



TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE
LYME EN EL ÁREA SANITARIA DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO LUCUS
AUGUSTI Y SU RELACIÓN CON LAS
POBLACIONES DE CORZOS
PARASITADOS POR *Ixodes*”**

María Esther Vázquez López

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

FACULTADE DE MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

DEPARTAMENTO DE
PEDIATRÍA
Facultade de Medicina
Hospital Clínico Universitario

c/. San Francisco, s/n
15782 Santiago de Compostela

Don MANUEL CASTRO GAGO, Catedrático de Pediatría del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela,

Doña M^a PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Don GONZALO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Don PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ, Profesor Interino del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada

“Estudio de la enfermedad de Lyme en el área sanitaria del Hospital Universitario Lucus Augusti y su relación con las poblaciones de corzos parasitados por Ixodes”

Presentada por Dña. **MARÍA ESTHER VÁZQUEZ LÓPEZ**, alumna del Programa de Doctorado "Pediatría".

Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992

Manuel Castro Gago

M^a Patrocinio Morrondo Pelayo

Gonzalo Fernández Rodríguez

Pablo Díaz Fernández



FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado, en parte, gracias a la concesión de una ayuda de:

Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas del Sistema Universitario de Galicia: Redes (R2014/005). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Investigador responsable: Rosario Panadero Fontán.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

A. Artículos de investigación:

1. Pato FJ, Panadero R, Vázquez L, López CM, Díaz P, Vázquez E, Díez-Baños P, Morrondo P, Fernández G. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 2013; 44: 660-665

2. Vázquez-López ME, Pego-Reigosa R, Díez-Morrondo C, Castro-Gago M, Díaz P, Fernández G, Morrondo P. Epidemiología de la Enfermedad de Lyme en un área sanitaria del Noroeste de España. **Gaceta Sanitaria** 2015; 29: 213-216.

3. Vázquez-López ME, Pérez-Pacín R, Díez-Morrondo C, Díaz P, Castro-Gago M. Enfermedad de Lyme en edad pediátrica. **Anales de Pediatría** 2015; doi: 10.1016/j.anpedi.2015.07.008.

4. Vázquez-López ME, Díez-Morrondo C, Sánchez-Andrade A, Pego-Reigosa R, Fernández G, Díaz P, Castro-Gago M. Prevalencia de clínica articular en enfermos de Lyme del Noroeste de España. **Reumatología Clínica** 2015: enviado para su publicación.

B. Comunicaciones a Congresos:

1. Vázquez-López ME, Pego-Reigosa R, González-Gómez J, Morales-Redondo M. Neuroborreliosis infantil. **Segunda Reunión Ibérica de Neuropediatría. IV Congreso de la Sociedad Portuguesa de Neuropediatría. Revista de Neurología** 2005; 41: 13.

2. Vázquez-López ME, Almuiña-Simón C, Díez-Morrondo C, Pérez-Gay L. Pérez-Pacín R, Castro-Gago M. Parálisis facial periférica y Enfermedad de Lyme. **XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Española de Neuropediatría. Revista de Neurología** 2015; 60: 235.



AGRADECIMIENTOS

Es para mí una tarea muy agradable, mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de esta tesis doctoral y de manera muy especial:

Al Dr. Manuel Castro Gago, Catedrático de Pediatría del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de Santiago de Compostela, por poner en valor este trabajo multidisciplinar y por sus importantes aportaciones al mismo.

A la Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por su constante apoyo y cercanía, su conocimiento, organización y visión conjunta; su optimismo y su generosa disponibilidad.

Al Dr. Gonzalo Fernández Rodríguez, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, por sus constantes aportaciones para un adecuado análisis estadístico de los datos.

Al Dr. Pablo Díaz Fernández, Profesor del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, por su ayuda con las garrapatas de nuestra comunidad, la puesta a punto de las técnicas de genodiagnóstico y su buen humor.

A mis compañeras Dra. Pilar Alonso García y Dra. Amparo Coira Nieto, del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo, por proporcionarme los datos serológicos que he utilizado en el estudio.

Al Dr. Pablo Díez Baños, Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por sus acertados consejos y su paciencia.

A los Profesores Dra. Rosario Panadero Fontán y Dr. Ceferino López Sánchez por la ayuda prestada sin demora, siempre que fue necesario.

Al Dr. Robustiano Pego Reigosa, del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Lucus Augusti, por sus valiosas aportaciones y su constante ayuda en la interpretación clínica de los datos.

A todos los integrantes del grupo de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo, por su entrañable acogida y colaboración en todo momento y en especial a las Investigadoras en Formación Ana Pérez Creo y Eva Cabanelas Dopazo por su gran ayuda en la recolección y análisis de los Ixódidos.

A mis padres, por su constante apoyo incondicional y por todos los valores que me han sabido inculcar y me han permitido formarme como profesional y como persona.

A mi esposo Tano, por su estímulo continuo en la búsqueda de un mejor conocimiento, por su inestimable apoyo moral y consuelo en los momentos de mayor dificultad y por su cariño y paciencia a lo largo de estos años.

A mis hijas, Clara y Lucía por la constante alegría y optimismo que me han sabido transmitir.





A mis padres,
A Tano y a mis hijas.



1 ANTECEDENTES DEL TEMA	3
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO Y SUS CARACTERÍSTICAS	3
1.1.1. Clasificación y nomenclatura	4
1.1.2. Estructura de <i>B. burgdorferi sensu lato</i>	6
1.1.3. Determinantes patogénicos	8
1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	9
1.2.1. Vectores biológicos	9
1.2.1.1. Características morfológicas y biológicas de <i>Ixodes ricinus</i> como principal vector de <i>Borrelia</i>	10
1.2.1.2. Prevalencia de infección por <i>Borrelia</i> en <i>Ixodes ricinus</i> procedentes del ambiente y de diferentes hospedadores.....	14
1.2.2. Tipos de hospedadores de <i>Borrelia</i>	16
1.2.3. Distribución de la enfermedad	19
1.3. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.....	21
1.4. SÍNTOMAS CLÍNICOS	24
1.5. DIAGNÓSTICO	30
1.5.1. Clínico: definición de caso	30
1.5.2. Microbiológico	33
1.5.3. Diferencial	35
1.6. TRATAMIENTO	37
1.7. PREVENCIÓN	40
1.8. PRONÓSTICO	42
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	49
3.1.1. Condiciones edafoclimáticas	49
3.1.2. Densidad de corzos y superficie forestal	50
3.1.3. Población de estudio	50
3.2. DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE <i>Borrelia</i> Y DE LA TASAS DE INCIDENCIA DE ENFERMEDAD DE LYME.....	54
3.2.1. Seroprevalencia.....	54
3.2.2. Incidencia de Enfermedad de Lyme	54
3.3. OBTENCIÓN DE GARRAPATAS DE CORZOS Y DEL MEDIO E IDENTIFICACIÓN DE GENOESPECIES DE <i>Borrelia</i>.....	55
3.3.1. <i>I. ricinus</i> de corzos.....	55
3.3.2. <i>I. ricinus</i> recogidas de la naturaleza.....	57
3.3.3. Caracterización molecular de los aislados de <i>Borrelia</i>	59
3.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE LYME.....	60
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	61



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1. FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS QUE INFLUYEN SOBRE LA SEROPREVALENCIA Y TASA DE INCIDENCIA	65
4.1.1. Seroprevalencia.....	65
4.1.2. Tasa de incidencia de Enfermedad de Lyme	67
4.1.3. Relación entre seroprevalencia, tasa de incidencia, densidad de corzos y cobertura forestal.....	71
4.1.4. Antecedente de picadura de garrapata y mes de diagnóstico de EL.....	73
4.2. GARRAPATAS RECOGIDAS DE CORZOS Y DE LA NATURALEZA: TIPIFICACIÓN DE LAS GENOESPECIES DE <i>Borrelia</i>	74
4.2.1. Prevalencia de infección por <i>B. burgdorferi s.l.</i> en garrapatas obtenidas de corzos	74
4.2.2. Prevalencia de infección por <i>B. burgdorferi s.l.</i> en garrapatas obtenidas de la naturaleza.....	77
4.2.3. Tipificación de las especies de <i>B. burgdorferi s.l.</i> en garrapatas obtenidas de corzos y de la naturaleza.....	81
4.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS, TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN DE LOS ENFERMOS DE LYME.....	85
4.3.1. Del sistema nervioso.....	86
4.3.2. Cutáneas.....	89
4.3.3. Articulares.....	91
4.3.4. Cardíacas.....	94
4.3.5. En edad pediátrica.....	96
5 CONCLUSIONES	101
6 RESUMEN	105
7 BIBLIOGRAFÍA	113





1 ANTECEDENTES DEL TEMA



1 ANTECEDENTES DEL TEMA

La enfermedad de Lyme (EL) o borreliosis de Lyme, es una enfermedad multisistémica, que en el hombre presenta un espectro de manifestaciones muy amplias fundamentalmente a nivel cutáneo, neurológico, reumatológico o cardíaco (Alonso *et al.*, 2012; Arapovic *et al.*, 2014). Su agente causal es la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, transmitida por la picadura de garrapatas duras, principalmente del género *Ixodes* (Pazos *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2014). Esta enfermedad adquirió un interés relevante a partir de 1975 tras la descripción en Lyme (Connecticut, EE.UU.), de un brote de artritis de carácter epidémico entre la población infantil (Skinner *et al.*, 2007). En Europa, se tenía conocimiento de la enfermedad desde principios del siglo XX, sin embargo, es a partir de los años 80 cuando se desarrolla una investigación profunda y sistemática de los cuadros clínicos asociados a *Borrelia*.

En España se tiene constancia de la EL desde 1977 (Uruñuela *et al.*, 1977), aunque no se confirmó serológicamente el primer caso hasta el año 1987 (Uría *et al.*, 1987); no obstante, fue en el año 1992, cuando se aisló por primera vez en nuestro país, *B. burgdorferi* en *Ixodes ricinus* (García-Moncó *et al.*, 1992). Posteriormente, en 1998 se aisló *B. garinii* en una muestra clínica de un paciente con eritema migratorio (EM) (Oteo-Revuelta *et al.*, 1998a).

En nuestro país, al igual que en otros países europeos, la EL no es de declaración obligatoria, lo que dificulta el conocimiento de la incidencia real de esta entidad. No obstante, en la última década, en Europa se ha constatado un incremento en la tasa de incidencia de EL (Vandenesch *et al.*, 2014) y actualmente se considera que es una enfermedad emergente (Parola *et al.*, 2001; Alonso Fernández *et al.*, 2012; Lledó *et al.*, 2014, García-Meléndez *et al.*, 2014; James *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2014).

En Centroeuropa y en los países escandinavos, se estima que existen elevadas tasas de incidencia, con valores de 155 casos/100.000 habitantes (Pazos *et al.*, 2010). En España se calcula que la incidencia es de 0,25 casos/100.000 habitantes (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005; Pazos *et al.*, 2010); sin embargo, existen diferencias notables entre regiones, hallándose mayor incidencia en el norte del país (Portillo *et al.*, 2014) y, concretamente, en determinadas áreas de la provincia de Lugo, donde puede considerarse que la EL es endémica (Pazos *et al.*, 2010; Alonso *et al.*, 2012; Vázquez-López *et al.*, 2015).

El incremento en las tasas de incidencia de EL registrado en los últimos años puede deberse, entre otros motivos, a un mayor contacto del hombre con la naturaleza y con los animales tanto domésticos como silvestres, porque cada vez las personas desarrollan un mayor número de actividades al aire libre. Otros factores que favorecen que la EL tenga un carácter emergente son la mayor implicación de los médicos de asistencia primaria, con exploraciones físicas y analíticas más completas e historias clínicas más minuciosas; así como, la utilización de nuevas técnicas de biología molecular que permiten la identificación de los agentes infecciosos (Barandika, 2012).

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO Y SUS CARACTERÍSTICAS.

En 1910, Afzelius relacionó las lesiones características del eritema migrans con la picadura de garrapata (García-Meléndez *et al.*, 2014); sin embargo, no fue hasta el año 1948 cuando se determinó el agente etiológico de la EL al observar, por métodos de tinción argéntica, espiroquetas en las lesiones cutáneas de los enfermos. La etiología bacteriana de la

EL se demostró, de manera concluyente, tras la adecuada respuesta a la penicilina en pacientes que presentaban lesiones cutáneas o cuadros neurológicos compatibles con la EL (Weber, 1974).

1.1.1. Clasificación y nomenclatura.

Las borrelias son un grupo de espiroquetas patógenas Gram-negativas transmitidas por artrópodos vectores. Son estructuras unicelulares que pertenecen al Reino *Procaryotae*, División *Gracilicutes*, Clase *Scotobacteria*, Orden *Spirochetales*, familia *Spirochaetaceae*, género *Borrelia* (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005; Navarro *et al.*, 2005).

Según la **European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis** (EUCALB, 2009), en el orden *Spirochaetales* se incluyen dos familias, *Leptospiraceae* (*Leptospira*, *Leptonema* y *Turneria*) y *Spirochaetaceae* (*Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Serpulina* y *Borrelia*).

En la actualidad, se han aislado un elevado número de cepas de *B. burgdorferi*, procedentes de distintas áreas geográficas y fuentes biológicas, que han presentado diferencias fenotípicas y genotípicas (EUCALB, 2009). En base a estas diferencias, se han reconocido hasta 20 genoespecies distintas dentro del complejo *B. burgdorferi sensu lato* (*s.l.*), de las cuales tres (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* y *B. afzelii*) se han identificado como agentes etiológicos del 96% de los casos de EL y se han aislado en garrapatas de la especie *I. ricinus* (Escudero-Nieto *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2005; Skinner *et al.*, 2007; EUCALB, 2009; Rizzoli *et al.*, 2011; García-Meléndez *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2015). Además, también se ha señalado la posibilidad de que otras seis genoespecies puedan ser, de forma ocasional, patógenas para la especie humana: *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* y *B. bavariensis* (Escudero-Nieto *et al.*, 2000; Brouqui *et al.*, 2004; EUCALB, 2009; Rizzoli *et al.*, 2011; Rudenko *et al.*, 2011; Biesiada *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2012, Rodríguez-Gonzales *et al.*, 2013).

En la Tabla 1.1 se detalla la distribución de las 20 genoespecies del complejo *B. burgdorferi s.l.* reconocidas hasta la actualidad (EUCALB, 2009).

Tabla 1.1. Distribución de las genoespecies del complejo *B. burgdorferi sensu lato*

Genoespecies	Distribución	Autores	Referencia
<i>B. afzelii</i>	Europa	Canica <i>et al.</i> (1993)	Scand J Infect Dis., 25:441-8
<i>B. americana</i>	EE.UU.	Rudenko <i>et al.</i> (2009b)	J Clin Microbiol., 47:3875-3880
<i>B. andersonii</i>	EE.UU.	Marconi <i>et al.</i> (1995)	J Clin Microbiol., 33:2427-34
<i>B. bavariensis</i>	Europa	Margos <i>et al.</i> (2009)	Appl Environ Microbiol., 75:5410-6.
<i>B. bissettii</i>	Europa, EE.UU.	Postic <i>et al.</i> (1998)	J Clin Microbiol., 36:3497-504
<i>B. burgdorferi s.s</i>	Europa, EE.UU.	Baranton <i>et al.</i> (1992)	Int J Syst Bacteriol., 42:378-83
<i>B. californiensis</i>	EE.UU.	Postic <i>et al.</i> (2007)	Int J Med Microbiol., 297:263-271
<i>B. carolinensis</i>	EE.UU.	Rudenko <i>et al.</i> (2009a)	J Clin Microbiol., 47:134-141
<i>B. finlandensis</i>	Europa	Casjens <i>et al.</i> (2011)	J Bacteriol., 193(6):1489-90
<i>B. garinii</i>	Europa, Asia	Baranton <i>et al.</i> (1992)	Int J Syst Bacteriol., 42:378-83
<i>B. chilensis</i>	América del Sur	Ivanova <i>et al.</i> (2014)	Envir Microbiol., 16:1069-1080
<i>B. kurtenbachii</i>	EE.UU.	Margos <i>et al.</i> (2010)	Ticks Tick Borne Dis., 1:151-158
<i>B. lusitaniae</i>	Europa	Le Fleche <i>et al.</i> (1997)	Int J Syst Bacteriol., 47:921-5
<i>B. japonica</i>	Japón	Kawabata <i>et al.</i> (1993)	Microbiol Immunol., 37:843-8
<i>B. sinica</i>	China	Masuzawa <i>et al.</i> (2001)	Int J Syst Evol Microbiol., 51:1817-24
<i>B. spielmanii</i>	Europa	Richter <i>et al.</i> (2006)	Int J Syst Evol Microbiol., 56:873-81
<i>B. tanukii</i>	Japón	Fukunaga <i>et al.</i> (1996)	Microbiol Immunol., 40:877-81
<i>B. turdi</i>	Japón	Fukunaga <i>et al.</i> (1996)	Microbiol Immunol., 40:877-81
<i>B. valaisiana</i>	Europa, Asia	Wang <i>et al.</i> (1997)	Int J Syst Bacteriol., 47:926-32
<i>B. yangtze</i>	Asia	Houj <i>et al.</i> (2015)	Am J Trop Med Hyg., 92:262-266

Desde el punto de vista médico las genoespecies de mayor interés son:

1. *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), hallada principalmente en Estados Unidos y Canadá, y con menor frecuencia en Europa. No se ha descrito en Rusia ni en Asia. Se asocia con mayor frecuencia a pacientes con artritis (Skinner *et al.*, 2007).
2. *B. garinii*, se denomina así en honor a Garin y Boujadox, que describieron la afección neurológica de esta enfermedad en Europa en 1922. Es la especie aislada con mayor frecuencia en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con neuroborreliosis (Biesiada *et al.*, 2012).
3. *B. afzelii*, identificada por el investigador sueco Afzelius, quien describió el primer caso de EM. Esta genoespecie se distribuye por Europa (principalmente los países de Centro y Escandinavia) y Asia, y se ha identificado principalmente, en pacientes con lesiones cutáneas tardías del tipo de la acrodermatitis crónica atrófica (Biesiada *et al.*, 2012).
4. *B. valaisiana*, se ha aislado mediante PCR de pacientes con EM y acrodermatitis crónica atrófica, aunque no se ha podido cultivar desde estas lesiones cutáneas (Weber *et al.*, 2001; Rudenko *et al.*, 2011).
5. *B. lusitaniae*, se ha aislado en garrapatas duras recolectadas en países de Europa central, en Portugal y Noroeste de España. Asimismo, se ha aislado en pacientes de Portugal que presentaban clínica reumatológica como manifestación principal de la EL (Collares-Pereira *et al.*, 2004; Lopes de Carvalho, 2008; Silva, 2011).
6. *B. bissetti*, se describió en Estados Unidos y se distribuye fundamentalmente por California. También está presente en Europa, donde se aisló a partir de un grupo de pacientes con EL. Algunos con signos cutáneos (EM y linfocitoma) y otras manifestaciones sistémicas más graves (Picken *et al.*, 1996). Estas observaciones indican que esta especie, o al menos sus aislados europeos, además de la piel también colonizan otros órganos.
7. *B. spielmani*, se ha aislado en pacientes con EM en Holanda, Alemania, Hungría y Eslovenia (Stanek *et al.*, 2008; Rudenko *et al.*, 2011).
8. *B. japonica*, únicamente descrita en Japón; se aisló en una niña con EL (Masuzawa *et al.*, 1996).

En Europa, en enfermos de Lyme se han aislado *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetti* y *B. spielmanii*, aunque predominan las tres primeras (Kubiak *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2012). En concreto, *B. garinii* se encuentra sobre todo en las zonas de Europa situadas más al sur (Estrada-Peña *et al.*, 2011). En Norteamérica sólo se han aislado cepas de *B. burgdorferi s.s.* y en Asia se han aislado cepas de *B. garinii* y *B. afzelii* (Roca *et al.*, 2006, Stanek *et al.*, 2012, Olmo *et al.*, 2014).

Existen otras especies de *Borrelia* responsables de patología en el hombre, que no causan enfermedad de Lyme sino que se asocian a cuadros clínicos diferentes. Por ejemplo, la *B. recurrentis*, vehiculada por piojos del cuerpo (*Pediculus humanus humanus*), que es la causante de la fiebre recurrente epidémica y *B. duttoni* o *B. hispanica* vehiculadas fundamentalmente por garrapatas blandas del género *Ornithodoros* que producen la fiebre recurrente endémica (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005). También se ha descrito *B. miyamotoi* transmitida por ixódidos, como causante de fiebre recurrente (Wagemakers *et al.*, 2015).

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

Las borrelias son espiroquetas y, por tanto, comparten una morfología común con *Leptospira* y *Treponema*, pero presentan características individuales y una expresión variable de proteínas como resultado de modificaciones metabólicas asociadas al tipo de hospedador. Además, se han referido variaciones morfológicas, antigénicas y genómicas entre los distintos aislados de *B. burgdorferi* procedentes de Europa y Norteamérica (Barandika, 2012).

Son bacilos finos y largos (0,2 a 0,5 μm de ancho y 10-30 μm de largo) de forma helicoidal dextrógira, con un número de 6 a 7 espiras. Las especies de *Borrelia* son las espiroquetas más largas, siendo *B. burgdorferi s.l.* la más larga de todas. Son microorganismos móviles y presentan un número variable de flagelos periplásmicos que oscila entre 7 y 11 (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

La estructura de *B. burgdorferi* (Figura 1.1.) es similar a la de todas las espiroquetas; posee un protoplasma cilíndrico rodeado primero por una membrana citoplasmática, luego por un periplasma que contiene los flagelos y finalmente una membrana de superficie externa (Skinner *et al.*, 2007; Olmo *et al.*, 2014).

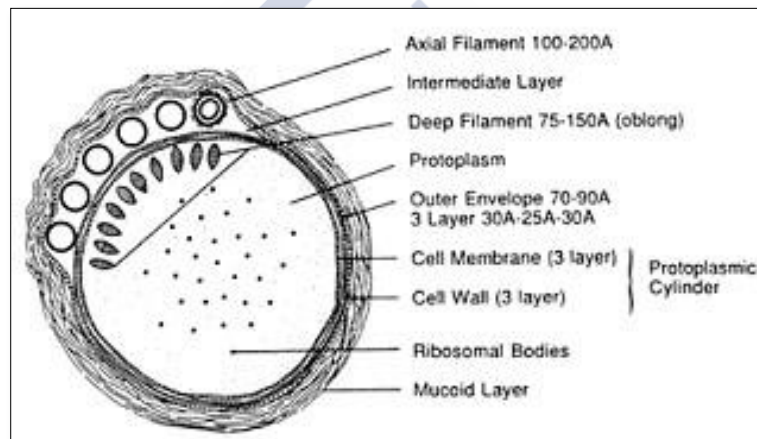


Figura 1.1. Estructura de *B. burgdorferi*.

El genoma de *B. burgdorferi* es excepcionalmente pequeño y fue el primero de todas las espiroquetas en ser secuenciado (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Este genoma contiene un cromosoma lineal de 910.725 pares de bases y 21 plásmidos, 9 circulares y 12 lineales que suponen 613 kilobases adicionales (Steere *et al.*, 2004; Skinner *et al.*, 2007). No se han identificado genes responsables de la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos o enzimas que actúen como cofactores, lo que contribuye a explicar el reducido tamaño del genoma y hace que la bacteria dependa del hospedador para satisfacer la mayoría de sus necesidades nutricionales (Steere *et al.*, 2004). Es también un carácter distintivo de *B. burgdorferi* la elevada proporción de su genoma dedicada a la codificación de lipoproteínas (8%), lo que hace pensar que éstas son de gran importancia para la supervivencia de la bacteria (Fernández Soto, 2003). Las funciones de la mayor parte de estas lipoproteínas, así como las de casi todos los demás genes plasmídicos no se conocen totalmente, pero se supone que permiten a la bacteria adaptarse a las diferentes condiciones ambientales que encuentra en los artrópodos y en los hospedadores vertebrados (Haake, 2000; Steere, *et al.*, 2001; García-Meléndez *et al.*, 2014).

Según Fernández-Soto (2003) las lipoproteínas sufren variaciones antigénicas para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador, al tiempo que participan en la patogenia de la enfermedad estimulando la respuesta inflamatoria y la inmunidad celular, interaccionando con la superficie de los macrófagos. Estas lipoproteínas, juegan un papel importante en la interacción parásito-hospedador y permiten a la espiroqueta unirse a las células del mamífero (Skinner *et al.*, 2007).

Especial mención merecen las lipoproteínas de membrana externa “*Outer Surface Proteins*” (Osp’s) que incluyen desde OspA a la OspF (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005) y que se codifican por genes localizados en los plásmidos. Las distintas Osp, tienen pesos moleculares diferentes, que oscilan entre los 19 kDa de la OspE y los 30-32 kDa de la OspA, teniendo valores intermedios el resto, es decir, OspB y Osp C (22-25 kDa), OspF (26 kDa) y OspD (28-30 kDa). También hay que destacar polipéptidos adicionales que incluyen el flagelar o flagelina (41 kDa), proteínas de choque térmico, proteínas de membrana responsables de la resistencia a la lisis por complemento y un antígeno de 93 kDa que forma parte del protoplasma cilíndrico (Skinner *et al.*, 2007).

La lipoproteína de membrana externa OspA, se expresa fundamentalmente en aislados procedentes de garrapatas antes de producirse la alimentación hemática (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Cuando la garrapata se está alimentando y la bacteria llega a las glándulas salivares procedente del intestino medio, rápidamente disminuye la producción de OspA y aumenta la de Osp C (Olmo *et al.*, 2014). La obtención de anticuerpos específicos frente a las variedades de lipoproteína OspA, ha permitido establecer diferentes serotipos con utilidad epidemiológica, ya que se correlacionan con las distintas genoespecies de *Borrelia*. Así por ejemplo, el serotipo 1 se corresponde con *B. burgdorferi* s.s., el serotipo 2 con *B. afzelii*, los serotipos 3, 4, 5, 6, 7, 8 y del J1 al J9 con *B. garinii* y el serotipo J11 con *B. japonica* (Wang *et al.*, 1999). Los serotipos 3, 5, 6, 7 y 8 de *B. garinii* se mantienen fundamentalmente en aves (Rudenko *et al.*, 2011), mientras que el serotipo J2 de *B. garinii* se asocia a roedores e insectívoros (Estrada-Peña *et al.*, 2011). Asimismo, Rudenko *et al.* (2011) han señalado que el serotipo 4 de *B. garinii* es altamente patógeno para las personas, siendo aislado del LCR de enfermos con neuroborreliosis y en ratones de campo (*Apodemus* spp.).

La OspC, aumenta su expresión desde el momento en que la garrapata comienza a alimentarse, de manera que su nivel será elevado cuando la bacteria se transfiere al mamífero hospedador. El aumento de la OspC, facilita la invasión de la bacteria en la piel y su diseminación hematogena (Munderloh *et al.*, 2005; Stanek *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014).

Las especies de *Borrelia* producen proteínas de choque térmico cuando se encuentran sometidas a una elevación de la temperatura, a privaciones de oxígeno y nutrientes o a la exposición de radicales de oxígeno. Estas proteínas tienen un gran número de funciones fisiológicas como son el plegamiento, desplegamiento y translocación de polipéptidos o el ensamblaje y desensamblaje de complejos multiméricos cuando la bacteria se encuentra bajo situaciones estresantes (Caride, 2002).

Las proteínas responsables de la resistencia frente a la lisis por el complemento del hospedador (“*Complement Regulatory-Acquiring Surface Proteins*”) o CRASPs se expresan en la superficie de la membrana externa. Éstas se ligan a las proteínas inhibitoras del complemento (factor H y otra proteína similar al factor H) del propio hospedador e impiden la inserción del complejo de ataque a la membrana. Esto permite la supervivencia de la bacteria en la sangre del hospedador. Las CRASPs varían según las distintas genoespecies de *Borrelia* y cada una de ellas se liga específicamente a las proteínas reguladoras de las distintas especies de hospedadores (Skinner *et al.*, 2007). En consecuencia, los alelos que codifican tales

variantes determinan el rango de hospedadores vertebrados competentes para cada genoespecie de *Borrelia* (Kurtenbach *et al.*, 2002).

1.1.3. Determinantes patogénicos.

B. burgdorferi presenta diversos mecanismos capaces de desencadenar una acción patógena, y se ha establecido una clara relación entre su dotación plasmídica y su capacidad de provocar infección (Purser *et al.*, 2000).

Posee enzimas capaces de disolver proteínas, lípidos y colágeno, que permiten la penetración y diseminación tisular, así como inducir y activar peptidasas y enzimas fibrinolíticos responsables de la destrucción de la matriz celular (Kamradt *et al.*, 2002).

Por otro lado, es capaz de activar el plasminógeno sanguíneo que tiene un gran poder quimiotáctico sobre distintas células inflamatorias. *Borrelia*, estimula indirectamente la producción de diversas citoquinas pro-inflamatorias (interleucinas 1 y 6, y el factor de necrosis tumoral alfa) que están relacionadas con la reacción inflamatoria que acompaña a la enfermedad. La respuesta inmune normalmente protectora, no es eficaz para erradicar estos microorganismos, pero sí contribuye a la enfermedad mediante mecanismos autoinmunes. Esta reacción está basada en la reactividad cruzada antigénica entre epítomos comunes al agente y al hospedador, especialmente localizados en las llamadas proteínas de choque térmico (Skinner *et al.*, 2007). Además, las lipoproteínas que expresa durante la infección también son capaces de activar células como los macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, mastocitos, células B o células de la glía favoreciendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria (Stanek *et al.*, 2003).

En definitiva, *Borrelia* es capaz de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para su supervivencia, lo que le permite acantonarse en los tendones y en el cerebro, donde las células del sistema inmune tienen difícil acceso. Se conoce la ausencia de especificidad en la adherencia a superficies celulares, aunque hay evidencia de la participación de un receptor de manosa en la adhesión de *B. burgdorferi* a las células de sistema monocito-macrófago o matrices extracelulares, lo que le permite colonizar una amplia variedad de tejidos. Sin embargo, las distintas especies presentan un tropismo tisular diferente, expresándose en la variabilidad clínica de las infecciones. Esta variabilidad vendría determinada por una predilección por estructuras con elevada composición de tejido conectivo, células cerebrales y células endoteliales, posiblemente por la existencia en la bacteria de un receptor para N-acetilglucosamina (NAG) (Pachner *et al.*, 1998; Navarro, 2005).

No se ha demostrado la producción de toxinas propias por parte de *B. burgdorferi*. La mayor parte del daño que produce en su hospedador lo ocasionan las reacciones inflamatorias que es capaz de generar (Stanek *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014).

Se considera que la existencia de un flagelo le confiere a *Borrelia* la capacidad de girar sobre sí misma, moviéndose de una forma característica que le permite desplazarse mejor entre las células de los tejidos, lo que favorece su diseminación y su paso desde el vector al hospedador (Sultan *et al.*, 2013). Además, *B. burgdorferi* puede suprimir la respuesta inmune local, disminuyendo la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) en las células de Langerhans, como se demuestra en la acrodermatitis crónica atrófica (Silberer *et al.*, 2000).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

1.2.1. Vectores biológicos

Un vector biológico es un artrópodo hematófago que, además de infectarse con un patógeno que se multiplica o evoluciona en su interior, es capaz de transmitir dicho agente a un nuevo hospedador (Rodhain, 1985; Martínez *et al.*, 1999). Existe un elevado número de artrópodos que actúan como vectores biológicos, siendo los arácnidos y, concretamente las garrapatas, el segundo grupo que más importancia tiene como vector biológico después de los dípteros (De la Fuente *et al.*, 2008; Estrada-Peña *et al.*, 2008).

Hoogstraal (1985) señaló que las garrapatas son ectoparásitos obligados que poseen características estructurales, fisiológicas, biológicas y de comportamiento que permiten la transmisión de una gran variedad de patógenos. Además, para Estrada-Peña *et al.* (1995) los vectores eficientes, entre los que se encuentran las garrapatas, son los que tienen propiedades fisiológicas y ecológicas que permiten la infección y promueven la transmisión de un agente patógeno a los hospedadores sensibles a él.

Las garrapatas pertenecen al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida, Subclase Acari, Suborden Ixodida (= Metastigmata), Familias Argasidae e Ixodidae. La familia Argasidae o garrapatas blandas, se caracterizan por poseer una cutícula de tipo coriáceo, por carecer de escudo dorsal y por alimentarse rápidamente, permaneciendo en el hospedador sólo el tiempo necesario para hacerlo. Los argásidos son, fundamentalmente, parásitos de aves y reptiles y su principal importancia económica en Europa se debe a que algunas especies transmiten la peste porcina africana (Estrada-Peña, 1994) o la fiebre recurrente transmitida por garrapatas en humanos (Croche *et al.*, 2015).

La familia Ixodidae o garrapatas duras, unen a su aspecto coriáceo la presencia de un escudo dorsal. Éste cubre totalmente el dorso de los machos y sólo el tercio anterior en las hembras; también está presente de forma incompleta en las larvas que son hexápodos y en las ninfas que ya son octópodos. Parasitan a vertebrados terrestres y la mayoría de las especies transmiten un importante número de patógenos tanto al hombre como a los animales (Estrada-Peña *et al.*, 1994).

Los principales géneros de ixódidos que parasitan a los animales en Europa y concretamente en España son: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* y *Boophilus* (Estrada-Peña, 1994).

Según diferentes autores (Roca *et al.*, 2006; Stanek *et al.*, 2012; Biesiada *et al.*, 2012) las principales especies de *Ixodes* y su distribución mundial son: *I. dammini* (= *I. scapularis*) e *I. pacificus* en el noreste y en el oeste de EE.UU., respectivamente. *I. persulcatus* en Asia (China, Japón y Corea) y en el este de Europa (Rusia) e *I. ricinus* en Europa.

Roca (2006) comprobó que, en Europa, las garrapatas del género *Ixodes* son los principales vectores de *B. burgdorferi*. Además, en Castilla y León, Fernández (2003) de un total 3.059 garrapatas retiradas de personas, comprobó que el 43,2% eran *I. ricinus* y sólo se detectó *B. burgdorferi* en esta especie. Esta garrapata puede transmitir a través de su picadura otros agentes patógenos para el hombre como *Anaplasma phagocytophilum* causante de la anaplasmosis granulocítica humana, parásitos como *Babesia* spp. (babesiosis humana) o el virus de la encefalitis humana transmitida por garrapatas (Estrada-Peña *et al.*, 2012, Márquez-Jiménez *et al.*, 2005; García-Meléndez *et al.*, 2014; Perrone *et al.*, 2014).

1.2.1.1. Características morfológicas y biológicas de *Ixodes ricinus* como principal vector de *Borrelia*.

Las garrapatas del género *Ixodes* se caracterizan porque en su superficie ventral se aprecia claramente un surco anal que se curva y rodea al ano por su porción anterior, siendo el único género que posee esta característica. El escudo carece de ornamentación y los ojos están también ausentes. Los machos tienen gruesas placas ventrales esclerotizadas.

En España, la especie más importante es *I. ricinus*, que como todas las especies de la Familia Ixodidae, tiene un escudo dorsal de naturaleza quitinosa. Este escudo, cubre la totalidad del idiosoma en los machos y está limitado al tercio anterior del idiosoma en las hembras. En la parte anterior de la garrapata, es decir el gnatosoma o *capitulum*, se integran las piezas bucales y los palpos y, como es característico de los ixódidos, se pueden observar dorsalmente porque no están cubiertas por el escudo dorsal (Figura 1.2). El hipostoma es largo, puntiagudo y con multitud de dientes orientados hacia atrás (Estrada-Peña, 1994; Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).



