del invierno se alimentan principalmente de roedores pequeños, particularmente el ratón de patas blancas. El estadio de ninfa, muy numeroso en primavera y verano, prefiere

alimentarse de mamíferos de tamaño mediano como mapaches y ardillas, pero también se alimentan del ratón de patas blancas. Las garrapatas de estadio adulto prefieren mamíferos grandes principalmente el venado de cola blanca durante el otoño, principios de invierno y primavera. Sin embargo, se ha reportado que todos los estadios se alimentan de este animal durante el período de su actividad. Además, se ha observado que todos los estadios se alimentan en el hombre (19).

Los hospederos más frecuentes en Estados Unidos son:

- Especies de roedores

Ratón de patas blancas	<i>Peromyscus leucopus</i>
Ratón de pradera	<i>Microtus pennsylvanicus</i>
Ardilla lisada	<i>Tamias striatus</i>
Ardilla gris	<i>Sciurus carolinensis</i>
Ratones saltadores de campo	<i>Napaeozapus insignis</i>

- Especies de conejos

Conejo de cola negra	<i>Lepus californicus</i>
Conejo de campo	<i>Sylvilagus bachmani</i>
Conejo cola de algodón	<i>Sylvilagus audubonii</i>
Conejo cola de algodón del este	<i>Sylvilagus floridanus</i>

- Especies de venados

Venado de cola blanca	<i>Odocoileus virginianus</i>
Venado de cola negra	<i>Odocoileus hemionus columbianus</i>
Venado durmiente	<i>Dama dama</i>
Venado axis	<i>Axis axis</i>

- Otros

Zarigüeya

Didelphis virginiana

Mapache

Procyon lotor

Musaraña cola corta

Blarina brevicauda

- Animales domésticos

Ganado vacuno

Bos taurus

Caballo

Equus caballus

Perro

Canus familiaris

Gato

Felis catus

En Europa

Ratón de campo cola larga

Apodemus sylvaticus

Ratón de campo cuello amarillo

Apodemus glareolus

Ratón de campo

Clethrionomys glareolus

Por lo que respecta a las aves, en un estudio realizado por Anderson y Magnarelli (4), las especies que se encontraron parasitadas fueron las siguientes:

Gorrión de pantano

Melospiza georgiana

Petirrojo americano

Turdus migratorius

Cianocita

Cyanocitta cristata

Reyezuelo de casa

Troglodytes aedon

Pájaro-gato

Dumetella carolinensis

Gorrión pequeño

Spizella passerina

Pinzón de cola larga roja

Pipilo erythrophthalmus

Cardenal del norte

Cardinalis cardinalis

Pajaro vaca de cabeza café

Mototrus ater

Platicador pecho amarillo	<i>Icteria virens</i>
Pájaro garganta amarilla	<i>Geothlypis trichas</i>
Tordo de agua del norte	<i>Seiurus noveboracensis</i>
Curruca de pino	<i>Dendroica pinus</i>
Tordo de espalda aceitunada	<i>Catharus usulatus</i>
Pájaro de cabeza y pecho negro	<i>Parus atricapillus</i>
Ave de pecho blanco	<i>Sitta carolinensis</i>
Tordo ermitaño	<i>Catharus guttatus</i>
Tordo de agua de Louisiana	<i>Seiurus motacilla</i>
Quiscal común	<i>Quiscalus quiscula</i>
Picoduro de pecho rosa	<i>Phœucticus ludovicianus</i>
Pinzón púrpura	<i>Carpodacus purpureus</i>

El ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) no únicamente es el hospedero preferido de la garrapata en sus estadios inmaduros, particularmente de la larva de *Ixodes dammini*, también es un importante reservorio de la espiroqueta, ya que este ratón soporta ataques repetidos de la garrapata. Estudios hechos en este animalito han revelado que elimina espiroquetas a través de la orina siendo ésta una posible fuente de transmisión de *Borrelia burgdorferi* a las poblaciones de ratones (21).

Por lo que respecta al venado, éste sirve de hospedero a las garrapatas de las especies *Ixodes dammini*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus* en sus tres estadios parasitarios. La abundancia del venado es la responsable, a su vez, de la abundancia del vector (21, 117).

Por lo que respecta a las aves, su importancia como hospederos radica en que pueden transportar al vector y al agente etiológico distancias considerables, ya que dentro de las aves estudiadas por Anderson y Magnerelli (4) además de anidar en la zona en la que fueron capturadas migran hacia el sur en invierno.

Borrelia burgdorferi, no parece afectar la salud de los animales silvestres, sin embargo, en perros, vacas y caballos se ha reportado que causa manifestaciones artríticas, cojera, e inflamación de las articulaciones (6). Otros animales que han mostrado ser susceptibles a este agente etiológico son el ratón de patas blancas, el conejo blanco de Nueva Zelanda, los hámsters y ciertas líneas genéticas de ratas, por lo que son de gran ayuda en la realización de estudios relacionados con la patogenicidad de este microorganismo (12, 22, 59).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La enfermedad de Lyme se ha reportado en Norteamérica, Europa, Asia y Australia (2, 23, 35, 56, 81, 95). En Estados Unidos, la mayoría de los casos reportados son de la costa noreste, sin embargo, se han encontrado otros brotes -mayores o menores- en diferentes áreas del país. Para 1984, la distribución conocida de la enfermedad de Lyme abarcaba 15 estados. Con el paso de los años, las áreas endémicas continuaron expandiéndose y es muy posible que esto se haya dado como resultado de un mejor reconocimiento de la enfermedad de Lyme por parte de los médicos (43).

En Europa, el eritema migrante se ha reportado en todos los países escandinavos, en Inglaterra, Escocia, los países del oeste, y los del este con excepción de Grecia (95). En Asia, la enfermedad de Lyme se ha reportado en Rusia, China y Japón (23, 35, 81, 95). En Australia se reportó en Hunter Valley al norte de Sydney (95).

La distribución geográfica del género *Ixodes* en Estados Unidos, Europa y Asia es la siguiente:

ESTADOS UNIDOS

I. dammini

Noreste: Nueva York (5, 42, 118),
Massachusetts (95, 106), Connecticut (74),
Nueva Jersey (20, 99), Virginia (95).

	Medio-oeste: Minnesota (85), Wisconsin (29).
<i>I. scapularis</i>	Sureste: Georgia (95).
<i>I. pacificus</i>	Oeste: California, Nevada, Oregon (18, 95).
<i>I. dentatus</i>	Este: Carolina del norte (95).

EUROPA y ASIA

<i>I. ricinus</i>	Toda Europa hasta el oeste de Asia (2).
<i>I. persulcatus</i>	Este de Europa y Asia (China y Japón) (2, 35, 81).
<i>I. ovatus</i>	Asia (Japón) (35, 56, 81).

Por lo que respecta a la presencia del agente vector de *Borrelia burgdorferi* en la República Mexicana, existen datos recopilados por la Dra. Hofmann (50) de que las especies *Ixodes pacificus*, *Ixodes scapularis* y otras especies de garrapatas que se ha observado también son vectores biológicos de las espiroquetas en Estados Unidos, se encuentran presentes en México.

Ixodes pacificus se reportó en México desde 1943 en la península de Baja California y se conocía con el nombre científico de *Ixodes ricinus californicus*. Esta garrapata se aisló principalmente de conejos y ratones de campo. *Ixodes scapularis* se reportó por primera vez en 1821, su presencia se ha detectado en el estado de Tamaulipas sobre perros y ganado vacuno; y en el estado de Jalisco sobre ganado vacuno (50).

A continuación se presenta en forma de tabla a las especies de garrapatas (no del género *Ixodes*) que en Estados Unidos son vectores de *Borrelia burgdorferi* y que se ha detectado su presencia en México (50):

ESPECIE	LOCALIDAD	HUÉSPED
<i>Amblyomma americanum</i>	En el noroeste de la República Mexicana.	Ganado vacuno, caballos y perros.
<i>Dermacentor albipictus</i>	Aguascalientes, Campeche, Coahuila, Durango, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Tabasco, Veracruz y Yucatán.	Ganado vacuno y caballar.
<i>Dermacentor parumapertus</i>	Regiones áridas del norte de México, en la Comarca Lagunera y en la península de Baja California.	Conejos y liebres.
<i>Dermacentor variabilis</i>	Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Edo. México, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosi, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Yucatán. Durango, Hidalgo, Nuevo León, Puebla, Tamaulipas y Veracruz.	Conejos, Ganado vacuno, venados.
<i>Haemaphysalis leporispalustri</i>		Conejos y liebres. Aunque es propia de estas especies, es muy frecuente encontrarla en aves a quienes llega a invadir con abundancia sorprendente siendo este hecho una herramienta muy poderosa para su diseminación

<i>Ornithodoros coriaceus</i>	Zona caliente y templada del Pacífico desde California hasta Chiapas.	Pequeños roedores y otros mamíferos silvestres como venados. Ocasionalmente el hombre.
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Península de Baja California, Chiapas, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas.	Perros, ganado vacuno y caballo, cueros, conejos, gatos y ocasionalmente el hombre.

Sin embargo, en México -hasta donde se ha investigado en el presente trabajo- no se ha realizado ningún estudio para determinar la ausencia o presencia de *Borrelia burgdorferi* y por consiguiente de la enfermedad de Lyme.

Refiriéndonos al resto de América Latina, Need y Escamilla (84) realizaron un estudio serológico en Perú. Obtuvieron muestras de suero de un grupo de 216 individuos todos ellos mayores de 10 años y dedicados a las labores del campo y las analizaron por el método de ELISA para detectar la posible presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*, ya que habían observado que dos especies de garrapatas existentes en ese país (*Ixodes affinis* e *Ixodes parvicinus*) podían ser considerados vectores potenciales de esta espiroqueta. Aunque los resultados que obtuvieron no fueron concluyentes (solo a dos pacientes se les detectó anticuerpos contra *Borrelia Burgdorferi*) la importancia de este estudio radica en presentar la primera posible evidencia de la enfermedad de Lyme en este país sudamericano.

Cualquier individuo que viva o visite áreas en donde la enfermedad sea endémica es susceptible a adquirirla, no importa sexo o edad. Sin embargo, se ha observado una mayor incidencia en niños debido a que éstos pasan mayor tiempo jugando en áreas boscosas. También se ha visto que personas que poseen animales domésticos como perros, vacas, caballos, etc. presentan mayor riesgo de contraer la enfermedad ya que pueden sufrir la picadura de la garrapata al encontrarse ésta en el pelaje de los animales domésticos (40). La transmisión horizontal, esto es, la transmisión de persona a persona, no ha sido reportada, sin embargo la transmisión transplacentaria si se ha reportado causando graves daños en el feto (80).

2.2. CUADRO CLÍNICO

2.2.1 PRIMER ESTADÍO DE LA ENFERMEDAD O ESTADÍO AGUDO

Clinicamente, la enfermedad de Lyme puede dividirse en tres estadios. El primer estadio se caracteriza por la aparición de una lesión dérmica conocida como eritema migrante en el 60 % de los pacientes y que frecuentemente se acompaña de fatiga intensa, dolor muscular, fiebre, calosfríos, dolor de cabeza y espalda (13, 17, 36, 40).

ALTERACIONES CUTÁNEAS

El eritema migrante es el sello distintivo de la enfermedad de Lyme, aunque su cuadro clínico varía considerablemente. La lesión inicia con la formación de máculas rojas, las cuales pueden llegar a ser papulares antes de que se expandan en forma concéntrica (17, 78).

La lesión expandida puede presentar diversas tonalidades rojas, o bien, presentar una mácula roja en el centro rodeada de piel "aparentemente" sana, que a su vez se encuentra rodeada por otra banda roja semejando una configuración anular o de "tiro al blanco". Las lesiones en forma concéntrica son las predominantes aunque también se han observado en algunos pacientes lesiones en forma triangular u oval. En otros pacientes se han encontrado lesiones de color azul-rojizo en las extremidades inferiores. En algunos casos, la parte

central del eritema puede ser claro, aunque lo típico es que sea eritematosa -como lo indica el nombre de la lesión- y además edematoso, vesicular, o con formación de una costra. Generalmente es indolora o asintomática, aunque en algunos pacientes se ha reportado prurito y/o dolor (17).

El tamaño de la lesión, su tiempo de aparición después de la picadura del vector, así como su persistencia, son variables. El diámetro del eritema fluctúa entre 10 a 15 cm su tiempo de aparición tarda de 1 a 14 días y su persistencia es de 3 a 32 días ya que el eritema se resuelve espontáneamente -o con tratamiento- por lo que el nombre apropiado para la lesión es eritema migrante y no eritema crónico migrante, como lo nombran en algunos casos (13, 17, 32, 40).

El eritema migrante puede aparecer como una lesión solitaria, pero en el 25 a 50 % de los casos se desarrollan lesiones secundarias o múltiples en diversas regiones del cuerpo, estas lesiones carecen de la pápula roja central característica. Este hecho muy probablemente refleja la propagación de las espiroquetas a través del torrente sanguíneo y no que se presenten picaduras adicionales de garrapatas (17, 40).

Cuando el eritema migrante aparece solo o combinado con síntomas menores, la enfermedad de Lyme se considera localizada. Si por el contrario, el eritema migrante se presenta acompañado por signos extracutáneos y síntomas de mayor intensidad, o si aparecen lesiones múltiples, la enfermedad de Lyme se considera diseminada. El que la enfermedad sea en su inicio localizada o diseminada, repercute en la respuesta del paciente hacia el tratamiento (17).

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL ERITEMA MIGRANTE

Las características fisiológicas del eritema migrante varían dependiendo de su apariencia clínica, así como del sitio seleccionado para la biopsia, es decir, si se toma de la porción central o de la porción periférica de la lesión (17, 32).

En el eritema migrante se han observado 3 modelos histológicos. El más común es un infiltrado intersticial superficial y perivascular profundo constituido en su mayoría por linfocitos, aunque también contiene células plasmáticas. Este modelo se observó en el 61 % de las biopsias observadas de un total de 18 muestras estudiadas (17).

El segundo modelo consiste en un infiltrado linfocítico intersticial superficial y perivascular profundo, con eosinófilos, pero carente de células plasmáticas. Este modelo se encontró en el 28 % de las biopsias estudiadas, todas ellas a excepción de una, se tomaron del centro de la lesión. Este modelo histológico es indistinguible del que se presenta cuando ocurre una picadura por artrópodo.

El tercer modelo es un infiltrado linfocítico superficial y perivascular profundo, carente de eosinófilos y células plasmáticas y se encontró en el 11 % de las biopsias (17). También se ha observado que el infiltrado linfocítico puede contener macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y células mastoides -cebas- dispersas (32).

Borrelia burgdorferi puede demostrarse histológicamente por tinción argéntica de la dermis, epidermis, o de ambas. Se encuentran con mayor frecuencia en los bordes de la lesión y en las biopsias que presentan células plasmáticas.

Los signos y síntomas que ocurren, o mejor dicho, que acompañan al eritema migrante, tales como linfadenopatía, esplenomegalia leve, orquitis, fiebre y conjuntivitis, pueden presentarse todos o ninguno. Algunos pacientes pueden presentar mialgia, similar a la que se presenta en una gripe. Los escalofríos y la fiebre pueden deberse probablemente a la espiroquetemia y a la respuesta inmune humoral como liberación de interferón (17, 32).

2.2.2 SEGUNDO ESTADÍO O ESTADÍO SUBAGUDO

El sello característico del segundo estadio de la enfermedad de Lyme, son las complicaciones del sistema nervioso y el dolor muscular. Aproximadamente el 5 % de los pacientes desarrolla anomalías cardíacas que duran de 6 días a 6 semanas. Estos pacientes experimentan palpitaciones, vértigo, respiración entrecortada asociada con impulsos eléctricos irregulares del corazón; algunos de estos pacientes pueden requerir de marcapasos temporales. Cabe hacer notar que este segundo estadio no siempre se presenta (32, 40, 41).

ALTERACIONES QUE SE PRESENTAN EN EL SISTEMA NERVIOSO EN LA ENFERMEDAD DE LYME

Para poder explicar mejor los daños neurológicos de la enfermedad de Lyme, se han dividido según el sistema que afectan, es decir, los que afectan al sistema nervioso periférico, los que afectan al sistema nervioso central y las neuropatías craneales. Esta división es meramente para facilitar la explicación de cómo se ve afectado el sistema nervioso (36, 41).

ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

La severidad del daño en el sistema nervioso periférico varía ampliamente. Los primeros reportes que se tienen, describen una neuropatía periférica aguda, frecuentemente dolorosa, pero sólo con anomalías sensoriales leves con predominio de anomalías motoras. Estudios patológicos y neurofisiológicos han demostrado lesiones claras de los nervios sensoriales en muchos de estos pacientes, lo que sugiere que el daño no se limita solamente a las raíces nerviosas (radiculitis). En algunos pacientes, las lesiones nerviosas pueden ser más diseminadas y pueden presentar debilidad motora generalizada. Por otro lado, se han reportado casos en los que se presenta un síndrome similar al de Guillain-Barre, el cual es un proceso inflamatorio agudo que principia con la desmielinización de nervios periféricos. Sin

embargo, como estos casos han sido muy pocos, falta determinar si es una causa de la infección o solo una coincidencia (36, 41).

Aunque en este estudio se considerarán a las neuropatías craneales en forma separada, no está demás recordar que algunos nervios craneales (o pares craneales), particularmente el séptimo, poseen segmentos periféricos largos pudiendo tomar parte en cualquier neuropatía periférica. Estudios neurofisiológicos realizados a un número considerable de pacientes, han demostrado que aquéllos que presentan parálisis de Bell, radiculoneuritis (o radiculitis) local, neuritis braquial o neuropatías diseminadas, padecen de anomalías similares en la conducción motora y sensorial. Además, todos presentan anomalías generalizadas de los nervios periféricos y solo difieren en el sitio en el cual el daño es más severo y más aparente. Este cuadro es muy común en pacientes que no se han tratado y que han estado enfermos algunos años. La frecuencia de estos casos es de un 25 a 33 % y repercute en cuadros más agudos, no sólo en apariencia neurofisiológica, sino también en su neuropatología y en la respuesta favorable a la terapia antimicrobiana (41).

ALTERACIONES DE LOS NERVIOS CRANEALES

Es ampliamente sabido que las anomalías en los pares craneales, particularmente la parálisis de Bell, ocurre con mucha frecuencia en la enfermedad de Lyme. Las anomalías de los pares craneales están acompañadas por pleocitosis (aumento de células, particularmente linfocitos) de líquido cerebroespinal, sugiriendo la participación del espacio subaracnoideo. Algunos de los reportes que describen neuropatías craneales no se han demostrado satisfactoriamente por lo que deben tomarse con mucha precaución (41):

PARES CRANEALES

I. Nervio olfativo: se han descrito anomalías o ausencia del sentido del olfato en algunos pacientes, sin embargo, no hay publicaciones que demuestren satisfactoriamente estas deficiencias.

II. Nervio óptico: Existen muchos reportes que describen pacientes con enfermedad de Lyme que presentan neuritis óptica. Sin embargo, aún no se sabe si esta asociación es real o sólo representa dos enfermedades diferentes que padece el mismo individuo.

III., IV., VI. Nervio ocular motor, nervio patético, nervio ocular externo: En algunos pacientes con enfermedad de Lyme que presentan meningitis, se ha reportado parálisis del músculo extraocular, este hecho aparece con cierta frecuencia y es patofisiológicamente razonable, por lo que puede ser válido.

V. Nervio trigémino: Entre los pacientes con infección del sistema nervioso con *Borrelia burgdorferi*, se han descrito un número significativo de casos con entumecimiento (o parálisis facial), dolor facial atípico y parestesia. Esta asociación está bien establecida (36, 40, 41).

VII. Nervio facial: La parálisis de Bell, ocurre hasta en un 10 % de los pacientes con infección diseminada por *Borrelia burgdorferi*. Esto ocurre frecuentemente en el marco de una meningitis causada por dicho agente etiológico. La enfermedad de Lyme, es una de las pocas enfermedades -junto con sarcoidosis, síndrome de Guillain-Barre y meningitis bacilar- que puede producir parálisis facial bilateral (36, 40, 41).

VIII. Nervio auditivo: Recientemente se han descrito casos de pacientes con infección definida por *Borrelia burgdorferi* en el sistema nervioso, que presentan pérdidas del sentido del oído o vértigo. En algunos casos -pocos- se ha demostrado mejoría con la terapia antimicrobiana.

IX a XII. Nervio glossofaríngeo, nervio vago o neumogástrico, nervio espinal, nervio hipogloso mayor: Los casos reportados de anomalías de estos nervios craneales son muy pocos y no están bien fundamentados.

ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Desde que se describió el caso de un paciente con meningopolineuritis, la meningitis aséptica se ha reconocido como una parte importante del síndrome clínico asociado con la infección por *Borrelia burgdorferi*, esta meningitis es generalmente indistinguible de cualquier otra de tipo aséptico. En estos casos, el líquido cerebroespinal presenta pleocitosis (algunos cientos de linfocitos) y una elevación en la concentración de proteínas y glucosa (41).

Algunos autores han enfatizado la posible participación de los nervios craneales y los nervios periféricos en este espectro clínico a través del espacio subaracnoideo, como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo, en estudios recientes no queda claro si el cerebro o el parénquima del cordón espinal están involucrados directamente o no. Por otro lado, algunos reportes de investigadores europeos y estadounidenses han demostrado lesiones localizadas del sistema nervioso central en pacientes que no sólo han tenido historia clínica que indique eritema migrante, sino también una clara evidencia -a nivel de laboratorio- de la infección del sistema nervioso central (41).

El diagnóstico de laboratorio de *Borrelia burgdorferi*, en general es difícil. Sin embargo, en pacientes que presentan infecciones del sistema nervioso central y que aún no han recibido tratamiento, es posible hacer un diagnóstico razonablemente confiable. ¿Cómo es esto posible? En muchas infecciones del sistema nervioso central -por ejemplo, Toxoplasmosis, Herpes simple, HIV- se ha demostrado evidencia de síntesis de anticuerpos específicos. Estos se detectan midiendo la proporción de inmunoglobulina en líquido cerebroespinal y en suero específico para el microorganismo en cuestión (41).

El sistema nervioso puede estar involucrado en todos los estadios clínicos de la enfermedad de Lyme. Los dolores de cabeza agudos, así como el dolor de cuello pueden deberse a la irritación de las meninges (41).

ALTERACIONES MUSCULARES EN LA ENFERMEDAD DE LYME

Por lo que respecta a las afecciones musculares, Steere reportó en un estudio realizado a 55 pacientes con enfermedad de Lyme que no habían recibido tratamiento con antibióticos, que el 20 % (11 pacientes) no desarrolló las manifestaciones características de la enfermedad, pero el 80 % restante (44 pacientes) desarrollaron uno de los siguientes tres modelos, o los 3, pero a diferente tiempo:

- a) 50 % presentó dolor intermitente y localizado del sistema músculo-esquelético.
- b) 60 % desarrolló artritis transitoria.
- c) 10 % desarrolló artritis crónica.

El dolor muscular intermitente localizado se presenta en el intervalo intermedio entre la fase temprana y la fase tardía de la enfermedad (57, 111).

En 1986, se reportó un caso de meningopolineuritis acompañado de miositis localizada. El paciente presentó parálisis facial bilateral, dolor, debilidad y atrofia de los músculos próximos a las extremidades superiores. Se encontraron elevados los niveles de creatinina y al estudiar una biopsia de músculo, se observaron signos típicos de miositis localizada, además se confirmó la presencia de *Borrelia burgdorferi* serológicamente (57).

Resumiendo, las afecciones musculares en este estadio pueden incluir mialgia y artralgia sin que haya evidencia de inflamación (13).

ALTERACIONES CARDÍACAS

Aproximadamente, del 8 al 10 % de todos los casos de la enfermedad de Lyme desarrollan anomalías cardíacas, las cuales generalmente son leves y transitorias. La obstrucción aurículo-ventricular es la característica más común, pudiendo experimentar los pacientes síncope, vértigo, dolor de pecho y fatiga. La miopericarditis, la disfunción leve del ventrículo izquierdo y la cardiomegalia, se han reportado en contadas ocasiones en pacientes adultos, sin embargo, también pueden ocurrir en niños (13).

2.2.3 TERCER ESTADÍO O ESTADÍO CRÓNICO

Las manifestaciones tardías de la enfermedad de Lyme se presentan algunos meses después de que ocurrió la picadura de la garrapata y de que inició el eritema migrante. Se ha observado que los pacientes con enfermedad de Lyme que no reciben ningún tratamiento médico desarrollan problemas en las articulaciones, características del padecimiento conocido como artritis reumatoide (13, 40, 111, 112).

La rodilla es la articulación que con mayor frecuencia se ve afectada, sin embargo, el codo, el hombro, el tobillo, la cadera y la articulación temporal-mandibular también pueden estar involucradas. Los ataques de artritis son recurrentes pudiendo tener una duración de días o semanas -en promedio una semana- (13, 111).

Estudios realizados por Steere y cols (111), muestran que los pacientes pueden presentar ataques recurrentes de artritis durante muchos años; sin embargo, a últimas fechas se ha observado que el número total de pacientes con esta característica ha decrecido entre un 10 a un 20 % cada año y que la frecuencia y duración de los ataques igualmente tiende a ser menor.

Una pregunta interesante que podría surgir a partir del párrafo anterior es la siguiente: ¿Qué factores intervienen o juegan un papel importante en los ataques recurrentes de artritis?. En primera instancia, se podría pensar que el estrés emocional o un trauma en la articulación afectada pueden precipitar los síntomas artríticos, probablemente porque estas situaciones alteraron la inmunorregulación en favor del agente causal. Por otro lado, Steere y cols consideran que la reinfección no es un factor participante ya que no se ha tenido conocimiento de pacientes con enfermedad de Lyme que cursen el tercer estadio, es decir, que presenten síntomas artríticos y que hayan desarrollado una nueva lesión dérmica (eritema migrante) a causa de una nueva picadura del agente vector. Cabe hacer notar que algunos individuos desarrollan lesiones secundarias en la piel, no porque sufran nuevas picaduras por parte de la garrapata, sino debido a la diseminación del agente etiológico en su organismo (17, 111).

Si la reinfección fuera un factor participante, deberían de presentarse modelos estacionarios de recurrencia. Sin embargo, los ataques de artritis pueden ocurrir en cualquier época del año (111).

Haciendo una comparación, la mayoría de las espiroquetas del género *Borrelia* causan fiebres recurrentes -por ejemplo *Borrelia hermsii*- y, en el caso de *Borrelia burgdorferi*, se presentan cuadros de artritis recurrente. En el caso de las fiebres recurrentes se piensa que son el resultado de la variación antigénica de las proteínas presentes en la membrana externa de la espiroqueta y es muy probable que ocurra la misma situación en el caso de la artritis recurrente causada por *Borrelia burgdorferi* (111).

Aproximadamente el 10 % de los pacientes con enfermedad de Lyme en el tercer estadio, puede desarrollar una artritis crónica con características clínicas similares a las de la artritis reumatoide, pudiendo observarse erosión del cartilago y hueso. Todos estos síntomas son causados por un número muy bajo de espiroquetas en el hospedero (105).

La patogénesis de la artritis crónica en la enfermedad de Lyme, continúa estudiándose. Existen varias teorías que tratan de explicarla, algunas involucran al sistema inmune y otras, además, a factores asociados con el hospedero como la susceptibilidad genética (36, 40, 48)

La primera teoría sostiene que en las articulaciones de los individuos que padecen la enfermedad de Lyme, se acumulan complejos inmunes, probablemente formados en esos sitios en respuesta a antígenos espiroquetales. Estudios realizados por Hardin y col proporcionan evidencia de que estos complejos inmunes tienen un papel activo en la patofisiología de las manifestaciones artríticas de la enfermedad. Piensan que conforme se incrementa la concentración de dichos complejos, la artritis se vuelve crónica, además de que se necesita que las espiroquetas permanezcan viables. Los complejos inmunes aumentan considerablemente la quimiotaxis de neutrófilos, los cuales, ya en el sitio preciso -articulación-, liberan una variedad de enzimas que atacan a los complejos antígeno-anticuerpo. De acuerdo con esta hipótesis, estas enzimas liberadas no sólo atacan a dichos complejos inmunes, sino también a las articulaciones provocando la erosión del hueso y el

tejido cartilaginoso, produciéndose los síntomas similares a la artritis (14, 15, 32, 36, 40, 48, 105, 111).

Habitch y cols sugieren una segunda hipótesis en la que sostienen que los efectos patológicos de las espiroquetas no sólo están asociados a las enzimas que segregan los neutrófilos, sino que también se deben a un mediador de la respuesta inmune, la interleucina 1(IL-1) (36, 40).

La IL-1 es una proteína con un peso molecular promedio de 17,000 daltones, sintetizada principalmente por los macrófagos. Es un regulador de la respuesta inmune del cuerpo y actúa como el director molecular de los mecanismos de defensa no específicos contra una gran variedad de agentes ambientales. Asimismo, coordina la reacción del cuerpo contra una infección bacteriana o algún trauma, regulando el principio de la fiebre, la liberación de los neutrófilos de la médula ósea y la proliferación de fibroblastos (40).

Uno de los estímulos más poderosos para la liberación de IL-1 es un lipopolisacárido complejo constituido por moléculas de azúcares y lípidos y que forma parte de la envoltura externa de la pared celular de todas las bacterias Gram-negativas. A pesar de lo expuesto por Aberer y Duray (1), de que no hay una evidencia suficiente para clasificar a *Borrelia burgdorferi* como Gram negativa por teñirse en forma incompleta, Habitch y cols supusieron que esta espiroqueta podía contener en su envoltura externa un lipopolisacárido, que disparara la liberación de IL-1 y ésta, a su vez, ejercer efectos locales y sistémicos severos en el cuerpo humano (36, 40).

Estos investigadores se dieron a la tarea de demostrar que la pared celular de *Borrelia burgdorferi* verdaderamente contenía dicho polisacárido. Una vez comprobada su presencia aplicaron un método químico de extracción para obtenerlo puro y así poder probar su teoría. Se corrieron dos series de experimentos, en la primera se inoculó a humanos y conejos con el lipopolisacárido purificado, los resultados obtenidos fueron notables: los conejos a los que se les inoculó en forma intravenosa desarrollaron cuadros febriles a las pocas horas, y los

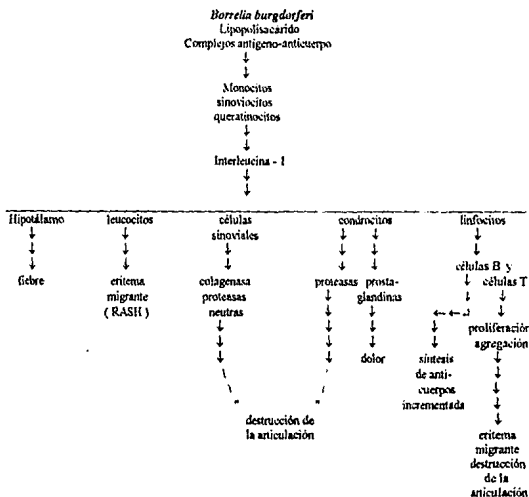
conejos y humanos a los que se les inoculó intradérmicamente, desarrollaron un rash similar al eritema migrante (40).

En la segunda serie de experimentos, se deseaba observar la respuesta de los macrófagos humanos (síntesis de IL-1) en contra de *Borrelia burgdorferi* tanto *in vivo* como *in vitro*. Ambos tipos de células se cultivaron juntas y se encontró que los macrófagos segregaban grandes cantidades de IL-1 en presencia de la espiroqueta, cuando observaron biopsias de piel de conejo a los cuales se les había inoculado en forma intradérmica IL-1, células de *B. burgdorferi* o el lipopolisacárido, todos ellos fueron capaces de inducir una respuesta inflamatoria aguda en la piel. Las lesiones en la piel y la fiebre son causadas por la liberación de IL-1 (40).

Habitch y cols creen que la liberación de IL-1 es en respuesta a *B. burgdorferi* que es directamente responsable de los síntomas artríticos característicos del tercer estadio de la enfermedad de Lyme. Cuando se cultivan células sinoviales -provenientes del forro interno de la rótula- en presencia de IL-1, este inmunorregulador estimula la producción de dos sustancias: la colagenasa y la prostaglandina E2, las cuales contribuyen a que se desarrollen los síntomas artríticos.

La colagenasa, como su nombre lo indica, degrada al colágeno, componente primario del tejido conectivo en las articulaciones. Esta degradación conduce a un modelo de erosión muy similar al visto en casos crónicos de la enfermedad de Lyme. La prostaglandina E2 produce el dolor característico de la artritis. Así, al final de los experimentos realizados, Habitch y cols demostraron que las células sinoviales de pacientes con enfermedad de Lyme liberan IL-1 cuando dichas células se exponen al microorganismo o al lipopolisacárido extraído de la envoltura externa de *Borrelia burgdorferi* (40).

DIAGRAMA EXPLICATIVO DEL PAPEL QUE JUEGA LA INTERLEUCINA 1 (IL-1) EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE LYME



La interleucina-1 actúa en varios órganos y células produciendo síntomas como el eritema, fiebre y artritis características de los estadios uno, dos y tres de la enfermedad.

Algunos pacientes con enfermedad de Lyme presentan la reacción de Jarisch-Herxheimer (fenómeno que se presenta inmediatamente después de la antibióticoterapia, manifestado como una exacerbación temporal de los síntomas). Se observó por primera vez en pacientes con sífilis tratados con ungüentos que contenían mercurio, en el siglo XVI. La reacción de Jarisch-Herxheimer también se presenta en otras enfermedades causadas por espiroquetas como la fiebre recurrente. En el caso de los pacientes con enfermedad de Lyme esta reacción concuerda con la teoría de Habicht y cols, la cual sostiene que con antibióticos se destruyen un gran número de espiroquetas liberándose grandes cantidades de

lipopolisacárido al torrente sanguíneo con la consecuente exacerbación en la producción de IL-1 (40).

También se pensó que una endotoxina era la causante de la fiebre y otros síntomas sistémicos comunmente observados en la enfermedad de Lyme, por lo que Schmid y cols se dieron a la tarea de buscar la presencia de esta posible endotoxina en muestras de sangre, sin embargo, fracasaron en su intento ya que no se detectó ninguna endotoxina o sustancia similar en dichas muestras de sangre (97).

Por otro lado, las similitudes histopatológicas de la artritis de Lyme con otras enfermedades reumáticas, puede ser el resultado de una respuesta inmune patológica en personas genéticamente susceptibles. Los resultados de las investigaciones preliminares para determinar la presencia de alelos en el locus D del complejo principal de histocompatibilidad clase II, asociados a la autoinmunidad en pacientes con artritis de Lyme crónica, sugieren la existencia de una fuerte relación de esta forma prolongada de la enfermedad con un patrón inmunogenético susceptible (36, 108).

Recientemente se han estudiado perfiles genéticos de 130 pacientes que presentaban diversas manifestaciones de la enfermedad de Lyme y se encontró una correlación notablemente significativa entre la cronicidad de la artritis y la presencia de los alelos HLA-DR4 y HLA-DR2. Por otro lado, se asoció la presencia del alelo HLA-DR4 con una falta de respuesta al tratamiento con antibióticos (108).