Figura 1.2. *I. ricinus* hembra (izquierda) y macho (derecha).

Las garrapatas, para localizar a sus hospedadores, se sirven del órgano de Haller, que está situado en el primer par de patas, y de las cerdas sensoriales. Los ixódidos cuando están esperando a un hospedador presentan su primer par de patas hacia delante a modo de antenas (Figura 1.3) y se sitúan en la parte superior de la vegetación o de diferentes soportes para detectar a sus hospedadores. Los estadios inmaduros se fijan a sus hospedadores fundamentalmente en la cabeza y, en especial, en la cara, mientras que los adultos lo hacen en las partes inferiores del cuerpo de los animales, sobre todo en el área inguinal y en la cara medial de las extremidades (Estrada-Peña, 1994; Vázquez *et al.*, 2011).



Figura 1.3. Ixódidos a la espera de un hospedador

Entre los factores que facilitan a las garrapatas la localización de los hospedadores se encuentran el dióxido de carbono que exhalan éstos, las vibraciones que originan, el calor que desprenden, las modificaciones de la luminosidad y las corrientes de aire creadas por el propio hospedador (Junta de Castilla y León, 1995).

La actividad de las garrapatas y, por tanto, la búsqueda de hospedadores, está condicionada por mecanismos de inactividad o diapausa. Estos mecanismos permiten a las garrapatas evitar fases de búsqueda de hospedadores cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Esta fase de inactividad de las garrapatas se produce en diferentes momentos de su ciclo estacional y se puede manifestar como diapausa de comportamiento que conlleva una quiescencia de las garrapatas sin alimentar o como diapausa de desarrollo que determina el desarrollo de los huevos o de las diferentes fases ya alimentadas. La inducción de la diapausa está determinada, fundamentalmente, por el fotoperiodo, mientras que su intensidad viene determinada por una gran variedad de factores, incluyendo los genéticos de la población local de garrapatas. Esta variabilidad de factores, junto con los que afectan directamente a la actividad de las garrapatas (naturaleza del hábitat, disponibilidad de hospedadores apropiados y clima) son los responsables de las grandes variaciones intraespecíficas en la actividad estacional de estos ectoparásitos en las distintas áreas geográficas, según la European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB, 2009).

Las variaciones de la actividad de las fases libres de los ixódidos están estrechamente relacionadas con el microclima. Para cada especie existe un umbral de temperatura, por debajo del cual hay un retraso en la producción de huevos y en el desarrollo de estos y de las larvas. Normalmente necesitan una temperatura que oscile entre -10 y $+35^{\circ}\text{C}$, aunque tolerarían oscilaciones mayores pero sólo durante cortos períodos de tiempo (Estrada-Peña *et al.*, 2012). Además de que las temperaturas sean adecuadas tiene que haber una humedad relativa no inferior al 80% porque si no las garrapatas, especialmente las larvas y las ninfas, se desecan y mueren (Anderson *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2009; Estrada-Peña *et al.*, 2012). Los adultos, al tener una cubierta quitinosa más desarrollada se defienden mejor de la evaporación (Barral *et al.*, 1994).

En Europa, los hábitats principales de *I. ricinus* son los bosques caducifolios, las zonas de arbustos y los pastizales húmedos y cubiertos de maleza, debido a que estas garrapatas sólo pueden sobrevivir en zonas donde haya una amplia cubierta de vegetación y de hojas cubriendo el suelo para que, durante los períodos del año más secos, se mantenga una humedad relativa adecuada (James *et al.*, 2014). Además, en estas áreas, debe haber un amplio número y variedad de hospedadores para que se puedan alimentar los diferentes estadios de esta garrapata (EUCALB, 2009; Estrada-Peña *et al.*, 2012).

I. ricinus se distribuye por el Este de Europa (desde la antigua URSS hasta el Mar Caspio y norte de Irán) y por diversos países del Centro y Sur de Europa. También se ha hallado en el Norte de África, donde se piensa que se ha dispersado a través de pájaros migratorios (Estrada-Peña *et al.*, 2012).

En España *I. ricinus* está ampliamente distribuida aunque debido a la elevada exigencia higrométrica de esta especie, es más abundante en la Cornisa Cantábrica y en el nordeste de España. Esta distribución se corresponde con la zona norte de la Península Ibérica (Galicia, Asturias, Cantabria, País Vasco, Castilla y León, Madrid, Aragón y Cataluña) donde han sido diagnosticados la mayoría de los casos de EL en España (Guerrero *et al.*, 2001; Pazos *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2014).

I. ricinus, según Estrada-Peña (1994), tiene un amplio rango de hospedadores, los adultos parasitan fundamentalmente a rumiantes, mientras que los estadios inmaduros se alimentan de un amplio número de micromamíferos y pequeñas aves. Este hecho conlleva importantes implicaciones epidemiológicas en la difusión y distribución de la EL. Además como se señala en EUCALB (2009), los estadios inmaduros pueden parasitar a casi todos los animales de sangre caliente, así como a los reptiles, aunque las larvas se alimentan mejor que las ninfas sobre pequeños mamíferos; mientras que las hembras sólo se alimentan con éxito en grandes animales como ciervos, ovejas, vacas y perros.

En España, *I. ricinus* está activa prácticamente durante todo el año aunque tiene 2 períodos de máxima actividad, uno en primavera-principios de verano y otro a finales de verano-otoño (Estrada-Peña, 1994; Portillo *et al.*, 2014). No obstante, en algunas zonas geográficas y, siempre en función del clima, puede estar activa incluso en invierno, puesto que, aunque la temperatura influye sobre el desarrollo de los ciclos biológicos de los ixódidos, es la humedad relativa del ambiente la que juega un papel primordial, no tanto sobre la velocidad a la que se producen las diferentes fases termodependientes, sino sobre la capacidad de supervivencia de los distintos estadios (Estrada-Peña, 1994).

En el **ciclo biológico de *Ixodes ricinus***, se alternan períodos de vida libre con fases parásitas. *Ixodes* es una garrapata que durante su vida se alimenta en 3 hospedadores diferentes (Figura 1.4). En climas templados y húmedos, su ciclo dura aproximadamente 2 años. Según Alonso (2012), el hombre es un huésped casual que no actúa como reservorio.

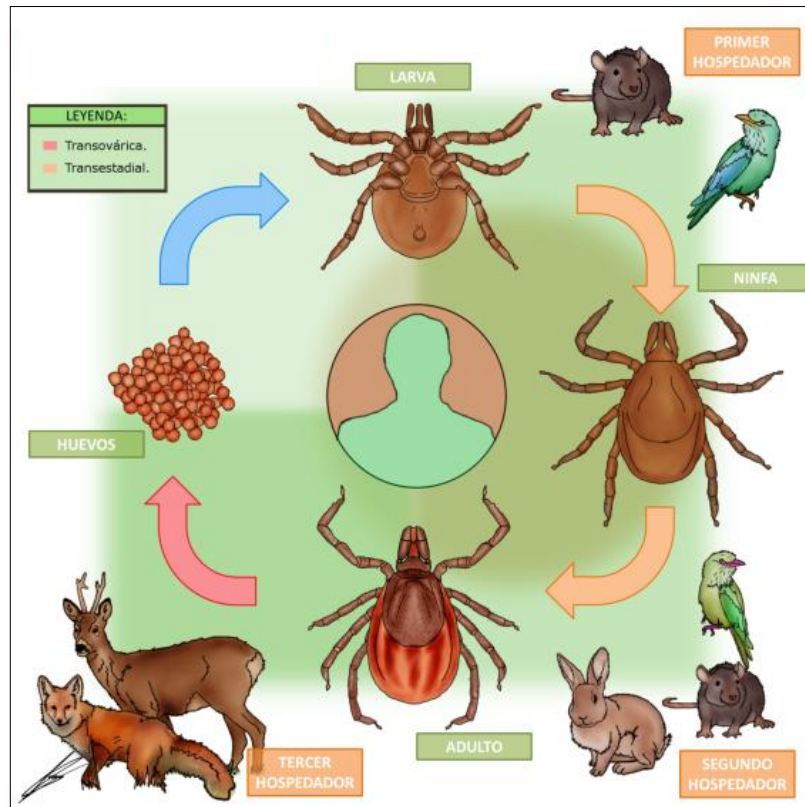


Figura 1.4. Ciclo biológico de *Ixodes ricinus* y *Borrelia* (Remesar-Alonso, 2015).

A finales de la primera primavera, las larvas emergen del huevo y se alimentan sobre el primer hospedador, caen al suelo y a principios de la segunda primavera mudan a ninfas que se alimentan del segundo hospedador, caen de nuevo al suelo y finalmente las hembras se alimentan del tercer hospedador a finales del segundo otoño-invierno. Todos los estadios aparecen casi simultáneamente a lo largo de la estación de actividad, aunque las ninfas y los adultos empiezan a alimentarse unas 4 semanas antes que las larvas (Estrada-Peña, 1994).

La hembra adulta es hematófaga y, tras ser fecundada por el macho, ingiere sangre durante 5-7 días del tercer hospedador que preferentemente son mamíferos de gran tamaño entre los que se incluye el hombre. Una vez repleta de sangre cae al suelo donde deposita los huevos y muere. Por el contrario, los machos del género *Ixodes* no se alimentan o realizan una minúscula ingestión de sangre para completar la espermatogénesis (Estrada-Peña, 1994; Estrada-Peña *et al.*, 2011).

Cuando las condiciones atmosféricas son adecuadas, de los huevos nacen las larvas que son hexápodos y miden menos de 1 mm. Éstas ingieren sangre, durante 3-4 días, del primer hospedador que, generalmente, son aves o pequeños mamíferos silvestres (roedores, erizos, ardillas, lagomorfos, etc.), posteriormente caen al suelo donde mudan a ninfas.

Las ninfas son un poco más grandes (2 mm) que las larvas y ya poseen cuatro pares de patas. Son también hematófagas y se alimentan durante varios días en el segundo hospedador que, generalmente, son también aves o micromamíferos silvestres, aunque también se alimentan de rumiantes domésticos o silvestres e incluso del hombre. Cuando están repletas de sangre caen al suelo y mudan a adultos que tienen que alimentarse del tercer hospedador para completar el ciclo.

Las larvas y las ninfas una vez que han ingerido sangre y se han desprendido del hospedador, deben buscar un microhábitat aislado y apropiado para realizar la muda debido a que ésta es un proceso extremadamente complicado y dinámico durante el cual ocurren muchos cambios hormonales y enzimáticos, así como alteraciones en los contenidos intestinales y textura. Asimismo, las hembras tras la cópula y haberse alimentado también necesitan un microhábitat similar al de los estadios inmaduros para depositar los huevos y que estos puedan dar lugar a larvas.

En las garrapatas el principal mecanismo de transmisión de patógenos es la inoculación directa a través de su saliva cuando se están alimentando sobre un hospedador y por las regurgitaciones que se producen desde el intestino medio. También se ha demostrado como mecanismo de transmisión entre vectores y en ausencia de infección sistémica del hospedador, la transmisión por coalimentación (alimentación próxima y simultánea) al permanecer el microorganismo en el lugar de su inoculación cierto tiempo antes de producirse la diseminación (Randolph *et al.*, 1996).

Ixodes sólo se alimenta una vez en cada estadio, por lo que si las larvas se alimentan de un hospedador reservorio de *Borrelia*, transmite la espiroqueta a la ninfa y posteriormente a los adultos (transmisión transestadial). Las larvas raramente se encuentran infectadas, de lo que se deduce que la transmisión transovárica no es común. No obstante, diversos autores (Burgdorfer *et al.*, 1982; Magnarelli *et al.*, 1988) observaron que cuando las garrapatas albergan un elevado número de borrelias, estas pueden atravesar la pared intestinal y producir una infección sistémica (espiroquetemia) colonizando distintos órganos, en particular el ganglio central y los ovarios, pudiéndose transmitir transováricamente a su descendencia sin que medie ningún animal como fuente de infección, calculándose que este tipo de transmisión puede suponer el 1% de la transmisión de *Borrelia* (Figura 1.4).

Matuschka *et al.* (1994) señalaron que los adultos de los ixódidos tienen el doble de posibilidades de estar infectados que las ninfas, puesto que estas últimas habrían estado expuestas a la infección sólo una vez, como larva, mientras que los adultos habrían estado expuestos 2 veces, una como larva y otra como ninfa.

Según diversos autores (EUCALB, 2009; Caride *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2012) el ciclo de *I. ricinus* determina que la mayoría de los brotes de la EL se produzcan en primavera y otoño, correspondiéndose con la presencia de garrapatas en la vegetación, con los períodos de alimentación de estas y con el tiempo de incubación de la enfermedad. Por ello, es necesario predecir las zonas de mayor riesgo de infección del hombre por garrapatas y de esta forma desarrollar programas de protección frente a ellas (Estrada-Peña *et al.*, 2011).

1.2.1.2. Prevalencia de infección por *Borrelia* en *Ixodes ricinus* procedentes del ambiente y de diferentes hospedadores.

Entre los factores que más importancia tienen desde el punto de vista epidemiológico en la EL, además del grado de exposición de la población a la picadura de garrapata, se encuentra la densidad de estas y el porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia* (Sprong *et al.*, 2012). En definitiva cuanto mayor sea el número de garrapatas existentes en una zona y el porcentaje de éstas infectadas por *Borrelia*, la probabilidad de picadura por garrapata será superior y también se incrementará la posibilidad de transmisión de *B. burgdorferi* al hombre.

Recientemente, Estrada-Peña *et al.* (2011) determinaron la prevalencia de ninfas infectadas por *Borrelia* en el continente europeo y sitúa a la cornisa cántabra española en una zona de baja prevalencia, aunque delimita un área (sur de Cantabria, Asturias y Galicia) de

prevalencia moderada en la que el nivel de infección de las ninfas es similar al de otros países europeos como Holanda y Bélgica.

Se han realizado diversos estudios para determinar el porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia* y se ha comprobado que estos varían de unos países a otros. También esta prevalencia difiere con el origen de la garrapata, es decir si se han recogido del ambiente o de los diferentes hospedadores en los que se haya alimentado.

A. De la naturaleza.

En la mayoría de los estudios realizados en distintos países europeos, no diferencian si *I. ricinus* son adultos o inmaduros, siendo la prevalencia de infección por *B. burgdorferi*, en orden decreciente del: 16,5% en Alemania (Schwarz *et al.*, 2012), 14,3% en el noroeste de Noruega (Tveten *et al.*, 2013), 8,2% en Estonia (Geller *et al.*, 2013), 6% en Dinamarca (Jensen *et al.*, 2000), 5,4% en Polonia (Cisak *et al.*, 2006), 1% en Inglaterra (Bettridge *et al.*, 2013).

Cuando se diferencia la prevalencia de infección entre adultos y estadios inmaduros, ésta es superior en los adultos: 35% en Suiza, (Jouda *et al.*, 2004), 33,3% en Noruega (Soleng y Kjelland, 2013), 22,9% en Polonia (Stanczak *et al.*, 2000), que en las ninfas: 20% en Suiza (Jouda *et al.*, 2004), 11,3% en Noruega (Soleng y Kjelland, 2013), 5% en Dinamarca (Jensen *et al.*, 2000), 5,3% en Polonia (Stanczak *et al.*, 2000) y 1,3% en Italia (Rizzoli *et al.*, 2004).

En el Norte de España (País Vasco), Barral *et al.* (2002) y Barandika *et al.* (2008) señalaron que el porcentaje de adultos de *I. ricinus* infectados por *B. burgdorferi* era del 9,3 y del 1,7%, respectivamente. Respecto al porcentaje de ninfas infestadas, Barral *et al.* (2002) y Ruiz-Fons *et al.* (2012) obtuvieron prevalencias del 1,5% y del 4% en el País Vasco y Asturias, respectivamente.

B. De micromamíferos.

Los ratones de campo (*Apodemus flavicollis* y *A. sylvaticus*) y los topillos (*Myodes glareolus* y *Microtus arvalis*) son las principales especies de micromamíferos en las que se ha estudiado que porcentaje de garrapatas de la especie *I. ricinus* estaban infectadas por *Borrelia*.

En ratones de campo (*A. flavicollis*) recogidos en Noruega, Radzijevskaia *et al.* (2013) observaron que el 2,4% de las larvas y el 12,1% de las ninfas de *I. ricinus* estaban infectadas por *B. burgdorferi* s.l. Estos mismos autores en *A. flavicollis* de Lituania, detectaron una prevalencia de infección del 1,7% en las larvas y no hallaron ninfas infectadas; además, comprobaron que la prevalencia de infección de *I. ricinus* obtenidas de topillos (*M. glareolus* y *M. arvalis*) era netamente superior, puesto que el porcentaje de larvas infectadas era de 25,6% y 20% respectivamente, mientras que en las ninfas la prevalencia de infección era de 32 y 35%.

Gassner *et al.* (2013), en ratones de campo (*A. sylvaticus*) recogidos en Holanda, detectaron una prevalencia de infección de *B. burgdorferi* s.l. del 2,1% y del 2,9 en larvas y ninfas, respectivamente. Este porcentaje fue netamente superior cuando examinaron larvas (7,2%) y ninfas (50%) de *I. ricinus* obtenidas de topillos (*M. glareolus*) lo que coincide con lo señalado Radzijevskaia *et al.* (2013), quienes también hallaron mayores prevalencias de infección por *B. burgdorferi* s.l. cuando las garrapatas procedían de los topillos que cuando se obtenían de los ratones. Por el contrario, en Suiza, Pérez *et al.* (2012) obtuvieron una prevalencia de infección de *B. burgdorferi* s.l. en ninfas de *I. ricinus* recogidas de *M. glareolus* (26,8%) inferior a la hallada en *A. sylvaticus* (32%) pero superior cuando las ninfas eran de *A. flavicollis* (23%).

C. De aves.

Kjelland *et al.* (2010) comprobaron que el 4,4% de las garrapatas obtenidas de aves migratorias de Noruega, estaban infectadas por *B. burgdorferi s.l.*, predominado la genoespecie *B. garinii* (77,8%). Asimismo, estos autores, en garrapatas recolectadas de aves paseriformes de Noruega, fundamentalmente tordos o mirlos (*Turdus spp.*), observaron que 13,6% de las ninfas y el 8,1% de larvas, estaban infectadas por *B. burgdorferi s.l.* y que también predominaba *B. garinii*.

En España, Palomar *et al.* (2012), comprobaron que el 13,1% de los *I. ricinus* retiradas de aves paseriformes de La Rioja estaban infectadas por *B. burgdorferi s.l.*, siendo *B. garinii* la genoespecie más prevalente; en menor proporción hallaron *B. valaisiana* y *B. afzelii*.

D. De corzos.

Rijpkema *et al.* (1996) encontraron que el 40% de los machos de *Ixodes* estaban infectados por *B. burgdorferi s.l.* y que este porcentaje era inferior (20%) en las hembras que todavía no se habían alimentado de los corzos. Posteriormente, Kjelland *et al.* (2011) observaron que el 2,9% de las ninfas procedentes de corzos abatidos en Noruega eran positivas a esta espiroquetas, mientras que no hallaron ningún adulto de *I. ricinus* infectado con *B. burgdorferi s.l.*

1.2.2. Tipos de hospedadores de *Borrelia*.

Se define como hospedador a un organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí. En relación con el ciclo de transmisión de *Borrelia*, destacan los siguientes tipos de hospedadores:

- De coalimentación: en él no se multiplica el patógeno, pero contribuye a aumentar el número de vectores infectados al alimentarse próximamente. En ausencia de infección sistémica del hospedador, se puede transmitir *B. burgdorferi* desde una garrapata infectada a otra no infectada al alimentarse simultáneamente de forma próxima (un centímetro o menos) sobre un hospedador. Además también se ha demostrado que *Borrelia* permanece en el lugar de su inoculación durante un determinado tiempo que sería suficiente para poder infectar a un vector que se alimente en ese lugar del hospedador (Pichón *et al.*, 2000).
- De barrera: además de resistir a la infección es capaz de eliminar la infección de las garrapatas que se alimentan sobre él.
- De reproducción o de mantenimiento: en ellos se alimentan las garrapatas adultas y son esenciales para la reproducción o el mantenimiento de la población de estos vectores.
- Reservorio competente: el agente infeccioso vive, se multiplica y depende, en gran medida para su subsistencia, de él. El hospedador reservorio debe permitir el incremento de la infección del patógeno en los vectores, amplificar su diseminación y favorecer su conservación cuando existan condiciones desfavorables para su transmisión (Pichón *et al.*, 2000).

Para establecer la capacidad de un animal como reservorio competente en un determinado hábitat hay que tener en cuenta la capacidad de éste para infectar los vectores (incluyendo el período de tiempo que persiste la infección, en este caso de la espiroquetemia), la abundancia de los hospedadores reservorio en el hábitat, y la proporción de la población de vectores alimentados en el reservorio competente (Mather *et al.*, 1989).

Al menos se han descrito 237 especies de animales que podrían estar implicadas en el mantenimiento de la garrapata *I. ricinus* y, por lo tanto, son susceptibles de comportarse como reservorio para *Borrelia* (Gern *et al.*, 2008). *B. burgdorferi s.l.* utiliza como hospedador reservorios a numerosas especies de animales vertebrados, fundamentalmente, aves y pequeños mamíferos (Pichón *et al.*, 2000).

Diversos autores (Palomar *et al.*, 2009; Kjelland *et al.*, 2010; Hasle *et al.*, 2013) han comprobado que *Ixodes ricinus* se alimenta sobre las aves y que éstas son reservorios competentes de *B. burgdorferi s.l.* Debido a que las aves migratorias son capaces de recorrer grandes distancias, incluso atravesar océanos y desiertos, tienen un papel importante en la diseminación de los agentes infecciosos transmitidos por garrapatas, entre los que se encuentra la *Borrelia*. De hecho, en un estudio reciente realizado en Noruega en aves migratorias, especialmente en mirlos, Hasle *et al.* (2013) comprobaron que la mayoría de estas aves son capaces de transportar garrapatas, de adquirir la infección por *Borrelia* (sobre todo *B. garinii* y *B. burgdorferi s.s.*) y de transmitirla a otras garrapatas que se alimenten de ellas, demostrando el papel de algunas aves migratorias como diseminadoras de la EL.

En Europa, según diversos autores (Gern *et al.*, 1994; EUCALB, 2009) hay diversas especies de mamíferos como reservorios competentes. La mayoría son roedores y, en menor proporción, se encuentran algunos lagomorfos, insectívoros y carnívoros. Entre los roedores, destaca la intervención de los ratones de campo (*Apodemus* spp.) que pueden infectar a las garrapatas durante, al menos, 14 meses.

Kurtenbach *et al.* (2002) demostraron que la especificidad de los hospedadores competentes es de base molecular/genética y, como se señaló anteriormente, depende del complemento del hospedador y de las CRASPs. Cada cepa de *B. burgdorferi s.l.* expresa distintas variantes de CRASPs que ligan específicamente a las proteínas inhibitoras de diversos hospedadores, permitiendo la supervivencia de dicha cepa en los hospedadores y en las garrapatas que se alimenten de ellos, lo cual determina el rango de hospedadores competentes.

Los ratones de campo infectados con *Borrelia*, son una fuente de infección, durante toda su vida, para las larvas de *I. ricinus* (Gern *et al.*, 1994). En España, Gil *et al.* (2005) detectaron ADN de *B. burgdorferi s.s.* en el 0,8% de *A. sylvaticus*. También los denominados ratones caseros (*Mus musculus*) pueden ser reservorios competentes y, según Gern *et al.* (1998), en Rusia y otros países del Este de Europa están implicadas otras especies de pequeños roedores. Otros reservorios competentes son los topillos (*Clethrionomys* spp.), de los que se alimentan muchas ninfas (EUCALB, 2009). Además, se ha observado mayor infección por *Borrelia* en estos que en los ratones de campo (Guerrero *et al.*, 2001). En Castilla y León, Fernández-Soto (2003) asoció la plaga de topillos que hubo en 1997 con el incremento de infección por *Borrelia* en *I. ricinus*. Las ardillas grises (*Sciurus carolinensis*) y rojas (*S. vulgaris*) pueden infectar y transmitir *B. burgdorferi s.l.* a las garrapatas que se alimentan sobre ellas (Gern, 2000). El lirón (*Glis glis*) actúa más eficazmente como un hospedador reservorio de *Borrelia* que otros roedores (Matuschka *et al.*, 1994).

Entre los lagomorfos, se ha comprobado que las liebres (*Lepus* spp.) son un reservorio competente; por el contrario, no se conoce exactamente la intervención de los conejos (*Oryctolagus cuniculi*) debido a que no son buenos hospedadores de los ixódidos y, además, porque en el análisis del escaso número de garrapatas recolectadas en ellos no se detectó *Borrelia* (Matuschka *et al.*, 1992; Tälleklint *et al.*, 1993; EUCALB, 2009).

Algunos insectívoros, como las musarañas (*Sorex* spp., *Neomys* spp.) y los erizos (*Erinaceus* spp.) también son hospedadores reservorios (EUCALB, 2009; Guerrero *et al.*, 2001).

Respecto a la intervención de los carnívoros y, concretamente de los silvestres, se han detectado anticuerpos de *B. burgdorferi* en coyote y mapache (*Procyon lotor*) en el norte de América, así como en zorro y tejón en Europa (Burgess *et al.*, 1989; Doby *et al.*, 1991; Gern *et al.*, 1998). También se ha aislado *B. afzelii* en diferentes tejidos del zorro (*Vulpes vulpes schrencki*), así como de las garrapatas recogidas a partir de él (*I. persulcatus*) en Asia (Isogai *et al.*, 1994a). Sin embargo, en un estudio realizado en el País Vasco sobre los carnívoros silvestres como reservorios de enfermedades, Gerrikagoitia (2010) no halló ningún animal infectado con *Borrelia*.

Los perros (*Canis familiaris*) son reservorios competentes aunque durante un corto período de tiempo tras su infección, ya que desarrollan rápidamente una respuesta inmune protectora. Dada la estrecha relación de los hombres con los perros, éstos se consideran como animales centinela para la EL, permitiendo marcar geográficamente aquellas zonas de mayor riesgo, de ahí su importancia eco-epidemiológica (Bhide *et al.*, 2004). En España, Miró *et al.* (2013) comprobaron que, en Galicia, se detectaba el mayor porcentaje de perros seropositivos.

No obstante, no todos los hospedadores antes citados actúan como reservorios competentes para todas las genoespecies de *B. burgdorferi*; por el contrario, la mayoría de los estudios muestran que cada genoespecie, e incluso cada cepa de una misma genoespecie, se mantiene en la naturaleza mediante un espectro diferente de hospedadores vertebrados, lo que sugiere la existencia de una asociación altamente específica entre cepa y hospedador (Gern, 2008).

En Europa, según Estrada-Peña *et al.* (2011), la mayoría de genoespecies de *B. burgdorferi* se han especializado en infectar a un determinado grupo de vertebrados. De esta manera los reservorios vertebrados actúan como filtros biológicos al seleccionar las especies de *Borrelia* compatibles con el medio ambiente fisiológico del hospedador y luego transmiten estas genoespecies a las siguientes garrapatas que se alimenten sobre ellos.

Diversos autores han señalado que existen algunas asociaciones muy específicas, como la de *B. afzelii* y pequeños roedores en Suiza (Humair *et al.*, 1995), la de *B. afzelii* y ardillas grises en Gran Bretaña (Craine *et al.*, 1997) y la de *B. burgdorferi* s.s. y *B. afzelii* y ardillas rojas en Suiza (Humair *et al.*, 1998). Asimismo, Estrada-Peña *et al.* (2011) observaron asociaciones entre OspA serotipo 2 de *B. afzelii* y OspA serotipo 4 de *B. garinii* que están presentes en roedores y en algunas especies de insectos.

A. El corzo y otros cérvidos como hospedadores de *Borrelia*.

Los corzos (*Capreolus capreolus*), ciervos (*Cervus elaphus*) y gamos (*Dama dama*) actúan como hospedadores de coalimentación y de mantenimiento pero no son hospedadores competentes o reservorios dado que no desarrollan la enfermedad (Pichon *et al.*, 2000; Kjelland *et al.*, 2011, Pato *et al.*, 2013).

Aunque la intervención del corzo en la epidemiología de *Borrelia* no está totalmente aclarada, diversos estudios han demostrado que estos animales son capaces de infectar a las garrapatas que se alimentan de ellos por el mecanismo de la coalimentación (Moestrup *et al.*, 2000; Pichon *et al.*, 2000, Kjelland *et al.*, 2011; Rizzoli *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2011; Sprong *et al.*, 2012). Además se ha detectado por PCR la presencia de *Borrelia* en la piel de estos corzos e incluso se ha comprobado que están vivas, lo cual permitiría la infección de garrapatas si se alimentan en la zona de piel contaminada (Pichon *et al.*, 2000). No obstante, según Kjelland *et al.* (2011) el corzo actúa también como hospedador barrera, dado que se ha observado que el porcentaje de garrapatas recogidas de la piel de los corzos infectadas por *Borrelia* es claramente inferior al hallado en las garrapatas recolectadas directamente de la vegetación en el mismo área geográfica de donde procedían los corzos. Es posible, por tanto,

que los cérvidos tengan un papel borrelícida o zooprofiláctico (Kjelland *et al.*, 2011; Isogai *et al.*, 1994b).

Se han ofrecido varias hipótesis para explicar la disminución de espiroquetas en el divertículo del intestino medio de las garrapatas cuando estas se alimentan sobre hospedadores no competentes, siendo las más importantes la ingestión de inmunoglobulinas del hospedador y una reacción mediada por complemento (Matuschka *et al.*, 1992; Lacombe *et al.*, 1993; Isogai *et al.*, 1994b; Clover *et al.*, 1995; Levin *et al.*, 1996; Kjelland *et al.*, 2011).

En diversos estudios realizados en diferentes países europeos como Dinamarca (Jensen *et al.*, 2000), Holanda (Sprong *et al.*, 2012) y Francia (Pichon *et al.*, 1999) se ha comprobado que cuando la densidad de corzos es mayor, también se registran poblaciones superiores de garrapatas. Sin embargo, Rosef *et al.* (2009) observaron que el grado de infestación de las garrapatas por *Borrelia* es mayor en zonas con menor densidad de corzos, debido a que al haber menos corzos disponibles las garrapatas tendrían que alimentarse de otros hospedadores, como los roedores, que sí son hospedadores competentes y de esta forma se favorecería la dispersión de *Borrelia*. De la misma manera, Rizzoli *et al.* (2004) y Kjelland *et al.* (2011) observaron que un incremento de la densidad de corzos se relacionaría con una mayor densidad de garrapatas pero con un menor porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia*. No obstante, estos últimos autores (Kjelland *et al.*, 2011) señalan que aunque los corzos no son hospedadores competentes, están implicados de forma crucial en la eco-epidemiología de la borreliosis, ya que actúan como hospedadores de mantenimiento para las garrapatas. Por el contrario, otros autores han observado que en las áreas con mayor densidad de corzos también existía un mayor porcentaje de garrapatas infectadas con *Borrelia*, lo que ocasionaba un mayor riesgo de adquirir la EL en los habitantes de esas zonas (Letrilliart *et al.*, 2005; Rizzoli *et al.*, 2011; James *et al.*, 2013).

En corzos procedentes de Holanda, Rijpkema *et al.* (1996) señalaron una seroprevalencia de infección por *B. burgdorferi* del 13%. Asimismo, esta seroprevalencia fue similar (13,3%) en corzos procedentes de zonas forestales próximas a París (Pichón *et al.*, 2000). En Dinamarca, Skarphedinsson *et al.* (2005) hallaron una seroprevalencia en corzos del 36,6%. En Inglaterra y Gales, Alonso *et al.* (2012) observaron que el 13,2% de los corzos eran seropositivos a *B. burgdorferi s.l.* y comprobaron que en el sur de la isla, que era donde se concentraban el mayor número de casos de EL, era también donde se apreciaba una seroprevalencia más elevada entre las poblaciones de rumiantes silvestres (corzos y ciervos). En un reciente trabajo realizado por nosotros (Pato *et al.*, 2013) en corzos abatidos en el Noroeste de España, comprobamos que el 68,8% eran positivos a *B. burgdorferi s.l.*, de los cuales el 88,7% estaban parasitados por *Ixodes ricinus*, siendo esta la única especie de garrapata que albergaban; además, comprobamos que el número de garrapatas que parasitan a los corzos era el factor que más influía sobre la seroprevalencia de *B. burgdorferi s.l.* Estos resultados sugieren que el corzo puede representar un importante indicador de la transmisión de *Borrelia* en el Noroeste de España debido a su abundancia y alto nivel de infestación por *B. burgdorferi* (Pato *et al.*, 2013).

1.2.3. Distribución de la enfermedad.

Dentro de las infecciones transmitidas por artrópodos, la EL es una de las más frecuentes en el mundo industrializado (Steere *et al.*, 2004). De hecho, es la enfermedad transmitida por picadura de garrapata más frecuente del hemisferio norte (Glatz *et al.*, 2015). Se considera una enfermedad emergente tanto en EEUU como en Europa (Parola *et al.*, 2001; Escudero-

Nieto y Guerrero-Espejo, 2005; Alonso *et al.*, 2012, Lledó *et al.*, 2014; García-Meléndez *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2014; Vázquez-López *et al.*, 2015).

Es una infección de distribución prácticamente cosmopolita puesto que, excepto en la Antártida, se ha descrito en todos los continentes, siendo más frecuente en el hemisferio norte (Portillo *et al.*, 2014, Vázquez-López *et al.*, 2015). No obstante, la distribución de la EL está condicionada por la distribución geográfica de sus vectores, especialmente por la de *I. ricinus*, así como por la densidad de sus hospedadores y por las condiciones edafoclimáticas de la zona. De hecho, se ha comprobado que los bosques caducifolios, las zonas de arbustos y los pastizales húmedos y cubiertos de maleza, son los hábitats más propicios para *I. ricinus*, principal vector de *Borrelia* spp. (Estrada-Peña *et al.*, 2012) y, según estos autores, debe haber un amplio número y variedad de hospedadores para que se puedan alimentar los diferentes estadios de esta garrapata y, en este sentido, se ha comprobado que, en Galicia, el corzo es uno de los hospedador de alimentación más importante para *I. ricinus* (Vázquez *et al.*, 2011; Pato *et al.*, 2013).

Debido a que los diversos cuadros clínicos de la EL están ocasionados por diferentes cepas de *Borrelia*, se acepta que la distribución de esta infección es heterogénea. De hecho, se ha observado que existe la posibilidad de que haya zonas geográficamente muy próximas con alta y baja incidencia, lo que indica que la EL tiene una distribución focal (Beceiro *et al.*, 2001, Vandenesch *et al.*, 2014).

También se ha comprobado que los habitantes del medio rural, al dedicarse fundamentalmente a labores agrícolas y ganaderas, tienen mayor contacto con la naturaleza y por tanto un riesgo superior de ser picados por una garrapata (Lledó *et al.*, 2004; Letrillart *et al.*, 2005; Linard *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2013).

En relación a la posible influencia de la edad de los paciente, se ha descrito una distribución bimodal con un pico de incidencia en la infancia (5-9 años) y otro en adultos (mayores de 60 años), probablemente debido a las actividades que se realizan en estas franjas de edad como son los juegos al aire libre o excursiones por el campo (López-Alberola 2006; Rizzoli *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2012; Espósito *et al.*, 2013b; Vandenesch *et al.*, 2014; Wilking *et al.*, 2014).

En general, no se han observado diferencias significativas en cuanto al sexo aunque predomina en los varones probablemente debido a que realizan mayor número de tareas relacionadas con la agricultura o con actividades forestales (Olmo *et al.*, 2014; Wilking *et al.*, 2014).

En Europa, la EL no es de declaración obligatoria en todos los países, calculándose que su incidencia en zonas endémicas oscila entre 16 y 140 casos por 100.000 habitantes/año (Deráková *et al.*, 2005). No obstante, la tasa anual de incidencia por 100.000 habitantes varía notablemente en función de la presencia de garrapatas infectadas, siendo muy baja (0,32 casos) en Inglaterra y Gales (Smith *et al.*, 2000) y más elevada (111 casos) en Alemania (Huppertz *et al.*, 1999) y entre 130-135 casos en Suecia (Deráková *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha constatado una tendencia al alza en algunas zonas del sur de Europa como Italia, Francia, Portugal o España (Rizzoli *et al.*, 2011; Portillo *et al.*, 2014).

En España, diversos autores (Pazos *et al.*, 2010; Alonso *et al.*, 2012; Portillo *et al.*, 2014) coinciden en afirmar que la distribución de la EL no es uniforme y la mayor parte de los casos se han comunicado en el Centro y en el Norte de la Península. Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo en 2005, estimaron una incidencia en nuestro país en torno a 0,25 casos por 100.000 habitantes y año.

A pesar de la evidencia de que en España existe EL en distintas localizaciones geográficas, en la mayoría de ellas se desconoce cuál es la verdadera importancia de esta

enfermedad, ya que se han realizado escasos estudios poblacionales para conocer su incidencia y su seroprevalencia. Las encuestas epidemiológicas realizadas hasta el momento ofrecen cifras muy variables. Así, en la Rioja, Oteo-Revuelta *et al.* (1991) señalan una seroprevalencia del 5,8%. En la provincia de Soria, en un área colindante con la anterior, se ha comunicado una prevalencia global del 13,1%, con un amplio espectro según las diferentes áreas de salud. Según Tamayo *et al.* (1990), en la provincia de Valladolid, existe un elevado riesgo de infección puesto que más del 10% de la población presentan una respuesta seropositiva frente a *B. burgdorferi*. En Asturias, Martínez *et al.* (1993) y Asensi *et al.* (1993), comprobaron que según la población estudiada la prevalencia variaba entre el 8% y el 23%. Por el contrario, estudios realizados en Canarias, Sevilla y Barcelona (Carrasco *et al.*, 1992; López-Prieto *et al.*, 1989) señalan bajas seroprevalencias (4%) de infección. En Sabadell (Segura *et al.*, 2004) y en Navarra (Oteiza-Olaso *et al.*, 2011) se han hallado seroprevalencias del 4,4%.

Como ocurre en otros países europeos (Tomao *et al.*, 2005; Demet *et al.*, 2008), en España, se ha observado una seroprevalencia más elevada en personas con alto riesgo de sufrir picaduras por garrapatas como los trabajadores forestales (Segura *et al.*, 2004).

Diversos autores (Anda *et al.*, 1996) coinciden en que el número de casos clínicos de EL en España es bastante menor de lo que cabría esperar en función de la seroprevalencia observada, lo que hace pensar que deben existir casos de infección asintomática o subclínica, enfermos no correctamente identificados o la existencia de falsos positivos por reacciones cruzadas.

En España se han propuesto una serie de criterios epizootiológicos y epidemiológicos para definir “zona endémica de borreliosis de Lyme” (Oteo-Revuelta *et al.*, 1998b).

Epizootiológicos:

- a) Presencia de forma habitual en el área objeto de la declaración del artrópodo vector, *Ixodes ricinus*, recogido bien de la vegetación o de los animales de la zona.
- b) Presencia de *B. burgdorferi* en *I. ricinus* puesta de manifiesto mediante cualquiera de los siguientes métodos: microscopio de campo oscuro, inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cultivo.

Epidemiológicos:

- a) Existencia de al menos un caso anual de Enfermedad de Lyme en el área objeto de la declaración.

1.3. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.

Las garrapatas al alimentarse de un reservorio competente que esté en fase de espiroquetemia se infectan con *B. burgdorferi* y cuando estas pican a una persona le inoculan, a través de la saliva, dicha infección.

Los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan los síntomas propios de la infección por *B. burgdorferi* son bastantes complejos; entre ellos, interviene la propia respuesta inflamatoria del hospedador ante estos microorganismos (Skinner *et al.*, 2007).

En este apartado se van a desarrollar los mecanismos que utilizan las garrapatas para transmitir la infección a las personas, la diseminación de *B. burgdorferi* en el organismo y la respuesta del sistema inmunitario.

A. Transmisión de la infección a las personas.

Como se indicó anteriormente, la transmisión de *Borrelia* se produce durante la alimentación de las garrapatas en sus diferentes estadios. Estas perforan la piel de sus hospedadores y se anclan a éstos con ayuda del hipostoma; este proceso es lento e indoloro debido a que las garrapatas a través de la saliva eliminan sustancias anestésicas. Esto explica que sólo el 50-70% de las personas infectadas recuerden la picadura (Rodríguez-González *et al.*, 2013). Además, para fijarse al hospedador, la mayoría de las garrapatas duras segregan una sustancia semejante al cemento que está integrada principalmente por lipoproteínas y compuestos antigénicos. Estos últimos tienen la función de evadir la respuesta inmune del hospedador, ya que se induce la producción de anticuerpos frente a estos antígenos y no frente a los antígenos de la garrapata (Caride, 2002). Además, la sustancia cementante evita que el hipostoma entre en contacto directo con el hospedador y de esta forma no atraviesa la epidermis.

Las garrapatas son telmófagas, por lo que no se alimentan directamente sobre un vaso sanguíneo, sino que producen una lesión en la piel del hospedador en la que vierten una serie de sustancias que provocan inflamación y acumulo de sangre que la garrapata succiona con ayuda de su bomba faríngea. La succión de sangre se alterna, a intervalos cortos, con regurgitaciones. De esta manera la garrapata elimina el exceso de líquido para mantener su equilibrio hídrico e inocular sustancias antigénicas que evaden la respuesta inmune del hospedador junto con las borrelias (Caride, 2002). Al tiempo que la garrapata se alimenta, se produce una rápida multiplicación de *Borrelia* en su interior de modo que se origina un número de bacterias suficientemente elevado para infectar a los hospedadores (Piesman, 1995). Además durante la alimentación de la garrapata, las espiroquetas pasan a través del epitelio intestinal desde el intestino delgado hacia los alveolos de las glándulas salivares y finalmente, al cabo de 2 días a los conductos salivares desde donde serán inoculadas en el hospedador (Piesman, 1995; De Silva y Fikrig, 1996). Por ello, el periodo que permanece la garrapata adherida a la piel del hospedador es determinante para la transmisión de *Borrelia*, considerándose necesario un tiempo mínimo igual o superior a las 48 horas, siendo el riesgo aproximado al 100% cuando permanece adherida 72 horas o más (Biesiada *et al.*, 2012), por lo que, según estos últimos autores, si se extrae la garrapata antes de 2 días se reduce considerablemente el riesgo de adquirir la enfermedad. No obstante, hay casos en los que las borrelias se pueden transmitir al comienzo de la alimentación de las garrapatas debido a que puede haber espiroquetas en sus glándulas salivares, como consecuencia de que se hayan alimentado parcialmente con anterioridad. Así, se ha demostrado que la transmisión puede ocurrir en menos de 24 horas y algunas especies de garrapatas (especialmente *I. persulcatus*) pueden tener espiroquetas en sus glándulas salivares aun sin alimentarse (EUCALB, 2009); no obstante, en general, el número de espiroquetas presentes en las garrapatas antes de que éstas empiecen a alimentarse suele ser insuficiente para infectar al hospedador.

Las condiciones que soportan las espiroquetas en el vector parecen condicionar su posterior acción patógena. Así, las reacciones bioquímicas que tienen lugar dentro de las garrapatas durante su alimentación pueden influir en la expresión de las diferentes lipoproteínas de membrana OspA/B y OspC. La Osp A se expresa fundamentalmente durante el otoño, invierno y comienzo de la primavera cuando la garrapata permanece inactiva (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005). A finales de primavera y en verano, cuando las garrapatas comienzan a alimentarse, la mayoría de las espiroquetas (60-70%) eliminan las OspA/B de su superficie y, en su lugar, producen OspC (Olmo *et al.*, 2014). Por tanto, muchas espiroquetas cambian sus proteínas superficiales cuando invaden las glándulas salivares e infectan al hospedador. Este hecho sugiere que la lipoproteína de membrana Osp C

ejerce una función relacionada con la transmisión de la espiroqueta desde la garrapata al hospedador vertebrado y las borrelias pueden permanecer en la piel durante largos períodos de tiempo sin causar enfermedad sistémica, a menos que se produzca una bajada de defensas del hospedador (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005).

B. Diseminación de *B. burgdorferi* en el organismo.

Una vez inoculada por la garrapata, *B. burgdorferi* se extiende por el tejido subcutáneo originando el eritema migratorio (EM) y se disemina a través de la sangre ocasionando los primeros síntomas de la EL, así como las manifestaciones clínicas que se producen más tardíamente (Halperin *et al.*, 2013). Además, según estos autores, las borrelias se mueven de forma centrífuga en el interior de la piel, alejándose de la localización de la picadura de la garrapata, a la vez que el eritema va aumentando de tamaño.

C. Respuesta del sistema inmunitario.

B. burgdorferi produce una respuesta de tipo humoral y celular. Esta última se produce porque los macrófagos, polimorfonucleares y monocitos fagocitan y destruyen las espiroquetas mediante su opsonización; en la pared celular de *B. burgdorferi* hay lipoproteínas que activan distintos tipos de células, como monocitos, sinoviocitos, queratocitos y células endoteliales que hacen que se libere interleuquina-1 que es una de las responsables del daño tisular que origina las manifestaciones clínicas (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005, Skinner *et al.*, 2007). Al actuar la interleuquina-1 sobre el hipotálamo se produce la fiebre, y la acción sobre los leucocitos que determina el desarrollo del EM. Su acción sobre células sinoviales y condrocitos provoca la destrucción articular, por la activación de proteasas y la reabsorción del hueso. La activación de prostaglandinas es la responsable del dolor. Por último, al actuar sobre los linfocitos B y T produce, por una parte, la destrucción articular al favorecer la liberación de prostaglandina y colagenasa y, por otra, el aumento de la síntesis de anticuerpos (Skinner *et al.*, 2007).

Respecto a la respuesta humoral, como en otras enfermedades infecciosas, diferentes autores (Biesiada *et al.*, 2012) han demostrado que se produce una respuesta específica de diferentes tipos de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA).

Al cabo de 3-4 semanas post-infección (spi) las primeras inmunoglobulinas que se detectan son las IgM y alcanzan un máximo a las 6-8 spi para, posteriormente, disminuir gradualmente. En esta etapa de la enfermedad, la aparición de IgM está dirigida, principalmente, frente al antígeno asociado a la flagelina de 41 kDa. También se ha demostrado que hay IgM específicas que pueden desarrollarse un poco más tarde, frente al antígeno OspB de 34 kDa (Biesiada *et al.*, 2012).

Las inmunoglobulinas específicas IgG e IgA aparecen gradualmente durante el segundo y tercer mes de la infección y se detectan durante años, aunque con el tiempo, en los pacientes se observa una disminución en los niveles de anticuerpos específicos. Sin embargo, los niveles absolutos pueden permanecer por encima de los normales, por lo que la presencia o ausencia de anticuerpos circulantes frente a *Borrelia* después de una terapia antibiótica no es un indicador fidedigno de curación (Halperin *et al.*, 2013). Por el contrario, un tratamiento antimicrobiano en la fase inicial de la infección puede inhibir el desarrollo de una respuesta humoral, por lo que, frecuentemente, estos niveles no son detectables en estos pacientes (Halperin *et al.*, 2013).

La infección primaria con *B. burgdorferi* estimula la formación de inmunocomplejos y su depósito. Los signos clínicos se relacionan con la persistencia del microorganismo y la aparición de los complejos inmunes. Sin embargo, no se sabe si las manifestaciones tanto

precoces como tardías, requieren la presencia de microorganismos viables, o bien si es la autoperpetuación de la respuesta inmune desarrollada frente a una infección previa la que es capaz de seguir produciendo las manifestaciones clínicas (Caride *et al.*, 2002).

1.4. SÍNTOMAS CLÍNICOS

La EL puede manifestarse con una gran variedad de síntomas y signos, denominándose por ello “el gran imitador” (Rudenko *et al.*, 2011; Portillo *et al.*, 2014). Esta diversidad de las manifestaciones clínicas no sólo afecta de manera individual a cada paciente, sino que también lo hace según su procedencia geográfica. Existen importantes diferencias entre las manifestaciones clínicas de los enfermos de Lyme en Estados Unidos y en Europa, por lo que se considera que estas diferencias están relacionadas con la diversidad antigénica de las distintas genoespecies de *Borrelia* (Guerrero *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001).

Hay evidencia de que ciertas genoespecies de *B. burgdorferi* *sl* en Europa pueden estar asociadas a manifestaciones clínicas específicas, así *B. garinii* se ha implicado en las formas neurológicas, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*s.s.*) en las formas articulares y *B. afzelii* en las formas cutáneas tardías (Stanek *et al.*, 2012). Por el contrario, esta variabilidad es menos frecuente en América (Hildenbrand *et al.*, 2009).

Las manifestaciones clínicas de EL son más frecuentes a finales de la primavera, durante el verano y principios del otoño (Biesiada *et al.*, 2012).

Debido a la cronicidad y la presentación en forma de exacerbaciones y remisiones, las manifestaciones clínicas de la EL se agrupan en tres fases: localizada precoz, diseminada precoz y diseminada tardía (Roca *et al.*, 2006). Sin embargo, las manifestaciones asociadas a cada una de estas fases pueden presentarse simultáneamente, de forma aislada o incluso solaparse en varias de ellas (Nau *et al.*, 2009; Olmo *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2014).

En la Tabla 1.2., se resumen las principales manifestaciones clínicas de la EL según su fase (Olmo *et al.*, 2014).

Tabla 1.2. Manifestaciones clínicas de la EL (Olmo *et al.*, 2014)

Fase localizada precoz (días-mes desde la picadura)
Eritema migratorio
Síntomas asociados: astenia, malestar, letargia, cefalea, rigidez de nuca, mialgias, artralgias, linfadenopatía regional.
Fase diseminada precoz (semanas-meses desde la picadura)
Carditis (bloqueo AV, cardiomiopatía, miopericarditis)
Afectación neurológica (meningitis linfocitaria, neuropatía craneal con afectación frecuente del nervio facial, neuropatía periférica)
Afectación musculoesquelética (artralgias migratorias)
Afectación cutánea (eritema migratorio múltiple)
Linfadenopatías
Afectación ocular (conjuntivitis, iritis, coroiditis, hepatitis)
Enfermedad hepática (disfunción hepática, hepatitis)
Enfermedad renal (microhematuria, proteinuria)
Fase diseminada tardía (meses-años desde picadura)
Síntoma musculoesqueléticos (artritis oligo o monoarticular con afectación frecuente de rodilla)
Enfermedad neurológica (neuropatía periférica, encefalomielitis)
Afectación cutánea (acrodermatitis crónica atrófica, lesiones similares a esclerodermia)

A. Fase localizada precoz (Fase I)

Se inicia tras un periodo de incubación medio de 10 días (entre 1 día a 3 meses) y en el lugar de la picadura aparece una lesión primaria denominada **eritema migrans o migratorio** (EM). Esta lesión es patognomónica y clave para el diagnóstico precoz de la enfermedad, incluso si las pruebas de laboratorio son negativas, pero siempre y cuando el paciente reconozca la posibilidad de haber estado expuesto a la picadura de garrapata (Stanek *et al.*, 2011a). Debido a que no se detectan anticuerpos frente a *B. burgdorferi* hasta 2-4 spi, si se observa EM en esta fase de la EL, es suficiente para confirmar el diagnóstico clínico (Stanek *et al.*, 2011a, Bieisada *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2014). No obstante, en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes en esta fase no se observa EM.

El EM se inicia en el lugar de la picadura de la garrapata como una pápula o una mácula de al menos 5 cm y, posteriormente, se extiende lentamente de modo centrífugo. Tiene una morfología anular que puede llegar a alcanzar los 50 cm de diámetro, con un borde de color rojo vivo mientras que el centro se aclara progresivamente (Roca *et al.*, 2006; Olmo *et al.*, 2014). No obstante, en algunos pacientes la erupción no se aclara por el centro, sino que puede aparecer muy eritematosa y endurecida e incluso necrosarse. También hay casos en los que aparecen varias lesiones anulares satélites. El estudio histológico del EM no aporta hallazgos específicos, observándose un infiltrado perivascular linfocitario y, en ocasiones, con células plasmáticas.

El EM puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, pero se localiza preferentemente en las extremidades inferiores y en el tronco (Stanek *et al.*, 2011a; Biesiada *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014). En los niños, tal vez por su menor estatura, esta lesión se observa con mayor frecuencia en el tronco o incluso en el cuello (López-Albeola *et al.*, 2006). El EM no suele ser doloroso, incluso sin tratamiento, aunque la tercera parte de los pacientes experimentan quemazón o ligero prurito (Stanek *et al.*, 2011a; Biesiada *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014).

La mayoría de los EM se observan entre Junio y Agosto (Stanek *et al.*, 2012) y su duración puede oscilar entre 1 día y 14 meses. Esta duración es superior en las infecciones producidas por *B. burgdorferi s.s.* (52 días) y menor para el resto de las especies (14 días). Suele desaparecer espontáneamente al cabo de 28 días e incluso antes con tratamiento adecuado (Stanek *et al.*, 2011a; Olmo *et al.*, 2014). Si persiste más de 4 semanas se denomina eritema crónico migratorio (ECM) (Stanek *et al.*, 2011a).

En ocasiones, tras su curación permanecen áreas hipopigmentadas residuales. Tampoco es raro que durante su resolución presente reactivaciones transitorias llamativas, sobre todo en los pacientes que no reciben el tratamiento adecuado (Roca *et al.*, 2006).

En Europa, en esta primera fase, no suele haber síntomas generales de tipo pseudogripal como fatiga, astenia, cefalea, debilidad, mialgias, artralgias, tos, rinitis o linfadenopatías regionales y si los hay, son poco intensos. Sin embargo en EEUU estas manifestaciones clínicas suelen ser más frecuentes (Weber *et al.*, 2001; Steere *et al.*, 2004; Roca, 2006; Stanek *et al.*, 2011a; García-Meléndez *et al.*, 2014).

Desde esta lesión inicial, se produce una diseminación por vía hematogena de *Borrelia* al resto del organismo (fase de espiroquetemia) dando lugar según el territorio y el órgano afectado, a una gran variedad de manifestaciones clínicas posteriores (Biesiada *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014).

B. Fase diseminada precoz (Fase II)

Semanas o meses después de la picadura de la garrapata, la enfermedad evoluciona hacia esta fase, en la que pueden aparecer síntomas inespecíficos como fiebre, escalofríos, cefalea intensa, dolor difuso, astenia e intenso malestar general (Olmo *et al.*, 2014).

En esta fase pueden aparecer en cualquier lugar del cuerpo, excepto palmas, plantas y mucosas, nuevas lesiones anulares similares al EM, aunque generalmente de menor tamaño (Hildenbrand *et al.*, 2009).

En la fase diseminada precoz también pueden producirse alteraciones cardíacas y más frecuentemente neurológicas; siendo menos frecuente la observación de conjuntivitis, iritis, uveítis y otras afecciones oculares, faringitis, adenopatías, hepatitis, esplenomegalia y orquitis (Roca, 2006, Stanek *et al.*, 2011a, Olmo *et al.*, 2014). Esta sintomatología evoluciona de modo intermitente y durante semanas se observan mejorías y empeoramientos. En los pacientes que no presentaron EM, la enfermedad se manifiesta inicialmente con los síntomas propios de esta fase. Asimismo, en Norteamérica, estas manifestaciones clínicas suelen ser más intensas que en Europa (Roca, 2006).

En esta fase de la enfermedad puede aparecer una lesión cutánea que no es patognomónica de la EL, el linfocitoma cutáneo benigno o linfocitoma borreliano que es en una lesión única, plana o nodular, de coloración eritematosa o violácea, indolora, de 1 ó 2 centímetros de diámetro. Se localiza en la mitad superior del organismo, siendo su lugar preferente el lóbulo de la oreja en los niños y en la areola mamaria o en el escroto en los adultos (Skinner *et al.*, 2007; Stanek *et al.*, 2011a). Esta manifestación cutánea es menos frecuente que el EM y sobre todo se observa en los pacientes europeos. Su etiopatogenia no es unívoca, pero en diversas ocasiones, en la lesión se ha aislado e identificado *Borrelia* (Abele *et al.*, 1990; Gissler *et al.*, 2002).

El estudio histológico del linfocitoma cutáneo benigno muestra un denso infiltrado linfocitario en la dermis, con presencia de macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas. Desde el punto de vista anatomopatológico estos hallazgos no son específicos y puede ser difícil de diferenciación con los linfomas malignos (Stanek *et al.*, 2011a, Biesiada *et al.*, 2012).

En el 4-8% de los pacientes también se observan **alteraciones cardíacas** y su intensidad es muy variable, desde palpitaciones a pancarditis fatal. Su curso suele ser recidivante, durando los episodios días o semanas. Son frecuentes (hasta en el 50% de los pacientes) y característicos de esta fase de la EL, los bloqueos aurículoventriculares que suelen ser de carácter transitorio y de grado variable. Se acompañan de signos electrocardiográficos y radiológicos de afectación difusa. Lo habitual es que no tengan mucha trascendencia clínica, aunque en raras ocasiones se han descrito casos de bloqueo irreversible que obligan a la colocación de un marcapasos permanente (Roca, 2006; Stanek *et al.*, 2003, Biesiada *et al.*, 2012).

Los episodios recidivantes pueden derivar en una cardiopatía crónica, expresión de una importante afectación cardíaca por *B. burgdorferi*, habiéndose demostrado la presencia del microorganismo en biopsias cardíacas de los pacientes afectados (Pinto, 2002).

Otras posibles manifestaciones cardíacas son la pericarditis aguda, miocarditis aguda e incluso pancarditis y angina por insuficiencia ventricular izquierda. En Europa las manifestaciones cardíacas suelen ser menos frecuentes y menos intensas que en Norteamérica (Roca, 2006).

En esta fase de la EL suele haber diversas **alteraciones neurológicas** que están presentes, en aproximadamente, el 15% de los pacientes no tratados (Brissette *et al.*, 2013; Hildenbrand *et al.*, 2009).

Se postulan varios mecanismos para explicar la afectación neurológica en la EL. Sigal *et al.* (1998) demostraron que los anticuerpos contra el antígeno flagelar se unen a los axones normales y a clones de linfocitos T del líquido cefalorraquídeo (LCR) pudiendo reaccionar con un conjunto de autoanticuerpos que incluyen la proteína básica de la mielina, la mielina

periférica, la cardiolipina y los galactocerebrósidos. Asimismo, Ryskova *et al.* (2002) comprobaron que en el 31% de pacientes, sobre todo en mujeres jóvenes, con serología positiva para *B. afzelii*, se detectaban anticuerpos frente a la proteína básica de la mielina. Además, estudios neuropatológicos sugieren que la vasculitis puede ser uno de los mecanismos fisiopatológicos primarios (Hildenbrand *et al.*, 2009). Además, según Brissette *et al.* (2013), *B. burgdorferi* es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y causar directamente daños sobre las células del sistema nervioso, ya que es capaz de inducir una serie de citoquinas y de factores neurotrópicos que estimulan una respuesta inflamatoria del sistema nervioso que daña las células neuronales.

En el 95% de los casos, las alteraciones neurológicas ocurren entre la 1ª y la 12ª semana posterior a la picadura de garrapata, siendo más frecuentes a las 4-6 semanas, observándose fundamentalmente entre los meses de Julio y Diciembre. En general, únicamente entre el 40-50% de estos pacientes recuerdan haber sido picados por una garrapata y sólo el 20-30% de los pacientes desarrollan EM (Mygland *et al.*, 2010).

Las manifestaciones neurológicas en la fase de diseminación precoz de la EL duran menos de 6 meses, por lo que se denominan neuroborreliosis precoz (Mygland *et al.*, 2010). En pacientes europeos, las manifestaciones neurológicas más frecuentes son la mononeuritis (sobre todo de pares craneales y en concreto la parálisis facial) y la meningoradiculitis, caracterizadas por dolor radicular, parestesias y meningitis (Stanek *et al.*, 2011a). El dolor radicular puede ser acusado, lancinante y variar mucho de un día a otro, aunque suele exacerbarse por la noche. La radiculoneuritis puede ser unilateral o bilateral y suele afectar al dermatoma correspondiente al lugar de la picadura. Además, según Navarro (2005), el trastorno disautonómico es frecuente en este tipo de neuropatía.

La meningitis se caracteriza por dolor de cabeza, cierta fotofobia, discreta rigidez de nuca y signos meníngeos levemente positivos o incluso negativos. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) se observa pleocitosis moderada (hasta 5000 células/ml), de claro predominio linfocitario, con proteinorraquia elevada y glucorraquia normal o muy levemente disminuida (Roca, 2006). Además, según Hildenbrand *et al.* (2009), hay una elevación de gammaglobulinas con producción local de inmunoglobulinas IgM e IgG, persistiendo esta última a lo largo del tiempo. Para el diagnóstico de neuroborreliosis, también es útil detectar anticuerpos en el LCR, aunque su ausencia no descarta la infección, especialmente si su examen se realiza en un estadio precoz de la enfermedad (Hildenbrand *et al.*, 2009; Mygland *et al.*, 2010).

Asociado a la meningitis pueden aparecer signos centrales como alteración de la concentración, de la memoria, del sueño y labilidad emocional (López-Albeola *et al.*, 2006). Además, según estos autores, la afectación de pares craneales, con parálisis facial unilateral o bilateral, es una manifestación neurológica frecuente sobre todo en verano.

También se ha observado neuritis retrobulbar, siendo la afectación de otros pares craneales menos frecuente y de modo muy variable (Hildenbrand *et al.*, 2009). Asimismo, se han señalado, como expresión de esta afectación periférica, alteraciones como la pupila de Argyll-Robertson, en la que no hay respuesta pupilar a la luz pero si acomodación, la diplopia, ageusia e hipoacusia (Correll *et al.*, 2015).

En algunos pacientes, también se ha observado parálisis facial recurrente unilateral y una triada típica (meningitis crónica linfocitaria, neuritis craneal y radiculoneuritis), asociada o no a otras manifestaciones clínicas muy variables como radiculopatía sensitiva o motora, presencia de corea o desarrollo de un cuadro de mielitis con ataxia y ataxia cerebelosa (Bigi *et al.*, 2010; Mygland *et al.*, 2010; Djukic *et al.*, 2012). En esta fase de la enfermedad, aunque

con menor frecuencia, también puede aparecer encefalitis y mononeuritis múltiple, de tipo desmielinizante o de tipo axonal (Hildenbrand *et al.*, 2009; Mygland *et al.*, 2010).

En la edad pediátrica las alteraciones neurológicas más frecuentes son la parálisis facial y la meningitis linfocitaria (López-Albeola *et al.*, 2006).

También se han citado **alteraciones de la función hepática**, con carácter transitorio y recurrente y, además, en el 10% de los casos aparece hepatitis anictérica (Navarro, 2005).

En este estadio de la enfermedad también pueden observarse manifestaciones de tipo reumatológico, como artralgias erráticas en una o más articulaciones sin hinchazón articular (Nau *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2012) y cuando son de carácter simétrico, conviene realizar un diagnóstico diferencial con la artritis reumatoide (Navarro, 2005).

C. *Fase diseminada tardía o neuroborreliosis tardía (Fase III).*

Se observa meses o años después de la picadura de la garrapata y se produce como expresión de los mecanismos patogénicos directos e indirectos inducidos por la infección de *Borrelia*. Este estadio de la enfermedad se caracteriza por afectación neurológica, aparición de lesiones cutáneas tardías y artritis (Olmo *et al.*, 2014).

Entre las **manifestaciones neurológicas** puede observarse una polineuropatía periférica con parestesias distales, aunque en los pacientes de EE.UU. lo más frecuente es una encefalopatía caracterizada por una disfunción cerebral difusa, fundamentalmente desde el punto de vista cognitivo, con trastornos de la atención y la memoria asociados a problemas del sueño y alteraciones del estado de ánimo. En estos pacientes el LCR suele mostrar ligera pleocitosis y ligero aumento de proteínas (Stanek *et al.*, 2012).

En Europa, en los pacientes con EL, la clínica más frecuente es una encefalomiелitis progresiva y la mayoría de ellos, en parte debido al tiempo transcurrido, no recuerdan haber padecido EM ni picadura de la garrapata. Pueden aparecer síntomas de afectación focal cerebral (afasia, hemiparesia, disartria, crisis epilépticas, etc.) o difusa (somnia, desorientación, alteraciones de la memoria, etc.). Con frecuencia hay afectación medular que cursa con paraparesia progresiva y con alteraciones de los esfínteres. También es frecuente la afectación de pares craneales, sobre todo del VIII, VII y II (Olmo *et al.*, 2014).

El análisis del LCR muestra pleocitosis linfocitaria leve, hiperproteorraquia y glucorraquia normal con evidencia de síntesis intratecal de inmunoglobulinas y presencia de bandas oligoclonales específicas frente a *B. burgdorferi*. La serología es positiva frente a esta bacteria, tanto en suero como en LCR, observándose una concentración intratecal de anticuerpos específicos.

En la resonancia magnética se observa, especialmente en la sustancia blanca cerebral, intensas lesiones inespecíficas que en algunos pacientes revierten tras el tratamiento antibiótico. Basándose en la arteriografía, Biesiada *et al.* (2012) y Stanek *et al.* (2012) han descrito infartos en corteza, cápsula interna, tálamo, etc., que pueden ser secundarios a una vasculitis cerebral, similar a la que ocurre en la sífilis.

Otras manifestaciones neurológicas como meningitis crónica, mielitis transversa, vasculitis del sistema nervioso central y alteraciones del sistema nervioso autónomo han sido descritas por diversos autores (López-Albeola *et al.*, 2006; Bigi *et al.*, 2010; Mygland *et al.*, 2010; Erol *et al.*, 2013).

En relación con las **manifestaciones dermatológicas**, en pacientes con EL en Europa, se ha descrito frecuentemente una acrodermatitis crónica atrófica (ACA), mientras que en los de EE.UU. ésta es excepcional, probablemente debido a que se asocia con la infección por *B. afzelii*. Esta afección, es más frecuente en mujeres de edad avanzada y, su localización es diferente al EM. Se inicia con una inflamación de color azulado en el pie (edema unilateral de

talón) o en la pierna, siendo menos frecuente en muslo o miembros superiores; progresivamente, se produce una atrofia cutánea en forma de “papel de cigarrillo”, con adenopatía regional y manifestaciones sensitivas y dolorosas en el 20% de los casos (Skinner *et al.*, 2007; Stanek *et al.*, 2011b). En estas lesiones, histológicamente se observa un infiltrado linfocitario, de células T y de células plasmáticas, en la dermis y en el tejido celular subcutáneo (Biesiada *et al.*, 2012).

En pacientes con títulos elevados de anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, Stanek *et al.* (2012) han descrito una lesión cutánea denominada morfea.

En estudios previos realizados por Asbrink (1991) se han descrito, en general con baja frecuencia, otras manifestaciones clínicas como la aparición de erupciones máculo-papulares y urticariales. Además, Nadelman *et al.* (2015) observaron un incremento de pacientes afectados de porfiria cutánea con respecto al resto de la población.

Respecto a las **manifestaciones de tipo reumatológico**, se observan afecciones articulares, como la artritis franca, que aparecen tras varios meses incluso años después del inicio de la enfermedad. Son más frecuentes en pacientes que no recibieron tratamiento inicial o este fue incorrecto (hasta en el 60% de los casos), aunque también se ha observado en los que recibieron tratamiento antibiótico (Roca, 2006; Olmo *et al.*, 2014).

En general, los pacientes presentan una artritis oligoarticular intermitente que persiste durante años y que afecta preferentemente a las grandes articulaciones, sobre todo a las rodillas (Nau *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; Aiyer *et al.*, 2014; Daikh *et al.*, 2013; Nimmrich *et al.*, 2014). Cada episodio suele durar unas cuantas semanas pero su intensidad y frecuencia tiende a reducirse lentamente a medida que pasa el tiempo. Durante estos episodios las articulaciones aparecen edematosas y con aumento local de la temperatura, pero el dolor no suele ser muy fuerte. En las radiografías suelen observarse signos de derrame articular y edema de partes blandas.

En los brotes que se manifiestan con mayor intensidad, suele haber febrícula y malestar general. En ocasiones se forman quistes de Baker, que pueden llegar a romperse. En el 10% de los casos se observa una evolución a una forma de artritis crónica persistente con erosión cartilaginosa y ósea que es más frecuente (60%) en pacientes con marcadores HLA-DR4 y HLA-DR2, ya que presentan reacciones cruzadas con el antígeno OspA de la espiroqueta (Biesiada *et al.*, 2012).

Los pacientes que sufren una mayor afectación articular suelen ser positivos para los alelos 0401 y 0101 del antígeno de histocompatibilidad HLA-DRBI que, también, se asocian con artritis reumatoide (Roca, 2006). Además, en algunos casos, se observan afectaciones poliarticulares y simétricas, simulando cuadros de artritis reumatoide seronegativa.

En el líquido articular de los pacientes con EL que padecen artritis se observa un incremento en el número de leucocitos a expensas de polimorfonucleares por lo que es necesario realizar un diagnóstico diferencial con la artritis séptica (Daikh *et al.*, 2013). Esto hace que en ocasiones el diagnóstico diferencial entre ambas entidades sea difícil e incluso pueda llegar a someterse a estos enfermos a tratamientos agresivos e innecesarios como el drenaje quirúrgico (Aiyer *et al.*, 2014). Por este motivo la artritis de Lyme debe ser considerada en pacientes de zonas endémicas con monoartritis u oligoartritis y sobre todo si la articulación afectada es la rodilla (Daikh *et al.*, 2013).

En estudios recientes, se ha descrito el **síndrome post-Lyme** que sufren algunos pacientes adecuadamente diagnosticados y que respondieron al tratamiento, pero que pasados más de 6 meses presentan síntomas limitantes subjetivos (Skinner *et al.*, 2007; Halperin *et al.*, 2007; Stanek *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014).

Según Skinner *et al.* (2007) entre las manifestaciones clínicas destaca el dolor musculoesquelético (sin artritis franca) y la fatiga crónica o trastornos neuropsiquiátricos (dificultades cognitivas, irritabilidad y trastornos del sueño y de la memoria, depresión, dolor de cabeza o parestesias en miembros). Según estos autores, para establecer el diagnóstico de síndrome post-Lyme habría que excluir la posibilidad de síndrome de fatiga crónica o de fibromialgia. Asimismo, Halperin *et al.* (2007) señalan que esta sintomatología no se acompaña de alteraciones clínicas características de EL, ni tampoco de datos de laboratorio que evidencien inflamación o afectación del sistema nervioso central o periférico y no hay ningún dato de laboratorio que apoye la posibilidad de un Lyme activo. No obstante, Stanek *et al.* (2012) observaron que el síndrome post-Lyme es más frecuente entre los enfermos que han tenido manifestaciones neurológicas de la EL, aunque según estos autores, no está indicado prescribir un segundo tratamiento antibiótico pues los riesgos superan a los potenciales beneficios (Olmo *et al.*, 2014). Actualmente existe controversia en cuando a si el síndrome post-Lyme representa realmente una infección crónica o únicamente un estado no infeccioso de fatiga crónica (García-Meléndez *et al.*, 2014).