2.3 COMPLICACIONES

Las infecciones microbianas durante el embarazo pueden provocar aborto, muerte fetal intrauterina, parto prematuro, retardo en el crecimiento intrauterino, malformaciones y/o disturbios funcionales en el neonato. Entre los agentes bacterianos que se sabe causan malformaciones congénitas, las espiroquetas, particularmente la especie *Treponema pallidum* está asociada con algunos problemas mencionados como son: aborto, muerte fetal intrauterina, y malformaciones congénitas. Por lo que toca al género *Borrelia* y *Leptospira*

ambos pueden transmitirse de madre a hijo a través de la placenta habiendo un elevado riesgo de pérdida fetal; sin embargo, en ninguno de estos dos géneros se han reportado defectos congénitos (71, 80).

En base a estudios clínicos y autopsias, la enfermedad de Lyme gestacional se ha asociado a varios problemas médicos incluyendo muerte fetal, hidrocefalia, anomalías cardiovasculares, ansiedad respiratoria en el neonato, hiperbilirrubinemia, retardo del crecimiento intrauterino y toxemia. Si cualquiera o todas estas asociaciones son coincidencia o casualidad todavía deben hacerse más investigaciones para esclarecer este hecho (71, 80).

A continuación se presenta una revisión de estudios epidemiológicos, serológicos y patológicos de casos de enfermedad de Lyme activa en mujeres embarazadas que se han asociado a consecuencias adversas durante el embarazo.

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Markowitz y cols realizaron un estudio epidemiológico con mujeres embarazadas que tenían la enfermedad de Lyme, con el fin de detectar algún efecto adverso en el feto. El estudio se realizó durante 9 años (1976-1984), en 19 pacientes cuyas edades fluctuaban entre los 21 y 37 años. Los síntomas presentados por las pacientes, si recibieron o no antibióticoterapia y si hubo o no complicaciones en el embarazo se resume en la siguiente tabla 2.1 (80).

TABLA 2.1: COMPLICACIONES DURANTE EL EMBARAZO DE MUJERES CON ENFERMEDAD DE LYME

paciente	edad años	síntomas en la mujer		antibióticos		feto normal y/o complicación en el feto
		tipo	inicio semana gestación	tipo	semana de gestación a la que se inicia	
1	30	eritema migrante, fiebre.	2	penicilina	3	normal
2	34	artritis	4			
		eritema migrante.	6	penicilina	8	muerte fetal intrauterina
3	27	artritis	16			
4	34	eritema migrante	8	penicilina	10	normal
5	21	eritema migrante	8	-----	--	normal
		artralgias	9	penicilina	10	normal
6	38	eritema migrante	9	penicilina	16	normal
		artritis	15			
7	32	parálisis facial, fiebre.	10	-----	--	parto prematuro
		artritis	19			
8	25	eritema migrante	11	penicilina	14	normal
9	31	eritema migrante, fiebre, artralgias	11	-----	--	normal
10	28	eritema migrante	15	penicilina	15	normal
11	30	eritema migrante	20	eritromicina	21	sindeactilia
		artralgias, dolor de cabeza, rigidez del cuello		penicilina	27	
12	26	eritema migrante, fiebre	23	penicilina	23	normal
13	27	eritema migrante, fiebre, artralgias	24	penicilina	24	normal
14	25	eritema migrante, fiebres.	25	-----	--	normal
		artritis.	30			
15	31	eritema migrante	27	penicilina	27	ceguera, retardo en el crecimiento intrauterino
16	31	eritema migrante, artralgias	27	penicilina	40	normal
17	30	eritema migrante, fiebre, artralgias	33	penicilina	34	normal
18	35	artritis	37	-----	--	normal
19	31	eritema migrante	37			rash
		meningoencefalitis	37			

En la tabla anterior se puede observar que sólo 5 pacientes (26 %) presentaron complicaciones en el embarazo no importando el trimestre de gestación en el cual inició la enfermedad. De estos casos, sólo 3 recibieron tratamiento con antibióticos (80).

Durante el estudio, ninguno de los infantes presentó defectos congénitos del corazón, sin embargo, dado el tamaño de la población en estudio, la posibilidad de observarlos estuvo limitada.

Por otro lado, no se observaron dos complicaciones iguales sobre el feto, ni tampoco pudo comprobarse una relación entre la enfermedad de Lyme cursada por la madre y las complicaciones presentadas por el feto, observando que ninguna de las anomalías detectadas estuvo asociada con otra etiología (80).

Finalmente, Markowitz y colaboradores realizaron una evaluación serológica en sangre obtenida del cordón umbilical de 5 infantes clínicamente sanos y ninguno de ellos mostró evidencia de anticuerpos en contra de *B. burgdorferi*, por lo que concluyeron, basándose en la seronegatividad de estos casos, que no había evidencia de infección oculta. Sin embargo, Mac Donald sostiene que un solo resultado seronegativo no excluye la posibilidad de que se tenga la enfermedad de Lyme, ya que se ha reportado seronegatividad en ciertos pacientes con enfermedad crónica (71, 80).

La sangre obtenida del cordón umbilical de un sexto infante fue seropositiva para anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*, pero 7 meses más tarde fue seronegativa.

Markowitz y cols piensan que esto se debió muy probablemente a una transferencia pasiva de anticuerpos maternos de la clase IgG (80). Mac Donald objeta esta suposición y dice que la serología del infante pudo convertirse a un estado de seronegatividad debido al tratamiento con antibióticos (71).

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

Se realizó un estudio serológico en infantes recién nacidos para determinar si las diferencias clínicas y serológicas podrían detectarse en bebés cuyas madres habían residido en áreas endémicas a diferencia de aquellos cuyas madres no lo habían hecho. El estudio se realizó con 421 infantes, de los cuales 255 pertenecían a áreas endémicas y 166 a áreas no endémicas; en el primer caso, sólo al 10.2 % se le pudieron detectar algunos anticuerpos contra el agente etiológico y en el segundo, sólo el 2.4 % de los infantes mostró anticuerpos detectables. Entre uno y otro grupo, las malformaciones congénitas observadas no fueron significativamente diferentes, sin embargo, el bajo peso al nacer y la ictericia se observaron

con más frecuencia en bebés de áreas endémicas. Debido a que en este estudio sólo se incluyeron infantes recién nacidos vivos, no fue posible asociar anomalías congénitas asociadas a aborto o a muerte fetal intrauterina (71).

ESTUDIOS PATOLÓGICOS

Por lo que respecta a estudios patológicos, Schlesinger y cols reportaron en 1985, que el agente etiológico de la enfermedad de Lyme podía transmitirse verticalmente al feto. Identificaron mediante técnicas de impregnación argéntica fragmentos de la espiroqueta en cortes histológicos de bazo, riñón y médula ósea obtenidas de la autopsia de un neonato quién murió a las 39 horas de haber nacido debido a una falla cardíaca secundaria. Sin embargo, dichos investigadores no pudieron encontrar a *Borrelia burgdorferi* en el miocardio hasta que se emplearon técnicas inmunohistoquímicas (94).

En otros estudios, Mac Donald reportó cuatro casos adicionales de transmisión materno-fetal de *B. burgdorferi* con anomalías cardíacas en tres de los fetos. Las espiroquetas se observaron por microscopía de campo oscuro en cortes histológicos de hígado, de otros varios tejidos y de placenta (71).

Por otro lado, también se describió transmisión transplacentaria de *B. burgdorferi* seguida de muerte neonatal en un caso en Alemania. Las espiroquetas se encontraron en cerebro e hígado del neonato cuando se realizó la autopsia. En este caso, la madre se trató con penicilina inmediatamente después de que apareció el eritema migrante en el segundo trimestre de su embarazo. Un caso más de muerte neonatal fue reportado en 1987; la muerte de este recién nacido se debió a una trombosis aórtica. El agente etiológico de la enfermedad se aisló del cerebro del neonato (71).

En las autopsias realizadas en algunos casos de enfermedad de Lyme gestacional, se ha encontrado al agente etiológico en el tejido fetal o placentario. Sin embargo, los estudios rutinarios del tejido, esto es con técnicas que emplean microscopio ordinario como la técnica con eosina y hematoxilina, no proporcionan ninguna pista de que la infección se haya

extendido al feto, ya que en ninguna autopsia realizada hasta el momento se ha observado inflamación de los tejidos fetales que contienen a la espiroqueta; por otro lado cabe mencionar que se requiere de gran habilidad y paciencia para identificar a las espiroquetas en los tejidos (71).

Las técnicas serológicas son una herramienta poco satisfactoria durante el embarazo para determinar la infección materna, ya que se presenta una marcada tendencia hacia la seronegatividad. Por lo que respecta al eritema migrante, el signo patognomónico de la enfermedad es una herramienta muy explotada por los epidemiólogos para diagnosticar la enfermedad en su estadio temprano. Sin embargo, la mitad de los pacientes nunca desarrollan la lesión del eritema migrante y aunque así fuera, en el caso de una paciente embarazada, esto no indica si la espiroqueta permanecerá localizada en la piel o si pasará a torrente sanguíneo representando una amenaza para el feto, ya que no hay una protección o barrera transplacentaria que proteja al feto de la espiroqueta una vez que el microorganismo haya llegado al torrente sanguíneo materno (71,80).

COMPLICACIONES OFTALMOLÓGICAS

Hasta antes de 1982 no se había reportado ninguna manifestación oftalmológica, salvo conjuntivitis. Sin embargo, Steere y cols reportaron el caso de una paciente que a las cuatro semanas de habersele presentado el eritema migrante en la piel, desarrollo iritis unilateral seguida de panofalmitis. Con el transcurso del tiempo, la paciente fue perdiendo agudeza visual y al intervenirla quirúrgicamente y extraer líquido vítreo purulento, en éste se pudo observar a través del microscopio de campo oscuro, la presencia de espiroquetas morfológicamente compatibles con el agente etiológico de la enfermedad de Lyme. A pesar del tratamiento con antibióticos, la espiroqueta sobrevivió y la paciente perdió totalmente la visión en ese ojo. Estudios posteriores, proporcionaron evidencia adicional de que el agente etiológico de esta enfermedad puede propagarse a los ojos. Estos estudios consistieron en

inocular intraperitonealmente a *Borrelia burgdorferi* de fluido espinal humano en 20 hamsters, al final del estudio, se aisló al microorganismo de los ojos de 9 de éstos (107).

2.4 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

2.4.1 PREVENCIÓN

Los principales métodos para reducir la incidencia de las enfermedades transmitidas por la picadura de garrapatas se dividen en 4 categorías:

- 1) Protección personal,
- 2) Control biológico,
- 3) Modificaciones en el medio y control físico
- 4) Control químico (2, 13).

1. PROTECCIÓN PERSONAL

Debido a que los vectores primarios de la enfermedad de Lyme se encuentran ampliamente distribuidos y no están concentrados en un hábitat en particular -áreas rurales y suburbanas-, los esfuerzos realizados por el individuo para prevenir la picadura, localizar y remover a la garrapata de dicho sitio, pueden ser las medidas más efectivas que deben tomarse para reducir el riesgo de contraer esta enfermedad (2, 13).

1.1 REPELENTES

Los repelentes aplicados sobre la ropa y en aquellos sitios donde ésta hace contacto con la piel como tobillos, cintura, cuello y muñecas, ayudan a prevenir picaduras por garrapatas. Existen compuestos que no matan al insecto y sólo lo repele cuando se aplican en la ropa. Estos compuestos son N,N-dietil-m-tolbutamina, la indalona (butil-3,4-dihidro-2,2-dimetil-4-oxo 2H piran-6 carboxilato), dimetilftalato, etilhexanediol, el dimetilcarbamato, el bencilbenzoato y el M-1960 que contiene 2-butil-2-etil-1,2-propanodiol-N-butilacetanilida-

bencilacetato. Estos compuestos ofrecen una protección de varias semanas aún después de que las prendas de vestir se laven, con excepción de los 4 primeros (2).

Las prendas pueden impregnarse con una emulsión o solución del repelente o mediante un atomizador, pero debido a su aspecto grasoso, al olor poco agradable de la mayoría de estos compuestos y a la disminución de la permeabilidad al aire cuando se tratan las prendas con los repelentes, su uso está limitado (2).

Combinar el uso de los repelentes con otras medidas personales brinda una mayor protección. Por ejemplo, usar prendas de vestir de una sola pieza con cierre al frente y con resorte en los tobillos y los puños, impiden que la garrapata trepe fácilmente y llegue a la piel. Por otro lado, es conveniente el uso de colores claros ya que de esta manera las garrapatas serán más fácilmente observables. Además, se recomienda el uso de ropas hechas de tejido liso y muy cerrado en lugar de aquéllas que se hacen de telas ásperas, ya que de esta manera es menos probable que las garrapatas permanezcan adheridas a la ropa (2).

Dado que cualquier persona que viva o visite un área en donde la enfermedad de Lyme sea endémica es susceptible de contraerla, se recomienda llevar a cabo estas medidas de seguridad para una protección adecuada (40).

1.2 PICADURA DE LA GARRAPATA Y COMO REMOVERLA DE LA PIEL

¿ Como remover a la garrapata del sitio de la picadura ? Antes de responder este punto se explicará brevemente la anatomía del agente vector y del mecanismo mediante el cual se adhieren a la piel del hospedero.

La garrapata adulta presenta 4 pares de patas largas y segmentadas provistas de clavos o tenazas y de unos cojincillos adhesivos que le permiten asirse a su hospedero mientras se alimenta de él. La cabeza, consiste de un cráneo pequeño el cual está provisto de unas estructuras largas que semejan trompas prensiles -como la de los elefantes- llamadas hipostomas. De cada lado de la cabeza presenta dos papilas sensoriales. Con los hipostomas, la garrapata taladra la piel hasta llegar a los capilares, asimismo secreta una sustancia

cementante, la cual es una mezcla de proteínas y lípidos que le permiten un mejor anclaje sobre la piel del hospedero. Las papilas sensoriales, están recubiertas de vellosidades y de otros receptores que le permiten a la garrapata localizar a una víctima de sangre caliente (2, 40).

Las garrapatas pueden quitarse del sitio de la picadura con la ayuda de unos fórceps o pinzas, con movimiento seguro y firme, ya que las estructuras de la garrapata son largas y con frecuencia se rompen durante el desprendimiento. Una vez desprendida la garrapata, deberá aplicarse un antiséptico en el sitio de la picadura. Es recomendable que las personas revisen periódicamente la piel de sus cuerpos después de visitar un área infestada de garrapatas, para que, en caso de picadura, las desprendan rápidamente del sitio ya que esto disminuye el riesgo de infección. La garrapata en el estadio de ninfa, se alimenta de su hospedero durante 4 a 7 días y la garrapata adulta durante 8 a 11 días. Aparentemente, las espiroquetas se transfieren al hospedero humano por salivación, sin embargo, es posible que puedan ser inyectadas por regurgitación del contenido gastrointestinal. Es muy probable que las ninfas, transmitan a las espiroquetas después de más de 48 horas de que se estén alimentando de su hospedero. Sin embargo, se han visto casos en los cuales la infección del hospedero resulta después de 24 horas o menos de que es parasitado por la garrapata (2).

1.3 EVITAR VISITAR ÁREAS INFESTADAS POR GARRAPATAS

Los individuos pueden reducir el riesgo de adquirir la enfermedad de Lyme, simplemente evitando visitar áreas infestadas de garrapatas del género *Ixodes* durante aquellas épocas del año cuando abundan en su estadio de ninfas. Cabe mencionar que en todos los estadios de su ciclo de vida las garrapatas se alimentan de animales de sangre caliente y del hombre, sin embargo, en el estadio de ninfa es en el que se trasmite el agente etiológico de la enfermedad de Lyme. El período estacional en el que abundan es de mayo a mediados de julio. Si el visitar estas áreas es inevitable, uno puede reducir el riesgo absteniéndose de sentarse o acostarse sobre la hierba. Es importante también tener un

cuidado escrupuloso con los animales domésticos ya que éstos pueden introducir pasivamente a la garrapata dentro de las casas (2).

2. CONTROL BIOLÓGICO

Existen dos especies de avispas: *Hunterellus hookery* e *Ixodiphagus hirtus*, que actúan como parásitos naturales de *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus*. Estas avispas durante su estado larvario se alimentan de las ninfas de las garrapatas (66). En Estados Unidos se ha introducido a la especie *Hunterellus hookery*, en áreas en donde *Ixodes dammini* abunda obteniéndose buenos resultados. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos la población de garrapatas permanece abundante (8).

3. MODIFICACIONES EN EL MEDIO AMBIENTE Y CONTROL FÍSICO

Ocasionalmente, alterar el medio ambiente de las garrapatas ha reducido significativamente su población y con el tiempo tal vez se consiga su erradicación. Sin embargo, algunos cambios en el medio ambiente pueden incrementar el riesgo de la picadura por estas garrapatas y, por ende, de contraer la enfermedad (2).

3.1 ALTERACIÓN DE LA VEGETACIÓN

Un incendio controlado puede ser de gran utilidad para destruir a las garrapatas activas, con lo cual se reduce la abundancia de los hospederos -de preferencia de las garrapatas del género *Ixodes*- creando un hábitat inhóspito para los huevecillos y demás estadios del vector primario de la enfermedad de Lyme, ya que las garrapatas del género *Ixodes* requieren de una cierta humedad relativa, si la vegetación se remueve drásticamente, como es en el caso de un incendio, el microclima cercano al suelo puede llegar a ser tan seco que impida la supervivencia de las garrapatas.

Sin embargo, los efectos sobre la población de garrapatas debido a alteraciones en la vegetación, pueden llegar a ser complejos. Quemar a finales de la primavera asegura la

destrucción de las garrapatas en su estadio de ninfas y reduce el riesgo de la picadura. No obstante, el incendiar suelos forestales es una medida de doble filo que debe llevarse a cabo concienzudamente, ya que se les despoja de materia orgánica necesaria ocasionando un desequilibrio ecológico (2).