En las infecciones por *B. burgdorferi s.l.*, también se han descrito **alteraciones durante el embarazo** que producen afectaciones del feto, en especial, durante el primer trimestre y sobre todo a nivel cardíaco o cutáneo. Elliot *et al.* (2001) aislaron este microorganismo en distintos órganos fetales.

1.5. DIAGNÓSTICO.

Debido a que la EL es una enfermedad multisistémica, con una gran variedad de manifestaciones, además del diagnóstico clínico, en ocasiones, es necesario realizar su confirmación mediante pruebas microbiológicas e incluso establecer un diagnóstico diferencial con otras entidades de clínica similar.

1.5.1. Clínico: definición de caso.

La EL, al igual que otras enfermedades producidas por espiroquetas como la sífilis, a veces, el diagnóstico clínico es problemático debido a que las manifestaciones son similares a las de otras enfermedades.

Además, la EL con frecuencia presenta un curso crónico-recurrente con periodos de latencia entre las crisis, que complica el estudio y seguimiento de los casos, requiriéndose por ello un conjunto de datos clínicos, proporcionados por una adecuada sospecha clínico-epidemiológica, una anamnesis detallada, una exhaustiva exploración física y una variedad de pruebas complementarias (Navarro, 2005).

El diagnóstico puede ser exclusivamente clínico cuando se evidencia la presencia de la única lesión considerada patognomónica (EM), aún con serología negativa (Biesiada *et al.*, 2012, Stanek *et al.*, 2012). Sin embargo, en un 60% de los casos esta lesión está ausente o se encuentran otras lesiones atípicas (cuadros más evolucionados sin lesiones cutáneas o con lesiones cutáneas tardías) haciéndose necesario el estudio de antecedentes epidemiológicos y la realización de diversas pruebas de diagnóstico anatomopatológico, microbiológico o serológico (Stanek *et al.*, 2012). No obstante, un resultado positivo de forma aislada, tampoco constituye por sí sólo una prueba de diagnóstico definitiva (Fernández-Soto, 2003).

Esta compleja evaluación determinó la proposición de una serie de criterios diagnósticos; estableciéndose unos criterios para definir el concepto de “caso clínico de enfermedad de Lyme” y otros diferentes para la “vigilancia epidemiológica de la EL”.

El grupo de trabajo de borreliosis de Lyme (Guerrero, 1995) definió como criterios de diagnóstico de **caso clínico de EL**:

- la presencia de EM (incluso en ausencia de resultado serológico positivo) o,
- al menos una manifestación de la enfermedad diseminada (incluyendo la acrodermatitis crónica atrófica y el linfocitoma cutáneo) asociada a:
 - demostración de anticuerpos IgG o IgM a *B. burgdorferi* en suero o LCR, o
 - aislamiento de *B. burgdorferi* de muestras clínicas

Además, se considera necesario que el paciente reconozca poder haber estado expuesto a la picadura de garrapata (Stanek *et al.*, 2012, Halperin, 2013). No obstante, un importante porcentaje de pacientes (30-50%) no recuerdan la picadura de garrapata (Roca, 2006; Mygland *et al.*, 2010; Pereyra *et al.*, 2011; Olmo *et al.*, 2014). Esto puede deberse a que es una picadura indolora (García-Moncó *et al.*, 2002) o a que las garrapatas son de pequeño tamaño (larvas, ninfas o adultos sin alimentar) y, por tanto, difíciles de ver (Roca, 2006; Olmo *et al.*, 2014). Por ello, se considera suficiente que los pacientes reconozcan que han estado expuestos a la picadura de garrapatas (Rodríguez-González, 2013).

Se considera que una persona estuvo expuesta a la picadura de garrapata cuando, en el mes anterior, ha estado en una zona de matorrales, hierba o arboleda, en la que se haya diagnosticado con anterioridad casos de enfermedad EL o donde se haya documentado la presencia de *B. burgdorferi* (Guerrero, 1995).

Por su parte EUCALB establece los siguientes criterios para el diagnóstico de **caso clínico**:

- Sí el eritema migrans tiene al menos 5 cm de diámetro, con o sin aclaramiento central y borde a menudo intensamente coloreado y no esté sobreelevado notablemente, no se precisaría ninguna prueba de laboratorio.
- La presencia de linfocitoma cutáneo, requiere pruebas de laboratorio que incluirían una seroconversión o una serología positiva. Esta lesión se define como una placa o un nódulo rojo azulado por lo general en el lóbulo de la oreja, el pezón o el escroto; es más frecuentemente en niños (especialmente en el oído) que en adultos.
- La existencia de Acrodermatitis Crónica Atrófica (ACA), necesita que se acompañe de altos niveles de IgG en suero frente a *Borrelia*. La ACA, se define como lesiones rojas o rojo-azuladas, generalmente en las superficies de extensión de las extremidades con hinchazón pastosa inicial y que con el tiempo se vuelven atróficas. Son posibles la induración de la piel y nódulos fibrosos sobre las prominencias óseas.
- La neuroborreliosis, incluye principalmente meningoradiculitis, meningitis, parálisis facial, encefalitis, mielitis o vasculitis en adultos y principalmente meningitis y parálisis facial en niños. Precisa pruebas de laboratorio consistentes en la demostración de síntesis intratecal de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* y la existencia de pleocitosis en LCR, aunque en las primeras fases de la enfermedad estos anticuerpos pueden estar ausentes.
- La artritis de Lyme, incluye los ataques recurrentes o persistentes de inflamación articular objetiva de forma oligo o pluriarticular. Tiene que acompañarse de niveles elevados de IgG anti-*Borrelia*.
- La carditis de Lyme, incluye bloqueo auriculoventricular de I, II o III grado, alteraciones de la conducción, alteraciones del ritmo y a veces miocarditis o pancarditis. Debe demostrarse la existencia de niveles elevados de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* en suero.

- Las manifestaciones oculares en la EL, incluyen conjuntivitis, uveítis, papilitis, espirocleritis o queratitis. El paciente debe tener niveles elevados de IgG anti-*Borrelia*.

Para la **vigilancia epidemiológica de la EL**, los **Centers for Disease Control of Prevention (CDCs)** de EE.UU., establecieron los siguientes criterios:

- A. Presencia de eritema migratorio de 5 cm o más de diámetro, diagnosticado por un médico. Se recomiendan pruebas serológicas, si el paciente no reconoce la exposición a picadura de garrapatas.
- B. Presencia de al menos una de las manifestaciones tardías de la enfermedad (musculoesqueléticas, cardiovasculares o neurológicas) con confirmación de laboratorio de la infección por *B. burgdoferi s.l.*

Los CDCs, consideran como manifestaciones tardías las siguientes:

- **Musculoesqueléticas:** episodios breves y recurrentes de inflamación articular en una o pocas articulaciones, a veces seguida de artritis crónica oligo o pauciarticular. No se considera como criterio a la artritis crónica progresiva que no esté precedida de breves episodios de inflamación, ni tampoco la poliartritis crónica simétrica. Tampoco se incluyen entre los criterios las artralgias, mialgias o síndrome de fibromialgia sino está acompañado de otras manifestaciones compatibles con la enfermedad.
- **Neurológicas,** se consideran criterios de inclusión cualquiera de las siguientes manifestaciones solas o combinadas: meningitis linfocitaria, neuritis craneal (en particular la parálisis facial tanto uni como bilateral), radiculoneuropatía o encefalomielitis. Esta última debe ser confirmada por la demostración de anticuerpos específicos contra *B. burgdoferi* en líquido cefalorraquídeo, evidenciando en este caso un título mayor en LCR que en sangre. La cefalea, fatiga, parestesias o el dolor cervical no son considerados criterios clínicos para el diagnóstico.
- **Cardiovasculares:** bloqueo de segundo o tercer grado acompañado o no de miocarditis. Las palpitaciones, bradicardia, bloqueo de rama o miocarditis sola no se consideran como criterios clínicos de diagnóstico.

La **confirmación, o evidencia de laboratorio**, requiere el cumplimiento de uno de los aspectos siguientes:

- A. Cultivo positivo para *B. burgdoferi s.l.*
- B. Empleo de dos pruebas serológicas interpretadas según los criterios establecidos, donde:
 - Es suficiente la respuesta de IgM positiva cuando el comienzo de los síntomas es menor o igual a 30 días.
- C. En cualquier fase de la EL es suficiente la respuesta de IgG positiva. Seropositividad por Western-Blot-IgG usando los criterios de interpretación establecidos.
- D. Anticuerpos en LCR por ELISA o IFI, cuando el título es superior al del suero.

Teniendo en cuenta estos datos, los CDCs clasifican los casos de EL en:

- **Caso confirmado:**

- A) Presencia de eritema migratorio y de exposición a picadura de garrapata.
- B) Con eritema migratorio y evidencia de laboratorio de la infección, sin exposición conocida a picadura de garrapata.
- C) Presencia, al menos, de una de las manifestaciones tardías y confirmación de la infección en el laboratorio.

- **Caso probable:** cualquier otro caso diagnosticado por personal médico y serología positiva.
- **Caso sospechoso:**
 - A) Con eritema migratorio, sin exposición conocida y no hay pruebas de laboratorio.
 - B) Pacientes seropositivos a *Borrelia* y que carecen de datos clínicos (casos de laboratorio).

El EUCALB plantea los mismo criterios clínicos y de laboratorio para casos de vigilancia epidemiológica que incluyen, en función de la presentación clínica, la realización de la técnica PCR, en muestras de: biopsias de lesiones de piel, LCR, líquido sinovial y fluido ocular (Rodríguez-González, 2013).

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

No hay hallazgos específicos en sangre periférica. La velocidad de sedimentación puede ser normal o estar ligeramente elevada, al igual que el recuento de células blancas. Sin embargo, en caso de neuroborreliosis, el LCR muestra una pleocitosis linfocitaria moderada y proteínas elevadas con niveles normales de glucosa. La presencia de bandas oligoclonales específicas en LCR es un hecho común y apoya el diagnóstico. En casos de neuropatías periféricas, el LCR puede ser normal. En el líquido sinovial se puede encontrar un incremento en el recuento de células blancas con predominio de polimorfonucleares (Stanek *et al.*, 2012).

1.5.2. Microbiológico.

Los análisis microbiológicos ayudan al diagnóstico de la EL pero su positividad en ausencia de clínica compatible, en ningún caso permite un diagnóstico de confirmación de EL, ya que un suero positivo sólo indica que el individuo ha estado en contacto con la bacteria, pero no diferencia entre la infección activa y la mera exposición a la espiroqueta. Además, las pruebas serológicas pueden dar falsos negativos, en las fases iniciales de la enfermedad, y también falsos positivos (Fernández-Soto, 2003).

Los métodos de diagnóstico microbiológico más empleados en la actualidad según Agüero-Rosenfeld *et al.* (2005), se pueden dividir en directos (cultivo y aislamiento, reacción en cadena de la polimerasa) e indirectos (inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo (ELISA) y Western blot (WB) o inmunoblot.

A. Directos.

Para el cultivo de *B. burgdorferi* se utilizan medios líquidos derivados del medio original de Kelly. En la actualidad los medios más utilizados son el BSK II, BSK-H y el medio de Kelly-Pettenkofer modificado. Según Agüero-Rosenfeld *et al.* (2005), los aislamientos de esta espiroqueta se han obtenido, fundamentalmente, a partir de lesiones de la piel y de líquidos corporales (sangre, líquido sinovial o LCR). El cultivo permite un diagnóstico de certeza pero es lento, no está ampliamente disponible y sólo suele ser positivo en las primeras semanas de infección por lo que su utilización es muy limitada y tiene una mínima significación en la práctica clínica (Rodríguez-González, 2013, Olmo *et al.*, 2014).

Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se detectan los ácidos nucleicos del patógeno. Se ha usado en piel y fluidos corporales como sangre, LCR o líquido sinovial. Este método también permite identificar las distintas genoespecies de *B. burgdorferi s.l.*

(EUCALB, 2009). Sus principales ventajas son la posibilidad de establecer un diagnóstico precoz sin necesidad de esperar la seroconversión del paciente; el adecuado diagnóstico en pacientes que presentan una sintomatología infrecuente o evolucionan hacia un cuadro crónico; y su gran sensibilidad al detectar pequeños fragmentos del ADN de *Borrelia* (Caride, 2002). Entre sus desventajas destacan que puede haber falsos negativos porque se tome una muestra en la que haya una pequeña cantidad de ADN diana (Navarro, 2005). Además, como detecta el ADN de *Borrelia*, independientemente de que los microorganismos estén vivos o muertos, no permite diferenciar una infección activa de la ya tratada (García-Moncó *et al.*, 2006). La PCR puede llegar a detectar el 80% de las infecciones si se realiza a partir de líquido sinovial de pacientes no tratados con afectación articular (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005), pero sólo un 10% si se realiza en LCR de pacientes no tratados con afectación neurológica (Mygland *et al.*, 2010). Se considera una técnica más sensible que el cultivo y más específica que el ELISA (Skinner *et al.*, 2007; Stanek *et al.* 2012).

Para la identificación de las **genoespecies de *Borrelia* en garrapatas**, se han utilizado las técnicas de PCR, la Reverse Line Blotting (RLB) y la Multilocus Sequence Anlysis (MLSA). La técnica más utilizada ha sido la PCR (Navarro, 2005; Barandika, 2012) realizando dos amplificaciones consecutivas mediante el uso del producto de la primera amplificación como diana para la segunda. El procedimiento de RLB también ayuda a mejorar la sensibilidad y permite, mediante el uso de sondas específicas, la identificación de las diferentes genoespecies (Wielinga *et al.*, 2006; Barandika, 2012).

B. Indirectos.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), se basa en la observación de espiroquetas, fijadas en portaobjetos, mediante anticuerpos IgG e IgM marcados con fluoresceína. Es una prueba rápida y simple, que ha sido propuesta como método de cribado en áreas endémicas, pero presenta, como todas las inmunofluorescencias, limitaciones importantes por la subjetividad del observador y, en este caso concreto, por las frecuentes reacciones cruzadas, principalmente, con *Treponema pallidum* y *Leptospira* spp (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Existen diversos tipos de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), siendo el más utilizado el ELISA-indirecto (ELISA-i) que detecta la presencia de anticuerpos en la muestra problema mediante la unión de estos al antígeno de *Borrelia*. Para evidenciar la reacción se añade un inmunoconjugado (anticuerpos anti-especie) marcado con un enzima que en contacto con un sustrato específico dará lugar a una reacción colorimétrica observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

El ELISA-i es una técnica de fácil realización que se puede automatizar y es más objetiva que la IFI (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). En general, los ELISA-i comercializados tienen una sensibilidad y especificidad del 89% y 72%, respectivamente, por lo que se recomienda que sus resultados sean confirmados por Western blot. Entre sus inconvenientes destacan los falsos positivos, debido a reacciones cruzadas contra otras espiroquetas (fiebre recurrente, sífilis), virus (mononucleosis infecciosa) o incluso enfermedades autoinmunes (lupus o artritis reumatoide); así como, los falsos negativos, que son más frecuentes en las etapas tempranas de la enfermedad. Según Skinner *et al.* (2007), normalmente no se detectan las IgM frente a *B. burgdoferi* hasta 4 semanas después de la infección y las IgG a las 6-8 semanas p.i.

En la actualidad, también se han puesto a punto técnicas ELISA en las que se utilizan antígenos recombinantes, como el péptido C (ELISA C6). El péptido C es un antígeno sintético derivado de la proteína de membrana VIsE (*variable membrane protein-like sequence, expressed*) que se expresa inmediatamente después de la infección, confiriéndole a este método una alta especificidad (100%). La sensibilidad es del 74% en etapas iniciales de

la enfermedad y puede alcanzar el 100% en etapas tardías. Como el antígeno usado en el ELISA C 6 es una pequeña secuencia definida de la proteína VISe, el riesgo de reacciones cruzadas con antígenos encontrados en otros microorganismos es muy reducido. Esta nueva prueba estaría diseñada para eliminar la confirmación por inmunoblot (Skinner *et al.*, 2007; Oteiza-Olaso *et al.*, 2011). Su mayor inconveniente es su elevado coste.

El test VIDAS[®] Lyme IgG and IgM (LYT) determina simultáneamente, de forma cualitativa y automatizada, la IgG e IgM anti-*Borrelia burgdorferi* en suero humano por la técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) que es un ELISA "sandwich" ligado a fluorescencia de alta sensibilidad (próxima al 100%) y especificidad (91%) según diversos autores (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Western blot o inmunoblot, es una técnica de inmunotransferencia de referencia entre los métodos de diagnóstico serológico. Detecta anticuerpos IgM e IgG frente a una diversidad de antígenos específicos de distintas genoespecies de *B. burgdorferi*. Según Skinner *et al.* (2007), se considera que los sueros de los pacientes tienen anticuerpos IgG dirigidos contra *B. burgdorferi* si se observan al menos dos bandas de reacción antígeno-anticuerpo de los siguientes pesos moleculares: 18, 21 kDa (Osp C); 28, 30, 39 kDa (Bmp A); 41 kDa (Fla) y 45, 58, 66 y 93kDa. Un resultado positivo para IgM deber tener inmunorreacción con una de las siguientes tres bandas: 24 kDa (Osp C), 39kDa (BmpA) y 41 kDa (Skinner *et al.*, 2007).

El gran problema de esta prueba es la falta de estandarización y adecuación de la cepa para la utilización de este test. En general, las recomendaciones para la interpretación de un Western blot deben de estar siempre adaptadas al medio donde se realice esta técnica, mediante el empleo de las genoespecies circulantes. Se recomienda el empleo de cepas de pase bajo (con la mayoría de las proteínas intactas) y que expresen Osp C (hay mucha variabilidad en este punto y la Osp C que es una de las proteínas vitales para la interpretación de un WB). Por todos estos motivos, es difícil definir criterios de interpretación internacionales.

En España y con los datos disponibles hasta la fecha, las genoespecies que deberían emplearse en un WB son *B. garinii* y *B. burgdorferi s.s.* Actualmente, la EUCALB está intentando definir criterios para su interpretación, pero este objetivo se considera poco realista dadas las diferencias en la distribución de genoespecies y en su incidencia en las zonas endémicas (Picazo y Fuertes Ortiz de Urbina, 1999). Según estos autores, en España, las bandas a tener en cuenta para IgG son de 93, 66, 58, 45, 41, 39, 30, 28, OspC, 18 kDa y se precisa evidenciar 5 de estas bandas para considerar IgG positivo; para la detección de IgM las bandas más relevantes serían las de 41, 39 y Osp C.

1.5.3. Diferencial

Dada la gran cantidad de entidades clínicas que podrían cursar con manifestaciones muy semejantes a las de la enfermedad de Lyme, es imprescindible realizar una historia clínica y epidemiológica muy detallada para que junto con la exploración física y las exploraciones complementarias pertinentes, nos permitan llegar a un adecuado diagnóstico de certeza y establecer el tratamiento idóneo (Stanek *et al.*, 2011a; García-Meléndez *et al.*, 2014).

A. Patologías cutáneas

El EM es patognomónico de la EL y se debe diferenciar de otras entidades como las reacciones de hipersensibilidad, la reacción exagerada a la picadura de insectos o la urticaria. Estos procesos cutáneos se inician y se resuelven de manera espontánea más rápidamente que

el EM. En casos de celulitis o erisipela, el área inflamada eritematosa raramente se aclara por el centro como sucede en el EM (Olmo *et al.*, 2014).

También se podría plantear un diagnóstico diferencial con el eccema numular que, generalmente, es más pequeño que el EM y además no cree tan rápidamente como éste y con otras entidades como la tiña del cuerpo, el granuloma anular, el eritema anular centrífugo o el eritema multiforme (García-Meléndez *et al.*, 2014).

Asimismo, el EM podría incluso presentar cierta similitud con el exantema del parvovirus B19 en niños o con una reacción medicamentosa, pero en este último supuesto habría un antecedente de la ingesta de medicamentos (Stanek *et al.*, 2012; García-Meléndez *et al.*, 2014).

La acrodermatitis crónica atrófica se debe diferenciar de insuficiencia venosa crónica, tromboflebitis superficial, acrocianosis, livedo reticularis, eritema nodoso o linfedema (Stanek *et al.*, 2012), todas estas entidades relacionadas con otras patologías de base.

B. Enfermedades neurológicas

La neuroborreliosis se debe diferenciar la parálisis facial idiopática que, no se asocia a meningitis ni tiene el predominio estacional propio de la ocasionada por *Borrelia*. Asimismo, la meningitis vírica, a diferencia de la causada por esta espiroqueta, se presenta normalmente con niveles normales de proteínas en el LCR. En las radiculopatías mecánicas es fundamental una buena anamnesis y el despistaje de un proceso compresivo; también hay que descartar la posibilidad de que se trate de un primer episodio de esclerosis múltiple que debería acompañarse de lesiones desmielinizantes características en una resonancia cerebral (Stanek *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2014).

C. Afectaciones cardíacas

En la enfermedad de Lyme, deben diferenciarse de otras causas, tanto infecciosas como no infecciosas, como trastornos de la conducción, pericarditis o miopericarditis. También deben descartarse trastornos en la conducción debidos a problemas estructurales detectables mediante pruebas de imagen (Stanek *et al.*, 2012)

D. Artritis de Lyme

Podría confundirse con otras enfermedades reumáticas como la artritis psoriásica, artritis reumatoide, sarcoidosis o lupus eritematoso sistémico. En estos casos la ausencia de nódulos subcutáneos y la negatividad del factor reumatoide y de los anticuerpos antinucleares ayudan al diagnóstico diferencial (Roca, 2006, Olmo *et al.*, 2014). Asimismo, se deben descartar otras artritis infecciosas tanto sépticas como víricas.

En algunos casos resulta especialmente problemático el diagnóstico diferencial con la fibromialgia y el síndrome de fatiga crónica (Roca, 2006, Olmo *et al.*, 2014). Incluso, se ha sugerido que *Borrelia* puede actuar como un desencadenante de la fibromialgia, hasta el punto que lo consideran como un síndrome post-infeccioso (Stanek *et al.*, 2003).

Se debe remarcar que aunque el antecedente de picadura de garrapata es en ocasiones crucial para un adecuado diagnóstico diferencial, no debemos olvidar que los ixódidos pueden transmitir diversos patógenos, siendo posible la existencia de coinfecciones.

En la Península Ibérica, se ha comprobado que *I. ricinus* también transmite bacterias como *Anaplasma phagocytophilum* (anaplamosis humana granulocítica), parásitos como *Babesia* spp. (babesiosis humana) y en Europa Central virus como el causante de la encefalitis transmitida por la picadura de garrapata (Marquez-Jimenez *et al.*, 2005; García-Meléndez *et*

al., 2014; Perrone *et al.*, 2014), entidades que también deberíamos tener presentes a la hora de realizar un adecuado diagnóstico diferencial.

La fiebre recurrente, transmitida por una garrapata blanda (*Ornithoros erraticus*) se ha notificado de forma esporádica en España a lo largo de este siglo, predominando en zonas rurales en período estival. A diferencia de la EL, se caracteriza por episodios de fiebre recurrente en muchos casos asociados a elevación de reactantes de fase aguda y su agente causal es *Borrelia hispanica* (Croche *et al.*, 2015).

1.6. TRATAMIENTO

B. burgdorferi es altamente sensible, “*in vitro*”, a la mayoría de los fármacos de uso habitual como penicilinas, cefalosporinas de segunda y tercera generación y tetraciclinas (Wormser *et al.*, 2006; Halperin *et al.*, 2013). Los macrólidos como la eritromicina, azitromicina o claritromicina son menos efectivos, por lo que no están recomendados como tratamiento de primera elección (Halperin *et al.*, 2013), aunque podrían utilizarse en caso de alergia o intolerancia a otros fármacos más efectivos.

A. En la fase localizada precoz (EM)

Se utilizan por vía oral (vo), doxiciclina, amoxicilina o cefuroxima axetilo. En adultos, el tratamiento de primera elección es la doxiciclina, en dosis de 100 mg dos veces al día (Wormser *et al.*, 2006; Hu, 2015) durante 14-21 días, aunque diferentes estudios apuntan que 10 días de tratamiento serían suficiente (Kowalski *et al.*, 2010; Stanek *et al.*, 2012). En niños mayores de 8 años la dosis sería de 4 mg/Kg/día en dos dosis, también durante 14-21 días y con un máximo de 100 mg por dosis.

La doxiciclina puede causar fotosensibilidad y está contraindicada en niños menores de 8 años y en mujeres embarazadas (Stanek *et al.*, 2012). En estos casos el tratamiento de elección sería amoxicilina a 50 mg/Kg/día repartida en 3 dosis en niños y 500 mg tres veces al día en mujeres embarazadas, durante 14-21 días en ambos casos.

Como tratamiento de segunda elección puede usarse la cefuroxima axetilo. En adultos se administra dos veces al día (500 mg) y en niños 30 mg/Kg/día repartida en dos dosis, durante 14-21 días.

B. En la fase diseminada precoz

El tratamiento, dependerá del órgano afectado. Si hay parálisis facial, el tratamiento de elección es la doxiciclina, durante 14 a 28 días (Stanek *et al.*, 2012). En adultos la dosis es de 100 mg dos veces al día y en niños mayores de 8 años, 4 mg/Kg/día repartido en dos dosis con un máximo de 100 mg por dosis (Hu, 2015). En niños menores de 8 años se usará la amoxicilina, v.o., 50 mg/Kg/día en tres dosis o la cefuroxima (30 mg/Kg/día en dos dosis).

La afectación del Sistema Nervioso (a excepción de la parálisis facial) debe tratarse por vía endovenosa (iv) con ceftriaxona, cefotaxima o penicilina G.

Por vía parenteral, la ceftriaxona es el fármaco idóneo porque es efectivo contra *B. burgdorferi*, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica y tiene una vida media, suficientemente larga, que permite una única administración diaria (Stanek *et al.*, 2012).

En adultos, la ceftriaxona se administra en dosis única diaria de 2 g, durante 2-4 semanas (Roca, 2006). En niños se administra durante el mismo tiempo en dosis única diaria de 70-100 mg/Kg, con un máximo de 2 g al día (Skinner *et al.*, 2007).

La penicilina G se administra en adultos, por vía iv, durante 2-4 semanas, a dosis de 4 millones de unidades cada 4 horas (Halperin *et al.*, 2013) y en niños se utiliza 200.000-400.000 unidades/Kg/día dividido en 6 dosis.

La dosis de la cefotaxima, iv, es de 2 g. cada 8 horas en adultos y entre 150-200 mg/Kg/día, repartido en 3 dosis, en niños con un máximo de 6 g. al día.

En pacientes europeos con afectación del sistema nervioso (Halperin *et al.*, 2013) no observaron diferencias entre los resultados obtenidos cuando se utilizaba el tratamiento endovenoso con los fármacos antes citados o cuando se administraba doxiciclina, vo, al menos durante 3-4 semanas, recomendando el tratamiento endovenoso para los casos en que hubiese una mala respuesta al tratamiento oral inicial.

La afectación cardíaca en pacientes sintomáticos con bloqueo auriculo-ventricular de segundo o tercer grado, con un intervalo PR mayor de 300 milisegundos, debe ser tratada con antibióticos por iv y con el paciente monitorizado en un Hospital. El tratamiento de elección es la ceftriaxona, iv, utilizando las mismas dosis y pautas anteriormente citadas, hasta que desaparezca la clínica. En ese momento el fármaco puede cambiarse a vía oral para completar un total de 21-28 días o incluso utilizar otro fármaco, por vo, como amoxicilina, cefuroxima axetilo o doxiciclina. Otra posibilidad sería la utilización de cefotaxima o penicilina G (Hu, 2015).

Sí el paciente está asintomático o presenta un bloqueo de primer grado, con un intervalo PR menor de 300 milisegundos, se podría instaurar desde el principio un tratamiento, durante 21 días, con doxiciclina, amoxicilina o cefuroxima, vo, y no precisaría ingreso hospitalario.

C. En la fase diseminada tardía

La artritis de Lyme puede tratarse, por vía oral, con amoxicilina o doxiciclina durante 28 días. En caso de artritis recurrente podría utilizarse la ceftriaxona, vía endovenosa, una vez al día durante 28 días (Wormser *et al.*, 2006; Hu, 2015).

En torno al 10% de los pacientes con afectación articular no responden completamente al tratamiento antibiótico, por lo que en este caso, se pauta tratamiento oral con antiinflamatorios no esteroideos, inyecciones intraarticulares de corticoides, fármacos antirreumáticos o incluso sinovectomía artroscópica (Roca, 2006; Stanek *et al.*, 2012; Daikh *et al.*, 2013; Nimmrich *et al.*, 2014).

La acrodermatitis crónica atrófica se trata, por vía oral, durante 21 días con doxiciclina, amoxicilina o cefuroxima axetilo.

En el Síndrome post-Lyme, no se recomienda administrar ceftriaxona, durante más de 10 semanas, puesto que se ha demostrado que prolongar el tratamiento no aporta beneficios y se incrementan los efectos secundarios adversos (Mygland *et al.*, 2010; Halperin *et al.*, 2013;).

En la Tabla 1.3., se resume los diversos fármacos, dosis, vía de administración y duración del tratamiento, al considerar las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes (Biesiada *et al.*, 2012).

Tabla 1.3. Principales fármacos, dosis, vías de administración y duración del tratamiento, al considerar las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes.

MANIFESTACION CLÍNICA	FÁRMACO	DOSIS de adulto	Dosis pediátrica	DÍAS DE TRATAMIENTO
Eritema migrans	Doxiciclina	100 mg v.o cada 12 horas	4 mg/Kg/día en dos dosis v.o (máximo 100 mg por dosis).	14-21
	Amoxicilina	500 mg v.o. cada 8 horas	50 mg/Kg/día v.o en tres dosis (máximo 500 mg por dosis).	14-21
	Cefuroxima	500 mg v.o cada 12 horas	30 mg/Kg/día v.o en dos dosis (máximo 500 mg por dosis)	14-21
Parálisis facial	Doxiciclina	100 mg v.o cada 12 horas	4 mg/Kg/día en dos dosis v.o (máximo 100 mg por dosis). En menores de 8 años amoxicilina o cefuroxima oral.	14-28
Afectación del sistema nervioso (excepto parálisis facial).	Ceftriaxona	2 g i.v una vez al día.	70-100 mg/kg i.v. una vez al día y con un máximo de 2 g al día.	14-28
	Cefotaxima	2 g i.v cada 8 horas.	150 mg-200 mg/kg/día i.v. en tres dosis con máximo de 6 g al día.	14-28
	Penicilina G	4 millones de unidades i.v cada 4 horas.	300.000 unidades/Kg/día divididas en 6 dosis, i.v.	14-28
Carditis en paciente asintomático o con bloqueo 1 ^{er} grado con PR<300 ms	Doxiciclina	100 mg v.o cada 12 horas	4 mg/Kg/día en dos dosis v.o (máximo 100 mg por dosis).	21
	Amoxicilina	500 mg v.o. cada 8 horas. 500 mg v.o cada 12 horas	50 mg/Kg/día v.o en tres dosis (máximo 500 mg por dosis).	21
	Cefuroxima		30 mg/Kg/día v.o en dos dosis (máximo 500 mg por dosis)	21
Carditis en paciente sintomático y con bloqueo 2 ^o -3 ^{er} grado con PR>300 ms	Ceftriaxona	2 g. i.v una vez al día.	70-100 mg/kg i.v. una vez al día y con un máximo de 2 g al día.	21-28
	Cefotaxima	2 g. i.v cada 8 horas.	150 mg-200 mg/kg/día i.v. en tres dosis con máximo de 6 g. al día.	21-28
	Penicilina G	4 millones de unidades i.v cada 4 horas.	300.000 unidades/Kg/día divididas en 6 dosis, i.v.	21-28
Artritis no recurrente	Doxiciclina	100 mg v.o cada 12 horas.	4 mg/Kg/día en dos dosis v.o (máximo 100 mg por dosis).	28
	Amoxicilina	500 mg v.o. cada 8 horas	50 mg/Kg/día v.o en tres dosis (máximo 500 mg por dosis).	28
Artritis recurrente	Ceftriaxona	2 g. i.v una vez al día.	70-100 mg/kg i.v. una vez al día y con un máximo de 2 g al día.	28

1.7. PREVENCIÓN

La mayoría de las personas son susceptibles de que, en algún momento de su vida, les pique una garrapata y si está infectada por *Borrelia* puedan adquirir la enfermedad de Lyme.

Debe tener especial cuidado la población que realiza actividades en el medio natural como: ganaderos, trabajadores silvícolas, jardineros, etc., ya que habitualmente están en contacto con la naturaleza. También deben tener cuidado las personas que se expongan esporádicamente a la picadura de las garrapatas, como los cazadores o los excursionistas (Lledó *et al.*, 2004; Letrillart *et al.*, 2005; Linard *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2013). No obstante, los parques y jardines del medio urbano reúnen también las condiciones necesarias para que se desarrolle el ciclo biológico de los ixódidos (Junta Castilla y León, 1995).

La influencia de los factores climáticos/ambientales sobre la actividad de las garrapatas hace que en determinadas épocas del año, especialmente desde la primavera hasta mediados de otoño, las personas deben estar más atentas a la posible picadura de los ixódidos.

Una buena prevención se basa en el mejor conocimiento de la biología de las garrapatas y las enfermedades que éstas pueden transmitir tanto por parte de los médicos como de la población en general.

Otra forma de prevenir la picadura de las garrapatas y evitar contraer la EL es salir al campo con ropa apropiada y usar repelentes (Stanek *et al.*, 2012). En las salidas al campo se recomienda usar ropa clara y que cubra la mayor parte del cuerpo porque de esta forma se visualizan estos ácaros con mayor facilidad, al tiempo que se expone menor superficie corporal. Deben usarse pantalones y camisa de manga larga, los pantalones deben ir dentro de los calcetines y éstos dentro de las botas. La camisa también debe meterse dentro de los pantalones y las mangas han de ajustarse a las muñecas. En las zonas donde haya árboles se recomienda el uso de sombrero.

Los dos repelentes más utilizados para prevenir la picadura de garrapata son la permetrina y la dietiltoluamida (DEET). Esta última podría aplicarse sobre la escasa superficie corporal que quede expuesta y es necesario repetir su aplicación cada dos horas. En niños, la DEET debe utilizarse en concentraciones inferiores al 30% y, tan pronto se llegue a casa, retirarla con agua y jabón. La permetrina se utiliza sobre todo para aplicar sobre la ropa (<http://aapredbook.aappublications.org/site/spanish>).

En zonas en las que abunden los ixódidos, las personas deben revisarse cada 2-3 horas y cuando lleguen a casa hacer una inspección cuidadosa de la ropa, piel y cuero cabelludo por si en ellas ha quedado adherida alguna garrapata (Junta de Castilla y León, 1995).

Si no se ha podido evitar la picadura de garrapata, hay que retirarla lo antes posible, puesto que el riesgo de infección se incrementa de forma proporcional al tiempo de alimentación de la garrapata, siendo este del 100% al tercer día. Por esto, la retirada precoz de las garrapatas es el mejor método profiláctico para prevenir la EL una vez que la picadura ha tenido lugar (Biesiada *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2012).