Otra medida que podría ponerse en práctica es la de mantener recortado el césped para, de esta manera, reducir el número de garrapatas; sin embargo, en zonas infestadas, esta medida preventiva es de poca o de ninguna ayuda. También se recomienda mantener los basureros lejos de las casas ya que en donde hay basura, ésta siempre atraerá a los roedores y éstos son hospederos de la garrapata. Asimismo, se aconseja no tener cerca de la casa los bebederos y comederos de las aves ya que éstas también son hospederos de las garrapatas (2, 4).

3.2 IMPEDIR EL ACCESO DE LAS GARRAPATAS A SUS HOSPEDEROS

En algunos casos, las garrapatas se han controlado impidiendo su acceso a los hospederos. ¿Cómo se logra esto? evitando la entrada de los animales, por ejemplo, ovejas, venados, etc., a las zonas infestadas. De esta manera las garrapatas no tendrán sobre quién alimentarse y morirán de inanición o desecación. Esto se hizo con un rebaño de ovejas en Europa, las cuales eran hospederos importantes de la garrapata *Ixodes ricinus*, el rebaño fue rotado en varios pastos durante extensos periodos, observándose que las garrapatas en las zonas infestadas, disminuyeron cuando fueron privadas de sus hospederos esenciales (2).

4 CONTROL QUÍMICO

Los acaricidas son ampliamente usados para tratar animales -domésticos y salvajes- infestados de garrapatas. También pueden ser aplicados a la vegetación, al suelo, a las cosas, o a las madrigueras de los animales. Los animales domésticos pueden ser bañados, o bien aplicarles el acaricida con un atomizador o ponerles un collar impregnado. En el caso de los animales silvestres como roedores, se les puede dejar a su alcance material tratado con acaricidas para que construyan sus nidos. Este método se ha distribuido ampliamente entre

la gente del campo, la aplicación de acaricidas residuales para el control de las garrapatas, puede ser efectivo y práctico cuando se aplica a áreas pequeñas frecuentadas por humanos, pero es bastante costosa cuando se aplica a áreas muy grandes, por ejemplo, forestales, en estos casos se prefiere aplicarlo por vía aérea (2).

2.4.2 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE LYME

El eritema migrante descrito inicialmente en Europa fue tratado con penicilina en forma efectiva a fines de 1940 y principios de 1950. Posteriormente, se reportó en Estados Unidos que tanto éste como sus secuelas asociadas podían prevenirse o aliviarse por tratamientos con antibióticos como la penicilina y la tetraciclina (55, 109).

Respecto a los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Lyme, los adelantos han sido muy lentos debido, en parte, a que la evaluación *in vitro* de los antibióticos no había sido posible ya que el agente etiológico se aisló hasta 1982 y los estudios realizados antes de esta fecha generalmente habían sido empíricos. Sin embargo, a la fecha, los estudios de susceptibilidad de *Borrelia burgdorferi in vitro*, frente a los antibióticos, se han visto limitados en parte por la falta de métodos estandarizados. El no tener controladas las condiciones de la prueba como las concentraciones del inóculo y las determinaciones del punto final, producen un amplio rango de resultados y en consecuencia de variaciones, para cada uno de los antibióticos probados (30, 70).

Sin embargo, a pesar de esta amplia variación, es claro que este microorganismo es muy susceptible a la eritromicina, azitromicina, claritromicina, ceftriaxona y cefotaxime; medianamente susceptible a la tetraciclina, doxiciclina, ampicilina y penicilina G; y resistente a los aminoglicósidos, rifampin, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Cabe hacer notar que, a pesar de que la eritromicina posee una alta eficacia *in vitro*, la presentada *in vivo* es muy pobre, esto también se ha observado en microorganismos del género *Legionella* y aún se desconocen sus causas (30, 55).

De 1980 a 1981, Steere y cols realizaron estudios con 108 pacientes en la etapa temprana de la enfermedad, los dividieron en tres grupos, mismos que estaban constituidos por individuos con edades similares, igual proporción de hombres y de mujeres, y todos ellos habían iniciado la terapia nueve o diez días después de que principiara la enfermedad (109).

A cada grupo de pacientes se le asignó un tratamiento al azar con los siguientes antibióticos: fenoximetilpenicilina, tetraciclina o eritromicina. En todos los casos la dosis fue de 250 mg cuatro veces al día durante un período de diez días. Steere y cols observaron que el 14 % de los pacientes, generalmente quienes cursaban con una enfermedad más severa, presentaron una intensificación de los síntomas durante las primeras 24 horas posteriores al inicio del tratamiento debido posiblemente a la muerte de un mayor número de microorganismos (reacción de Jarisch-Herxheimer) y que ocurría con mayor frecuencia en los pacientes tratados con penicilina y tetraciclina que en aquéllos a quienes se les había administrado eritromicina. En cuanto al tiempo en el cual se resolvieron las complicaciones asociadas, se observó que en los pacientes tratados con penicilina fue significativamente más corto, esto es, 5.4 días con respecto a aquellos pacientes tratados con tetraciclina y eritromicina, en donde el tiempo de resolución fue de 5.7 y 9.2 días, respectivamente.

También se encontró que el porcentaje de pacientes que requirieron de un tratamiento posterior, es decir, 10 días más con antibiótico, fue mayor en el grupo al cual se le había administrado eritromicina, en un 17 %. En el grupo de pacientes que fue tratado con penicilina el porcentaje que requirió de un retratamiento fue del 5 % y para el grupo tratado con tetraciclina fue de 8 %.

En la siguiente tabla (2.2) se resumen los antibióticos empleados por Steere y cols en su estudio, así como las dosis empleadas y el tiempo que duró el tratamiento.

Tabla 2.2: TERAPIA ANTIMICROBIANA EN ADULTOS (109).

ANTIBIÓTICO	DOSIS	DURACION EN DÍAS*
Tetraciclina	250 mg qid	10 días
Fenoximetilpenicilina	500 mg qid	10 días
Eritromicina	250 mg qid	10 días

* La duración de la terapia en algunos casos con síntomas persistentes o recurrentes, fue de 10 días más. qid cuatro veces al día. (*quater in die*)

De acuerdo con las observaciones de Steere y cols, la tetraciclina se consideró la droga de elección y la que menor eficacia tuvo fue la eritromicina. A pesar de la antibióticoterapia, un número significativo de pacientes -aproximadamente el 50 %- desarrollaron complicaciones tardías menores como parálisis facial, taquiarritmias, fatiga, letargo, ataques cortos de artritis y artralgiás, dolores musculares, dolor de cabeza, independientemente del antibiótico administrado.

Luft y cols realizaron un estudio con un grupo de pacientes con eritema migrante. De este grupo, los pacientes que no presentaban síntomas sistémicos o bien éstos eran leves, respondieron satisfactoriamente al tratamiento con fenoximetilpenicilina oral en dosis de 250 a 500 mg cuatro veces al día durante 14 a 21 días. Sin embargo, 4 % de los pacientes con eritema migrante y síntomas moderados a severos como fiebre, dolor muscular marcado, dolor de cabeza y fatiga, a pesar de recibir el mismo tratamiento no respondieron a la terapia inicial, la enfermedad continuó progresando y requirieron de tratamiento posterior.

A otro grupo de pacientes similar al anterior con eritema migrante y síntomas sistémicos, se le administró 500 mg de probenecid con cada dosis de penicilina y se observó que sólo uno de los pacientes requirió un refuerzo y alargamiento del tratamiento. Esto se semeja a la sífilis, en donde se requiere mantener niveles sostenidos del antibiótico y que éste esté por encima del nivel necesario para matar a los microorganismos, lo cual se logra con el probenecid (70).

Aunque existen fracasos bien documentados en el tratamiento de la enfermedad de Lyme con bajas dosis orales de tetraciclina y penicilina, está claramente establecido que estos dos antibióticos tienen eficacia en el tratamiento de la infección, siempre y cuando los pacientes presenten infección local y sin complicaciones. Es por eso que es muy importante tener un gran cuidado en los estudios del tratamiento temprano de la enfermedad, no olvidando que *Borrelia burgdorferi* puede diseminarse por vía hematológica. Puede darse el caso de pacientes con eritema migrante y una infección no aparente del sistema nervioso central (SNC). Si estos pacientes se tratan con bajas dosis de antibiótico, la infección del SNC no se elimina, volviéndose posteriormente crónica (17, 40, 70).

Tomando como guía, algunos hallazgos de la sensibilidad *in vitro* a algunos antibióticos, se ha observado que la amoxicilina en dosis de 500 a 1,000 mg tres veces al día en combinación con 500 mg de probenecid igualmente tres veces al día; la doxiciclina en dosis de 100 mg dos o tres veces al día y la minociclina 100 mg dos veces al día, parecen ser elecciones razonables, ya que proveen niveles adecuados en suero y producen mejores niveles en tejidos que bajas dosis orales de penicilina y tetraciclina (70).

Por lo que respecta al tratamiento en el caso de los niños, a continuación se resumen en una tabla (tabla 2.3), los antibióticos, las dosis y la duración para niños menores y mayores de 12 años, de acuerdo a Belani y Rigelmann (13).

TABLA 2.3: TERAPIA ANTIMICROBIANA EN NIÑOS (13).

ANTIBIÓTICO	DOSIS		DURACIÓN EN DÍAS
	< 12 años	> 12 años	
ESTADIO I			
Amoxicilina PO	40 mg/ Kg/ día tid	500 mg tid	14
Penicilina PO	50 mg/ Kg/ día tid	500 mg tid	14
Eritromicina PO	40 mg/ Kg/ día tid	250 mg qid	21
Tetraciclina PO	-----	250 mg qid	14
Doxiciclina PO	-----	100 mg bid	14
ESTADIOS II Y III			
Ceftriaxona IM / IV	100 mg/ Kg/ día q.12 ó q.24 h	2 mg/ día q.12 ó q.24 h	14 - 21
Penicilina G	100,000-250,000 U/ Kg/ día q.4 - q.6 h	20,000,000 / U/ día q.4 h - q.6 h	14 - 21
*Amoxicilina PO más probenicid	50 mg/ Kg/ día tid 40 mg/ Kg/ día tid	500 mg tid 500 mg tid	30
*Doxiciclina PO	-----	100 mg bid	30

* De acuerdo a anotaciones de los autores, para la artritis crónica y las manifestaciones cutáneas de la enfermedad de Lyme, la terapia parenteral puede ser continuada por una terapia oral prolongada si los síntomas persisten.
 PO (en recetas médicas) por la boca. Del latín *per os*
 bid dos veces al día, *bis in die*
 tid tres veces al día, *ter in die*
 qid cuatro veces al día, *quater in die*
 q. cada, *quoque*
 IM intramuscular
 IV intravenosa

En las manifestaciones tardías de la enfermedad o en algunos casos de recurrencia después de la antibióticoterapia oral, se ha observado que la administración parenteral del antibiótico y en dosis elevadas es más eficaz (13, 70, 109).

Belani y Rigelmann sostienen que la ceftriaxona se ha colocado como la droga de elección para las manifestaciones tardías de la enfermedad debido a su actividad *in vitro* e *in vivo* contra *Borrelia burgdorferi* y a su buena penetración en el SNC y en el líquido sinovial (13).

En otro estudio realizado por Steere y cols, pero ahora con un grupo de 12 pacientes con manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Lyme, les suministró a dichos

pacientes penicilina de 20,000,000 U por vía intravenosa en dosis divididas, observando que el dolor de cabeza y el entumecimiento de cuello, así como el dolor radicular, empezaron a cesar al segundo día de la terapia y en la mayoría de los casos desaparecieron a los 7 o 10 días de tratamiento. Sin embargo, al igual que con su grupo de pacientes con enfermedad de Lyme en etapa temprana, 3 de los 12 pacientes continuaron presentando con cierta frecuencia artralgias, dolor muscular y fatigas (110).

Como parte del estudio, compararon su grupo de 12 pacientes con un segundo grupo de 15 pacientes al cual sólo se le había administrado prednisona y observaron que la duración de los síntomas meníngeos fue significativamente más corto en los pacientes tratados con prednisona -una semana-, que en los tratados con penicilina -29 semanas-. También observaron que en ambos grupos se requirió de un promedio de 7 a 8 semanas para restablecer completamente las deficiencias motoras (110).

A pesar de los hallazgos encontrados, se han reportado casos en los cuales la infección aguda del SNC progresó a pesar de la terapia con penicilina. Estos casos en realidad son raros, ya que se ha observado que la meningitis y la meningoencefalitis causada por *B. burgdorferi*, responde muy bien a dosis elevadas de penicilina. Por lo que respecta a la meningopolineuritis y el síndrome de Bannwarth, éstos no responden bien a este mismo tratamiento y con frecuencia los pacientes padecen secuelas por largo tiempo (70).

Estudios subsecuentes de Luft y Dattwyler sobre la eficacia de la penicilina y la ceftriaxona revelan que aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados con penicilina continuaron con ataques de artritis, y que 3 de los 4 con neuropatías resolvieron favorablemente; además, uno de los pacientes con bloqueo completo del corazón resolvió su defecto de conducción cardíaca, pero 2 meses más tarde desarrolló artritis. Por lo que respecta a los pacientes que recibieron el tratamiento con ceftriaxona, ninguno presentó evidencia de que persistiera enfermedad activa y sólo uno de los pacientes continuó con periodos ininterrumpidos de fatiga y dificultad en la memoria (70).

Todas las recomendaciones respecto a la terapia, hasta el momento son tentativas, ya que el comportamiento de los antibióticos en los pacientes es muy diferente. Algunos pueden sanar completamente con penicilina, pero otros no reportan ninguna mejoría con dicho antibiótico. Por otro lado cabe recordar que, por lo que respecta a los estudios de sensibilidad *in vitro*, tampoco hay nada definitivo o concluyente a la fecha. Es recomendable que estos estudios *in vitro* se estandaricen y uniformicen para obtener resultados más comparables y precisos. Por otro lado, también se recomienda que los estudios con grupos de pacientes que presentan la enfermedad, tengan seguimiento a largo plazo para de esta manera, definir terapias óptimas (30, 55, 70).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico convencional se enfoca a la detección y discriminación de analitos en muestras clínicas para ayudar a determinar la condición de un paciente. Estos analitos pueden ser componentes químicos de la sangre y otros fluidos corporales, componentes celulares, microorganismos infecciosos, proteínas, etc. El diagnóstico de la enfermedad de Lyme se basa principalmente en criterios clínicos y en los resultados de las pruebas serológicas. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la enfermedad en algunas ocasiones pueden estar ausentes, o bien ser difíciles de discernir. Por lo que respecta a las pruebas serológicas de rutina, con frecuencia emiten resultados confusos debido a una falta de sensibilidad en la etapa temprana de la infección, esto se debe a que la mayoría de los pacientes presenta una respuesta inmunológica tardía y pobre. Además, también se presentan resultados falsos positivos causados por reacciones cruzadas entre los anticuerpos producidos por el hospedero durante otras enfermedades infecciosas o inflamatorias, contra algunos antígenos de *Borrelia burgdorferi*. Por otro lado, igualmente se han observado muchas variaciones en los resultados inter e intralaboratorios (64, 79, 86, 101).

El diagnóstico de las enfermedades bacterianas depende del cultivo del agente etiológico, sin embargo, el aislamiento de *Borrelia burgdorferi* a partir de sangre, del líquido de las articulaciones, de fluido cefalorraquídeo o de tejidos es muy difícil, además de que pueden requerirse desde semanas hasta meses de incubación antes de que pueda detectarse el crecimiento. Esto puede deberse a que la cantidad de microorganismos en el individuo infectado es muy pequeña, además de que es muy posible que influya la calidad y la cantidad de la muestra. Por lo anterior, se puede ver que el cultivo del microorganismo no es el método de elección para diagnosticar la enfermedad de Lyme. Sin embargo, el cultivo de biopsias de piel puede indicarse en algunos casos atípicos y para el control de la terapia, ya que se ha observado que en pacientes con eritema migrante agudo, los microorganismos pueden cultivarse en un 60 - 70 % de los casos (8, 63, 64, 86, 101).

Por lo que respecta al estudio histológico de biopsias de piel, éstas muestran muy pocos microorganismos y con marcado polimorfismo, aún cuando se usen métodos inmunohistoquímicos (64).

Existen varios métodos que pueden emplearse para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Estos se presentan a continuación divididos en dos grupos: métodos microbiológicos y métodos inmunológicos. De todos ellos se dará una breve descripción, mencionando ventajas y desventajas.

3.1 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

3.1.1 CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Los medios de cultivo como ya se ha mencionado, no constituyen una opción práctica para el diagnóstico de esta enfermedad. En Estados Unidos se ha demostrado que el aislamiento de *Borrelia burgdorferi* a partir de sangre, de fluido de las articulaciones, de líquido cefalorraquídeo y de tejido, es muy difícil a pesar del hecho de que el microorganismo puede crecer en ciertos medios de cultivo. Por otro lado, se requieren de muchas semanas de incubación antes de que pueda detectarse algún crecimiento, esto hace pensar que el número de microorganismos presentes en los individuos es muy bajo (8, 24, 63). Sin embargo, a pesar de lo expuesto anteriormente, el cultivo de biopsias de piel tiene aplicación en algunos casos atípicos y en el control de la terapia (64).

Para cultivar al microorganismo a partir de una sección de piel, en primer lugar se debe desinfectar la superficie de la cual se tomará la muestra. Posteriormente se aplica anestesia local -lidocaína al 1 % y epinefrina 1:100,000-. Posteriormente se toma la biopsia de aproximadamente 2 mm de una posible lesión primaria de eritema migrante, se coloca en 0.5 ml de medio BSK incompleto -sin suero y sin gelatina- hasta el momento en que se procese. La muestra se transfiere a otro tubo que contiene perlas de vidrio pequeñas, se adiciona 0.4 ml de medio BSK incompleto fresco y se somete a un aparato especial para disgregar la biopsia. Una vez concluido este paso, se toma 0.1 ml de la suspensión y se

transfiere a un tubo con tapón de rosca que contiene 6 ml de medio BSK completo (VER ANEXO I). El tubo se cierra perfectamente y se incuba a 33 °C (101).

Los cultivos se examinan a las 2 semanas de incubación y todas las muestras continúan incubándose al menos durante 8 semanas. Posteriormente, se realiza la búsqueda de espiroquetas en 10 µl de cultivo mediante microscopia de fluorescencia, o de alguna otra técnica microscópica (101).

3.1.2 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS PARA LA BÚSQUEDA DE *Borrelia burgdorferi* EN FLUIDOS BIOLÓGICOS Y TEJIDOS.

El reconocimiento microscópico de *Borrelia burgdorferi* en fluidos biológicos y tejidos es difícil y todo un reto, como ya se ha mencionado, a causa del bajo número de microorganismos presentes en los individuos infectados, a la aparente escasez de colonias en los tejidos y a las diferencias tan marcadas de morfología y tamaño entre uno y otro microorganismo. En la biopsia de tejidos se tiene otro inconveniente y es el de que si no se cuenta con la experiencia necesaria es difícil detectar a una espiroqueta entre fibras de colágeno (1).

A continuación se mencionaran algunas de las técnicas que se han empleado para detectar al agente causal de la enfermedad de Lyme.

TINCIÓN DE GRAM

Como se sabe, la tinción de Gram se basa en las diferencias en la composición de la pared celular de microorganismos procariontes. Para el caso específico de *Borrelia burgdorferi*, la tinción de Gram no ha dado buenos resultados. Las bacterias se tiñen en forma incompleta y sólo en dos cepas se ha reportado una tinción de Gram negativa débil, por lo que esta reacción se ha considerado evidencia insuficiente de que las espiroquetas sean Gram negativas (1).

TINCIÓN DE WRIGHT

La muestra se fija al portaobjetos con metanol. Posteriormente se adiciona el colorante de Wright y se deja actuar durante un minuto. Se adiciona amortiguador de fosfato de sodio diluido y se deja reaccionar hasta que en la superficie del portaobjetos se observe un brillo metálico por lo menos durante 3 minutos. Se enjuaga con agua destilada. Se monta con Permout (resina sintética de índice de refracción 1.544) y se cubre con un cubreobjetos. Esta tinción proporciona buenos resultados, se produce un color azul-rosa comparable al que se obtiene con la tinción de Giemsa, además de que ofrece la ventaja de ser un procedimiento sencillo (1).

TINCIÓN DE MAY-GRÜNWARD

Esta técnica es una modificación de la tinción de Giemsa y tiene la particularidad de producir un matiz metacromático en ciertas estructuras de parásitos optimizando la visibilidad microscópica. El procedimiento que a continuación se describe logra una mejor metacromasia. Se prepara la solución de trabajo del colorante de Jenner en el momento de su uso, a partir de una solución patrón que contiene 1 g de colorante de Jenner disuelto en 400 ml de metanol absoluto. De esta solución se toman 30 ml y se combinan con 30 ml de agua bidestilada. El primer paso de la tinción es una deshidratación en dos cambios de metanol absoluto, se aplica el colorante de Jenner durante 6 minutos. Después se aplica colorante de Giemsa y se deja actuar 45 minutos. Se lava con abundante agua bidestilada. Una vez lavado el portaobjetos se sumerge en ácido acético al 1 % para diferenciar el color. Se lava con abundante agua bidestilada y se deshidrata con alcohol a diferentes concentraciones, se clarifica con xileno y se monta con Permout. Esta tinción produce un color azul-verde metacromático y con frecuencia ofrece detalles nítidos de la espiroqueta (1).

Las tinciones de Wright, Wright-Giemsa y May-Grünwald, son subóptimas para usarlas en forma rutinaria en secciones de tejido. debido a que el entorno se tiñe densamente, lo que hace a las espiroquetas indiscernibles del tejido. Sin embargo, estas técnicas tienen potencial para usarse en la búsqueda de las espiroquetas en fluidos biológicos como fluido sinovial, líquido pericardial, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo y orina. Estos colorantes son fáciles de preparar, su costo es bajo, son estables químicamente. Sin embargo, para confirmar resultados se recomienda el uso de anticuerpos monoclonales (1).

TINCIÓN CON FLUOROCROMOS

Los detalles de la morfología de las espiroquetas no pueden evaluarse adecuadamente por ninguna de las tinciones con fluorocromos, ya que el fenómeno de fluorescencia se extingue rápidamente. La técnica con auramina-rodamina es la que produce una fluorescencia más duradera y, como se sabe, es muy usada en la búsqueda del bacilo de la tuberculosis, sin embargo en el caso de *Borrelia burgdorferi* la mayoría de las veces el resultado es negativo. La reacción con naranja de acridina produce una reacción más intensa (1).

TÉCNICA NARANJA DE ACRIDINA

Para realizarla, hay que fijar las muestras con éter-alcohol durante 30 minutos. Hidratar con una serie de concentraciones de alcohol -70 %, 50 %, 40 %, 10 %- hasta llegar a agua bidestilada. Las muestras se sumergen en ácido acético al 1 % durante 6 segundos, se lavan dos veces con agua bidestilada; posteriormente se sumergen en naranja de acridina al 1 % preparada con amortiguador de fosfatos a pH 6.0 durante 3 minutos, se lavan con amortiguador de fosfatos y se observan al microscopio de fluorescencia (1).

MÉTODO DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA

Por lo que respecta a los métodos de impregnación argéntica, todos ellos tiñen a las espiroquetas en forma completa, permitiendo un estudio detallado de la citomorfología de *Borrelia burgdorferi*. Los métodos empleados con más frecuencia son la tinción de Dieterle y la de Bosma-Steiner. En esencia, estas dos técnicas son muy similares, con la diferencia de que la segunda incorpora la incubación con una enzima -amilasa-, la cual se ha reportado que confiere la ventaja de delinear un mayor número de espiroquetas en cortes de tejido (1).

MÉTODO DE DIETERLE

Para realizarlo se requiere sumergir las muestras en una caja de coplin que contiene solución de nitrato de plata al 1 %. Se incuban durante un minuto, después se vuelven a incubar, pero ahora con nitrato de plata caliente durante 5 minutos. Se lavan abundantemente con agua bidestilada. Posteriormente se sumergen en solución reveladora precalentada en microondas durante 30 segundos, se dejan reaccionar aproximadamente 3 a 4 minutos. Se sumergen en alcohol al 95 % se clarifica con xileno y se montan en Permout (1).

MÉTODOS INMUNOCITOQUÍMICOS

Las técnicas inmunocitoquímicas tienen la ventaja de definir en forma más clara células aglutinadas. Por otro lado, se ha observado que las características estructurales varían mucho dependiendo de las condiciones de la inmunotinción, esto es, el tipo de fijador empleado, el tipo de anticuerpos empleados -monoclonal, policlonal- así como del tipo de antígenos -esto es flagelina o las proteínas de superficie de la membrana- (1).

La técnica inmunocitoquímica más empleada es la de inmunofluorescencia indirecta la cual consiste en fijar un corte de tejido sobre un portaobjetos, al cual posteriormente se le añaden anticuerpos marcados con un fluorocromo específico (el más utilizado: isotiocianato de fluoresceína) contra el antígeno buscado. Se deja reaccionar el tiempo y la temperatura

adecuada, dependiendo del fluorocromo añadido para permitir que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, después de lavar el portaobjetos varias veces para eliminar todo aquello que no reaccionó. Las muestras se leen con ayuda de un microscopio de fluorescencia. Esta técnica da una mejor definición de formas aglutinadas -o mejor dicho- de agregados de células, que las técnicas de impregnación argéntica (1).

Las técnicas de tinción con nitrato de plata, naranja de acridina y los métodos de inmunofluorescencia indirecta combinados con el uso de anticuerpos monoclonales, son procedimientos adecuados para detectar a *Borrelia burgdorferi*; sin embargo, en tejidos humanos y en otros fluidos biológicos, la principal desventaja de estos métodos es el tiempo requerido para la búsqueda del microorganismo, no hay que olvidar que su número es escaso en estas muestras, lo que hace improbable que una espiroqueta se encuentre rápidamente en tejidos teñidos. Por otro lado, estas técnicas están sujetas a la habilidad del individuo que examine las preparaciones y a su experiencia (1, 72).

3.2 DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Las pruebas inmunológicas son consideradas por muchos investigadores y médicos como las pruebas de elección para el diagnóstico y estimación de la prevalencia de la enfermedad de Lyme (39, 72, 76, 114).

Aunque la mayoría de estos análisis se han llevado a cabo para detectar anticuerpos en suero, también se han detectado inmunoglobulinas contra *Borrelia burgdorferi* en muestras de líquido cefalorraquídeo y de orina. En Europa, a los pacientes con posible enfermedad de Lyme que presentan trastornos neurológicos se les toman muestras tanto de sangre como de líquido cefalorraquídeo; en Estados Unidos esta práctica permanece limitada ya que las manifestaciones neurológicas son muy poco frecuentes entre su población. Por lo que respecta a las muestras de orina, está bien establecido que *Borrelia burgdorferi* puede infiltrarse a los riñones y ser excretada en la orina, para detectarla se han aplicado técnicas

inmunoenzimáticas modificadas (ELISA) y se han estado desarrollando pruebas más sensibles que sean capaces de detectar al microorganismo (53, 72).

No importa el método usado, la mayoría de las pruebas inmunológicas no pueden detectar a los anticuerpos de la clase IgM contra *Borrelia burgdorferi* durante el estadio inicial de la infección, ya que la respuesta específica alcanza su pico máximo entre 3 a 6 semanas después del inicio de la enfermedad y el pico máximo de los anticuerpos de la clase IgG se alcanzan solamente meses o años después del inicio de la enfermedad (39, 72, 76, 108). Sin embargo, avances recientes en el uso de métodos inmunoenzimáticos de captura han mejorado y aún incrementado la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi* de clase IgM (47, 72).

La sensibilidad de los métodos inmunológicos aumenta considerablemente al emplear como antígenos las proteínas más inmunogénicas de *Borrelia burgdorferi* como los flagelos periplásmicos purificados o fracciones enriquecidas de flagelina, en lugar de utilizar células completas o sonicadas del microorganismo (44, 46, 72).

También debe tomarse en cuenta a los pacientes a quienes se les hayan prescrito antibióticos, ya que la respuesta inmune puede ser acortada o abortada. Además, en algunos individuos tratados exitosamente, el título de anticuerpos puede declinar o bien permanecer por meses o años; por tal motivo, con estas variaciones es difícil concluir que una aparente declinación en el título de anticuerpos después del tratamiento con anticuerpos sea una prueba definitiva de que la persona se ha curado por lo que el monitoreo del título de anticuerpos de corta duración tiene un valor limitado (72). Por lo que respecta a la especificidad de las pruebas inmunológicas, los géneros *Borrelia* y *Treponema* poseen antígenos comunes por lo que pueden ocurrir reacciones falsas positivas, sobretodo cuando se emplean células completas o sonicadas de *Borrelia burgdorferi* (46, 49, 65, 72, 76, 77, 114).

En cuanto al género *Treponema*, en la especie *Treponema pallidum* la reactividad cruzada no es un problema ya que tanto la sífilis como la enfermedad de Lyme pueden diferenciarse clínicamente. Por otro lado, los anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* raramente reaccionan en las pruebas para detectar sífilis (65, 72, 114).

Los treponemas orales, como en el caso de *Treponema denticola* y otros treponemas de flora habitual, es posible que anticuerpos contra estos microorganismos den reacciones cruzadas con la enfermedad de Lyme (72, 114). Este problema se ha tratado de minimizar utilizando a *Treponema phagedenis* (biovar Reiter) como un inmunoabsorbente para disminuir la fluorescencia no específica en anticuerpos treponémicos, lo cual es muy empleado en las pruebas de inmunofluorescencia para detectar sífilis. Sin embargo, para el caso de la enfermedad de Lyme no ha dado buenos resultados (72, 114).

Entre las especies del género *Borrelia*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. burgdorferi* y algunas otras, hay una mayor reactividad cruzada, ya que las proteínas de superficie y de subsuperficie son muy similares. En estos casos, los esfuerzos por adsorber a los anticuerpos que causan reactividad cruzada no han tenido éxito. Por lo tanto, se recurre a la diferenciación clínica y epidemiológica para separar a la enfermedad de Lyme de varias infecciones de fiebre recurrente, para esto se debe tener un amplio conocimiento de las áreas endémicas de cada enfermedad, la distribución geográfica de las especies del género *Borrelia* y su asociación con el agente vector (65, 72, 114).

En cuanto a las especies del género *Leptospira*, éstas no guardan una relación tan estrecha como las especies de los géneros *Borrelia* y *Treponema*, por lo que la reactividad cruzada en las pruebas para diagnóstico de la enfermedad de Lyme no parecen ser un problema (114).

También se han reportado diferencias intra-especie, reportes previos indicaban diferencias serológicas no significativas entre aislamientos de *Borrelia burgdorferi* provenientes de Estados Unidos y de Europa empleando técnicas de inmunofluorescencia indirecta (93). Se han observado cambios antigénicos rápidos y pérdida de una de las

principales proteínas de la envoltura externa (Osp B) en tiempos cortos -10 a 15 pases- en cultivos *in vitro* en medio BSK II, esto debe tomarse en cuenta cuando se emplean a las espiroquetas como antígenos para pruebas serológicas (100). También se han observado variaciones en las principales proteínas de superficie -Osp A y Osp B- y otras proteínas de 21 a 25 KDa, en aislamientos frescos provenientes del vector de dos cepas diferentes (65). Aún cuando se ha visto que tanto la diversidad como la variación antigénica han sido bien documentadas en Estados Unidos y en Europa, el significado clínico de estos hallazgos no es claro. Se desconoce si estas cepas de *Borrelia burgdorferi* tienen diferentes capacidades de infección para el humano -esto es, distintos factores de virulencia- ; sin embargo cuando se probaron cepas por métodos inmunoenzimáticos con sueros humanos y de conejo, había muy poca o ninguna diferencia en la reactividad con las inmunoglobulinas (72).

Como los anticuerpos se producen contra un grupo de proteínas inmunogénicas comunes a todas las cepas de *Borrelia burgdorferi* no se observa variación con los métodos inmunoenzimáticos convencionales a pesar de la cepa empleada como antígeno; sin embargo, la reactividad en análisis de Western-blot puede diferir cuando se prueba una serie de cepas (72).

MÉTODOS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta se han empleado satisfactoriamente para detectar anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en sueros de pacientes con posible enfermedad de Lyme, en animales salvajes y domésticos que habitan áreas endémicas, así como en tejidos del agente vector (72, 76). Actualmente, estas técnicas son más empleadas en laboratorios de investigación y en laboratorios clínicos en donde la demanda para el diagnóstico de la enfermedad no es muy alta (72).

Se han realizado muchas modificaciones a la técnica convencional con el fin de mejorar tanto sensibilidad como especificidad de la prueba, incluso se ideó una técnica semi-automatizada que sustituye al microscopio de fluorescencia por un fluorómetro surgiendo equipos comerciales que eliminan la subjetividad humana (43, 79).

A continuación se describen las metodologías más empleadas.

Wilkinson en su técnica diluye el suero problema en una suspensión al 3 % de yema de huevo, la cual se emplea para disminuir la fluorescencia no específica (por algunos artefactos) que pudiera intervenir en la lectura final. El título lo expresa como el recíproco de la dilución más alta del suero dada por 1 más la fluorescencia azul-verde ligera de por lo menos 50 % de las espiroquetas por campo. El título considerado positivo fue ≥ 256 (VER ANEXO II) (114).

Lane y cols¹ llevaron a cabo un método de inmunofluorescencia indirecta, el cual emplea al mismo tiempo anticomplemento. A *grosso modo*, la técnica seguida por estos investigadores fue la siguiente: Una vez que se hizo reaccionar al suero problema con un frotis de células de *Borrelia Burgdorferi* fijadas con acetona-metanol, se adicionó complemento de hámster se dejó incubar la muestra y posteriormente se agregaron anticuerpos de cabra anti-C3 de hámster marcados con isotiocianato de fluoresceína.

Para propósitos de registro, sólo aquellos microorganismos que exhibían una tinción homogénea y completa se consideraron positivos. Las tinciones incompletas y con intensidades diferentes en más del 50 % de los microorganismos, se consideraron negativas o no específicas. La dilución en la cual el 50 % o más de los microorganismos se tiñó específicamente se consideró el título de corte. En los experimentos realizados por Lane y cols el título fue de 1:8 (65).

Lane y cols son los primeros en reportar y describir el uso y validez de esta técnica para detectar anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi*. El hecho de que sólo se puedan detectar complejos antígeno-anticuerpo verdaderos con complemento de hámster, además del

anticuerpo anti-C3 de este mismo animal, marcados con isotiocianato de fluoresceína, redujo significativamente la reactividad no específica que puede ocurrir en el método de inmunofluorescencia indirecta convencional. Por otro lado, la tinción observada en esta nueva técnica fue muy nítida y los puntos finales de lectura muy reproducibles, lo que facilita tanto cuantificación como interpretación, a diferencia del método de inmunofluorescencia convencional el cual usualmente exhibe una pérdida gradual de la intensidad conforme decrece la concentración de anticuerpos. De acuerdo con los resultados obtenidos por Lane y cols, esta nueva técnica fue altamente específica para detectar a *Borrelia burgdorferi* - 100 % de especificidad- con un título de corte muy bajo: 1:8 contra un título 1:128 o 1:256 determinado por dos laboratorios diferentes para el método de inmunofluorescencia convencional. Comparando este nuevo método con una técnica de Immunoblotting se determinó que el nuevo método es más sensible (80 % de sensibilidad) que el convencional (68 % de sensibilidad). De acuerdo con los autores, lo anterior puede convertir a esta prueba en una herramienta útil para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Sin embargo, aún falta determinar su sensibilidad absoluta para detectar anticuerpos contra la espiroqueta en estadios tempranos de la enfermedad (65).