Para retirar las garrapatas que se han fijado al cuerpo, tradicionalmente, las personas las sumergen en alcohol, aceite, petróleo, cortarlas con una tijera, etc., sin embargo, no son sistemas sanitariamente seguros ya que pueden facilitar la penetración de agentes infecciosos de la garrapata. Actualmente se considera que el método más adecuado para la retirada de las garrapatas se basa en sujetar con una pinza a la garrapata, agarrándola por el capítulo o gnatosoma, tan cerca de los quelíceros y del hipostoma como sea posible. A continuación, se ejercerá una tracción de forma progresiva y continua, nunca bruscamente, en la misma dirección de su implantación, hasta conseguir su extracción (Figura 1.5).



Figura 1.5. Retirada correcta de una garrapata.

Si al retirarla no se desprende totalmente, el resto que pudiera quedar se tratara como un cuerpo extraño. En todos los casos, se aplicará un antiséptico en la zona de la picadura por garrapata (Calvo y Aguado, 2014).

Un tema controvertido es la indicación de tratamiento antibiótico profiláctico de la EL ante la picadura de garrapata. El uso de una dosis única de 200 mg de doxiciclina oral en adultos o de 4 mg/Kg/dosis única en niños mayores de 8 años, parece prevenir en un 87% de los casos la aparición del EM (Nadelman *et al.*, 2001).

El Boletín Epidemiológico de Galicia (2014) recomienda el tratamiento antibiótico profiláctico sólo en el caso de que el paciente cumpla todos los siguientes criterios:

- La garrapata adherida al cuerpo se ha identificado como un adulto o ninfa de *I. scapularis* en América o de *I. ricinus* en Europa y ha permanecido en contacto con la persona durante más de 36 horas.
- La profilaxis puede realizarse dentro de las 72 horas posteriores a la retirada de la garrapata.
- Que la información ecológica/epidemiológica de la zona demuestre que más del 20% de las garrapatas locales están infectadas por *B. burgdorferi*.
- Sí no hay contraindicaciones para el uso de la doxiciclina.

Independientemente de que se cumplan o no todos los criterios para el tratamiento profiláctico, se recomienda que todas las personas a las que se les haya retirado una garrapata se mantengan en vigilancia durante 30 días e inicien el tratamiento correspondiente en caso de que desarrollen síntomas o signos de EL (García-Meléndez *et al.*, 2014).

En caso de que la doxiciclina esté contraindicada podría usarse la amoxicilina durante una semana. No obstante, en Europa el uso de antibióticos profiláctico es todavía, si cabe, más controvertido (Stanek *et al.*, 2012).

Otra forma de prevención es la inmunización. En EE.UU. se elaboró la vacuna LYMERix (Glaxo SmithKline) basada en la obtención de productos Osp por técnicas de ADN recombinante, debido a que por razones de seguridad no se pueden usar las bacterias enteras. Se trataba de una vacuna Osp A monovalente dirigida sólo frente a *B. burgdorferi s.s.* LYMERix fue aprobada para su utilización en EE.UU. por la **Food and Drug Administration**

(FDA) en 1998 y retirada por el propio laboratorio en 2002 debido a las posibles respuestas adversas (Skinner *et al.*, 2007).

Sigue siendo muy difícil la obtención de una vacuna para la enfermedad de Lyme, debido a que son muchas las cepas causales y estas bacterias tienen una capacidad muy alta para modificar sus proteínas de membrana. En la actualidad no existe ninguna vacuna disponible en el mercado para la EL, aunque está en una fase avanzada la investigación sobre una nueva vacuna, en este caso multivalente Osp A frente a *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii*, *B. afzelii* y *B. bavariensis* (Lantos, 2013; Wressnigg *et al.*, 2013).

1.8. PRONÓSTICO

La mayoría de los pacientes diagnosticados y tratados correctamente tienen un pronóstico excelente (Stanek *et al.*, 2012; Olmo *et al.*, 2014). Sin embargo, la respuesta al tratamiento antibiótico siempre es mejor cuando se administra en las fases iniciales de la EL que cuando se realiza en fases más avanzadas. En estas últimas, la respuesta es mucho más lenta y el período de convalecencia es más prolongado, aunque la mayoría de los pacientes se acaban recuperando completamente o presentan escasa sintomatología residual (Roca, 2006). No obstante, las reinfecciones son posibles tras la curación de la enfermedad, sobre todo en las fases iniciales (Roca, 2006), y no deben confundirse con una inadecuada respuesta al tratamiento.

En un pequeño porcentaje de pacientes, a pesar de que el diagnóstico y el tratamiento sean correctos, persisten una serie de síntomas subjetivos definido con síndrome post-Lyme cuyo pronóstico no mejora al prolongar la terapia antibiótica (Stanek *et al.*, 2011a).





2 OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

Basándonos en los antecedentes antes expuestos, en este estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

1°. Determinar la seroprevalencia de *Borrelia* en personas con sospecha de padecer enfermedad de Lyme en el área sanitaria del Hospital Universitario Lucus Augusti y establecer su posible relación con la tasa de incidencia de esta enfermedad.

2°. Analizar la posible influencia de la zona de procedencia y el hábitat de residencia de los pacientes sobre la seroprevalencia y tasa de incidencia de la enfermedad de Lyme.

3°. Comprobar si la edad y el sexo de los enfermos de Lyme influyen sobre las tasas de incidencia.

4°. Relacionar la densidad de corzos y la cobertura forestal de la zona de procedencia de los pacientes con la seroprevalencia y la tasa de incidencia.

5°. Investigar el antecedente de picadura de garrapata y la posible relación entre los meses en que se diagnosticaron los casos de Lyme y la densidad de garrapatas en corzos y en el medio ambiente.

6°. Identificar las genoespecies de *Borrelia* en machos adultos de *Ixodes ricinus* presentes en los corzos abatidos en el área de estudio y en ninfas y adultos recogidos de la naturaleza.

7°. Estudiar las manifestaciones clínicas y las fases de la enfermedad de Lyme en los casos confirmados, su evolución y respuesta al tratamiento.

8°. Determinar la incidencia y contribuir al conocimiento de esta enfermedad en los pacientes pediátricos del área sanitaria.

9°. Estimar si la zona de estudio puede considerarse como endémica para la enfermedad de Lyme y evaluar la posible indicación de tratamiento profiláctico tras picadura de garrapata.





3 MATERIAL Y MÉTODOS



3 MATERIAL Y MÉTODOS

Para su mejor comprensión, este apartado se divide en 4, en los que se describe los métodos utilizados para establecer:

- Características epidemiológicas de la zona de estudio.
- Seroprevalencia de *Borrelia* y tasas de incidencia de la enfermedad de Lyme.
- Especies de *Borrelia* halladas en los corzos y en la naturaleza.
- Manifestaciones clínicas de la EL.

3.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO.

3.1.1. Condiciones edafoclimáticas.

La provincia de Lugo está situada en el Noroeste de España, entre los 42° 20' y 43° 45' de latitud Norte y los 6° 49' y 8° 00' de longitud Oeste. Limita al Norte con el Mar Cantábrico, al Sur con la provincia de Ourense, al Este con la provincia de León y Asturias y al Oeste con las de A Coruña y Pontevedra.

Lugo es la más extensa de las cuatro provincias gallegas y tiene una superficie de 9.856 km², lo que supone, aproximadamente, la tercera parte de la Comunidad Gallega. La orografía de la provincia de Lugo se caracteriza por estar ocupada en su mayoría por una meseta de 500 metros de altitud media rodeada por cadenas montañosas; al norte están las Sierras Septentrionales (Serra do Xistral, da Toxiza, da Cadeira, etc.) que limitan el interior de la provincia con el mar Cantábrico, y al este y al sureste se sitúan las Sierras Orientales (Meira, Ancares, Courel, etc.).

A Lugo, por su situación en el noroeste de la península ibérica, le corresponde un clima oceánico que, según Rodríguez-Rajo *et al.* (2003), se caracteriza por ligeras variaciones de temperatura, siendo la temperatura media anual de 11,5°C y las medias de las temperaturas máximas y mínimas de 16,8°C y 6,2°C, respectivamente. Las precipitaciones anuales (963 mm) son abundantes aunque irregulares, registrándose los valores más elevados en los meses de invierno (124,8 mm) y los más bajos en los del verano (20 mm). No obstante, dentro de la provincia hay variaciones climáticas ostensibles que dependen de las zonas (Carballeira *et al.*, 1983).

Para facilitar la exposición de los resultados, así como su interpretación, dividimos el área de influencia del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) en 2 zonas: Meseta y Montaña. Los diferentes parámetros climáticos se obtuvieron a partir de los datos registrados entre 2005 y 2013 en 19 estaciones meteorológicas situadas en diferentes localidades de la provincia de Lugo.

La **Meseta** se corresponde con los 23 ayuntamientos de la zona central y su altitud oscila entre los 200 y los 650 metros. El clima es templado cálido, con temperaturas moderadas (12°C) y precipitaciones más bajas (<1300 mm) que en la Costa debido a que las Sierras Septentrionales y Orientales resguardan esta área.

La **Montaña** abarca los 18 ayuntamientos situados en las Sierras Septentrionales y Orientales de la provincia. La altitud oscila entre 650 y 1500 m y el clima es continental-pirenaico, caracterizado por bajas temperaturas (10°C) y elevadas precipitaciones (> 1500 mm). En la Tabla 3.1. se resumen los parámetros considerados.

Tabla 3.1. Principales parámetros climáticos y orográficos que caracterizan el área de estudio.

PARAMETROS	MESETA	MONTANA
Temperatura media anual (°C)	12	10
Media de las temperaturas máximas (°C)	16	14
Media de las temperaturas mínimas (°C)	7	5
Oscilación media anual (°C)	9	9
Precipitación total anual (mm)	<1300	>1500
Altitud (m)	200-650	650-1500

3.1.2. Densidad de corzos y superficie forestal.

La densidad de estos animales (número de ejemplares/100 ha) de cada ayuntamiento se obtuvo de la establecida en estudios previos por Vázquez *et al.* (2011). A partir de los datos publicados por la Consellería do Medio Rural e do Mar (2007) se calculó la superficie forestal, teniendo en cuenta la superficie total de cada ayuntamiento.

En la Tabla 3.2., se resume la densidad de corzos y el porcentaje de superficie forestal al considerar los ayuntamientos.

3.1.3. Población de estudio

El Hospital Universitario Lucus Augusti da cobertura asistencial a un área sanitaria en la que residen 223.374 personas, distribuidas en 41 ayuntamientos

En la Figura 3.1., se representa la localización de los ayuntamientos al considerar su situación en las 2 zonas en las que se ha dividido el área sanitaria del HULA.

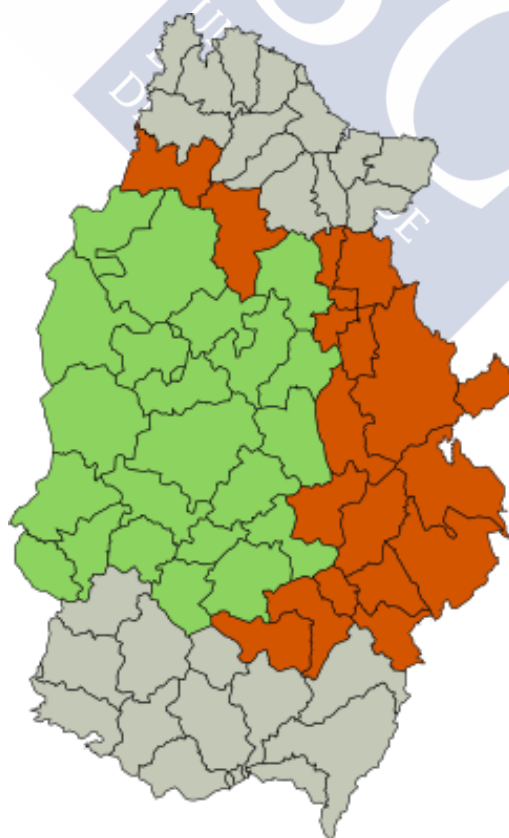


Figura 3.1. Localización de los ayuntamientos de procedencia de los pacientes y su distribución según la zona; verde: Meseta, naranja: Montaña.

Tabla 3.2. Densidad de corzos y superficie forestal de los ayuntamientos.

ZONA	AYUNTAMIENTO	DENSIDAD CORZOS	SUPERFICIE FORESTAL
MESETA	Antas de Ulla	4,33	0,55
	Begonte	5,65	0,61
	Castro de Rei	3,57	0,41
	Castroverde	4,72	0,57
	Corgo (O)	4,65	0,56
	Cospeito	7,14	0,26
	Friol	4,49	0,58
	Guitiriz	5,85	0,68
	Guntín	4,14	0,51
	Láncara	4,39	0,54
	Lugo	4,30	0,53
	Monterroso	4,33	0,46
	Outeiro de Rei	4,38	0,53
	Palas de Rei	4,33	0,53
	Paradela	3,94	0,44
	Páramo (O)	4,06	0,45
	Pastoriza	3,57	0,42
	Pol	5,05	0,56
	Portomarín	4,64	0,57
	Rábade	4,38	0,37
	Sarria	3,29	0,35
	Vilalba	4,77	0,53
	Xermade	5,62	0,71
MEDIA	4,59	0,51	
MONTANA	Abadín	5,71	0,71
	Baleira	6,20	0,75
	Baralla	5,96	0,69
	Becerreá	6,04	0,75
	Cervantes	6,26	0,78
	Fonsagrada (A)	6,28	0,78
	Incio	5,52	0,63
	Meira	5,41	0,63
	Muras	7,14	0,90
	Navia de Suarna	7,11	0,85
	Negueira de Muñiz	6,28	0,83
	Nogais (As)	6,04	0,75
	Pedrafita do Cebreiro	5,36	0,63
	Pontenova (A)	6,92	0,84
	Ribeira de Piquín	6,88	0,86
	Riotorto	6,59	0,73
	Samos	5,58	0,66
	Triacastela	5,58	0,65
	MEDIA	6,19	0,76

En la zona de la Meseta se encuentran 23 ayuntamientos: Lugo, Friol, Outeiro de Rei, Castro de Rei, Pol, Castroverde, O Corgo, Guntín, Palas de Rei, Guitiriz, Begonte, Rábade, Cospeito, Láncara, O Páramo, Portomarín, Monterroso, Antas de Ulla, Xermade, Vilalba, A Pastoriza, Sarria y Paradela. La zona de la Montaña comprende 18 ayuntamientos: A Fonsagrada, Navia de Suarna, Baleira, Ribeira de Piquín, Negueira de Muñiz, Becerreá, Baralla, Meira, Muras, Abadín, Riotorto, Cervantes, As Nogais, Triacastela, Pedrafita do Cebreiro, Samos, O Incio y A Pontenova.

De acuerdo con el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MAGRAMA), se consideraron residentes del hábitat rural los que vivían en entidades singulares de población menores de 2.000 personas y el resto del hábitat urbano. En el medio

rural habitaban 105.505 personas en el año 2006 y 96.697 en el 2013. La población urbana era de 122.257 personas en el 2006 y de 126.677 en el 2013. La distribución de la población se obtuvo del INE (padrón municipal de los años 2006 al 2013). Además, de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (Estadísticas Sanitarias Mundiales de la OMS, 2011), los pacientes se estratificaron según su edad (años): en jóvenes (<15), adultos (15-60) y mayores (> 60). En las Tablas 3.3. y 3.4. se resume la distribución de la población en cada ayuntamiento, al inicio y al final del estudio, al considerar las diferentes variables analizadas.

Tabla 3.3. Distribución de la población por ayuntamiento, en los años de inicio y fin del estudio, al considerar la zona y sexo de las personas.

ZONA	AYUNTAMIENTO	TOTAL		SEXO			
		HABITANTES		HOMBRES		MUJERES	
		2006	2013	2006	2013	2006	2013
MESETA	Antas de Ulla	2573	2219	1231	1086	1342	1133
	Begonte	3587	3322	1800	1664	1787	1658
	Castro de Rei	5785	5422	2879	2682	2906	2740
	Castroverde	3187	2887	1624	1481	1563	1406
	Corgo	4192	3828	2093	1933	2099	1895
	Cospeito	5409	5047	2629	2444	2780	2603
	Friol	4490	4137	2218	2050	2272	2087
	Guitiriz	5972	5658	2921	2837	3051	2821
	Guntín	3248	3018	1640	1521	1608	1497
	Láncara	3047	2866	1546	1463	1501	1403
	Lugo	93450	98007	43682	45765	49768	52242
	Monterroso	4140	3969	2069	1982	2071	1987
	Outeiro de Rei	4695	5046	2408	2586	2287	2460
	Palas de Rei	3759	3656	1842	1802	1917	1854
	Paradela	2307	2038	1163	1010	1144	1028
	Páramo	1823	1555	921	771	902	784
	Pastoriza	3726	3393	1856	1688	1870	1705
	Pol	1945	1794	955	884	990	920
	Portomarín	1910	1690	953	855	957	835
	Rábade	1668	1674	840	851	828	823
Sarria	13352	13524	6532	6647	6820	6877	
Vilalba	15455	15116	7577	7379	7878	7737	
Xermade	2332	2131	1151	1023	1181	1078	
MONTAÑA	Abadín	3141	2760	1511	1359	1630	1401
	Baleira	1684	1448	879	766	805	682
	Baralla	3100	2834	1572	1470	1528	1364
	Becerreá	3334	3072	1684	1557	1650	1515
	Cervantes	1914	1593	1067	907	847	686
	Fonsagrada	4856	4198	2552	2188	2304	2010
	Incio	2236	1875	1067	917	1169	958
	Meira	1774	1775	872	885	902	890
	Muras	926	754	466	381	460	373
	Navia Suarna	1615	1337	867	742	748	595
	N. de Muñiz	213	213	111	114	102	99
	Nogais	1441	1295	746	670	695	625
	P. do Cebreiro	1414	1199	755	644	659	555
	Pontenova	3016	2610	1484	1264	1532	1346
	R. de Piquín	771	630	387	319	384	311
	Riotorto	1634	1439	804	698	830	741
	Samos	1820	1556	942	807	878	749
	Triacastela	821	756	409	373	412	383

Tabla 3.4. Distribución de la población por ayuntamiento, en los años de inicio y fin del estudio, al considerar la zona y edad de las personas.

ZONA	AYUNTAMIENTO	EDAD					
		JOVENES		ADULTOS		MAYORES	
		2006	2013	2006	2013	2006	2013
MESETA	Antas de Ulla	192	160	1213	1037	1168	1022
	Begonte	243	229	1894	1759	1450	1334
	Castro de Rei	449	433	3168	2958	2168	2031
	Castroverde	220	198	1664	1522	1303	1167
	Corgo	278	268	2342	2033	1572	1527
	Cospeito	384	376	2884	2690	2141	1981
	Friol	325	270	2284	2150	1881	1717
	Guitiriz	487	471	3310	3163	2175	2024
	Guntín	211	195	1744	1578	1293	1245
	Láncara	401	200	1518	1523	1128	1143
	Lugo	11550	13162	59366	61422	22532	23423
	Monterroso	429	385	2200	2174	1511	1410
	Outeiro de Rei	425	545	2789	2982	1481	1519
	Palas de Rei	183	253	1826	1794	1750	1609
	Paradela	151	124	1234	1072	922	842
	Páramo	147	121	953	789	723	645
	Pastoriza	304	261	2006	1821	1416	1311
	Pol	153	132	1002	927	790	735
	Portomarín	142	119	985	848	783	723
	Rábade	189	184	977	982	502	508
Sarria	1337	1456	7854	7947	4161	4121	
Vilalba	1500	1507	8831	8667	5124	4942	
Xermade	147	163	1205	1140	980	828	
MONTAÑA	Abadín	205	154	1524	1321	1412	1285
	Baleira	112	71	845	751	727	626
	Baralla	228	194	1578	1450	1294	1190
	Becerreá	215	197	1780	1654	1339	1221
	Cervantes	111	82	956	784	847	727
	Fonsagrada	287	221	2423	2107	2146	1870
	Incio	93	86	1057	837	1086	952
	Meira	153	169	1000	1000	621	606
	Muras	52	41	449	354	425	359
	Navia Suarna	72	38	867	593	676	706
	N. de Muñiz	17	10	103	126	93	77
	Nogais	108	96	718	639	615	560
	P. do Cebreiro	68	35	737	625	609	539
	Pontenova	222	164	1598	1374	1196	1072
	R. de Piquín	38	21	356	296	377	313
	Riotorto	104	94	792	674	738	671
	Samos	107	77	910	786	803	693
Triacastela	70	67	449	409	302	280	

De las historias clínicas también se extrajo la información relativa a si los pacientes recordaban haber sufrido picadura de garrapata en el último año y se relacionó con el mes en el que se efectuó el diagnóstico.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE *Borrelia* Y DE LA TASAS DE INCIDENCIA DE ENFERMEDAD DE LYME.

3.2.1. Seroprevalencia.

El Servicio de Microbiología del HULA, previa autorización del Comité Ético, nos facilitó los resultados serológicos realizados entre los años 2006-2013, de 2.845 personas consideradas de riesgo para EL. A éstas, se les había solicitado la determinación de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* spp. por presentar clínica infecciosa inespecífica, lesiones cutáneas u otro tipo de manifestaciones clínicas compatibles con EL.

La prueba serológica empleada para la detección de anticuerpos frente a *Borrelia* fue el test VIDAS® Lyme IgG and IgM (bioMérieux, St. Louis, Mo.), que es un ELISA "sandwich" ligado a fluorescencia de alta sensibilidad y especificidad. El laboratorio de Microbiología del HULA fue quien realizó dicha técnica.

En el análisis de los resultados de las serologías, y debido a la confidencialidad de los datos personales, solo se dispuso de la zona y el hábitat de los pacientes.

La seroprevalencia de infección por *Borrelia* se expresó en porcentaje (%), es decir el número de sueros positivos respecto al de sueros analizados.

Para determinar la seroprevalencia anual, se halló el porcentaje de sueros positivos en cada año respecto al total de muestras analizadas en ese año.

3.2.2. Incidencia de Enfermedad de Lyme.

Este trabajo constituye un estudio hospitalario puesto que se revisaron las historias de las personas valoradas en el HULA con diagnóstico clínico de EL, por presentar datos clínicos compatible con esta enfermedad y, al menos una prueba serológica positiva a *Borrelia*. Las historias revisadas se identificaron gracias al Sistema de Análisis Experto de Hospitalización de Agudos, modificación clínica 9º edición (CIE 9 MC) en el que se codifican los diagnósticos al alta de los pacientes ingresados.

A la vez, se trata de un estudio poblacional ya que también se revisaron las historias de las personas que presentaban Western-Blot (+) a esta espiroqueta, cuya identificación fue facilitada por el Servicio de Microbiología del HULA.

La presencia de *Borrelia* se confirmó mediante un Western blot comercial (EUROLINE-WB, Euroimmun AG, Lübeck, Germany) realizado en el Centro Nacional de Microbiología (Instituto Carlos III). Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante empleando el software EuroLineScan.

Para conocer la tasa de incidencia de EL en el área sanitaria objeto de estudio, se realizó un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo de los últimos 8 años (2006-2013) en el que revisaron 199 historias clínicas de personas residentes en el área de influencia del HULA.

Para definir los pacientes incluidos en el estudio se siguieron los criterios de vigilancia epidemiológica de los CDC (Rodríguez-González *et al.*, 2013):

- A. Casos con eritema migratorio de 5 cm o más de diámetro, diagnosticado por un médico y con exposición a garrapata conocida.
- B. Casos con eritema migratorio de 5 cm o más de diámetro, diagnosticado por un médico y sin exposición a garrapata conocida pero con confirmación de laboratorio.
- C. Casos con al menos una de las manifestaciones tardías de la enfermedad (musculoesqueléticas, cardiovasculares o neurológicas) con confirmación de laboratorio de la infección por *Borrelia*.

La **confirmación, de laboratorio**, requiere el cumplimiento de uno de los siguientes aspectos:

- A. Cultivo positivo para *Borrelia*.
- B. Empleo de dos pruebas serológicas interpretadas según los criterios establecidos, donde:
 - b.1. Es suficiente la respuesta de IgM positiva cuando el comienzo de los síntomas es menor o igual a 30 días.
 - b.2. Es suficiente la respuesta de IgG positiva para cualquier momento de la enfermedad.
- C. Seropositividad por Western-Blot IgG usando los criterios de interpretación establecidos.
- D. Anticuerpos en LCR por ELISA o IFI, cuando el título es superior al del suero.

La tasa de incidencia anual (TI) se expresó por 100.000 habitantes/año. Se calculó dividiendo el número de casos nuevos entre el número de personas en riesgo de adquirir la enfermedad en ese año, considerando la población total al inicio del mismo.

Asimismo, para el cálculo de las tasas de incidencia anuales específicas (TIE) respecto a la zona, hábitat, sexo y edad de los pacientes, se tuvo en cuenta la población de cada categoría al inicio de ese año.

La tasa de incidencia acumulada (TIA) se expresó por 100.000 habitantes y para su cálculo se consideraron los casos confirmados de enfermedad diagnosticados en todo el periodo de estudio (2006-2013). Además, para el cálculo de las tasas de incidencia acumuladas específicas (TIAE) respecto a la zona, hábitat, sexo y edad de los pacientes se tuvieron en cuenta los enfermos de cada categoría diagnosticados en los 8 años del estudio y se expresaron por 100.000 habitantes. La población en riesgo de cada categoría se determinó hallando la media poblacional interanual.

3.3. OBTENCIÓN DE GARRAPATAS DE CORZOS Y DEL MEDIO E IDENTIFICACIÓN DE GENOESPECIES DE *Borrelia*.

Debido a que *I. ricinus* es el principal vector de *Borrelia*, tanto de los corzos como de los muestreos realizados en la naturaleza, se seleccionaron las garrapatas pertenecientes a esta especie.

3.3.1. *I. ricinus* de corzos.

La recogida de las garrapatas se realizó sobre 175 corzos abatidos, en distintos ayuntamientos de la zona de estudio, durante las temporadas de caza (Abril-Octubre) de los años 2007-2008.

A cada cazador se le proporcionó el material necesario y se le explicó brevemente la forma de obtener correctamente las muestras. Entre el material entregado, se facilitó una ficha de campo (Figura 3.2.) en la que se hacían constar una serie de datos sobre el animal cazado como sexo, edad y estado corporal y sobre la descripción del entorno en el que fue abatido el corzo (fecha, término municipal, localidad, provincia, etc.) y una bolsa de plástico donde se depositaba la piel. La ficha de campo presentaba un número para la identificación del animal que correspondía con la numeración de la bolsa en la que se depositaba la piel. Estas muestras fueron remitidas al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela. Allí se extrajeron las garrapatas fijadas a la piel y se revisó cuidadosamente la bolsa para obtener los ejemplares que se habían desprendido del

cuerpo del animal después de su muerte. Una vez obtenidas, las garrapatas se depositaron en recipientes individuales que se marcaron con el número de identificación del corzo del que procedían.

FICHA DE CAMPO.
Corzo 20

1. DATOS DEL TECOR:
 NOMBRE: MATRÍCULA:
 TÉRMINO MUNICIPAL: PROVINCIA:

2. DESCRIPCIÓN DEL ENTORNO EN QUE FUE ABATIDO EL ANIMAL:
 FECHA: LOCALIDAD:
 TÉRMINO MUNICIPAL: PROVINCIA:
 VEGETACIÓN PREDOMINANTE EN LAS 100 ha CIRCUNDANTES:

3. DESCRIPCIÓN DEL CORZO:
 SEXO: Macho Hembra.
 EDAD: Jóvenes (0-2 años) Adultos (>2 años)
 ESTADO CORPORAL:
 Muy delgado Delgado Normal Gordo Muy gordo.

DATOS ANATÓMICOS:




Figura 3.2. Ficha de campo y bolsa entregada a los cazadores.

Las garrapatas se conservaron en etanol 70% mezclado con vaselina líquida hasta su identificación. Para determinar las especies y sus estadios, se emplearon las claves de Gil-Collado *et al.* (1979), Estrada-Peña *et al.* (2004) y Pérez-Eid (2007). Asimismo, se cuantificaron los ejemplares de cada uno de los estadios de desarrollo (larvas, ninfas y adultos) presentes en cada corzo.

Para la realización de este estudio se emplearon únicamente los machos de *I. ricinus* ya que, éstos no se alimentan de su tercer hospedador, en este caso el corzo y, por lo tanto, se elimina la posibilidad de que la fracción del complemento de este rumiante silvestre haya destruido la espiroqueta. Así, se procesaron todas las garrapatas macho adultas ($n= 1.449$) halladas en los animales. Para su análisis molecular, se consideraron los ejemplares macho de *I. ricinus* recuperados de corzos abatidos en un mismo ayuntamiento, que se distribuyeron en pooles de, como máximo, 10 garrapatas, aunque este número varió dependiendo de la cantidad de *Ixodes* obtenidas en cada uno de los municipios.

Para facilitar la penetración, a través del exoesqueleto quitinoso de las garrapatas, de los diferentes compuestos empleados durante la extracción, las garrapatas macho de los corzos se cortaron longitudinalmente por la línea media; posteriormente se lavaron, durante 20-30 minutos, en microtubos de 1,5 ml en los que se había depositado 1 ml de PBS (tampón fosfato salino pH= 7,4) con objeto de eliminar la disolución de etanol y vaselina líquida. Finalmente, se eliminó el líquido, y los tubos se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su procesado.

En la Tabla 3.5., se resumen los datos relativos al número de corzos examinados en cada ayuntamiento, así como el número de machos de *I. ricinus* que albergaban, la media de machos por corzo, el número de pooles examinados y la media de machos de cada pool.

Tabla 3.5. Número de corzos, de machos de *I. ricinus* y de pooles estudiados al considerar los ayuntamientos de procedencia.

ZONA	AYUNTAMIENTO	Nº corzos examinados	Total <i>I. ricinus</i> ♂	— ♂/corzo	Nº pooles	— ♂/pool
MESETA	Begonte	3	25	8,3	4	6,25
	Castro de Rei	8	66	8,3	10	6,6
	Castroverde	17	152	8,9	17	8,9
	Corgo (O)	12	114	9,5	16	7,1
	Cospeito	2	5	2,5	1	5
	Friol	1	1	1	1	1
	Guitiriz	5	21	4,2	3	7
	Láncara	3	5	1,7	1	5
	Lugo	18	283	15,7	30	9,4
	Outeiro de Rei	1	1	1	1	1
	Páramo (O)	1	1	1	1	1
	Pastoriza	7	36	5,1	4	9
	Pol	11	63	5,7	6	10,5
	Portomarín	1	1	1	1	1
	Vilalba	4	4	1	1	4
	Xermade	6	10	1,7	1	10
TOTAL		100	788	7,9	98	8,0
MONTAÑA	Abadín	5	38	7,6	5	7,6
	Baleira	5	56	11,2	7	8
	Baralla	13	166	12,8	18	9,2
	Becerreá	6	49	8,2	6	8,2
	Cervantes	10	94	9,4	11	8,5
	Fonsagrada (A)	14	136	9,7	16	8,5
	Incio (O)	1	2	2	1	2
	Meira	2	34	17	3	11,3
	Muras	1	1	1	1	1
	Navia de Suarna	10	66	6,6	7	9,4
	Pedrafita	1	2	2	1	2
	Pontenova (A)	2	10	5	1	10
	Ribeira de Piquín	2	2	1	1	2
	Riotorto	1	2	2	1	2
	Triacastela	2	3	1,5	1	3
	TOTAL		75	661	8,8	80
TOTAL		175	1449	8,3	178	8,1

3.3.2. *I. ricinus* recogidas de la naturaleza.

Con objeto de conocer la tasa de infección por *Borrelia* en los diferentes estadios de desarrollo de *I. ricinus*, así como las genopecies presentes relacionadas con la EL, entre los meses de abril y junio de 2013, ambos incluidos, se realizaron varias salidas al campo para recoger garrapatas de la vegetación; los muestreos se realizaron en 14 ayuntamientos en los que también se habían identificado *I. ricinus* en los corzos (Tabla 3.6.).

En cada uno de estos ayuntamientos, las garrapatas se recogieron mediante el método de bandereo, y para ello se utilizaron paños de algodón blanco de 1 m x 1 m. La tela se pasó

lentamente por la vegetación durante 5-10 metros –aproximadamente 30 segundos- (Figura 3.3); las larvas, ninfas y adultos se agarran de forma temporal a la tela, pudiendo recogerse manualmente o con unas pinzas (Walker *et al.*, 2003).



Figura 3.3. Recogida de garrapatas de la naturaleza mediante bandereo.

Las garrapatas se conservaron en un tubo con alcohol de 70°. En cada muestreo participaron dos personas, siempre las mismas, y duró aproximadamente una hora y media; este se extendió unos 15 minutos más en aquellas zonas donde se encontró un mayor número de garrapatas en el medio, puesto que al agarrarse más garrapatas al paño, se debe comprobar la tela más a menudo.

En el laboratorio, las garrapatas se identificaron hasta nivel de especie empleando varias claves (Gil-Collado *et al.*, 1979; Estrada-Peña *et al.*, 2004; Pérez-Eid, 2007). Posteriormente los ejemplares se separaron en larvas, ninfas, machos y hembras adultos, y se realizó un recuento de cada una de estas fases de desarrollo. Una vez identificadas y cuantificadas, las garrapatas se conservaron en etanol absoluto a -20°C hasta su análisis molecular.

Para la detección de ADN de *Borrelia* en las garrapatas recogidas de la naturaleza se emplearon ninfas, machos y hembras adultas; en el presente estudio no se examinaron larvas debido a que la transmisión transovárica de *Borrelia* no es frecuente en *I. ricinus*, por lo que raramente éstas se encuentran infectadas. Además tampoco se estudiaron el total de los restantes ejemplares de ninfas, machos y adultos recogidos sino una selección de ellos. El ADN se extrajo a partir de pools de cada uno de los estadios de desarrollo. El número de *I. ricinus* por pool varió dependiendo de la cantidad de garrapatas recogidas en cada uno de los muestreos, pero se tendió a realizar pools de 10 ninfas y de 5 adultos. Las garrapatas se cortaron por la mitad longitudinalmente con un bisturí, y solo se empleó una mitad para la extracción; la otra se mantuvo conservada en etanol absoluto. Las garrapatas se introdujeron en tampón PBS durante 20-30 minutos para eliminar el alcohol que pudieran contener y tras eliminar el líquido, se extrajo el ADN.

En la Tabla 3.6. se resumen los datos relativos al número total de *I. ricinus* (ninfas, machos y hembras) empleados en el presente estudio; el número de garrapatas de cada uno de los estadios que fue finalmente se analizaron; así como, el número de pools realizados y la media de ninfas, machos y hembras empleados en cada uno de los pools.

Tabla 3.6. Número total de *I. ricinus* analizadas y de pools estudiados al considerar los ayuntamientos de procedencia.

ZONA	AYUNTAMIENTO	Nº <i>I. ricinus</i> analizadas			Nº de pools			Media de <i>I. ricinus</i> / pool		
		Ninfas	Machos	Hembras	Ninfas	Machos	Hembras	Ninfas	Machos	Hembras
MESETA	Begonte	50	25	21	5	5	4	10	5	5,3
	Castro de Rei	30	2	3	3	1	1	10	2	3
	Castroverde	50	2	9	5	1	2	10	2	4,5
	Cospeito	50	9	8	5	2	2	10	4,5	4
	Lugo	60	13	16	6	3	3	10	4	5,3
	O Corgo	50	11	8	5	2	2	10	5,5	4
	Vilalba	50	8	12	5	2	2	10	4	6
	TOTAL		340	70	77	34	16	16	10	3,9
MONTAÑA	A Fonsagrada	100	17	25	10	3	5	10	5	5
	A Pontenova	41	14	35	4	3	7	10	4,7	5
	Cervantes	100	8	3	10	2	1	10	4	3
	Meira	33	3	2	3	1	1	11	3	2
	Navia Suarna	50	19	16	5	4	3	10	4,8	5,3
	Ribeira Piquín	20	3	1	2	1	1	10	3	1
	Riotorto	50	11	16	5	2	3	10	5,5	5,3
	TOTAL		394	73	98	39	16	21	10	4,3
TOTAL		734	143	175	73	32	37	10	4,9	4,7

3.3.3. Caracterización molecular de los aislados de *Borrelia*.

La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Alemania), siguiendo el protocolo específico para sangre y tejidos recomendado por el fabricante.

Para determinar cuáles eran las genoespecies de *Borrelia* presentes en *I. ricinus* se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando un fragmento del gen de la flagelina (flaB), de acuerdo con los protocolos descritos por Barbour *et al.* (1996) y Stromdahl *et al.* (2003), y se utilizaron los cebadores señalados en la Tabla 3.7. Dicha PCR se realizó en dos etapas (PCR anidada), cada una de ellas constituidas por una reacción independiente, incluyéndose controles negativos y positivos en todos los ensayos.

Tabla 3.7. Cebadores empleados en la amplificación del gen de la flagelina de *Borrelia*.

Primera amplificación:		
FlaLL	5'-ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT-3'	658 pb de flaB (Stromdahl <i>et al.</i> 2003)
FlaRL	5'GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT-3'	
Segunda amplificación		
FlaLS	5'-AACAGCTGAAGAGCTTGGAAATG-3'	354 pb de flaB (Barbour y cols. 1996)
FlaRS	5'-CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC-3'	

En la primera reacción se amplificó un fragmento de aproximadamente 658 pares de bases (pb); para ello se emplearon 2 µl de ADN purificado, MgCl₂ 1,5 mM, tampón de PCR 1x, 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dNTPsNZYMix, Nzytech, Lisboa, Portugal), 1 µM de cada cebador (Tabla 3.7.) y 1,5 unidades de Taq polimerasa (NZYTaq DNA polymerase, Nzytech, Lisboa, Portugal) en un volumen final de 25 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MyCycler, BioRad, Hercules, California, EE.UU.), sometiendo a la mezcla a una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 55°C (hibridación) y 45 s a 72°C (hibridación) y una extensión final de 7 min a 72°C.

La segunda reacción de la PCR amplificó un fragmento interno de aproximadamente 354 pb, empleándose para ello 1,5 µl del producto de la primera reacción de PCR y los cebadores FlaLS y FlaRS (Tabla 3.7.) en un volumen final de 25 µl. La concentración de los compuestos empleados en esta segunda PCR fue idéntica a la de la primera PCR. El programa del termociclador fue similar al anterior, con la excepción de los tiempos y temperaturas de las fases de hibridación y extensión que pasaron a ser de 30 s a 55°C y 30 s a 72°C respectivamente; además, el número de ciclos se redujo a 30.

Los fragmentos obtenidos tras la realización de la segunda reacción de amplificación se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa. Para ello se cargaron 10 µl del producto de la segunda PCR junto con 2 µl de tampón de muestras en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x; posteriormente se aplicó un voltaje de 100 V durante 40-60 min. El gel se visualizó en un analizador de imagen Fluor- S Multimager (BioRad). Las bandas de ADN se evidenciaron mediante tinción con un sustituto del bromuro de etidio (Red Safe, REAL, Valencia, España).

La purificación de las muestras positivas y la determinación de la secuencia nucleotídica se realizó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela. Los productos de amplificación se secuenciaron en ambos sentidos utilizando el BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) y se leyeron en un secuenciador automático ABI-prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon con el programa Chromas Pro v.1.7.5. (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) y posteriormente se alinearon con BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3. (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, EE.UU.). Finalmente, la identificación de las especies presentes se realizó mediante la comparación de las secuencias de ADN obtenidas con aquellas de especies/genotipos de *Borrelia* depositadas en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), usando la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE LYME.

Antes de iniciar la recogida de datos relativos a los enfermos se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de Investigación de Galicia. Los criterios seguidos para la selección e identificación de los pacientes incluidos en el estudio ya han sido expuestos en el apartado 3.2.2.

Una vez seleccionados los pacientes y con el objetivo de recoger los datos relativos a las manifestaciones clínicas que presentaban, así como los resultados analíticos de mayor interés, se diseñó un cuaderno de recogida de datos (Anexo I). Además, con objeto de respetar las Normas de Buena Práctica Clínica, los principios éticos fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki y el Convenio de Oviedo, así como los requisitos establecidos en la

legislación española en el ámbito de la investigación respetando la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (15/1999, de 13 de diciembre), a cada paciente se le asignó un número en el cuaderno de recogida de datos, para asegurar el anonimato de la información.

En dicho cuaderno se recogieron los datos relativos a edad, sexo, lugar y hábitat de residencia de los pacientes, si recordaban el antecedente de picadura de garrapata, así como las manifestaciones clínicas, mes y año de diagnóstico. También se recopilaron los datos de laboratorio de mayor relevancia, el tratamiento administrado y la evolución de los pacientes.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se procesaron mediante la hoja de cálculo Microsoft Excel 2007 y todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico PASW Statistics 20 para Windows (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE.UU.).

Para comprobar la posible influencia de diferentes variables categóricas (zona, hábitat, sexo y edad) sobre los valores de incidencia y seroprevalencia se empleó el test Chi-cuadrado; asimismo, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para variables cuantitativas (densidad de corzos y cobertura vegetal). En el caso de las variables cualitativas, la fuerza de la asociación con la incidencia y la seroprevalencia se midió mediante el cálculo del riesgo relativo (RR) y *odds ratio* (OR), respectivamente, con intervalos de confianza del 95%.

En el estudio de la intensidad de parasitación por garrapatas en los corzos se empleó la media aritmética como medida de tendencia central, y la desviación estándar (DE) como medida de dispersión. El porcentaje de infección por *Borrelia* en los machos adultos de *I. ricinus* se estimó mediante la tasa de infección mínima (MIR, de las siglas en inglés *Minimum Infection Rate*), asumiendo que cada pool positivo mediante PCR contenía únicamente una garrapata positiva. La presencia de diferencias significativas en el MIR y en el porcentaje de pools de garrapatas positivos a *Borrelia* al tener en cuenta la zona se estimó mediante Chi-cuadrado; se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferencias en la intensidad de parasitación de los corzos considerando la zona de captura. La influencia de la densidad de corzos y la cobertura vegetal sobre el MIR y sobre el porcentaje de pools de garrapatas positivos a *Borrelia* se valoró con el coeficiente de correlación de Spearman.





4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos, y con objeto de facilitar la comprensión de los trabajos que integran esta Tesis Doctoral, dividimos este apartado en 3.

- Factores epidemiológicos que influyen sobre la seroprevalencia y tasa de incidencia.
- Garrapatas obtenidas en corzos y en el medio: tipificación de las genoespecies de *Borrelia*.
- Manifestaciones clínicas, tratamiento y evolución de los enfermos de Lyme.

4.1. FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS QUE INFLUYEN SOBRE LA SEROPREVALENCIA Y TASA DE INCIDENCIA.

Para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, se debe tener en cuenta las características epidemiológicas de la zona, que las manifestaciones clínicas del paciente sean compatibles con la infección por *B. burgdorferi s.l.* y su confirmación microbiológica (Agüero *et al.*, 2005; Wormser *et al.*, 2006; Portillo *et al.*, 2014). No obstante, tanto el cultivo microbiológico como la rentabilidad de la PCR es baja, por lo que, en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, se realiza un primer cribado serológico mediante inmunofluorescencia o enzoinmunoensayo y su posterior confirmación por Western-Blot (Biesiada *et al.*, 2012; Portillo *et al.*, 2014; Twizeyimana *et al.*, 2014).

4.1.1. Seroprevalencia

De los 2.845 sueros analizados, el 15,1% fueron seropositivos. La seroprevalencia hallada en el presente trabajo fue superior a la señalada por Tomao *et al.* (2005) en Italia (7,8%), pero inferior a la detectada por Segura *et al.* (2004) en otros países del Norte de Europa (28% en Holanda y 26% en Suiza). No obstante, la seroprevalencia hallada en nuestro estudio está dentro de los valores señalados por Biesiada *et al.* (2012) en otros países europeos (5-25%).

Al tener en cuenta los diferentes ayuntamientos de procedencia de las personas, se observó que la seroprevalencia osciló entre 0 y 65% (Ribeira de Piquín, localidad situada en la montaña lucense). Estas diferencias entre zonas ya se habían señalado en otras regiones españolas; siendo superiores las halladas en el Norte (13,2%) por Oteiza-Olaso *et al.* (2011) que las obtenidas en el sureste (3,7%) por Alcande-Encinas *et al.* (2010).

La seroprevalencia anual de *Borrelia* osciló entre 8,8% en 2007 y 22,3% en 2012 (Figura 4.1.), constatándose un aumento en la tendencia.

Como se señaló en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos, solo se dispuso de la zona y hábitat de las personas a las que se les realizó la determinación de anticuerpos frente a *Borrelia*.

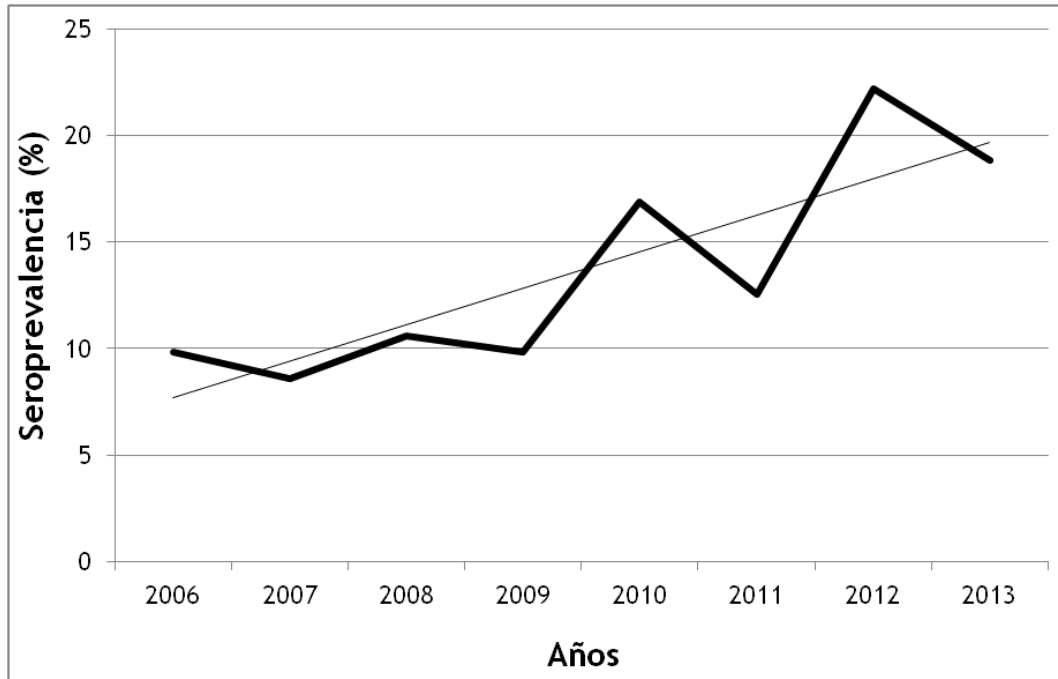


Figura 4.1. Porcentaje de personas seropositivas a *Borrelia* durante los años de estudio y línea de tendencia

Al considerar la **zona de residencia y el hábitat**, como se aprecia en la Tabla 4.1, la seroprevalencia fue significativamente superior en los residentes en la Montaña que en los de la Meseta ($\chi^2= 53,78$; $p<0,001$). Los valores de OR indican que las personas de la Montaña tienen aproximadamente 2 veces más riesgo de ser seropositivas a *Borrelia* que los de la Meseta. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre la seroprevalencia de los habitantes del medio rural y los del urbano ($\chi^2= 48,86$; $p<0,001$), constatándose con OR que las personas de hábitat rural tenían 2 veces más riesgo que las del urbano.

Tabla 4.1. Seroprevalencia de *Borrelia* al considerar la zona y hábitat de residencia de las personas.

	Seroprevalencia (2006-2013)		
	%	OR	CI (95%)
Zona			
Montaña	24,4		
Meseta	12,5	2,263	1,812-2,827
Hábitat			
Rural	19,9		
Urbano	10,5	2,114	1,708-2,616

Así mismo, la seroprevalencia anual de *Borrelia* fue superior en los habitantes de la Montaña que en los de la Meseta (Figura 4.2.), constatándose un aumento de la línea de tendencia.

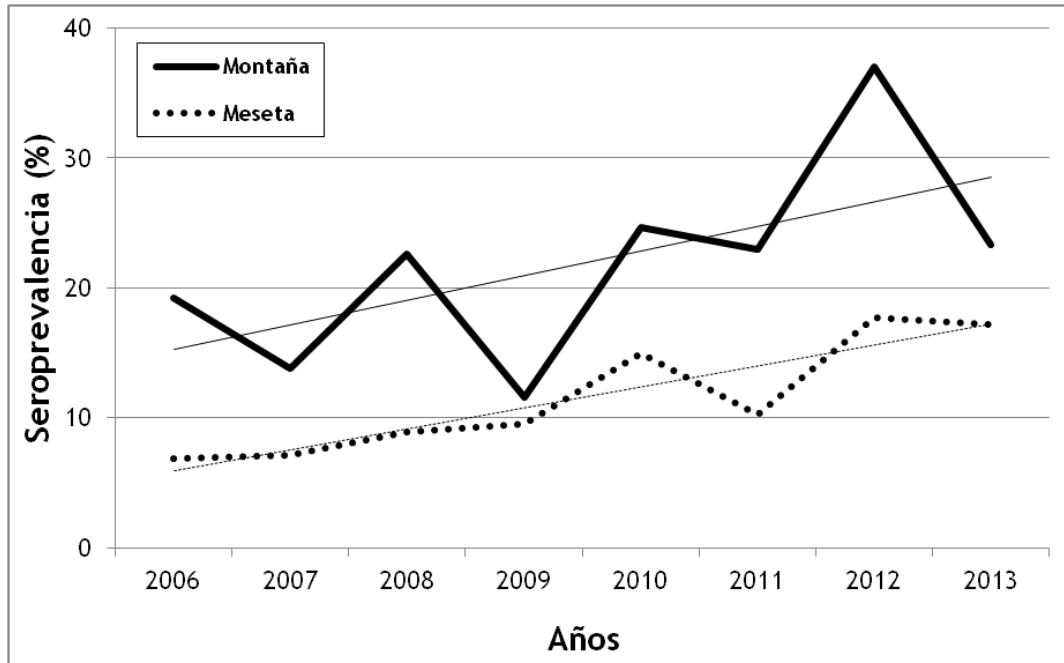


Figura 4.2. Seroprevalencia anual de *Borrelia* y líneas de tendencia al tener en cuenta la zona de procedencia de las personas.

4.1.2. Tasa de incidencia de Enfermedad de Lyme.

De las 199 historias clínicas seleccionadas como casos posibles de EL, únicamente 108 cumplían los criterios establecidos por los CDC para ser considerados casos confirmados de enfermedad, siendo la tasa de incidencia acumulada durante todo el estudio de 48,34 por 100.000 habitantes. La **tasa de incidencia anual** por 100.000 habitantes osciló entre 2,6 en 2007 y 11,6 en 2012 (Figura 4.3.), constatándose una tendencia ascendente con el tiempo ya observada en otros países europeos (Stanek *et al.*, 2012; Vandenesch *et al.*, 2014).

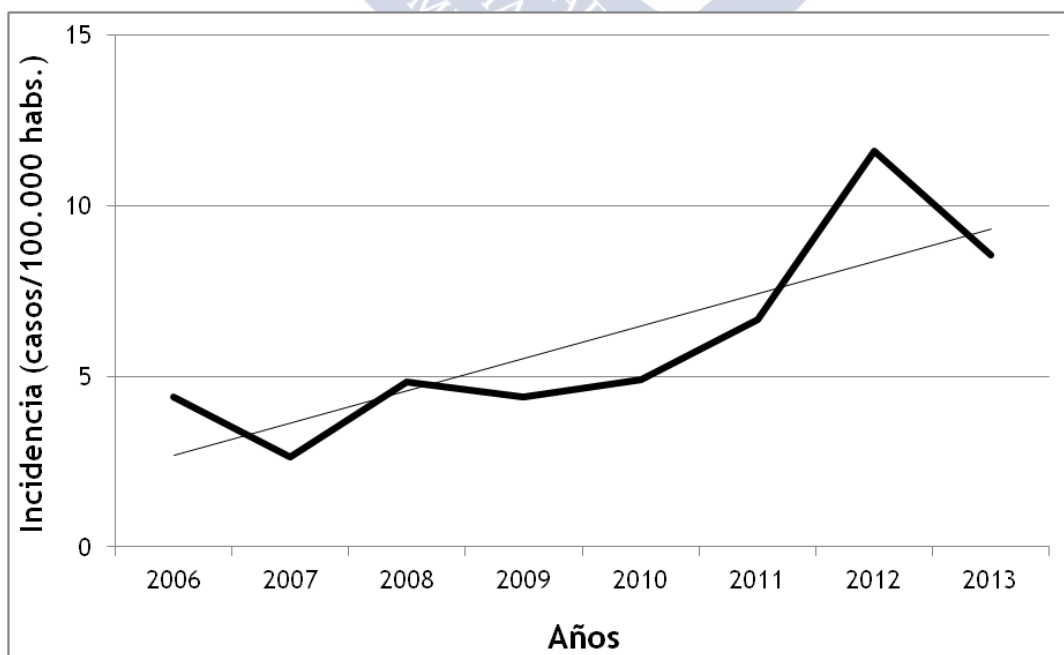


Figura 4.3. Evolución de la tasa de incidencia de enfermedad de Lyme durante los años de estudio y línea de tendencia.

Las tasas de incidencia anuales obtenidas en este estudio fueron superiores a las señaladas en España (0,25/100.000 habitantes/año) por otros autores (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005; Pazos Ferro *et al.*, 2010; Pereyra-Rodríguez *et al.*, 2011; Alonso Fernández *et al.*, 2012), e incluso podrían ser superiores, al no incluirse en este estudio posibles pacientes diagnosticados ambulatoriamente, por la presencia de eritema migrans sin estudio serológico ni visita hospitalaria. Además, hay que destacar que en un ayuntamiento de la montaña lucense se obtuvo en el año 2013 una TI de 476,19 casos/100.000 habitantes que es incluso superior a la observada en zonas consideradas endémicas de Centroeuropa en las que la TI está próxima a los 155 casos/100.000 hab/año (Derdáková y Lencakova, 2005; Vandenesch *et al.*, 2014).

Estos resultados, refuerzan la hipótesis de que la provincia de Lugo, al igual que sucede en Asturias, Norte de Castilla y León, Cantabria, País Vasco, La Rioja y Navarra (Portillo *et al.*, 2014), se debe incluir como zona de riesgo de EL. Asimismo, se debería considerar a España como uno de los países europeos en los que existe una clara tendencia al incremento de la incidencia de la EL (Rizzoli *et al.*, 2011).

Al considerar las **tasas de incidencia anual específicas (TIE)**, se observó que fueron superiores en los habitantes de la Montaña que en los de la Meseta (Figura 4.4.) y en los del hábitat rural que en los del urbano (Figura 4.5.). Además, se comprobó que las TIE mostraron una tendencia ascendente con el tiempo en los pacientes de la montaña y en los del hábitat rural. Este aumento que muestra la tendencia al considerar la zona y el hábitat de residencia de las personas, se puede atribuir a un mayor riesgo de adquirir la enfermedad o al aumento en la tasa de diagnóstico, pero no a un incremento de residentes en la montaña o en el hábitat rural, ya que estos se redujeron en el 6,62% y 8,35%, respectivamente.

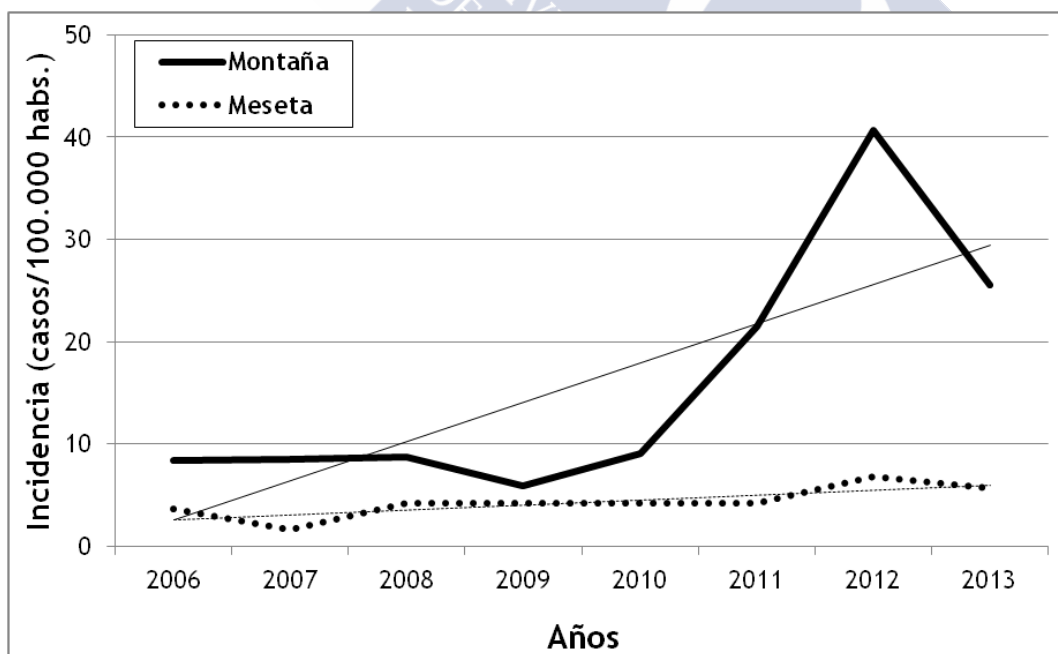


Figura 4.4. Tasas de incidencia anual específicas y sus líneas de tendencia, al considerar la zona de residencia de los pacientes.

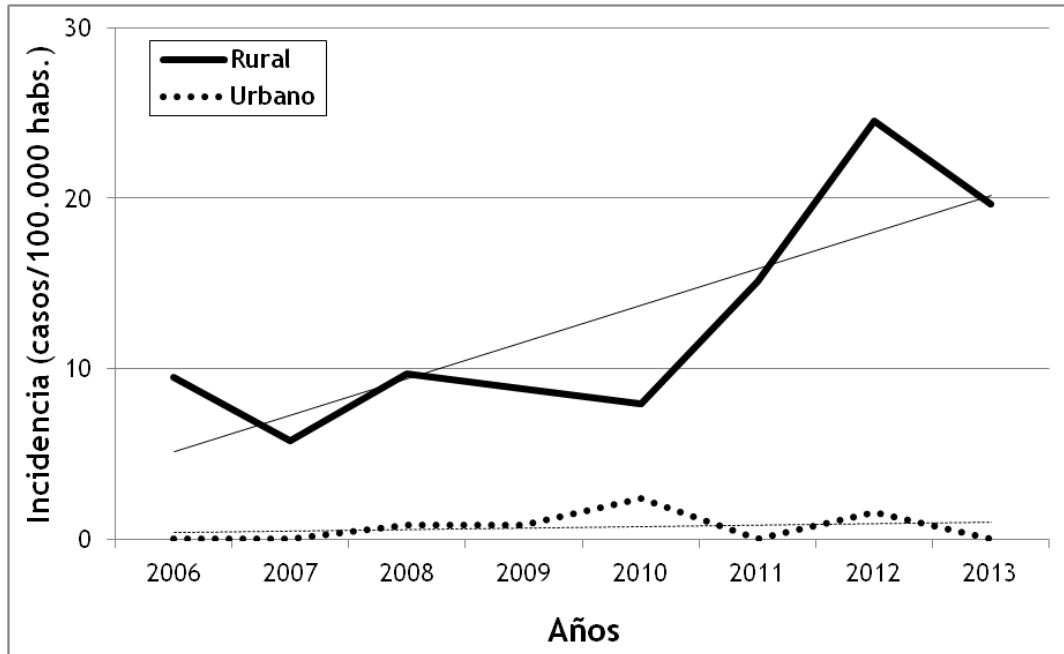


Figura 4.5. Tasas de incidencia anuales específicas y sus líneas de tendencia, al considerar el hábitat de residencia de los pacientes.

En relación con el **sexo**, como se aprecia en la Figura 4.6., aunque la TIE fue superior en los hombres, sin embargo, la tendencia fue similar entre ambos.

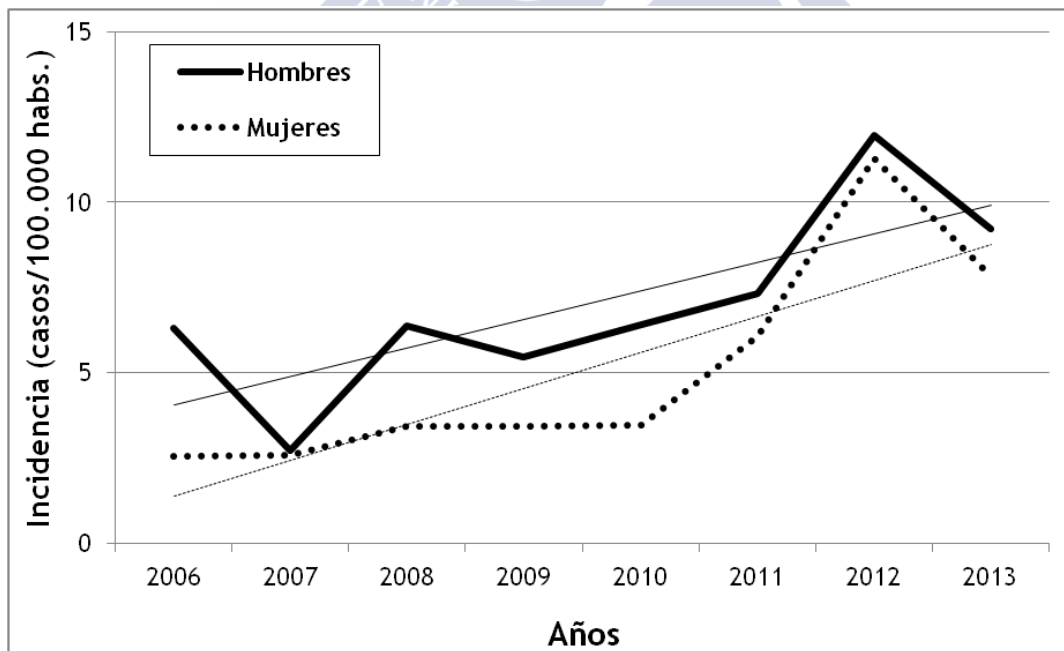


Figura 4.6. Tasas de incidencia anuales específicas y sus líneas de tendencia, al considerar el sexo.

Al considerar los grupos de **edad** (Figura 4.7.), la TIE fue superior en los mayores y en los jóvenes. Esta distribución bimodal coincide con la señalada por otros autores (Rizzoli *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2012; Wilking y Stark, 2014, Vandenesch *et al.*, 2014).

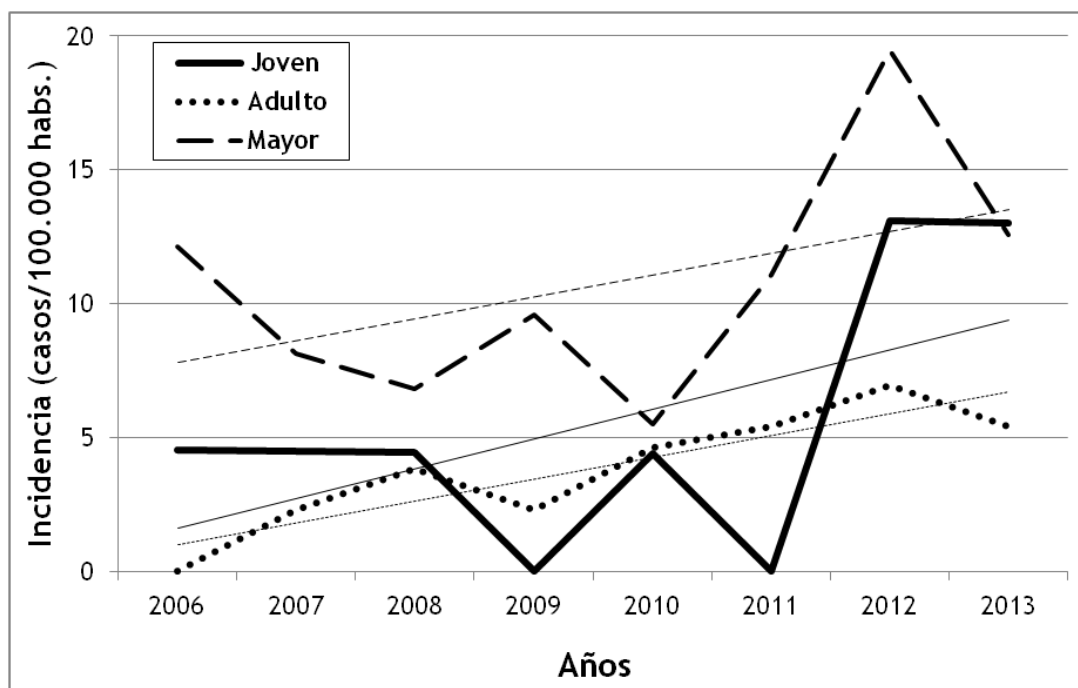


Figura 4.7. Tasas de incidencia anuales específicas y sus líneas de tendencia, al considerar la edad de los pacientes.

Al tener en cuenta las **tasas de incidencia acumulada específicas** (Tabla 4.2.), se observó que respecto a la **zona y hábitat** de los pacientes, la TIAE era significativamente ($\chi^2=55,16$; $p<0,001$) superior en los residentes en la Montaña (125,27) que en los de la Meseta (34,37). Asimismo, la TIAE fue significativamente ($\chi^2=71,12$; $p<0,001$) mayor en los habitantes del medio rural (99,91) que en los del urbano (5,62). De hecho, el riesgo de padecer EL fue más de 3 veces superior en los pacientes de la Montaña que en los de la Meseta y 17 veces superior en los del medio rural que en los del urbano. Además, la asociación entre la EL y estos 2 factores (zona y hábitat) se mantuvo al considerarlos conjuntamente ($p<0,001$).

Las diferencias observadas por nosotros entre las 2 zonas de estudio, coinciden, en general, con las de otros autores (Portillo *et al.*, 2014; Wilking y Stark, 2014; Vandenesch, *et al.*, 2014) que también habían hallado diferencias de incidencia entre regiones de un mismo país. Esta distribución local / regional de la enfermedad ya descrita en Francia (Vandenesch *et al.*, 2014) se ve también apoyada por las importantes diferencias de incidencia observadas en nuestro estudio entre ayuntamientos próximos. Estas diferencias locales en la incidencia de la enfermedad, han de ser tenidas en cuenta a la hora de planificar programas preventivos para la mejora de la salud pública.

Tabla 4.2. Comparación de las tasas de incidencia acumulada específicas al considerar la zona, hábitat de procedencia, sexo y edad de los pacientes.

VARIABLE	CATEGORÍA	n	TIA	RR	IC (95%)	P
ZONA	Montaña	42	125,27	3,64	2,47-5,36	< 0,001
	Meseta	66	34,37			
HÁBITAT	Rural	101	99,91	17,76	8,26-38,21	< 0,001
	Urbano	7	5,62			
SEXO	Mujer	47	40,53	1,37	0,94-2,01	0,1
	Hombre	61	56,23			
EDAD	Joven	10	44,30	1,79 (M/J)	0,92-3,51	> 0,05
	Adulto	40	30,75	1,44 (J/A)	0,72-2,88	> 0,05
	Mayor	58	79,55	2,50 (M/A)	1,73-3,87	< 0,001

TIA: tasa de incidencia acumulada; RR: riesgo relativo; IC95%: índice de confianza al 95%; P: probabilidad.

La mayor tasa de incidencia observada en los habitantes del medio rural, concuerda con la hallada por otros autores (Letrillart *et al.*, 2005; Linard *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2013; Lledó *et al.*, 2014) que relacionan este resultado con el hecho de que los habitantes del medio rural, al dedicarse fundamentalmente a labores agrícolas y ganaderas, tienen mayor contacto con la naturaleza y por tanto un riesgo superior de ser picados por una garrapata.

En relación con el **sexo**, la TIAE fue ligeramente superior en los hombres que en las mujeres, pero estas diferencias carecieron de significación estadística, lo que concuerda con lo observado por otros autores (Olmo *et al.*, 2014; Wilking y Stark, 2014).

Al considerar la **edad** de los pacientes, se observaron diferencias estadísticamente significativas únicamente en las TIAE entre los adultos y los de mayor edad (Tabla 4.2.). Los valores de RR indican que el riesgo de EL fue aproximadamente 2 veces superior en las personas de mayor edad que en los adultos.

4.1.3. Relación entre seroprevalencia, tasa de incidencia, densidad de corzos y cobertura forestal

Al comparar la seroprevalencia y la tasa de incidencia acumulada durante todo el periodo de estudio (2006-2013) para cada uno de los 41 ayuntamientos (Tabla 4.3.), se constató que existía una correlación positiva y significativa entre ambas ($r= 0,726$; $p<0,01$). Estos resultados indican que la detección de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* es útil para un primer cribado serológico mediante ELISA, aunque es imprescindible su posterior confirmación mediante Western-Blot, excepto en aquellos pacientes con eritema migrans (Biesiada *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2003; Portillo *et al.*, 2014; Twizeyimana *et al.*, 2014).

Al relacionar la **densidad de corzos y la cobertura forestal** (Tabla 4.3.), se comprobó que existía una correlación positiva y significativa entre ambas ($r= 0,597$; $p<0,01$). Estos resultados coinciden con los señalados por otros autores (Melis *et al.*, 2009; Borowik *et al.*, 2013; Olmo, 2014) quienes comprobaron que las variaciones en la composición y cubierta forestal influían sobre las densidades de las poblaciones de los corzos.

Además, los bosques caducifolios, las zonas de arbustos y los pastizales húmedos y cubiertos de maleza, como sucede en la montaña lucense, son los hábitats más propicios para *I. ricinus*, principal vector de *Borrelia* spp. (Estrada-Peña *et al.*, 2012) y, según estos autores, debe haber un amplio número y variedad de hospedadores para que se puedan alimentar los diferentes estadios de esta garrapata y, en este sentido, se ha comprobado que, en Galicia, el corzo es uno de los hospedador de alimentación más importante para *I. ricinus* (Vázquez *et al.*, 2011; Pato *et al.*, 2013).

Tabla 4.3. Relación entre seroprevalencia, tasa de incidencia, densidad de corzos y superficie de masa forestal.