FLUOROINMUNOENSAYO EN FASE SÓLIDA

En la técnica de fluoroinmunoensayo en fase sólida, conocida en Estados Unidos como FIA-L, se emplea un antígeno solubilizado en desoxicolato de sodio derivado de un lisado de *Borrelia burgdorferi* (49, 88).

En esta técnica se emplea una barra de plástico (paddlelike) de unos 10 cm de largo forrada con nitrocelulosa, sobre una de las superficies se extiende uniformemente el antígeno solubilizado y se deja secar a temperatura ambiente. La otra superficie se deja tal cual y se utilizará como un control del antígeno. Las incubaciones y lavados se llevan a cabo sumergiendo las barras en tubos de ensayo que contienen el reactivo apropiado. Los reactivos de incubación y lavado se usan en un volumen de 0.5 ml y las incubaciones y

lavados se llevan a cabo a temperatura ambiente y en un agitador mecánico para tubos de ensayo. La fluorescencia se determina en un fluorómetro y la concentración de anticuerpos se determina por extrapolación de las unidades de señal de fluorescencia (Δ FSU) en una curva de calibración (VER ANEXO III) (49).

Δ FSU= Fluorescencia del lado de donde se aplicó el antígeno menos fluorescencia del lado control.

Esta misma técnica seguida por Hechemy, la adoptó y registró un laboratorio farmacéutico, y la sacó a la venta bajo el nombre de FIAX kit. El equipo comercial lo evaluaron Pennell y cols (88).

Esta técnica comercial presenta algunas modificaciones. El filtro de nitrocelulosa cubierto con antígeno solubilizado se trató con leche desgrasada en polvo al 5 %. El filtro de nitrocelulosa control solamente se trató con leche. Los factores que contribuyen a la reproducibilidad del método son:

- a) Las muestras se corren por duplicado y los resultados se promedian
- b) Los niveles de fluorescencia se determinan en un fluorómetro eliminando la subjetividad humana.
- c) El fluorómetro se calibra con un suero altamente positivo para cada corrida.

Concluyendo, la técnica de fluoroinmunoensayo de fase sólida abate el tiempo de análisis además de que elimina la subjetividad humana debido a que no se usa el microscopio de fluorescencia para leer las muestras, además de que sólo emplea una dilución única, en lugar de las diluciones seriadas y por duplicado de la técnica convencional. Todo esto, aunado a la comercialización del método (49, 88).

MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS. MÉTODO DE ELISA.

El método inmunoenzimático más empleado para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme es el ensayo de la enzima ligada a un inmunoabsorbente y que se conoce mejor como método de ELISA. Esta técnica consiste en colocar el suero problema en una placa de

polivinilo que contiene al antígeno absorbido en su superficie. Se da un tiempo de incubación de aproximadamente una hora a 37 °C para permitir que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo. La placa se lava con solución salina para eliminar todo aquello que no reaccionó. Posteriormente se adiciona un segundo anticuerpo marcado con una enzima, nuevamente la placa se somete a incubación y a un lavado y, por último, se adiciona el sustrato de la enzima empleada. La actividad enzimática se mide leyendo las muestras en un espectrofotómetro a $\lambda = 400$ nm. (27, 72, 114).

El método de ELISA ofrece un mayor número de ventajas que las técnicas de inmunofluorescencia ya que es más fácil de realizar, tiene la capacidad de poder automatizarse, se pueden analizar un mayor número de muestras, además de que se obtienen resultados más objetivos. Sin embargo, al igual que las técnicas de inmunofluorescencia, son de un valor diagnóstico limitado en los estadios tempranos de la enfermedad de Lyme, ya que la gran mayoría de los pacientes no han formado suficientes anticuerpos para detectarse por los métodos serológicos de rutina (26, 27, 39, 44, 46, 114).

Para la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico temprano de la enfermedad de Lyme se han realizado algunas modificaciones y mejoras tanto al método de ELISA como al antígeno que emplea. Por lo que respecta a las modificaciones en las preparaciones del antígeno, algunos investigadores han purificado y concentrado los determinantes antigénicos que inducen la respuesta inmune temprana, empleando flagelina purificada de *Borrelia burgdorferi* así como fracciones enriquecidas de este mismo determinante antigénico (26, 39, 44, 46).

Por lo que respecta a la técnica, se han empleado amplificadores de la reacción antígeno-anticuerpo como el reactivo biotina-estreptoavidina. También se han empleado métodos de absorción para minimizar reacciones cruzadas, como es el uso de *Treponema phagedenis* biotipo Reiter. Igualmente, se ha empleado una nueva técnica denominada ELISA de captura (31, 47, 73).

MEJORAS HECHAS A LOS ANTÍGENOS EMPLEADOS

El antígeno que más se ha empleado en el diagnóstico serológico ha sido extractos de células completas de *Borrelia burgdorferi* sonicadas, y ha dado buenos resultados en los estadios tardíos de la enfermedad de Lyme, no así en los tempranos en donde son insatisfactorios por su baja sensibilidad (20 - 60 %) (26, 39, 44, 46).

Basándose en el éxito del uso de flagelos periplásmicos de algunas especies del género *Treponema* como antígeno para el diagnóstico de la sífilis y en el hecho de que a pesar de que en el estadio temprano no se han formado niveles medibles de anticuerpos de la clase IgM en contra de la proteína de 41 KDa (flagelina), seguidos por los de la clase IgG contra el mismo antígeno y, también basándose en que sólo en los estadios tardíos de la enfermedad se desarrollan anticuerpos de clase IgG contra otros antígenos de la espiroqueta, Hansen y cols (44, 46), Coleman y cols (26) y Grodzicki y cols (39), cada uno de manera independiente, realizaron sus estudios llegando a la conclusión de que el antígeno idóneo para sustituir al extracto sonificado de células completas, eran los flagelos de *B. burgdorferi*.

Hansen y cols purificaron flagelos de *B. burgdorferi* y los emplearon como antígenos en una prueba de ELISA, comparando los resultados obtenidos con la misma prueba pero la convencional, que empleaba como antígeno extracto de células completas sonicadas. Cosecharon a las espiroquetas mediante centrifugación y posteriormente emplearon un detergente ligero -sarcosil-TE (N-lauoilsarcosina al 2 % en TRIS 10 mM pH 8.0 y EDTA 1mM)- para lisar a las células. El material insoluble en el detergente se eliminó y posteriormente la muestra se sometió a un gradiente de densidad con cloruro de cesio. Las bandas visibles se colectaron por separado y dializaron contra un amortiguador de fosfato salino, posteriormente se examinaron al microscopio electrónico y se observaron flagelos fragmentados pero preservados morfológicamente, no se encontraron contaminantes de otras estructuras celulares como fragmentos de membrana, ribosomas, etc. El antígeno obtenido, además se sometió a un análisis por Western-blot e inmunoelectroforesis cruzada para determinar su pureza, encontrando como único contaminante una traza menor de la

banda de 32 KDa, probablemente correspondiente a la proteína principal de superficie de la espiroqueta. Esta proteína se detectó por Western-blot y no hay sospecha de que tenga algún impacto contra la calidad del antígeno flagelar para su uso serológico ya que es específica de *B. burgdorferi* y sólo provoca una respuesta inmune débil y lenta (44, 46).

En la siguiente tabla 3.1 se resumen los resultados obtenidos por Hansen y cols.

TABLA 3.1: Comparación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de ELISA empleando como antígeno extractos sonicados de *B. burgdorferi* y flagelos purificados (46).

% SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA INDICADA CON:

Días después del inicio de los síntomas (no. paciente)	% SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA INDICADA CON:							
	SUERO				LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO			
	extracto sonificado		flagelos purificados		extracto sonificado		flagelos purificados	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
<20 (19)	10.5	26.3	57.9	63.2	21.1	63.2	26.3	78.9
21-40 (24)	41.7	50.0	79.2	83.3	75.0	95.8	83.3	95.8
41-160 (13)	81.6	23.1	100.0	46.2	100.0	92.3	92.3	84.6
total (56)	41.1	35.7	76.8	67.9	62.5	83.9	66.1	87.5

Como se puede observar, el empleo de los flagelos purificados de *Borrelia burgdorferi* como antígeno en las técnicas de ELISA, mejora significativamente el serodiagnóstico de la enfermedad de Lyme. En la técnica de ELISA para detectar anticuerpos de la clase IgM, la sensibilidad se incrementó en buena medida, mientras que en la técnica para detectar anticuerpos de la clase IgG lo que se incrementó fue la especificidad. Al emplear un solo antígeno purificado se pierden los irrelevantes, eliminando la detección de anticuerpos inespecíficos. En el caso de las muestras de líquido cefalorraquídeo, la medición de anticuerpos no mejora comparada con la de las muestras de suero, ya que en el líquido cefalorraquídeo normal, el contenido de inmunoglobulinas es muy bajo y por lo tanto el nivel de anticuerpos inespecíficos también es muy bajo (44, 46).

Coleman (26) y Grodzicki (39) reportan que el empleo de flagelina purificada en una técnica de ELISA no mejora el serodiagnóstico, al contrario de la fracción enriquecida de flagelina que resulta ser el mejor antígeno para detectar anticuerpos de la clase IgM en sueros de pacientes en la fase aguda de la enfermedad. Por su parte, Hansen y col argumentan que el fracaso de Coleman y Grodzicki puede deberse al uso del detergente dodecil sulfato de sodio para lisar a las células y para preparar la electroforesis en gel de poliacrilamida, ya que es posible que este detergente desnaturalice epitopes importantes del flagelo además de interferir con la unión del antígeno a las placas de microdilución (44, 46).

Por lo que respecta a fracciones enriquecidas de flagelina utilizadas como antígeno en algunos ELISA, lo que se trata es de tener unas concentraciones mayores de esas proteínas tratando de extraer la mayor cantidad posible a partir de la suspensión de células cultivadas. De acuerdo a los resultados obtenidos por Coleman, la fracción enriquecida de flagelina es el mejor antígeno para detectar anticuerpos de la clase IgM en la fase temprana de la enfermedad de Lyme (26).

El perfil antigénico de *B. burgdorferi* presenta variación entre cepa y cepa y algunas de estas variaciones pueden ser por causas genéticas (10, 11, 100). Considerando estas observaciones, el utilizar un solo antígeno de prueba, en este caso los flagelos de la espiroqueta, tiene la ventaja de ser fenotípicamente estable y no presentar variación entre cepa y cepa, al menos en la región central de la proteína. Otra ventaja de emplear este tipo de antígenos es que se eliminan proteínas irrelevantes, sin embargo, hay que hacer hincapié en que no se eliminan totalmente las reacciones cruzadas (44, 46).

AMPLIFICACIÓN DE LA REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO CON BIOTINA-ESTREPTOAVIDINA Y EMPLEO DE TÉCNICAS DE ADSORCIÓN EN LA TÉCNICA DE ELISA.

El uso conjunto de los procedimientos de amplificación con biotina-estreptoavidina y la remoción de anticuerpos anti-treponémicos no específicos, puede incrementar la sensibilidad de la técnica de ELISA para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme y puede ser de gran ayuda, sobre todo durante las primeras semanas de la enfermedad cuando las técnicas rutinarias tienden a ser negativas (73, 77).

El fundamento de la técnica es el mismo: una vez que se ha dejado interactuar al suero problema con el antígeno unido a la microplaca de poliestireno, se adiciona un segundo anticuerpo marcado con biotina purificada. Mediante un lavado se elimina todo aquello que no reaccionó y posteriormente se adiciona la enzima marcada con estreptoavidina. Después de incubar y lavar la placa se adiciona el sustrato de la enzima (73).

Por lo que respecta a la adsorción, Magnarelli y cols emplearon un adsorbente comercial con *Treponema phagedenis* biotipo Reiter para remover a los anticuerpos anti-treponémicos no específicos en los sueros problema, antes de llevar a cabo la técnica de ELISA (ya sea la convencional o la amplificada) mezclando volúmenes iguales de adsorbente diluido y de suero humano. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C y posteriormente se adicionaron alícuotas de 60 µl de estos sueros tratados a las placas, para evaluarse por la técnica de ELISA (73, 77).

Se debe tomar muy en cuenta que la técnica de ELISA amplificada o no, puede dar reacciones falsas positivas ya que los géneros *Borrelia* y *Treponema* poseen antígenos comunes, por lo que los anticuerpos no específicos contra treponemas orales o contra *Treponema pallidum* pueden reaccionar con los componentes flagelares de *Borrelia burgdorferi*. Además, no se debe olvidar el antígeno de peso molecular de aproximadamente 60 KDa, común a un amplio número de bacterias incluyendo a *Borrelia burgdorferi*. Todas estas reacciones cruzadas pueden ser realizadas con la técnica de ELISA amplificada.

Magnarelli y cols recomiendan emplear técnicas de amplificación conjuntamente con métodos de adsorción (45, 73).

Por lo que respecta al adsorbente, la concentración de éste es muy importante ya que si es muy elevada, la sensibilidad del ensayo disminuirá, por lo tanto deberá buscarse la concentración óptima. Cabe hacer notar que los anticuerpos contra treponemas son difíciles de eliminar completamente, sobre todo cuando se emplean adsorbentes comerciales. También hay que tomar en cuenta que la concentración de anticuerpos no específicos varía de paciente a paciente (73, 77).

Si el paciente carece de eritema migrante en la piel pero presenta signos y síntomas similares a los que desarrollan los pacientes con enfermedad de Lyme, si los casos humanos ocurren donde la enfermedad y el agente vector son endémicos y si los resultados de la técnica de ELISA convencional son negativos, entonces los métodos de ELISA amplificada y con adsorción o de captura de anticuerpos de la clase IgM, ayudarán a esclarecer la causa de la infección (73).

TÉCNICA DE ELISA DE CAPTURA

En 1988, Berardi y cols aplicaron la técnica de ELISA de captura para la detección de anticuerpos de la clase IgM en la enfermedad de Lyme. Estos anticuerpos son de especial interés, sobretodo para el diagnóstico temprano de ésta, además de que pueden ser un indicador de infección activa y reciente (16, 47).

En la técnica de ELISA indirecta se emplea un segundo anticuerpo para detectar a los de la clase IgM. La principal limitante es la interferencia debida a la presencia del factor reumatoide y a las reacciones falsas negativas debidas a la competencia entre los anticuerpos de las clases IgM e IgG por los sitios de unión (47).

La técnica de ELISA de captura elimina la competencia adsorbiendo al factor reumatoide así como también evita la competencia por los sitios de unión. Hansen y cols desarrollaron esta técnica empleando flagelos purificados y biotinilados de *Borrelia*

burgdorferi. Esta técnica se lleva a cabo de la siguiente manera: A la placa con anticuerpos anti-humanos clase IgM adsorbidos obtenidos de conejos, se le adiciona el suero diluido. Después de incubar y lavar la placa se adiciona una solución, con la mezcla de los flagelos biotinilados y la enzima peroxidasa marcada con avidina. Nuevamente la placa se incuba, se lava para eliminar todo aquello que no reaccionó y se adiciona el sustrato o-fenilendiamina, se incuba la placa protegiéndola de la luz y se detiene la reacción con ácido sulfúrico 3 M, posteriormente se lee al espectrofotómetro a 400 nm de longitud (47).

Esta técnica es un recurso sólo si las de diagnóstico rutinario han fracasado o son ambiguas por no coincidir con el diagnóstico clínico (47).

3.3 OTROS MÉTODOS.

MÉTODO DE WESTERN-BLOT

Esta técnica permite realizar una disección figurativa de la espiroqueta causante de la enfermedad de Lyme obteniendo cada uno de sus componentes e identificando contra cual de estos generan anticuerpos los pacientes. El fundamento de esta técnica es el siguiente: Las proteínas celulares y algunos componentes no proteicos se separan primero de acuerdo a su peso molecular, por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Estos componentes separados en una sola dimensión se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se incuba en un exceso de proteína globular como albúmina sérica bovina para bloquear los sitios libres que pudiera haber. La membrana se incuba después con el suero problema diluido y la reacción antígeno-anticuerpo se revela con un segundo anticuerpo marcado con una enzima -por ejemplo peroxidasa-, posteriormente se agrega el sustrato y el cromógeno colorido insoluble -péroxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol- (7).

Teniendo bien definidos los criterios de interpretación para el modelo de bandas obtenidas, la técnica de Westrn-blot se considera un método útil -para el caso de la enfermedad de Lyme- para la confirmación de resultados obtenidos por técnicas rutinarias.

Este método también se ha empleado para la diferenciación de estudios clínicos de la enfermedad de Lyme ya que se ha demostrado que conforme progresa la enfermedad se presenta una expansión de la respuesta inmune contra *Borrelia burgdorferi* (38, 120).

Sin embargo, por lo complicado de la realización de la prueba, se limita a casos difíciles de diagnosticar (120).

MÉTODO DE LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Este método fue descrito por primera vez en 1985. Permite aislar, detectar y amplificar cantidades exponenciales de segmentos definidos de ADN. Esta técnica se ha empleado básicamente para fines de investigación, pero paulatinamente se ha ido incorporando al laboratorio clínico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, genéticas oncológicas y en transplantes (83).

El método de PCR permite amplificar secuencias específicas de ADN entre miles de genes diferentes presentes en una muestra. Una vez extraído el ADN, el método de PCR consiste básicamente en tres pasos. El primero de ellos es una desnaturalización del material genético a 95 °C durante un minuto o dos; una vez que se han separado las hebras de ADN, el segundo paso es una hibridación de un par de oligonucleótidos denominados "primers" hechos sintéticamente y que son complementarios a un segmento específico de ADN. Los "primers" se agregan en cantidades abundantes. Esta hibridación se lleva a cabo a una temperatura de 55 - 65 °C durante un minuto o dos. El tercer paso, llamado de extensión, consiste en adicionar una ADN polimerasa termorresistente para que sintetice una nueva cadena de ADN la cual será el template para la siguiente síntesis (83).