ZONA	AYUNTAMIENTO	SEROPREVALENCIA	TASA INCIDENCIA	DENSIDAD CORZOS	SUPERFICIE FORESTAL
MESETA	Antas de Ulla	28,57	188,15	4,33	0,55
	Begonte	25,53	185,77	5,65	0,61
	Castro de Rei	13,88	18,99	3,57	0,41
	Castroverde	28,57	211,27	4,72	0,57
	Corgo (O)	25,71	132,94	4,65	0,56
	Cospeito	16,43	60,56	7,14	0,26
	Friol	9,52	0,0	4,49	0,58
	Guitiriz	26,31	107,09	5,85	0,68
	Guntín	10,71	134,23	4,14	0,51
	Láncara	12,19	70,45	4,39	0,54
	Lugo	9,12	11,14	4,30	0,53
	Monterroso	5,0	25,72	4,33	0,46
	Outeiro de Rei	11,86	39,23	4,38	0,53
	Palas de Rei	8,69	0,0	4,33	0,53
	Paradela	19,04	49,90	3,94	0,44
	Páramo	0,0	0,0	4,06	0,45
	Pastoriza	17,39	0,0	3,57	0,42
	Pol	14,28	56,92	5,05	0,56
	Portomarín	0,0	0,0	4,64	0,57
	Rábade	22,22	0,0	4,38	0,37
	Sarria	10,21	0,0	3,29	0,35
	Vilalba	22,22	100,13	4,77	0,53
	Xermade	13,04	0,0	5,62	0,71
MONTAÑA	Abadín	12,5	36,75	5,71	0,71
	Baleira	12,51	0,0	6,20	0,75
	Baralla	10,71	0,0	5,96	0,69
	Becerreá	19,14	32,81	6,04	0,75
	Cervantes	8,33	0,0	6,26	0,78
	Fonsagrada (A)	27,21	394,19	6,28	0,78
	Incio	12,00	485,44	5,52	0,63
	Meira	28,57	56,53	5,41	0,63
	Muras	0,0	0,0	7,14	0,90
	Navia Suarna	25,92	76,98	7,11	0,85
	Negueira Muñiz	33,33	0,0	6,28	0,83
	Nogais (As)	18,75	78,74	6,04	0,75
	Pedrafita	10,00	0,0	5,36	0,63
	Pontenova (A)	31,88	268,20	6,92	0,84
	Ribeira Piquín	65,00	1806,24	6,88	0,86
	Riotorto	27,27	138,99	6,59	0,73
	Samos	5,50	0,0	5,58	0,66
	Triacastela	0,0	0,0	5,58	0,65

Al relacionar la **densidad de corzos con la seroprevalencia** hallada en cada ayuntamiento (Tabla 4.3.), se comprobó que existía una correlación positiva y significativa entre ambas ($r= 0,343$; $p= 0,028$). Asimismo, se constató esta correlación ($r= 0,310$; $p= 0,048$) entre la **densidad de corzos y la tasa de incidencia de EL**. Estos resultados concuerdan con los hallados en otros países de Europa, en los que ya se había constatado una correlación positiva entre la densidad de las poblaciones de corzos y la incidencia de EL (Jensen *et al.*, 2000; Letrillart *et al.*, 2005).

Aunque la intervención del corzo no está totalmente aclarada en la epidemiología de *Borrelia* spp., diversos estudios han demostrado que estos animales actúan como hospedadores de alimentación de *I. ricinus* (Moestrup *et al.*, 2000; Vázquez *et al.*, 2011;

Kjelland *et al.*, 2011; Rizzoli *et al.*, 2011; Sprong *et al.*, 2012) y que un aumento de la densidad de corzos favorece el incremento de las poblaciones de garrapatas (Jensen *et al.*, 2000; Rizzoli *et al.*, 2011; Kjelland, *et al.*, 2011; Sprong *et al.*, 2012). Además, se ha observado que en las áreas que había mayor densidad de corzos también existía un mayor porcentaje de garrapatas infectadas con *Borrelia*, lo que ocasionaba un mayor riesgo de adquirir la EL en los habitantes de esas zonas (Letrillart *et al.*, 2005; Rizzoli *et al.*, 2011; James *et al.*, 2013). En este sentido, en el área de este estudio, el porcentaje de corzos seropositivos a *B. burgdorferi* era del 68,8%, de los cuales el 88,7% estaban infestados por *Ixodes ricinus* (Pato *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que el corzo puede representar un importante indicador de la transmisión de *Borrelia* en el Noroeste de España debido a su abundancia y alto nivel de infestación por *B. burgdorferi* (Pato *et al.*, 2013).

Al comparar la **masa forestal con la seroprevalencia y la incidencia de EL**, se observó (Tabla 4.3.) que en los ayuntamientos en los que la masa forestal era superior también lo eran la seroprevalencia y la incidencia de EL, aunque estas diferencias carecían de significación estadística ($r=0,174$; $p> 0,05$). Se ha señalado que las variaciones en la composición forestal pueden afectar al porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia*. En zonas con bosques caducifolios, como los que predominan en nuestro área de estudio, la prevalencia de *B. burgdorferi s. l.* en ninfas de *I. ricinus* fue mayor que la encontrada en las garrapatas procedentes de bosques de coníferas (James *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente estudio, nuestros resultados indican que la densidad de las poblaciones de corzos resultan mejores indicadores de la EL que la masa forestal.

4.1.4. Antecedente de picadura de garrapata y mes de diagnóstico de EL

En relación con el **antecedente de picadura de garrapata**, solo el 45,37% tenían constancia de ella, lo que concuerda con lo señalado por diferentes autores (Roca, 2006; Mygland *et al.*, 2010; Pereyra-Rodríguez *et al.*, 2011; Olmo *et al.*, 2014), bien por tratarse de una picadura indolora (García-Moncó *et al.*, 2002) o bien por ser en ocasiones garrapatas de pequeño tamaño (larvas, ninfas o adultos sin alimentar) que son difíciles de ver (Roca, 2006; Olmo *et al.*, 2014).

Respecto a la **época del año en que se estableció el diagnóstico**, en el 68,5% de los casos se realizó entre los meses de Junio y Octubre (Fig. 4.8.). Los meses en los que se diagnosticaron la mayoría de los casos de EL concuerdan, en general, con lo observado en otras comunidades españolas como La Rioja (Oteo-Revuelta *et al.*, 2000) y en otros países de Europa como Alemania (Wilking y Stark, 2014). Además, en estudios previos (Vázquez *et al.*, 2011), obtuvieron una mayor prevalencia de infestación por garrapatas en los corzos entre mayo y julio. El desfase que existe entre este periodo y el momento del diagnóstico de la EL se debe, probablemente, al tiempo que transcurre desde la picadura de garrapata hasta el diagnóstico.

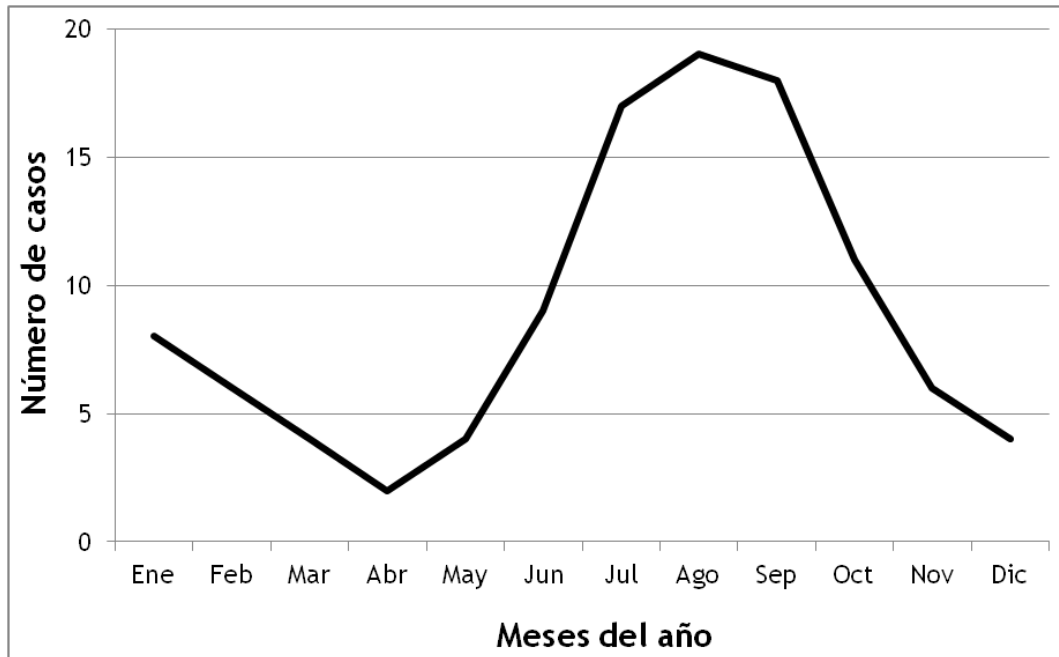


Figura 4.8. Número de casos según el mes en el que se realizó el diagnóstico.

4.2. GARRAPATAS RECOGIDAS DE CORZOS Y DE LA NATURALEZA: TIPIFICACIÓN DE LAS GENOESPECIES DE *Borrelia*.

Para su mejor comprensión, este apartado le subdividimos en 3. En los 2 primeros, se detallan las prevalencias de infección por *Borrelia* halladas en las garrapatas obtenidas de los corzos y de la naturaleza, y en el tercero se especifican las genoespecies de *Borrelia* identificadas.

4.2.1. Prevalencia de infección por *B. burgdorferi s.l.* en garrapatas obtenidas de corzos

En este estudio, todas las garrapatas identificadas en los corzos eran de la especie *I. ricinus*. Estos resultados coinciden con los hallados, previamente en un estudio más amplio realizado en Galicia, por Vázquez *et al.* (2011) quienes comprobaron que la especie predominante en corzos abatidos en distintas localidades gallegas era *I. ricinus* (presente en el 99,7% de los animales); estos autores únicamente hallaron un animal que albergaba *Dermacentor* (0,3% de los animales). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros países y regiones del centro de Europa, como el norte de Italia, Polonia y Alemania (Carpi *et al.*, 2008; Skotarczak *et al.*, 2008; Vor *et al.*, 2010). Por el contrario, Alonso *et al.* (2004) observaron que la especie de garrapatas predominante en cérvidos del sureste de España era *Rhipicephalus bursa*, mientras que *I. ricinus* fue una de las especies con menor prevalencia. Estos datos coinciden con la distribución de *I. ricinus* en el medio, ya que sus hábitats son principalmente áreas con precipitaciones abundantes, amplia cubierta vegetal y elevado número de rumiantes silvestres y domésticos en extensivo (Estrada-Peña *et al.*, 2004), como sucede en nuestro estudio.

Durante el proceso de clasificación de las garrapatas, se observó (Figura 4.9.) que estas pertenecían a todos los estadios (larva, ninfa y adulto) siendo, en los corzos, más prevalentes los adultos y en especial las hembras (Tabla 4.4.). Estos resultados coinciden con lo observado en estudios previos (Matuschka *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 2011), en los que también se hallaron un elevado porcentaje de estadios inmaduros en rumiantes silvestres. En

este sentido, Estrada-Peña (1994) señaló que, aunque *I. ricinus* tiene un amplio rango de hospedadores, las larvas y las ninfas se alimentan principalmente de un elevado número de micromamíferos y pequeñas aves, mientras que los adultos parasitan, sobre todo, a rumiantes. De hecho, las hembras de *I. ricinus* sólo se alimentan con éxito en grandes animales como ciervos, ovejas, vacas y perros (EUCALB, 2009).

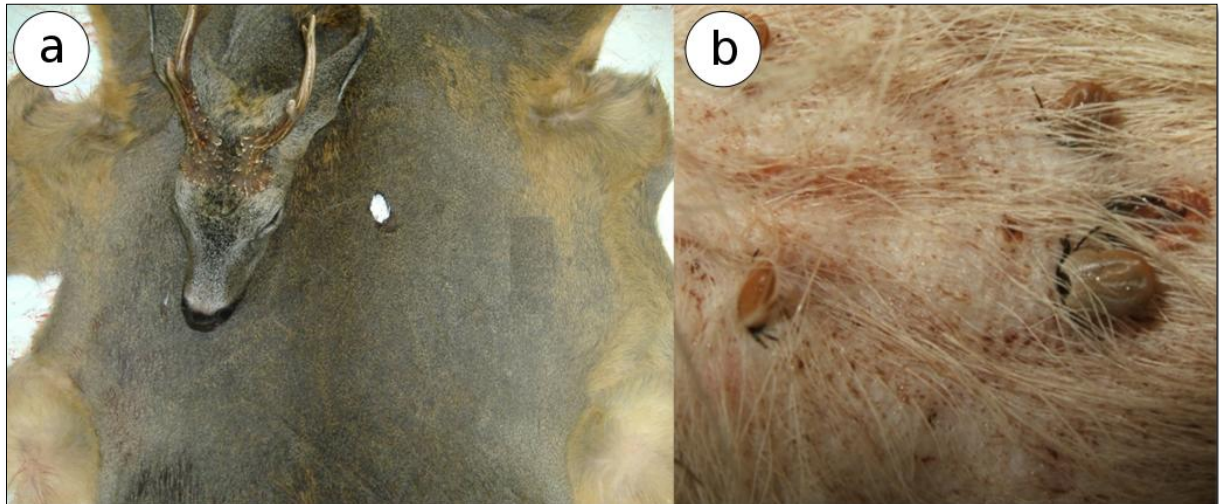


Figura 4.9. a) Las garrapatas se obtuvieron tras un examen minucioso de la piel del corzo. b) La presencia de hembras adultas ingurgitadas fue muy frecuente.

Al considerar la zona de procedencia de los corzos se observó que las cifras medias de garrapatas en los corzos abatidos en la meseta fueron superiores a las halladas en los de la montaña (Tabla 4.4.), constatándose con el test de Kruskal-Wallis que estas diferencias eran significativas ($\chi^2= 4,214$; $p= 0,040$). Estos resultados difieren de los obtenidos por Vázquez *et al.* (2011), quienes hallaron cifras medias superiores en los corzos abatidos en la montaña, aunque carecieron de significación estadística. Asimismo, se observó que el número medio de cada uno de los estadios de desarrollo de *I. ricinus* resultó ligeramente más elevado en los corzos de la meseta que en los de la montaña, a excepción de las hembras adultas; con el test de Kruskal-Wallis se constató que estas diferencias no eran significativas en ningún caso ($p > 0,05$).

Tabla 4.4. Número medio \pm DE de *I. ricinus* recuperadas de los corzos, al considerar la zona climática y el estadio de desarrollo.

	Meseta	Montaña	TOTAL
Larva	12,05 \pm 34,89	5,76 \pm 6,64	9,64 \pm 27,77
Ninfa	21,09 \pm 30,11	19,50 \pm 22,82	20,50 \pm 27,54
Macho adulto	10,97 \pm 12,93	10,67 \pm 9,58	10,85 \pm 11,50
Hembra adulta	24,60 \pm 20,47	26,03 \pm 26,68	25,33 \pm 23,02
Total	59,47 \pm 57,74	45,69 \pm 48,99	53,70 \pm 54,52

Al relacionar la densidad de corzos con el número total de garrapatas recuperadas de éstos, con la prueba de Spearman se comprobó que ambas variables no estaban correlacionadas ($\rho= -0,159$; $p= 0,036$). Asimismo, tampoco estuvo correlacionada la densidad de corzos con la intensidad de infestación por los diferentes estadios de desarrollo de *I.*

ricinus ($p > 0,05$). Estos resultados coinciden con los de Carpi *et al.* (2008) quienes señalaron que la intensidad de infestación por garrapatas no era dependiente de la densidad de corzos.

Respecto a la cobertura forestal y su posible relación con la intensidad de parasitación por garrapatas, se constató que tampoco estaba correlacionada con ninguno de los estadios de desarrollo de *I. ricinus* ($p > 0,05$). Estos resultados, no concuerdan con las observaciones de Estrada-Peña *et al.* (2012), debido a que los bosques caducifolios o pastizales húmedos y cubiertos de maleza, como sucede en la montaña lucense, serían los hábitats más propicios para *I. ricinus*.

Mediante la PCR que amplifica un fragmento del gen que codifica para la flagelina de *Borrelia* (FlaB; Figura 4.10.) se comprobó que *B. burgdorferi s.l.* estaba presente en un reducido número de machos adultos de *I. ricinus* recogidos de los corzos, puesto que únicamente se detectaron amplicones del tamaño esperado (≈ 350 pb) en 9 de los 178 (5,1%) pools procesados. Asimismo, la tasa de infección mínima (MIR), que se calculó considerando que únicamente un ejemplar de la garrapata estaba infectado en cada pool positivo, fue inferior al 1% (Tabla 4.5.). Estas prevalencias tan reducidas son similares a las halladas en garrapatas de corzos abatidos en Noruega, donde únicamente el 2,9% de las ninfas eran positivas a esta espiroquetas, mientras que ningún adulto de *I. ricinus* estaba infectado con *B. burgdorferi s.l.* (Kjelland *et al.*, 2011). Sin embargo, en un estudio previo realizado en el mismo país, Rijpkema *et al* (1996) encontraron unas prevalencias muy elevadas, puesto que el 40% de los machos de *Ixodes* obtenidos de corzos estaban infectados por *B. burgdorferi s.l.*, aunque este porcentaje era inferior (20%) en las hembras que todavía no se habían alimentado de los corzos.

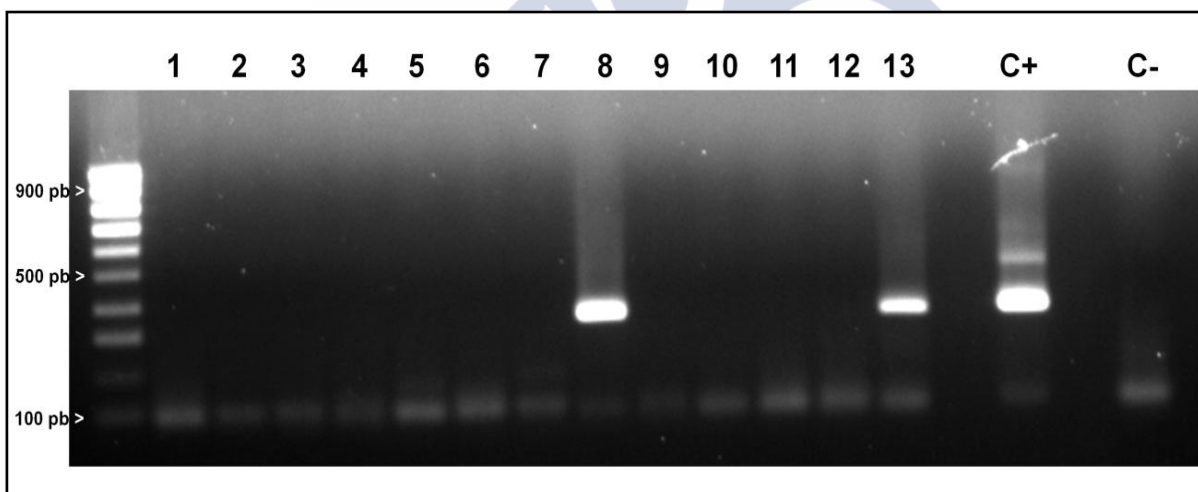


Figura 4.10. Amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 pb del gen de la flagelina de *Borrelia*. Calles 8 y 13: muestras positivas; C+: control positivo; C-: control negativo.

Al tener en cuenta únicamente los ayuntamientos donde se detectaron machos adultos de *I. ricinus* infectados con *B. burgdorferi s.l.*, se observó que el porcentaje de pools positivos osciló entre el 3,3% de Lugo y el 33,3% de Guitiriz (Tabla 4.5.). Asimismo, el MIR varió también de forma considerable, entre el 0,4% (Lugo) y el 4,8% (Guitiriz).

Tabla 4.5. Porcentaje de pooles y tasa de infección mínima (MIR) de machos de *I. ricinus* positivos a *B. burgdorferi s.l.* en relación con la zona de captura de los corzos.

Zona	Ayuntamiento	Machos <i>Ixodes ricinus</i>	
		Total pooles*	MIR**
MESETA	Castro de Rei	1/10 (10,0%)	1/66 (1,5%)
	Castroverde	3/17 (17,6%)	3/152 (2,0%)
	Guitiriz	1/3 (33,3%)	1/21 (4,8%)
	Lugo	1/30 (3,3%)	1/283 (0,4%)
	Total Meseta	6/98 (6,1%)	6/788 (0,8%)
MONTAÑA	Baralla	1/18 (5,6%)	1/166 (0,6%)
	Fonsagrada (A)	2/16 (12,5%)	2/136 (1,5%)
	Total Montaña	3/80 (3,8%)	3/661 (0,5%)
Total		9/178 (5,1%)	9/1449 (0,6%)

Al considerar la zona de procedencia de los corzos, se observó que tanto el porcentaje de pooles positivos como la tasa de infección mínima fue superior en las garrapatas obtenidas de corzos de la meseta (Tabla 4.5.), aunque con Chi cuadrado se comprobó que estas diferencias no eran estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Asimismo, al analizar la posible influencia de la densidad de corzos y la superficie forestal sobre el número de garrapatas en las que se hallaron las distintas genoespecies de *B. burgdorferi s.l.* se observó que en los ayuntamientos de la meseta, en los que había menor densidad de corzos y de masa forestal, fue donde se halló un mayor número de garrapatas infectadas, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). En este sentido, Jensen *et al.* (2000) comprobaron que la prevalencia de *B. burgdorferi s.l.* en ninfas de *I. ricinus* era independiente de la abundancia de corzos en la zona.

4.2.2. Prevalencia de infección por *B. burgdorferi s.l.* en garrapatas obtenidas de la naturaleza.

En las diferentes salidas se recogieron un total de 2.450 garrapatas de la vegetación. Todas eran *Ixodes ricinus*, excepto 7 hembras y 4 machos adultos de *Dermacentor marginatus* recogidos en los ayuntamientos de Cospeito y A Fonsagrada. Mediante el examen microscópico de los ejemplares de *I. ricinus* se comprobó que existían garrapatas pertenecientes a todos los estadios (Figura 4.11.), predominando las ninfas (2.017 ejemplares) sobre las hembras (175) y los machos adultos (158); las larvas se identificaron en menor proporción (89 ejemplares).

Nuestros resultados coinciden con los descritos en España por Asensi *et al.* (1993), Gil *et al.* (2005), Barandika *et al.* (2008, 2011), Barral *et al.* (2002) y Ruiz-Fons *et al.* (2012), que señalaron que *I. ricinus* era la especie de garrapata más frecuente en diferentes Comunidades Autónomas del norte de la Península Ibérica. Por el contrario, en el centro del País predominan otras especies, principalmente *Hyalomma lusitanicum* y *Dermacentor marginatus* (Toledo *et al.*, 2009; Barandika *et al.*, 2011). En estas zonas, *I. ricinus* se halla de forma ocasional, lo que puede deberse a la elevada exigencia higrométrica de esta garrapata (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005); por ello, la mayoría de los casos de EL en España se han diagnosticado en la zona norte (Anda *et al.*, 1993; Guerrero *et al.*, 2001; Pazos *et al.*, 2010; Portillo *et al.*, 2014).

En todos los ayuntamientos muestreados se recogieron ninfas, machos y hembras adultas de *I. ricinus*; esta amplia distribución revela que la Comunidad Gallega constituye un hábitat muy favorable para la supervivencia y desarrollo de los diferentes estadios de *I. ricinus*, pues

les proporciona amplias zonas de densa cubierta vegetal, que mantiene una elevada humedad relativa durante los períodos del año más secos (James *et al.*, 2014). Además, en Galicia existe un amplio número y variedad de hospedadores de los que se pueden alimentar los diferentes estadios de esta garrapata (Estrada-Peña *et al.*, 2012).



Figura 4.11. Diferentes estadios de desarrollo de *I. ricinus* recogidos de la vegetación. De izquierda a derecha: hembra y macho adulto, ninfa y larva.

Del total de las 2.439 garrapatas *I. ricinus* recogidas de la naturaleza, sólo fueron analizadas 1.052 (ninfas 734, hembras 175 y machos 143), repartidas en 142 pools.

El análisis molecular de las muestras de estas garrapatas analizadas (Figura 4.12.) permitió detectar ADN de *B. burgdorferi s.l.* en el 59,9% (85/142) de los pools procesados (Tabla 4.6.).

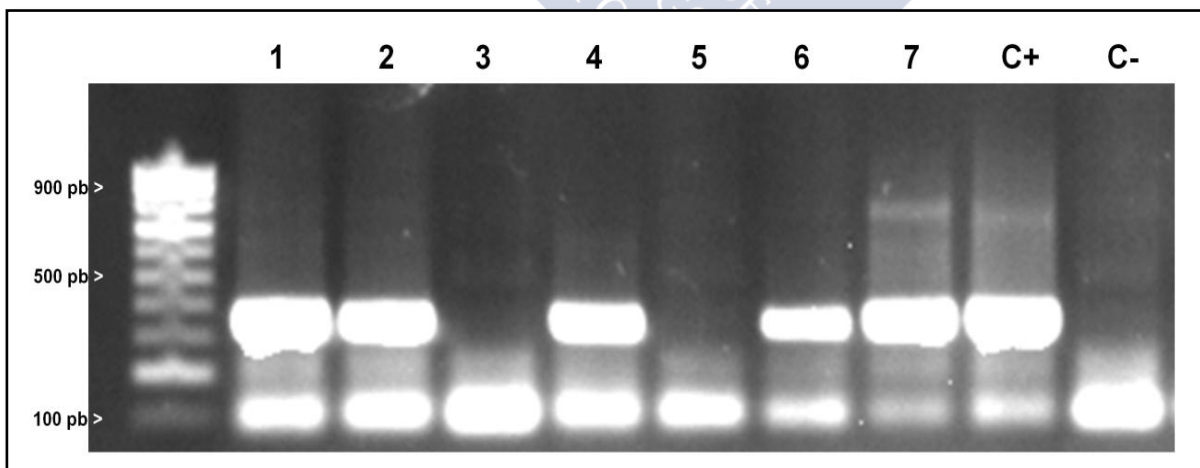


Figura 4.12. Amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 pb del gen de la flagelina de *Borrelia* en muestras procedentes de garrapatas obtenidas de la vegetación. Calles 1,2,3,6 y 7: muestras positivas; C+: control positivo; C-: control negativo.

Tabla 4.6. Porcentaje de pools y tasa de infección mínima (MIR) de ninfas y machos adultos de *I. ricinus* recogidos en la naturaleza y positivos a *B. burgdorferi s.l.*

ZONA	AYUNTAMIENTO	NINFAS		MACHOS ADULTOS	
		Pools	MIR	Pools	MIR
MESETA	Begonte	4/5 (80%)	4/50 (8%)	3/5 (60%)	3/25 (12%)
	Castro de Rei	3/3 (100%)	3/30 (10%)	0/1 (0%)	0/2 (0%)
	Castroverde	4/5 (80%)	4/50 (8%)	0/1 (0%)	0/2 (0%)
	Corgo (O)	3/5 (60%)	3/50 (6%)	1/2 (50%)	1/11 (9,1%)
	Cospeito	2/5 (40%)	2/50 (4%)	2/2 (100%)	2/9 (22,2%)
	Lugo	6/6 (100%)	6/60 (10%)	1/3 (33,3%)	1/13 (7,7%)
	Vilalba	3/5 (60%)	3/50 (6%)	1/2 (50%)	1/8 (12,5%)
	Total	25/34 (73,5%)	25/340 (7,4%)	8/16 (50%)	8/70 (11,4%)
MONTAÑA	Cervantes	3/10 (30%)	3/100 (3%)	1/2 (50%)	1/8 (12,5%)
	Fonsagrada (A)	1/10 (10%)	1/100 (1%)	0/3 (0%)	0/15 (0%)
	Meira	3/3 (100%)	3/33 (9,1%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)
	Navia de Suarna	4/5 (80%)	4/50 (8%)	2/4 (50%)	2/19 (10,5%)
	Pontenova (A)	4/4 (100%)	4/41 (9,8%)	0/3 (0%)	0/14 (0%)
	Ribeira de Piquín	0/2 (0%)	0/20 (0%)	0/1 (0%)	0/3 (0%)
	Riotorto	5/5 (100%)	5/50 (10%)	1/2 (50%)	1/11 (9,1%)
	Total	20/39 (51,3%)	20/394 (5,1%)	4/16 (25,0%)	4/73 (5,5%)
TOTAL	45/73 (61,6%)	45/734 (6,1%)	12/32 (37,5%)	12/143 (8,4%)	

Tabla 4.6. (continuación)

ZONA	AYUNTAMIENTO	HEMBRAS ADULTAS		TOTAL	
		Pools	MIR	Pools	MIR
MESETA	Begonte	4/4 (100%)	4/21 (19%)	11/14 (78,6%)	11/96 (11,5%)
	Castro de Rei	1/1 (100%)	1/3 (33,3%)	4/5 (80%)	4/35 (11,4%)
	Castroverde	1/2 (50%)	1/9 (11,1%)	5/8 (62,5%)	5/61 (8,2%)
	Corgo (O)	2/2 (100%)	2/8 (25%)	6/9 (66,7%)	6/69 (8,7%)
	Cospeito	2/2 (100%)	2/8 (25%)	6/9 (66,7%)	6/67 (9,0%)
	Lugo	3/3 (100%)	3/16 (18,8%)	10/12 (83,3%)	10/89 (11,2%)
	Vilalba	2/2 (100%)	2/12 (16,7%)	6/9 (66,7%)	6/70 (8,6%)
	Total	15/16 (93,8%)	15/77 (19,5%)	48/66 (72,7%)	48/487 (9,9%)
MONTAÑA	Cervantes	0/1 (0%)	0/3 (0%)	4/13 (30,8%)	4/111 (3,6%)
	Fonsagrada (A)	1/5 (20%)	1/25 (4%)	2/18 (11,1%)	2/140 (1,4%)
	Meira	0/1 (0%)	0/2 (0%)	3/5 (60%)	3/38 (7,9%)
	Navia de Suarna	2/3 (66,7%)	2/16 (12,5%)	8/12 (66,7%)	8/85 (9,4%)
	Pontenova (A)	7/7 (100%)	7/35 (20%)	11/14 (78,6%)	11/90 (12,2%)
	Ribeira de Piquín	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/4 (0%)	0/24 (0%)
	Riotorto	3/3 (100%)	3/16 (18,8%)	9/10 (90%)	9/77 (11,7%)
	Total	13/21 (61,9%)	13/98 (13,3%)	37/76 (48,7%)	37/565 (6,5%)
TOTAL	28/37 (75,7%)	28/175 (16%)	85/142 (59,9%)	85/1052 (8,1%)	

El porcentaje de pools positivos fue superior en las hembras adultas (75,7%), mientras que solo en el 37,5% de los pools de machos adultos se halló ADN de *B. burgdorferi s.l.* Por su parte, la tasa de infección mínima (MIR), que se calculó considerando que únicamente un ejemplar de *Ixodes* spp estaba infectado en cada pool positivo, fue del 8,1% (Tabla 4.6.), que es, por lo general, superior a las prevalencias halladas en el norte de España, que oscilaron entre el 0,9% y el 10,2% (Barral *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2005; Barandika, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2012). De igual modo, en el centro de España, Toledo *et al.* (2009) identificaron *Borrelia* spp. en el 1,7% de las garrapatas recogidas en la Comunidad de Madrid, aunque en *I. ricinus* la prevalencia fue mucho más elevada (25%) que en *Hyalomma lusitanicum* (3,3%); de todos modos, estos autores solo analizaron 8 ejemplares, hallados en una única zona de muestreo.

Los porcentajes de infección hallados en nuestro estudio son similares a los observados en otros países de Europa, como Dinamarca (5-6%; Jensen *et al.*, 2000), Estonia (8,2%; Geller

et al., 2013), Finlandia (5%; Mäkinen *et al.*, 2003), Francia (13,2%; Quessada *et al.*, 2003) o Polonia (9%; Cisak *et al.*, 2006). Sin embargo, el metaanálisis de los resultados obtenidos en Europa desde 1984 hasta 2003 revela que *B. burgdorferi s.l.* es mucho más prevalente en garrapatas de países del centro de Europa (Rauter y Hartung, 2005); de hecho en Alemania, Noruega o la República Checa, los porcentajes de garrapatas infectadas con la espiroqueta varían entre el 14,3% y el 35% (Baumgarten *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2001; Mäkinen *et al.*, 2003; Danielová *et al.*, 2004; Maetzel *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2012; Tveten *et al.*, 2013).

Al considerar el estadio de desarrollo de la garrapata, los valores más elevados de MIR se observaron en las hembras adultas (16%), y los más reducidos en las ninfas (6,1%). Nuestros resultados revelan la presencia de un elevado número de garrapatas infectadas con *B. burgdorferi s.l.* en Galicia; estas prevalencias, aún tratándose de tasas de infección mínimas, son superiores a las halladas en otras regiones del norte de España, donde el porcentaje de adultos de *I. ricinus* infectados por *Borrelia* osciló entre el 1,7-9,3% (Barral *et al.*, 2002; Barandika *et al.*, 2008) y el de ninfas entre el 1,5-4% (Barral *et al.*, 2002; Ruiz-Fons *et al.*, 2012). De hecho, recientemente, Estrada-Peña *et al.* (2011) consideró la zona integrada por Galicia, Asturias y el sur de Cantabria como un área de prevalencia moderada de *Borrelia* en garrapatas, en la que el nivel de infección de las ninfas es similar al de otros países europeos como Holanda y Bélgica.