Los cambios de temperatura requeridos se llevan a cabo en forma directa y con mucha precisión en cuestión de segundos en un instrumento creado específicamente para este fin (83).

Estos tres pasos descritos constituyen un ciclo de amplificación y se repite hasta tener millones de copias de un segmento específico de ADN. Si el segmento deseado de ADN no esta presente, se llevará a cabo una amplificación ineficiente si es que llega a ocurrir alguna (83).

Una vez que el ADN ha sido amplificado se procede a detectar el producto de esta amplificación. Esto puede hacerse mediante varios métodos: En base al peso molecular empleando geles de agarosa o poliacrilamida, o bien, en base a la secuencia mediante la hibridación con sondas marcadas radiactivamente o con biotina, o bien, mediante cortes de enzimas de restricción.

Las muestras que pueden emplearse son: sangre completa, orina, liquido cefalorraquídeo, liquido sinovial, semen, tejidos, liquido amniótico, o linfocitos de sangre periférica (83).

A partir de 1989 se han publicado varios reportes sobre la aplicación del método PCR para la detección de *Borrelia burgdorferi* (62, 67, 68, 79, 82, 87, 89, 91, 92, 101, 119). Sin embargo, aunque este método ha mostrado ser capaz de identificar específicamente el ADN de *Borrelia burgdorferi*, anteriormente sólo se había utilizado para detectar al microorganismo en garrapatas y en modelos animales por lo que en el diagnóstico en humanos todavía falta determinar en qué manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme el método es útil y qué tipo de muestra es la óptima (67, 68, 82, 87).

Las muestras empleadas para la detección de *Borrelia burgdorferi* en humanos han sido: lisados en "crudo" del agente vector (62, 89), tejidos de animales infectados experimentalmente (68), orina y liquido cefalorraquídeo (67), biopsias de piel (82, 101). De acuerdo a Schwartz y cols, las biopsias cutáneas en donde se presenta el eritema migrante son un material excelente para llevar a cabo la detección del microorganismo mediante el método de PCR (101).

Desarrollar un método específico de PCR adecuado para el agente etiológico de la enfermedad de Lyme requiere de la identificación de una secuencia de ADN presente en

todas las cepas de *Borrelia burgdorferi* y que no tenga homología con otros microorganismos del mismo género como por ejemplo *Borrelia hermsii* (67, 68, 91).

Malloy y cols (79) y Persing y cols (89) han empleado como secuencia blanco, partes del gen que codifica para la proteína Osp A. Sin embargo, a causa de la variación en las secuencia de este gen, los "primers" hechos con esta secuencia no detectan a todas las cepas de *Borrelia burgdorferi*.

Rosa y Schwan (91) seleccionaron una secuencia que no presentaba reacción cruzada con otras especies del género *Borrelia*, estas secuencias fueron del aminoácido 9 al 26 y del 362 al 379. Estas mismas secuencias fueron empleadas por Pachner y cols (87).

Lebech y cols (67, 68) y Wise y cols (119) observaron que el gen que codifica para la flagelina se conservaba entre las diferentes cepas de *Borrelia burgdorferi*, aún entre las europeas y estadounidenses, las cuales sólo presentaban una diferencia en tres o cuatro nucleótidos. En base a esta observación, estos investigadores asumieron que los "primers" derivados del gen que codifica para la flagelina deberían ser capaces de amplificar el ADN de todas las cepas de *Borrelia burgdorferi*. Sin embargo, no pasaron por alto la estrecha relación entre la secuencia de ADN del gen que codifica para la flagelina de *Borrelia burgdorferi* y del que codifica para la flagelina de *Treponema pallidum*, por lo que elaboraron los "primers" en áreas no homólogas.

Si bien el método de la reacción de la polimerasa en cadena, es una excelente herramienta para la identificación de *Borrelia burgdorferi*, se deben extremar las precauciones, ya que así como amplifica exponencialmente segmentos de ADN lo mismo sucede con los errores. Se debe tener mucho cuidado en evitar la contaminación de las muestras, por lo que se recomienda que los diversos pasos de la metodología se realicen en cuartos separados y de ser posible cuenten con ventilación separada. Se recomiendan por lo menos tres cuartos -Cuarto No. 1: preparación de la muestra y extracción del ADN. Cuarto No. 2: ciclo de amplificación del ADN. Cuarto No. 3: detección de los productos

amplificados- y que la persona que lleve a cabo el experimento siempre se mueva del cuarto No. 1 al cuarto No. 3 y nunca viceversa (83, 101).

Por otro lado, se debe evitar la formación de aerosoles, y emplear puntas aspersoras y viales exclusivos para cada muestra. Los reactivos empleados deben prepararse en condiciones de esterilidad y almacenarse en pequeñas alícuotas para su uso posterior. Algunas de estas medidas pueden ser difíciles de llevar a cabo en un laboratorio de diagnóstico clínico, ya que a veces es difícil contar con las barreras físicas adecuadas (83, 101).

ANEXO I
MEDIO DE CULTIVO BSK II

El medio de cultivo BSK II se prepara de la siguiente manera:

900 ml	Agua destilada
100 ml	CMRL 1066 sin glutamina
5 g	Neopeptona
50 g	Albúmina sérica bovina, fracción V
2 g	Levadura
6 g	N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-ácido etansulfónico (HEPES)
5 g	Glucosa
0.7 g	Citrato de sodio
0.8 g	Piruvato de sodio
0.4 g	N-acetilglucosamina
2.2 g	Bicarbonato de sodio

El pH del medio se ajusta a 7.6 con hidróxido de sodio 1 N a una temperatura de 20 - 25°C, y se adicionan 200 ml de gelatina al 7 %. Esterilizar mediante filtración con aire a presión a través de membranas de nitrocelulosa con un poro de 0.2 μ de diámetro. Almacenar a 4°C. Justo antes de usar, se agrega al medio suero de conejo hasta una concentración final de 6 %.

Todo el material deberá estar libre de detergente, enjuagado con agua destilada y esterilizado en autoclave (8).

NOTA: CMRL 1066 (Marca Gibcolab) Medio de cultivo para tejidos que contiene aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento.

ANEXO II

MÉTODO DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA MODIFICADA POR WILKINSON (114).

Antígeno: células completas
de *B. burgdorferi* fijadas
con acetona.

+
↓
↓
↓
↓
↓
↓
↓
↓
↓
↓

20 µl de cada dilución del
suero, por duplicado, partiendo
de una dilución inicial 1:16
hecha con una susp. al 3 %
de yema de huevo.

↓ Incubación: 30 min a 37°C en cámara húmeda.

↓ Lavar con amortiguador de fosfatos salino
durante 10 min.

↓ Secar con papel secante

Adicionar a cada pocito 20 µl de suero
anti-Inmunoglobulina humana polivalente
marcada con isotiocianato de fluoresceína

↓
↓
↓
↓
↓
↓

↓ Incubar 30 min a 37°C en cámara húmeda.

↓ Lavar con amortiguador de fosfatos salino
durante 10 minutos.

↓ Secar con papel secante.

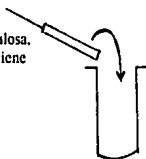
Cubrir con amortiguador de carbonato a
pH 9. Colocar un cubreobjetos encima.

↓
↓
↓

Leer al microscopio de fluorescencia

ANEXO III
TÉCNICA SEGÚN HECHEMY (49).

Barra con nitrocelulosa.
una superficie contiene
Ag. solubilizado



0.5 ml de suero dil 1:50
en gelatina de pescado
liquido al 2 %

↓ Incubar con agitación 1 h a 25 °C

↓ Lavar

Amortiguador TRIS 5 min



Sumergir

Suero con anticuerpos anti-Ig
humana polivalente conjugados
con isotiocianato de fluoresceína

↓ Incubar con agitación 30 min a 25 °C

↓ Lavar

Amortiguador TRIS 5 min



↓ Leer en un fluorómetro

El resultado obtenido se determina por extrapolación de las unidades de señal de fluorescencia (Δ FSU) en una curva de calibración .

CONCLUSIONES

1. *Borrelia burgdorferi*, agente causal de la enfermedad de Lyme, se transmite por garrapatas del género *Ixodes* y muy probablemente por otros insectos hematófagos como mosquitos y jejenes.
2. *Borrelia burgdorferi* requiere para su desarrollo de un medio de cultivo enriquecido y de 2 a 8 semanas para detectarse su crecimiento. Por otro lado, aislar a este microorganismo de muestras biológicas humanas tales como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y biopsias de piel, es muy difícil debido al bajo número de microorganismos presentes.
3. La enfermedad de Lyme es un padecimiento multisistémico que se presenta por estadios, desde la aparición de una lesión en la piel acompañada por malestar generalizado y fatiga, hasta complicaciones neurológicas, cardíacas e inclusive artritis. Esta enfermedad puede tratarse satisfactoriamente con antibióticos como penicilina, tetraciclina, doxiciclina, eritromicina; sobre todo en la fase temprana de la enfermedad.
4. Dado que la demostración directa del microorganismo a partir de muestras clínicas mediante el cultivo, es un procedimiento impráctico y de bajo rendimiento, la confirmación del diagnóstico clínico se lleva a cabo detectando los anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* mediante pruebas inmunológicas.
5. La sensibilidad de estas pruebas se ve limitada durante la fase temprana de la enfermedad, debido a que la mayoría de los pacientes presenta una respuesta inmune tardía y pobre.

6. La especificidad también se ve obstaculizada ya que *Borrelia burgdorferi* comparte determinantes antigénicos con otras especies del género *Borrelia*, *Treponema* y *Leptospira*.
7. Para mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas inmunológicas se han empleado como antígeno las proteínas más inmunogénicas de *Borrelia burgdorferi*. Además se han utilizado a la par métodos de adsorción para remover anticuerpos no específicos de las muestras así como métodos de amplificación de la reacción antígeno-anticuerpo con biotina-estreptoavidina.
8. La prueba inmunológica más empleada es el método de ELISA porque ofrece un mayor número de ventajas que los métodos de inmunofluorescencia: fácil realización, capacidad de automatización, manejo de un mayor número de muestras, resultados más objetivos.
9. El método de Western-blot se emplea como prueba confirmativa de los resultados obtenidos por técnicas rutinarias de casos de difícil diagnóstico.
10. Actualmente se ha empezado a emplear el método de PCR. Sin embargo, con respecto a esta técnica todavía falta determinar en qué manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme el método es útil y el tipo de muestra óptima.
11. Para un diagnóstico eficaz se debe tomar en cuenta las áreas geográficas en donde la enfermedad es endémica, la historia clínica del paciente y los resultados del laboratorio.
12. A pesar de que en México se han encontrado algunos de los vectores que transmiten a *Borrelia burgdorferi*; esto no es evidencia suficiente para concluir su existencia en nuestro país. Para esto, se requiere de una serie de estudios de laboratorio encaminados a la búsqueda de la espiroqueta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aberer E. and Duray H. Paul. "Morphology of *Borrelia burgdorferi*: Structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods". J. Clin. Microbiol. 29 (4): 764 - 772. (1991)
2. Anderson F. John. "Preventing Lyme disease". Rheum. Dis. Clin North Am. 15 (4): 757 - 766. (1989).
3. Anderson F. John; Johnson C. Russell; Magnarelli A. Louis; Hyde W. Fred. "Identification of endemic foci of Lyme disease: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*)". J. Clin. Microbiol. 22 (1): 36 - 38. (1985).
4. Anderson F. John; Magnarelli A. Louis. "Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut". Yale J. Biol. Med. 57 (4): 627 - 641. (1984).
5. Anderson F. John; Magnarelli A. Louis; Lefebvre B. Rance; Andreadis G. Theodore; McAninch B. Jay; Perng Guey-Chuen; Johnson C. Russell. "Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas". J. Clin. Microbiol. 27 (1): 13 - 20. (1989)

6. Balows Albert; Hausler J. William; Herrman Kenneth; Isenberg Henry; Shadomy Jean.

"*Borrelia*" in

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

5a. ed.

American Society for Microbiology

Washington, Estados Unidos. (1991)

7. Barbour G. Alan. "Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes".
Yale J. Biol. Med. 57 (4): 581 - 586. (1984).

8. Barbour G. Alan. "Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes". Yale J. Biol.
Med. 57 (4): 521 - 525. (1984).

9. Barbour G. Alan. "Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent". J.
Clin Microbiol. 26 (3): 475 - 478. (1988).

10. Barbour G. Alan; Heiland A. Ramona; Howe R. Timothy. "Heterogeneity of major
proteins in Lyme disease borreliae: A molecular analysis of North American and European
isolates". J. Infect. Dis. 152 (3): 478 - 484. (1985).

11. Barbour C. Alan; Tessier L. S.; Hays F. S. "Variation in a major surface protein of Lyme
disease spirochetes". Infect Immun. 45: 94 - 100. (1984).

12. Barthold W. Stephen; Moody D. Kathleen; Terwilliger A. Gordon; Duray H. Paul;
Jacoby O. Robert; Steere C. Allen. "Experimental Lyme arthritis in rats infected with
Borrelia burgdorferi". [letter] J. Infect. Dis. 157 (4): 842 - 846. (1988).

13. Belani Kiran and Regelman E. Warren. "Lyme disease in children". *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15 (4): 679 - 690. (1989).
14. Benach L. Jorge; Fleit B. Howard; Habitch S. Gail; Coleman L. James; Bosler M. Edward; Lane P. Bernard. "Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor". *J. Infect. Dis.* 150 (4): 497 - 507. (1984).
15. Benach L. Jorge; Habitch S. Gail; Gocinski L. Barbara; Coleman L. James. "Phagocytic cell responses to *in vivo* and *in vitro* exposure to the Lyme disease spirochete". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 599 - 605. (1984).
16. Berardi P. Victor; Weeks K. E.; Steere C. Alan. "Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme immunoassay". *J. Infect. Dis.* 158: 754 - 760. (1988).
17. Bernard W. Berger. "Cutaneous manifestations of Lyme Borreliosis". *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15 (4): 627 - 632. (1989).
18. Bissett L. Marjorie; Hill Warren. "Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California". *J. Clin. Microbiol.* 25 (12): 2296 - 2301. (1987).
19. Bosler M. Edward; Ormiston G. Brian; Coleman L. James; Hanrahan P. John; Benach L. Jorge. "Prevalence of the Lyme disease spirochete in populations of white-tailed deer and white-footed mice". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 651 - 659. (1984).

20. Bowen Stephen G.; Schulze L. Terry; Parkin L. William. "Lyme disease in New Jersey, 1978 - 1982". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 661 - 668. (1984).
21. Burgdorfer Willy. "Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 515 - 520. (1984).
22. Burgdorfer Willy. "The New Zealand white rabbit: An experimental host for infecting ticks with Lyme disease spirochetes". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 609 - 612. (1984).
23. Burgdorfer Willy. "Vector/ host relationships of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*". *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15 (4): 775 - 787. (1989).
24. Callister M. Steven.; Case L. K.; Agger A. William; Schell F. R.; Johnson C. Russell; Ellingson E. C. J. "Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoenner-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*". *J. Clin. Microbiol.* 28 (2): 363 - 365. (1990).
25. Caputa C. Anthony; Murtaugh P. Michael; Bey F. Russell; Loken Keith. "110 Kilodalton recombinant protein which is immunoreactive with sera from humans, dogs, horses with Lyme borreliosis". *J. Clin. Microbiol.* 29 (11): 2418 - 2423. (1991).
26. Coleman L. James; Benach L. Jorge. "Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: Their role in early diagnosis". *J. Infect. Dis.* 155 (4): 756 - 765. (1987).
27. Dattwyler J. Raymond; Luft J. Benjamin. "Immunodiagnosis of Lyme borreliosis". *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15 (4): 727 - 734. (1989).

28. Davis P. Bernard; Dolbecco Renato; Herman N. Eisen; Harold S. Gingsbergs.
"The spirochetes". In

MICROBIOLOGY

4a ed.

J.B. Lippincott Company

Philadelphia, USA. (1991).

29. Davis P. Jeffrey; Schell L. Wendy; Amundson E. Terry; Godsey S. Marvin; Spielman Andrew; Burgdorfer Willy; Barbour G. Alan; LaVenture Martin; Kaslow A. Richard. "Lyme disease in Wisconsin: Epidemiologic, clinical, serologic and entomologic findings". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 685 - 696. (1984).

30. Dever L. Lisa; Jorgensen H. James; Barbour G. Alan. "In vitro antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* a microdilution MIC method and time-Kill studies". *J. Clin. Microbiol.* 30 (10): 2692 - 2697. (1992).

31. Dorward W. David; Schwan G. Tom; Garon F. Claude. "Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans". *J. Clin. Microbiol.* 29 (6): 1162 - 1170. (1991).

32. Duray H. Paul. "Histopathology of clinical phases of human Lyme disease". *Rheum Dis. Clin. North Am.* 15 (4): 691 - 710. (1989).

33. Fikrig Erol; Barthold W. Stephen; Kantor S. Fred; Flavell A. Richard. "Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant Osp A". *Science.* 250 (4980): 553 - 556. (1990).

34. Fikrig Erol; Magnarelli A. Louis; Chen Manchuan; Anderson F. John; Flavel A. Richard. "Serologic analysis of dogs, horses and cottontail rabbits for antibodies to antigenic flagellar epitope of *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 31 (9): 2451 - 2455. (1993).
35. Fukunaga Masahito; Sohnaka Masaco; Takahashi Yukie; Nakao Minoru; Miyamoto Kenji. "Antigenic and genetic characterization of *Borrelia* species isolated from *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan". J. Clin. Microbiol. 31 (5): 1388 - 1391. (1993).
36. Garcia-Manco Juan Carlos and Benach L. Jorge. "The pathogenesis of Lyme disease". Rheum. Dis. Clin. North Am. 15 (4): 711 - 726. (1989).
37. Greene T. Russell; Walker L. Richard; Burgess C. Elizabeth; Levine F. Jay. "Heterogeneity in immunoblot patterns obtained by using four strain of *Borrelia burgdorferi* and sera from naturally exposed dogs". J. Clin. Microbiol. 26: 2287 - 2291. (1988).
38. Greene T. Russell; Walker L. Richard; Nicholson L. William; Heidner W. Hans; Levine F. Jay; Burgess C. Elizabeth; Wyand Michael; Breitschwerdt B. Edward; Berkhoff A. Herman. "Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimentally and naturally exposed dogs". J. Clin Microbiol. 26 (4): 648 - 653. (1988).
39. Grodzicki L. Robert; Steere C. Allen. "Comparison of immunoblotting and indirect enzyme linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosis early Lyme disease". J. Infect. Dis. 157 (4): 790 - 797. (1988).

40. Habitch S. Gail; Beck Gregory; Benach L. Jorge. "Lyme disease. A bacterium transmitted to human beings by the bite of a deer tick causes this hazard of summer time". *Sci Am.* 257 (1): 78 - 83. (1987).
41. Halperin J. John. "Nervous system manifestations of Lyme disease". *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15 (4): 635 - 647. (1989).
42. Hanrahan P. John; Benach L. Jorge; Coleman L. James; Bosler M. Edward; Grabau C. John; Morse L. Dale. "Epidemiologic features of Lyme disease in New York". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 643 - 650. (1984).
43. Hanrahan P. John; Benach L. Jorge; Coleman L. James; Bosler M. Edward; Morse L. Dale; Cameron J. Donald; Edelman Robert; Kaslow A. Richard. "Incidence and cumulative frequency of endemic Lyme disease in a community". *J. Infect. Dis.* 150 (4): 489 - 496. (1984).
44. Hansen Klaus and Asbrink Eva. "Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* flagellum enzyme-linked immunosorbent assay". *J. Clin. Microbiol.* 27 (3): 545 - 551. (1989).
45. Hansen Klaus; Bangsberg M. J.; Fjordvang H.; Pedersen Strandberg Nils; Hindersson Peter. "Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60 KDa antigen common to a wide range of bacteria. *Infect Immun.* 56: 2047 - 2053. (1988).

46. Hansen Klaus; Hindersson Peter; Pedersen Strandberg Nils. "Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease". J. Clin. Microbiol. 26 (2): 338 - 346. (1988).
47. Hansen Klaus; Kurt P. H.; Lebech Anne-Mette. "Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a μ -capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 29 (1): 166 - 173. (1991).
48. Hardin A. John; Steere C. Allen; Malawista E. Stephen. "The pathogenesis of arthritis in Lyme disease: Humoral immune responses and the role of intra-articular immune complexes". Yale J. Biol. Med. 57 (4): 589 - 593. (1984).
49. Hechemy E. K.; Harris L. H.; Wethers A. J.; Stevens W. R.; Stock R. B.; Reilly A. A.; Benach L. J. "Fluoroimmunoassay studies with solubilized antigens from *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 27 (8): 1854 - 1858. (1989).
50. Hoffmann Anita. "Monografía de los Ixodoideade México". Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. XXIII. (1962).
51. Hovind-Hougen Kari. "Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*". Yale J. Biol. Med. 57 (4): 543 - 548. (1984).
52. Hyde W. Frederick; Johnson C. Russell. "Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema* and *Leptospira* spp". J. Clin. Microbiol. 20 (2): 151 - 154. (1984).

53. Hyde W. Frederick; Johnson C. Russell; White J. Theresa; Shelburne E. Charles. "Detection of antigens in urine of mice and humans infected white *Borrelia burgdorferi*. etiologic agent of Lyme disease". J. Clin. Microbiol. 27 (1): 58 - 61. (1989)
54. Johnson C. Russel; Hyde W. Frederick; Rumper M. Catherine. "Taxonomy of the Lyme disease spirochetes". Yale J. Biol. Med. 57 (4): 529 - 537. (1984).
55. Johnson E. Scott; Kein C. George; Schmid P. George; Feeley C. James. "Susceptibility of the Lyme disease spirochete to seven antimicrobial agents". Yale J. Biol Med. 57 (4): 549 - 553. (1984).
56. Kawabata Masato; Baba Shunichi; Iguchi Kazuyuki; Yamaguti Noboru; Russell Harold. "Lyme disease in Japan and its possible incriminated tick vector *Ixodes persulcatus*". [Letter] J. Infect. Dis. 156 (5): 854. (1987).
57. Kolstoe John and Messner P. Ronald. "Lyme disease: Musculoskeletal manifestations". Rheum. Dis. Clin. North Am. 15 (4): 649 - 656. (1989).
58. Koneman W. Elmer; Allen D. Stephen; Dowell J. R.; Janda M. William; Sommers M. Herbert; Winn C. W.
"Spirochetal Disease" in
COLOR ATLAS AND TEXT BOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY.
3a. ed.
J B Lippincott Company.
Philadelphia, Estados Unidos. (1988).

59. Kornblatt N. Arnold; Steere C. Allen; Brownstein G. David. "Infection in rabbits with the Lyme disease spirochete". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 613 - 614. (1984).
60. Krieg R. Noel
"Genus IV *Borrelia*" in
Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology .
Estados Unidos (1984).
61. Kristoferitsch Wolfgang. "Lyme Borreliosis in Europe. Neurologic Disorders". *Rheum Dis Clin North Am.* 15 (4): 767 - 774. (1989).
62. Kron A Michael; Gupta Amar; Mackenzie D. Charles. "Identification of related DNA sequences in *Borrelia burgdorferi* and two strains of *Leptospira interrogans* by using Polimerase chain reaction". *J. Clin. Microbiol.* 29 (10): 2338 - 2340. (1991).
63. Kurtii J. Timothy; Munderloh G. Ulrike; Johnson C. Russel; Ahlstrand G. Gilbert.
"Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*". *J. Clin. Microbiol.* 25 (11): 2054 - 2058. (1987).
64. Laboratory Report. Fourth International Conference on Lyme Borreliosis: Overview. *LabMed.* VII (5): 10 - 11. (1990).
65. Lane S. Robert; Lennete T. Evelyne; Madigan E. John. "Interlaboratory and Intralaboratoty comparisons of indirect immunofluorescence assays for serodiagnosis of Lyme disease". *J. Clin. Microbiol.* 28 (8): 1774 - 1779. (1990).

66. Laurrose F; King G. Arthur. "The overwintering in Massachusetts of *Ixodiphagus hirtus*. Science. 67 (1735): 351 - 353. (1928).
67. Lebech Anne-Mette; Hansen Klaus. "Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme borreliosis by polymerase chain reacton". J. Clin. Microbiol. 30 (7): 1646 - 1653. (1992).
68. Lebeche Anne-Mette; Hindersson Peter; Vuust Jens, Hansen Klaus. "Comparison of in vitro culture and polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals". J. Clin. Microbiol. 29 (4): 731 - 737 (1991).
69. Lefebvre B. Rance; Perng Guey-Chuen; Johnson C. Russell. "The 83 kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected host is expressed by chromosomal gene". J. Clin Microbiol. 28 (7): 1673 - 1675. (1990).
70. Luft J. Benjamin and Dattwyler J. Raymond. "Treatment of Lyme Borreliosis". Rheum. Dis. Clin. North Am. 15 (4): 747 - 755. (1989)
71. Mac Donald B. Alan. "Gestational Lyme borreliosis. Implications for the fetus". Rheum. Dis. Clin. North Am. 15 (4): 657 - 677. (1989).
72. Magnarelli A. Louis. "Laboratory diagnosis of Lyme disease". Rheum. Dis. Clin North Am. 15 (4): 735 - 745. (1989).

73. Magnarelli A. Louis; Anderson F. John. "Adsorption and biotin-streptavidin amplification in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis". *J. Clin. Microbiol.* 29 (9): 1761 - 1764. (1991).
74. Magnarelli A. Louis; Anderson F. John; Chappell Adrian W. "Geographic distribution of humans, raccoons, and white-footed mice with antibodies to Lyme disease spirochetes in Connecticut". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 619 - 626. (1984).
75. Magnarelli A. Louis; Anderson F. John; Johnson C. Russell. "Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections". *J. Infect. Dis.* 156 (1): 183 - 188. (1987).
76. Magnarelli A. Louis; Meegan M. James, Anderson F. John; Chappell Adrian W. "Comparison of an indirect fluorescent antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease". *J. Clin Microbiol.* 20 (2): 181 - 184. (1984).
77. Magnarelli A. Louis; Miller N. James; Anderson F. John; Riviere R. George. "Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease". *J. Clin. Microbiol.* 28 (6): 1276 - 1279. (1990).
78. Malawista E. Stephen; Steere C. Allen; Hardin A. John. "Lyme disease: A unique human model for an infectious etiology of rheumatic disease". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 473 - 477. (1984).
79. Malloy C. Diane; Nauman K. Robert; Paxton Helen. "Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction". *J. Clin. Microbiol.* 28 (6): 1089 - 1093. (1990).

80. Markowitz E. Lauri; Steere C. Allen; Benach L. Jorge; Slade D. John; Broome V. Claire. "Lyme disease during pregnancy". JAMA. 255 (24): 3394 - 3396. (1986)
81. Masuzawa Toshiyuki; Okada Yukata; Yanagihara Yasutake; Sato Nanao. "Antigenic properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan". J. Clin. Microbiol. 29 (8): 1568 - 1573. (1991).
82. Melchers Willem, Mers Jacques, Rosa Patricia, Claas Eric, Nohlmans Liesel, Koopman Roland, Horrevorts Alfons, Galama Joep. "Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease". J. Clin. Microbiol. Nov, 1991. 29 (11): 2401 - 2406.
83. Nadej Roberta. "PCR: applications to the clinical laboratory". Lab.Med. VIII (4): 11 - 15. (1991).
84. Need T. James; Escamilla Joel. "Lyme disease in South America?". J. Infect. Dis. 163: 681 - 682. (1991).
85. Osterholm T. Michael; Forfang C. Jan; White E. Karen; Kuritskg N. Joel. "Lyme disease in Minnesota: Epidemiologic and serologic findings". Yale J. Med. Biol 57 (4): 677 - 683. (1984).
86. Overview of laboratory test for Lyme disease. LabMed. VIII (5): 20 - 24. (1991).
87. Pachner R. Andrew; Ricalton Nancy; Delaney Elizabeth. "Comparison of polymerase chain reaction with culture and serology for diagnosis of murine experimental Lyme borreliosis". J. Clin. Microbiol. 31 (2): 208 - 214. (1993).

88. Pennell R. Daniel; Wand J. Philip; Schell F. Ronald. "Evolution of quantitative fluorescence immunoassay (FIAX) for detection of serum antibody to *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 25 (11): 2218 - 2220. (1987).
89. Persing H. David; Telford III R. Sam; Spielman Andrew; Barthold W. Stephen. "Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction". J. Clin. Microbiol. 28 (3): 566 - 572. (1990).
90. Robinson M. John; Pilot-Matias J. Tami; Pratt D. Steven; Patel V. Chandu; Bevirt S. Terry; Hunt C. J. "Analysis of the humoral response to the flagellin protein *Borrelia burgdorferi*: Cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from siphilis". J. Clin. Microbiol. 31 (3): 629 - 635. (1993).
91. Rosa A. Patricia; Schwan G. Tom. "A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction". J. Infect. Dis. 60 (6): 1018 - 1029. (1989).
92. Rosa A. Patricia; Schwan G. Tom. "Polymerase Chain reaction analysis identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 29 (3): 524 - 532. (1991).
93. Russel A. Sampson J. S.; Schmid G. P.; Wilkinson W. H.; Plikaytis B. "Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease". J. Infect. Dis. 140: 465 - 470. (1984).
94. Schlesinger P. A., Duray P. H., Burke B. A. "Maternal fetal transmission of the Lyme disease spirochete *Borrelia Burgdorferi*" Ann. Intern. Med. 103 (3): 67 - 68. (1985).

95. Schmid P. George. "The global distribution of Lyme disease". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 617 - 618. (1984).

96. Schmid P. George; Stergerwalt G. Arnold; Johnson E. Scott; Barbour G. Alan; Steere C. Allen; Robinson M. Isadore; Brenner J. Don. "DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease". *J. Clin. Microbiol.* 20 (2): 155 - 158. (1984).

97. Schmid P. George; Verardo Louis; Highsmith K. Anita; Weisfeld S. Jason. "Failure to detect endotoxin in sera from patients with Lyme disease". [letter]. *J. Infect. Dis.* 150 (4): 616. (1984).

98. Schneider Thomas; Lange Robert; Weigelt Wolfgang. "Analysis of the humoral response to the flageline protein of *Borrelia burgdorferi*". *J. Clin. Microbiol.* 31 (9): 2553. (1993).

99. Schulze L. Terry; Bowen Stephen G.; Lakat F. Michael; Parkin E. William; Shisler K. Joseph. "Geographical distribution and density of *Ixodes dammini* (Acari: *Ixodidae*) and relationship to Lyme disease transmission in New Jersey". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 669 - 675. (1984).

100. Schwan G. Tom; Burgdorfer Willy. "Antigenic changes of *Borrelia burgdorferi* as a result of *in vitro* cultivation". [letter]. *J. Infect. Dis.* 156 (5): 852 - 853. (1987).

101. Schwartz Ira; Wormser P. Gary; Schwartz J. John; Cooper Denise; Weissensee Paul; Gazumyan Anna; Zimmermann Ellen; Goldberg S. Neil; Bittker Susan; Cambell L. Grant; Pavia S. Charles. "Diagnosis of early Lyme disease by PCR amplification and culture skin biopsies from erythema migrans lesions". *J. Clin. Microbiol.* 30 (12): 3082 - 3088. (1992).

102. Simon M. M.; Schaible U. E.; Wallich R.; Kramer M. D. "A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: Approach to a vaccine against Lyme disease". Immun Today. 12 (1): 11 - 16. (1991).
103. Simpson J. Warren; Schrupf E. Merry; Hayes F. Stanley; Schwan G. Tom. "Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 29 (9): 1940 - 1948. (1991).
104. Simpson J. Warren; Schrupf E. Merry; Schwan G. Tom. "Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39 Kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*". J. Clin. Microbiol. 28 (6): 1329 - 1337. (1990).
105. Snyderman R. David; Schenkein P. David; Berardi P. Victor; Lastavica C. Catherine; Pariser M. Kenneth. "*Borrelia burgdorferi* in joint fluid in chronic Lyme arthritis". Ann. Intern. Med. 104: 798 - 800. (1986).
106. Spielman Andrew; Levine F. Jay; Wilson L. Mark. "Vectorial capacity of North American *Ixodes* ticks". Yale J. Biol. Med. 57 (4): 507 - 513. (1984).
107. Steere C. Allen; Duray H. Paul; Kauffman J. Danny; Wormser P. Gary. "Unilateral blindness caused by infection with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*". Ann. Intern. Med. 103 (3): 382 - 384. (1985).
108. Steere C. Allen; Dwyer E.; Winchester J. Robert. "Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles". N. Engl. J. Med. 323: 219 - 223. (1990).

109. Steere C. Allen; Malawista E. Stephen; Bartenhagen H. Nicolas; Spieler N. Phyllis; Newman H. James; Rhan W. Daniel; Hutchinson J. Gordon; Green Jerry, Snyderman R. David; Taylor Elise. "The clinical spectrum and treatment of Lyme disease". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 453 - 460. (1984).
110. Steere C. Allen; Pachner R. Andrew; Malawista E. Stephen. "Successful treatment with high dose intravenous penicillin". *Ann. Intern. Med.* 99: 767 - 772. (1983).
111. Steere C. Allen; Schoen T. Robert; Taylor Elise. "The clinical evolution of Lyme arthritis". *Ann. Intern. Med.* 107: 725 - 731. (1987).
112. Szer S. Ilona; Taylor Elise; Steere C. Allen. "The long-term course of Lyme arthritis in children". *N. Engl. J. Med.* 325 (3): 159 - 163. (1991).
113. Weber Klaus; Schierz Günther; Wilske Bettina; Preac-Mursic Vera. "European Erythema Migrans disease and related disorders". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 465 - 471. (1984).
114. Wilkinson W. Hazel. "Immunodiagnostic tests for Lyme disease". *Yale J. Biol. Med.* 57 (4): 567 - 572. (1984).
115. Wilske Bettina; Preac-Mursic Vera; Göbel B. Ulf; Graf Barbara; Jauris Sigrid; Soutschek Erwin; Schwab Elisabeth; Zumstein Gitta. "An Osp A serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and Osp A sequence analysis". *J. Clin. Microbiol.* 31 (2): 340 - 350. (1993).

116. Wilske Bettina; Preac-Mursic Vera; Schierz Günther; Kühbeck R.; Barbour G. Allen; Kramer M. "Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*". Ann N. Y. Acad. Sci. 539: 126 - 143. (1988).
117. Wilson L. Mark; Levine F. Jay; Spielman Andrew. "Effect of deer reduction on abundance of the deer tick (*Ixodes dammini*)". 57 (4): 697 - 705. (1984).
118. Williams L. Christine; Curran S. Anita; Lee Chen Alda; Sousa O. Victor. "Lyme disease: Epidemiologic characteristics of an outbreak in Westchester County, N.Y.". Am. J. Public Health. 76 (1): 62 - 65. (1986).
119. Wise J. Darla; Weaver L. Terry. "Detection of the Lyme disease bacterium, *Borrelia burgdorferi*, by using the polymerase chain reaction and a nonradioisotopic gene probe". J. Clin. Microbiol. 29 (7): 1523 - 1526. (1991).
120. Zöller L.; Burkard S.; Schäfer H. "Validity of Western Immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis". J. Clin. Microbiol. 29 (1): 174 - 182. (1991).