La presencia de porcentajes de infección por *Borrelia* más elevados en adultos que en ninfas se había observado también en otros países europeos, como República Checa, Finlandia, Suiza, Alemania, Noruega y Polonia (Hubálek *et al.*, 1993; Mäkinen *et al.*, 2003; Jouda *et al.*, 2004; Kampen *et al.* 2004; Maetzel *et al.*, 2005; Soleng y Kjelland, 2013; Stanczak *et al.*, 2000). Según Matuschka *et al.* (1993), los adultos de los ixódidos presentan una mayor probabilidad de estar infectados que las ninfas, puesto que estas últimas habrían estado expuestas a la infección sólo una vez, como larva, mientras que los adultos habrían estado expuestos 2 veces, una como larva y otra como ninfa. Sin embargo, es necesario considerar que, en nuestro estudio, los pools de ninfas se realizaron con más individuos (generalmente 10 ninfas/pool) que en el caso de los adultos, donde se analizaron conjuntamente aproximadamente 5 garrapatas; por ello, en el caso de las ninfas, la prevalencia real podría ser muy superior al 6,1% observado. Estas ninfas son, según Gern y Humair (2002), de gran importancia como vectores de la espiroqueta, ya que los machos adultos de *I. ricinus* no se alimentan, y las hembras adultas se alimentan principalmente de grandes animales, ungulados sobre todo, que no constituyen hospedadores reservorios competentes de la espiroqueta. En este sentido, es necesario llevar a cabo nuevos estudios y analizar las garrapatas recogidas de vegetación de forma individual con objeto de obtener, de esta manera, datos más precisos acerca de la prevalencia de infección por *Borrelia* en *I. ricinus* de Galicia. De hecho, determinar la prevalencia de la infección por *Borrelia* en las garrapatas que se encuentran en la naturaleza es uno de los componentes de mayor importancia para valorar el riesgo de adquirir EL (Mannelli *et al.*, 2003). Esta información puede ser de gran utilidad en la prevención de esta enfermedad, puesto que la Sociedad de enfermedades infecciosas de América (ISDA) y el Boletín Epidemiológico de Galicia (2014) recomiendan el tratamiento antibiótico profiláctico cuando, entre otros criterios, más del 20% de las garrapatas de la zona estén infectadas con *Borrelia burgdorferi s.l.*

Al considerar la zona de recogida de las garrapatas, como se aprecia en la Tabla 4.6., en las de la meseta se obtuvo un mayor porcentaje de pools positivos (48/66; 72,7%) y tasa de infección mínima (9,9%) que en las de la montaña (37/76, 48,7%; MIR= 6,5%). Con Chi cuadrado se comprobó que las diferencias en el número de pools positivos ($\chi^2= 8,498$; $p=$

0,003) y en el MIR ($\chi^2= 3,853$; $p= 0,049$) eran estadísticamente significativas. Al tener en cuenta únicamente los ayuntamientos donde algún pool resultó positivo, en la meseta este porcentaje osciló entre el 62,5% de Castroverde y el 83,3% de Lugo; mientras que, en la montaña lo hizo entre el 11,1% de Fonsagrada y el 90% de Riotorto. Del mismo modo, se observó que en la zona de meseta el MIR osciló entre un 8,2% (Castroverde) y un 11,5% (Begonte), mientras que en la montaña se observó una mayor oscilación (1,4% en A Fonsagrada - 12,2% en A Pontenova). Estos resultados contrastan con la mayoría de los estudios, que señalan que el porcentaje de *I. ricinus* infectadas con *Borrelia* spp. es superior en zonas boscosas (Gray *et al.*, 1992, 1995; Dister *et al.*, 1997; Barral *et al.*, 1993). No obstante, Estrada-Peña *et al.* (2011) señalaron que las prevalencias más reducidas de *B. burgdorferi s.l.* en garrapatas están asociadas a zonas con una mayor oscilación térmica, donde se registren las temperaturas mínimas y máximas más bajas, como en la zona de montaña, lo que concuerda con lo observado en el presente trabajo. Todo ello indica en la prevalencia de *Borrelia* spp. en las garrapatas en Galicia influyen múltiples factores y, en consecuencia, es necesario realizar estudios más amplios que permitan identificarlos. En este sentido, sería de gran utilidad conocer el papel que tienen diferentes animales silvestres (micromamíferos, aves, etc.) como reservorios de la espiroqueta. Además, Gray *et al.* (1992) observaron mayor porcentaje de garrapatas infectadas con *Borrelia* en zonas con baja presencia de garrapatas y grandes mamíferos, pero con un elevado número de roedores que actuaban como reservorios.

Cuando se tuvieron en cuenta las diferentes fases de desarrollo de la garrapata, se comprobó que tanto el porcentaje de pools positivos a *B. burgdorferi s.l.* como el MIR fueron siempre superiores en los *I. ricinus* de la meseta (Tabla 4.6.). En las dos zonas, los porcentajes de pools positivos fueron significativamente más elevados en hembras adultas y más bajos en machos ($\chi^2= 10,607$; $p= 0,005$), mientras que el MIR fue significativamente superior en hembras, y más bajo en ninfas ($\chi^2= 18,554$; $p< 0,001$).

4.2.3. Tipificación de las genoespecies de *Borrelia burgdorferi s.l.* en garrapatas obtenidas de corzos y de la naturaleza.

Como se señaló en el apartado anterior, en las garrapatas recuperadas de los corzos y de la naturaleza se hallaron 9 y 85 pools positivos de *B. burgdorferi s.l.*; no obstante, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos se identificaron, a mayores, dos pools positivos a *B. miyamotoi* en los ixódidos de los corzos y uno en las recolectadas en la naturaleza. Esta genoespecie no se incluyó en el presente estudio puesto que no se considera un agente causal de la EL, sino que se encuentra asociada a la presencia de fiebres recurrentes (Wagemakers *et al.*, 2015).

Al analizar las secuencias del complejo *B. burgdorferi s.l.* se identificaron cinco genoespecies patógenas, que se encuentran entre las de mayor interés desde el punto de vista médico como causantes de EL: *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto (s.s.)*, *B. garinii*, *B. lusitaniae* y *B. valaisiana*. En la actualidad, existe un amplio consenso en que *B. afzelii*, *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii* y *B. valaisiana* constituyen las principales causantes de la EL en Europa y Asia (Skinner, *et al.*, 2007; Biesiada, *et al.*, 2012; Dehnert, *et al.*, 2012; Kubiak, *et al.*, 2012); cada una de estas genoespecies se asocia con determinadas manifestaciones clínicas: *B. afzelii* con lesiones cutáneas tardías del tipo de la acrodermatitis crónica atrófica (Biesiada *et al.*, 2012), *B. burgdorferi s.s.* con artritis (Skinner *et al.*, 2007), *B. garinii* con neuroborreliosis (Biesiada *et al.*, 2012) y *B. valaisiana* con acrodermitis crónica atrófica (Weber *et al.*, 2001; Rudenko *et al.*, 2011). Por el contrario, *B. lusitaniae* se trata de una

genoespecie relativamente nueva presente fundamentalmente en el sur de Europa y en el norte de África, y de la que se posee poca información, aunque cada vez son más numerosos los trabajos en los que se describe su poder patógeno (Collares-Pereira, *et al.*, 2004; Richter, *et al.*, 2013; Szekeres *et al.*, 2015).

Todas las genoespecies se detectaron tanto en garrapatas recuperadas de los corzos como en las recogidas de la vegetación, excepto *B. burgdorferi s.s.*, que únicamente se identificó en un pool de *I. ricinus* procedentes del ambiente. *B. garinii* fue la genoespecie detectada en un mayor porcentaje de pools positivos, tanto en las garrapatas recogidas del medio como en los machos adultos obtenidas en los corzos (Figura 4.13.); por el contrario, *B. afzelii* fue la menos frecuente en *I. ricinus* de corzos y de vegetación.

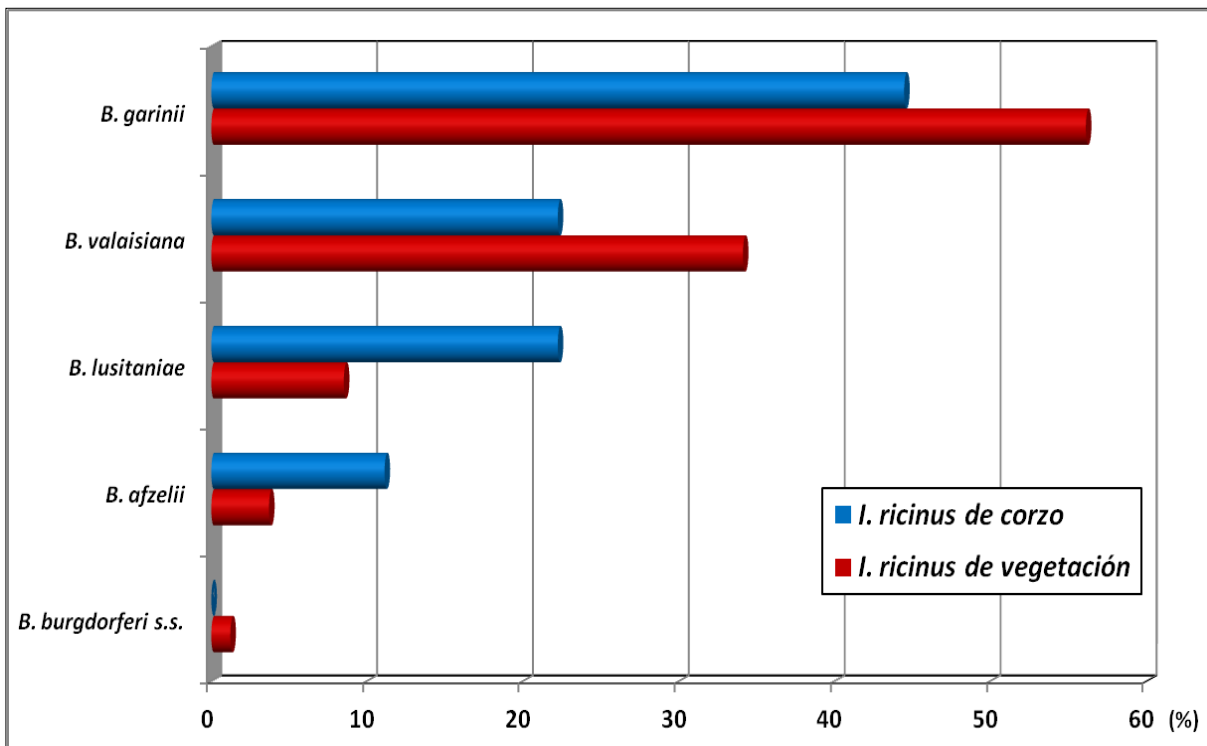


Figura 4.13. Porcentaje de pools positivos donde se identificaron las diferentes genoespecies del grupo *B. burgdorferi s.l.*

Como se aprecia en la Tabla 4.7., los porcentajes de pools positivos para las diferentes genoespecies de *B. burgdorferi s.l.* y los valores de MIR fueron siempre muy superiores en las garrapatas recogidas en la naturaleza.

En Europa, varias investigaciones han señalado que en enfermos de Lyme se han aislado *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetti* y *B. spielmanii*, aunque predominan las tres primeras, que son las halladas también en este estudio (Kubiak *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2012). En este sentido, los trabajos realizados en España han permitido identificar una elevada diversidad de genoespecies de *B. burgdorferi s.l.*, superior a la hallada en otros países europeos; las principales diferencias con respecto al resto de Europa parecen ser el predominio de *B. garinii* y *B. lusitaniae* (Estrada-Peña *et al.*, 2011) y la reducida importancia de *B. afzelii*, una de las genoespecies aisladas con mayor frecuencia en otros países del centro y norte del continente.

Tabla 4.7. Porcentajes de pools positivos y valores de MIR al considerar las genoespecies identificadas

	<i>I. ricinus</i> de corzo		<i>I. ricinus</i> de vegetación	
	Pool positivo (%)	MIR (%)	Pool positivo(%)	MIR(%)
<i>B. afzelii</i>	1/178 (0,6)	1/1449 (0,07)	3/142 (2,1)	3/1052 (0,3)
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	0/178 (0)	0/1449 (0)	1/142 (0,7)	1/1052 (0,1)
<i>B. garinii</i>	4/178 (2,3)	4/1449 (0,3)	46/142 (32,4)	46/1052 (4,4)
<i>B. lusitaniae</i>	2/178 (1,1)	2/1449 (0,1)	7/142 (4,9)	7/1052 (0,7)
<i>B. valaisiana</i>	2/178 (1,1)	2/1449 (0,1)	28/142 (19,7)	28/1052 (2,7)

De todos modos, la importancia y distribución de cada una de las genoespecies varía notablemente, incluso dentro de una misma Comunidad Autónoma. Así, en varios trabajos realizados en *I. ricinus* recogidos de vegetación del País Vasco, se identificaron las cinco genoespecies del grupo *B. burgdorferi s.l.* halladas en el presente estudio (Barral *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2005; Barandika *et al.*, 2008), donde la genoespecie más abundante fue *B. burgdorferi s.s.* (14/28), seguida de *B. valaisiana* (10/28) y *B. garinii* (8/28); siendo *B. afzelii* (1/28) la menos frecuente (Gil *et al.*, 2005). En garrapatas recogidas en diferentes Comunidades del norte de España (Castilla y León, La Rioja y País Vasco), Escudero-Nieto *et al.* (2000) hallaron cuatro genoespecies, siendo *B. garinii* la más frecuente (7/13); mientras que, *B. burgdorferi s.s.* (3/13), *B. valaisiana* (2/13) y *B. lusitaniae* (1/13) se hallaron en menor proporción. En Madrid, Toledo *et al.* (2009) únicamente identificaron *B. burgdorferi s.s.* (15/25) y *B. garinii* (4/25).

Todas las investigaciones realizadas en España coinciden al señalar que *B. afzelii* es una genoespecie muy poco prevalente en garrapatas de la Península Ibérica; de hecho no se han descrito manifestaciones cutáneas relacionadas con esta genoespecie en España (Anda *et al.*, 1993; Guerrero, 1995; Arteaga *et al.*, 1998). Algunos autores han señalado asociaciones entre ciertas genoespecies de *Borrelia* y algunos hospedadores, sobre todo micromamíferos y aves, lo que puede limitar en gran medida su presencia en determinadas áreas. Así, se ha descrito que los roedores son hospedadores competentes para transmitir *B. afzelii*, pero no para *B. garinii* o *B. valaisiana*; en Suiza, Humair *et al.* (1995) observaron una importante asociación entre *B. afzelii* y pequeños roedores, así como entre *B. burgdorferi s.s.* y *B. afzelii* y las ardillas rojas; en el Reino Unido, Craine *et al.* (1997) también observaron una considerable relación entre *B. afzelii* y las ardillas grises. Por el contrario, varias investigaciones sugieren que diversas especies de aves actuarían como reservorios de *B. garinii* y *B. valaisiana* (Kirstein *et al.*, 1997; Kurtenbach *et al.*, 1998, Hanincová *et al.*, 2003). En este sentido, la escasez o ausencia de estos hospedadores en la zona de estudio podría explicar la limitada presencia en Galicia de algunas genoespecies de *Borrelia* como *B. afzelii* y *B. burgdorferi s.s.* que son muy frecuentes en otras regiones europeas.

Con respecto a la distribución de las diferentes genoespecies de *Borrelia*, como se aprecia en la Tabla 4.8., en los machos de *I. ricinus* obtenidos de corzos abatidos en las 2 zonas de estudio, se identificaron *B. garinii* y *B. lusitaniae*, mientras que *B. afzelii* y *B. valaisiana* se hallaron únicamente en corzos de la zona de meseta. *B. garinii* fue la genoespecie que presentó mayor distribución, pues se identificó en garrapatas de corzos abatidos en cuatro ayuntamientos diferentes, mientras que las otras genoespecies solo se detectaron en uno o dos municipios.

Tabla 4.8. Ayuntamientos donde se identificaron las genoespecies de *Borrelia* en machos de *I. ricinus* obtenidos de los corzos.

GENOESPECIE	MESETA	MONTAÑA
<i>Borrelia azfelii</i>	Guitiriz	
<i>Borrelia garinii</i>	Castro de Rei, Castroverde	Baralla, A Fonsagrada
<i>Borrelia lusitaniae</i>	Castroverde	A Fonsagrada
<i>Borrelia valaisiana</i>	Castroverde, Lugo	

Respecto a las genoespecies identificadas en las garrapatas de la vegetación, se observó que *B. burgdorferi s.s.* y *B. lusitaniae* solo se hallaron en las recogidas en la zona de montaña, mientras que el resto se observaron en ambas áreas (Tabla 4.9.). La distribución de *B. garinii* y *B. afzelii* fue similar en ambas zonas, pero *B. valaisiana* se identificó con mayor frecuencia en los *I. ricinus* de la meseta.

Tabla 4.9. Pooles de *I. ricinus* recogidas de vegetación positivos a *Borrelia burgdorferi s.l.* al considerar la zona climática.

	MESETA			MONTAÑA			TOTAL
	ninfas	♂	♀	ninfas	♂	♀	
<i>B. azfelii</i>	1 (4%)	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	3
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	1
<i>B. garinii</i>	12 (48%)	5 (62,5%)	7 (46,7%)	13 (65%)	3 (75%)	6 (46,2%)	46
<i>B. lusitaniae</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	5 (38,5%)	7
<i>B. valaisiana</i>	12 (48%)	2 (25%)	8 (53,3%)	3 (15%)	1 (25%)	2 (15,4%)	28

Al tener en cuenta los diferentes estadios de desarrollo de las garrapatas (Figura 4.14.), se comprobó que en las ninfas se hallaron todas las genoespecies relacionadas con EL identificadas en nuestro estudio; por el contrario, en las hembras adultas solo se detectaron las tres genoespecies más comunes (*B. garinii*, *B. valaisiana* y *B. lusitaniae*). Independientemente del estadio de desarrollo de la garrapata, y como se muestra en la Figura 4.14., en un elevado porcentaje de pooles positivos, se halló *B. garinii* (46,4-66,7%) y *B. valaisiana* (25-35,7%). Por el contrario, *B. lusitaniae* fue mucho más frecuente en las hembras adultas.

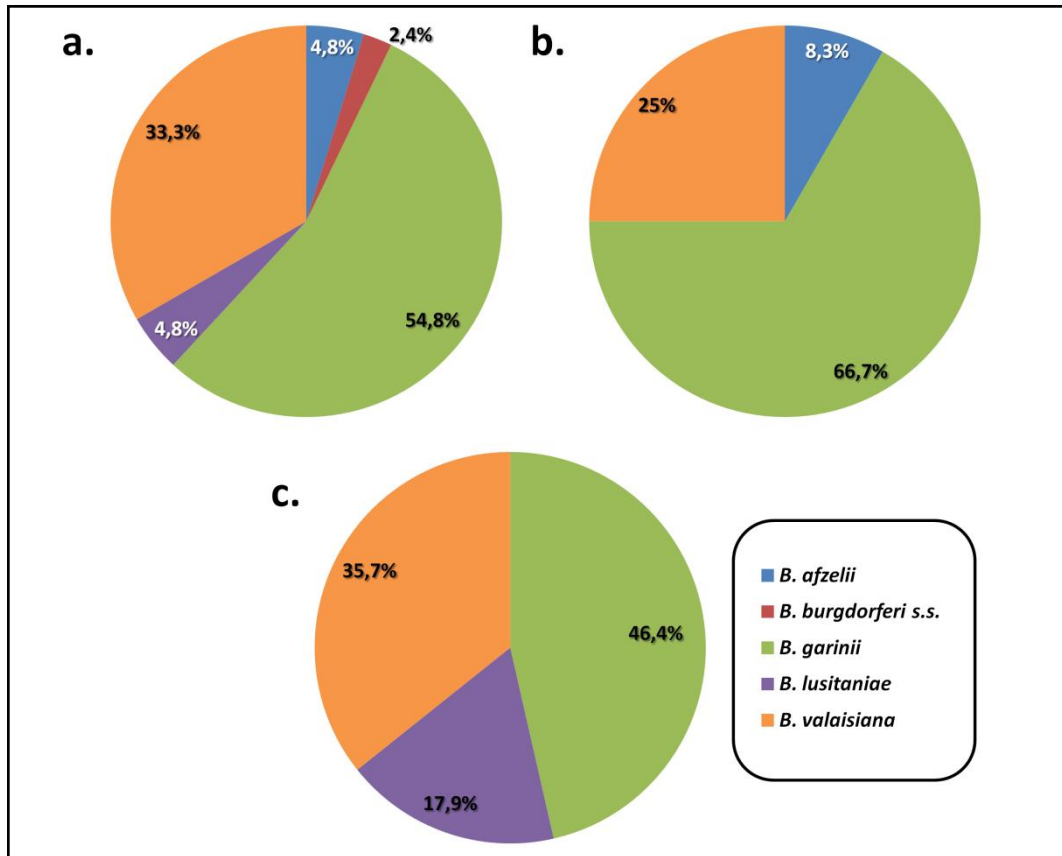


Figura 4.14. Porcentaje de pools positivos donde se identificaron las diferentes genoespecies de *Borrelia*, al considerar el estadio de desarrollo de *I. ricinus*. a) ninfas; b) machos adultos; c) hembras adultas.

4.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS, TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN DE LOS ENFERMOS DE LYME.

La mayoría (62%) de los pacientes (Tabla 4.10.) tenían un solo tipo de manifestación clínica y fueron menos frecuentes las combinaciones de dos (32,5%), tres (4,6%) o cuatro (0,9%). Los síntomas neurológicos (67,5%) y dermatológicos (47,2%) fueron los más prevalentes y, en menor proporción, se observaron los articulares (15,7%) y los cardíacos (13%).

Según diversos autores la clínica de la enfermedad varía de unas zonas a otras, siendo estas diferencias claras entre EE.UU. y Europa (Girschick *et al.*, 2009; Wormser *et al.*, 2013; Portillo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014a). En EE.UU. sólo se ha aislado *B. burgdorferi s.s.* como responsable de la enfermedad, mientras que en Europa se han aislado fundamentalmente 3 genoespecies (*B. burgdorferi s.s.*, *B. afzelii* y *B. garinii*), siendo esta última la más prevalente en España (Portillo *et al.*, 2014; Marques, 2015). Cada una de estas genoespecies presenta un tropismo especial por los diferentes tejidos y por lo tanto diferente sintomatología (Derdáková *et al.*, 2005; Wormser *et al.*, 2006; Marques 2015). De hecho *B. afzelii* parece asociarse más frecuentemente con dermatitis crónica atrófica, *B. garinii* con neuroborreliosis y *B. burgdorferi s.s.* con artritis, aunque el espectro clínico de cada una de ellas puede también superponerse (Derdáková *et al.*, 2005; Marques, 2015). Esto explicaría, en parte, las diferentes manifestaciones neurológicas, dermatológicas, cardíacas o reumatológicas, que presentaron los pacientes de nuestro estudio, en los que, no obstante,

predominó la clínica neurológica propia de *B. garinii*, siendo esta genoespecie la más frecuentemente encontrada en las garrapatas recogidas de la naturaleza en la zona de estudio.

Tabla 4.10. Prevalencia de manifestaciones dermatológicas (D), neurológicas (N), cardíacas (C) y reumatológicas (R) y fases de la EL en las que se encontraban los enfermos.

Cuadro clínico	TOTAL n (%)	FASE I n (%)	FASE II n (%)	FASE III n (%)
D	24 (22,2)	24 (85,7)		
N	38 (35,1)		37(55,3)	1(7,7)
C	2 (1,9)		2 (3,0)	
R	3 (2,8)			3 (23,0)
D+C	2 (1,9)	1 (3,6)	1 (1,5)	
D+N	18(16,7)	1 (3,6)	17 (25,3)	
D+R	4 (3,7)	2 (7,1)		2 (15,4)
C+N	6 (5,6)		5 (7,4)	1 (7,7)
N+R	5 (4,6)		3 (4,5)	2 (15,4)
D+C+N	1 (0,9)			1 (7,7)
D+N+R	1 (0,9)			1 (7,7)
C+N+R	3 (2,8)		2 (3,0)	1 (7,7)
D+C+N+R	1 (0,9)			1 (7,7)
TOTAL	108	28	67	13

En el momento del diagnóstico, el 25,9% de los enfermos de Lyme se encontraban en Fase I, el 62,1% en Fase II y el 12% en Fase III. De los 28 pacientes que estaban en Fase I, la mayoría (85,7%) presentaban exclusivamente afectación cutánea, siendo esta patognomónica de la EL (Biesada *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2012; Portillo *et al.*, 2014).

De los 67 pacientes que estaban en Fase II, el 95,5% presentaban clínica neurológica aislada o asociada a patología dermatológica y cardíaca. Como se expondrá en el apartado de manifestaciones neurológicas, las más frecuentes fueron las precoces, lo que explica que la mayoría de nuestros pacientes se encontraran en la Fase II de la enfermedad en el momento del diagnóstico, hecho que concuerda con lo observado en otros estudios (Portillo *et al.*, 2014).

En la Fase III, la clínica reumatológica sola o asociada (76,9%) fue la más frecuente.

4.3.1. Del sistema nervioso.

De los 108 casos confirmados con enfermedad de Lyme, 73 pacientes (67,6%) padecían neuroborreliosis, resultando este porcentaje superior al 35% descrito en Europa (Hildenbrand *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014b) o al 15% publicado en EEUU (Hildenbrand *et al.*, 2009; Jassan, 2014; Wang *et al.*, 2014b; Halperin, 2015b). Este elevado porcentaje de pacientes con clínica neurológica se corresponde con los resultados obtenidos por Verma *et al.* (2014), quienes afirmaron que la neuroborreliosis es la manifestación más frecuente de la forma diseminada de la EL en Europa.

En la mayoría de los casos (52,1%) los síntomas neurológicos fueron la única manifestación de la EL y el resto, asociaba alteraciones cutáneas (24,7%), cardíacas (8,2%), articulares (6,8%) o una combinación de tres o más de estas (8,2%) como corresponde a una enfermedad multisistémica como es la EL (Matera *et al.*, 2014; Halperin, 2015b).

De los 73 enfermos con neuroborreliosis (Tabla 4.11.), 26 (35,6%) presentaron una sola manifestación neurológica, mientras que la mayoría (64,4%) asociaban dos o más. En este último caso cabe señalar que el 11% presentaban meningoradiculoneuritis (MR) o Síndrome

de Bannwart (Weber, 2001); no obstante, la combinación más frecuentemente observada fue la meningoradiculitis descrita por Pachner *et al.* (2007) como la forma más frecuente de presentación de neuroborreliosis en Europa.

Tabla 4.11. Principales manifestaciones neurológicas y localización de la radiculitis

CLÍNICA	Nº (%)	TERRITORIO (Nº)	PAR CRANEAL(Nº)
Radiculitis	17 (23,3%)	C(5),D(2),L(7),CL(2),DL(1)	
Radiculitis+meningitis	28 (38,3%)	C(8),D(7),L(9),CD(1),CDL(3)	
Radiculitis+meningitis+ neuropatía craneal	8 (11%)	C(2),L(5),DL(1)	VII(7),VII+VI(1)
Radiculitis+meningitis+ polineuropatía sensitivo motora	1 (1,4%)	L(1)	
Radiculitis+meningitis+mielitis	1 (1,4%)	L(1)	
Radiculitis+polineuropatía sensitivo motora	3 (4,1%)	D(1),L(2)	
Meningitis	3 (4,1%)		
Meningitis+neuropatía craneal	6 (8,2%)		VII (6)
Neuropatía craneal	5 (6,8%)		VII(3),X(1),III(1)
Encefalopatía	1 (1,4%)		

La mayoría de los pacientes con neuroborreliosis padecían radiculitis (79,5%) lo que coincide con lo observado en otros estudios realizados en Europa (Wang *et al.*, 2014b; Jassan, 2014); por el contrario, en EE.UU., Wang *et al.* (2014b) señalaron que solo el 4% de los enfermos de Lyme padecían radiculitis. La zona lumbar fue la más frecuentemente afectada y en menor medida la región cervical o dorsal, hecho ya descrito por Halperin (2015b) aunque con una frecuencia claramente menor para la población americana.

El 26% de los pacientes presentaban neuropatía craneal, siendo este porcentaje similar (35%) al descrito por otros autores en Europa (Wang *et al.*, 2014b). La parálisis facial periférica fue la neuropatía craneal predominante (84,4%) y en menor medida estaban afectados otros nervios craneales como el vago (5,2%), el motor ocular común (5,2%) y el motor ocular externo (5,2%), lo que coincide con los señalado por otros autores (Halperin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014b). De forma excepcional, un paciente sufrió afectación simultánea del VI y VII par craneal dato ya documentado en Europa y América (Hildenbrand *et al.*, 2009; Abul-Kasim, 2010).

Todos los pacientes con parálisis facial a los que se realizó punción lumbar asociaban meningitis linfocitaria, lo que concuerda con lo señalado por Bremell y Hagberg (2011) que sugirieron la realización de una punción lumbar de rutina en pacientes con parálisis facial periférica residentes en zonas endémicas de EL, en especial, si esta afección neurológica se observaba entre Mayo y septiembre.

En cuatro pacientes se detectó una polineuropatía sensitivomotora de tipo mixto sin un claro predominio axonal como describen algunos autores (Pachner *et al.*, 2007).

Únicamente en 2 pacientes se detectaron manifestaciones neurológicas tardías de la EL, como encefalopatía y mielitis, que son raras o infrecuentes entre los enfermos de Lyme (Bigi *et al.*, 2010; Erol *et al.*, 2013).

Del total de pacientes con clínica neurológica, la mayoría se encontraban en fase II (87,6%), el 11% en fase III y sólo el 1,4% en fase I.

Se obtuvo LCR en 52 de los 73 pacientes, siendo normal en 5 casos. El 64% del total de enfermos con neuroborreliosis padecían meningitis (M) sola o asociada a radiculitis (R), neuropatía craneal (NC), polineuropatía sensitivomotora (PN) o mielitis (MI). En la Tabla 4.12., se resumen los principales datos bioquímicos hallados en el LCR de los pacientes con

meningitis, los resultados obtenidos concuerdan con los hallados en otros estudios (Mygland *et al.*, 2010; Djukic *et al.*, 2012) en los que también se observaron alteraciones bioquímicas en el LCR. Un resultado normal en la citoquímica se asocia a pacientes inmunodeprimidos o con diagnósticos muy tempranos de neuroborreliosis precoz (Migland *et al.*, 2010).

El número total de leucocitos detectado en el LCR de los enfermos osciló entre 10 y 1.000 lo que concuerda con lo observado por otros autores (Migland *et al.*, 2010; Djukic *et al.*, 2012). Entre las células del LCR había un claro predominio de mononucleares y en la mayoría de los casos las proteínas estaban elevadas y los niveles de glucosa normales. Estos datos nos ayudan en el diagnóstico diferencial con otros tipos de meningitis bacterianas en las que las proteínas también están elevadas pero predominan los neutrófilos con niveles bajos de glucosa o bien en el diagnóstico diferencial con meningitis de origen vírico en las que predominan los linfocitos pero los niveles de proteínas en el LCR se mantienen habitualmente dentro de los límites normales (Migland *et al.*, 2010; Esposito *et al.*, 2013b).

Tabla 4.12. Datos de laboratorio de los pacientes con meningitis.

CLÍNICA	Leucocitos en LCR x (SD)	% MN en LCR x (SD)	Proteínas en LCR x (SD)	Glucosa en LCR x (SD)	Leucocitos en sangre x (SD)	% PMN en sangre x (SD)	% LI en suero x(SD)
M	645,7 (761,8)	70,7 (48,2)	65,0 (32,7)	55,7 (8,1)	6233,3 (2470,5)	67,7 (15,0)	26,0 (9,9)
M + R	191,4 (265,1)	95,9 (4,8)	98,8 (38,1)	68,4 (29,8)	8392,9 (3017,8)	58,9 (12,1)	29,9 (11,5)
M+R+NC	207,1 (202,8)	90,8 (11,2)	151,8 (68,9)	57,6 (16,9)	7325,0 (2165,1)	62,0 (13,1)	27,8 (14,4)
M+NC	150,0 (175,4)	88,0 (10,2)	78,3 (31,7)	62,5 (7,0)	11083,0 (6350,9)	54,7 (16,6)	34,3 (14,7)
M+NC+PN	21	75	94	59	7200	66	25
M+R+MI	61	94	353	54	4700	56	45

En el 73% de los casos, mediante ELISA se detectaron anticuerpos en LCR, siendo este porcentaje similar (70%) al descrito por Erol *et al.* (2013). Además, se solicitó la detección de *Borrelia*, mediante PCR, en el LCR de 15 pacientes y en uno se detectó *B. garinii*, lo que supone que el 6,7% de las PCR realizadas eran positivas, siendo este porcentaje inferior al 17-21% que Lebech (2002) señala para la detección de DNA de *B. burgdorferi* en el LCR de los pacientes con clínica neurológica; no obstante, nuestros resultados concuerdan en parte con los de este autor, quien también observó que la genoespecie dominante era *B. garinii* debido a su especial tropismo por el sistema nervioso.

En las muestras de sangre periférica, tanto por ELISA como por Western Blot, todos los pacientes eran seropositivos a *Borrelia* y al igual que en otros estudios (Suárez *et al.*, 2015) no se observó leucocitosis significativa ni desviación izquierda.

Como se aprecia en la tabla 4.13. de los 10 pacientes que no recibieron tratamiento antibiótico, no se apreció mejoría o esta fue parcial en el 90% de los casos. Los enfermos tratados con antibióticos (fundamentalmente ceftriaxona o doxiciclina), evolucionaron hacia la curación completa en el 67% de los casos, se obtuvo una respuesta parcial en el 22% y no se observó mejoría en el 11%.

Tabla 4.13. Evolución de los pacientes teniendo en cuenta el tratamiento administrado.

TRATAMIENTO (fármaco, semanas, vía)	MEJORA COMPLETA (CURACIÓN)	MEJORA PARCIAL (SECUELAS)	NO MEJORA
No recibieron tratamiento	1	2	7
Ceftriaxona, 4, iv	10	0	0
Ceftriaxona, 4 (3 iv+1 im)	1	0	0
Ceftriaxona, 3, iv	20	7	1
Ceftriaxona, 3 (2 iv+1 im)	4	0	0
Ceftriaxona, 2, iv	8	2	0
Doxiciclina, 8, vo	0	1	0
Doxiciclina, 4, vo	2	0	0
Doxiciclina, 3, vo	2	2	0
Doxiciclina, 2, vo	1	0	0
Azitromicina o Ciprofloxacilo	0	2	0
TOTAL	49	16	8

Los 16 pacientes con secuelas habían presentado radiculitis y estas consistieron en dolor radicular residual en 7, parestesias en 5 (de estos uno asociaba parestesia facial), debilidad muscular en 3 y en 1 caso se resolvió la clínica neurológica pero persistió la artritis que asociaba.

El porcentaje de enfermos que alcanzó la curación completa tras el tratamiento con ceftriaxona (81,1%) fue superior al observado en los tratados oralmente con doxiciclina (62,5%). Estos resultados contrastan con estudios realizados en EEUU y Europa que proponen el uso de doxiciclina oral en vez de una terapia más agresiva con ceftriaxona iv para los casos de neuroborreliosis sin afectación parenquimatosa del sistema nervioso central (Bremell *et al.*, 2014; Jassan *et al.*, 2014; Halperin *et al.*, 2013; Halperin 2015a). Esta propuesta se basa en que la doxiciclina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y en que la espiroqueta es sensible a la misma. Sin embargo, estos y otros autores (Dersch *et al.*, 2014) puntualizan que son necesarios estudios con un mayor grado de evidencia científica, para poder establecer como tratamiento de primera elección a la doxiciclina en vez de la ceftriaxona como ocurre actualmente.

El 91,8% de los enfermos con neuroborreliosis residían en el medio rural y menos de la mitad (41,1%) recordaban el antecedente de picadura de garrapata. La mediana de edad fue de 67 años (rango: 1-89), existiendo un ligero predominio del sexo masculino (61,65%), coincidiendo estos datos en gran medida con lo observado en Dinamarca por Bodker *et al.* (2015).

Entre los meses de Junio y Octubre se diagnosticaron el 67,1% de los casos, lo que coincide con los resultados de Kindler *et al.* (2015) que observaron que el 75% de los casos se diagnosticaban en estos meses.

4.3.2. Cutáneas.

En 51 pacientes (47,2%), de los 108 casos confirmados de EL, se observaron manifestaciones cutáneas consistentes en eritema migrans en 44 casos, eritema crónico migrans en 6 casos y acrodermatitis crónica atrófica en un único paciente. Este dato supone que en nuestro estudio, las manifestaciones cutáneas constituyen la segunda manifestación en frecuencia de la enfermedad tras la neuroborreliosis. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros países europeos como Suecia (Skogman *et al.*, 2010), Eslovenia (Strle *et al.*, 2013), Austria (Glatz *et al.*, 2015) o Francia (Skinner *et al.*, 2007) en los que la clínica dermatológica fue la manifestación predominante. Esta discordancia podría explicarse por una limitación del estudio, dado que sólo incluye pacientes de diagnóstico hospitalario o aquellos

que sin ser valorados en el Hospital presentaron Western-Blot positivo a *Borrelia*. De esta manera es posible que un número no despreciable de enfermos con eritema migrans hayan sido diagnosticados y tratados por sus médicos de atención primaria sin consulta hospitalaria y con serologías negativas a *Borrelia* y por lo tanto no hayan sido incluidos en el. Esto podría suponer un mayor número de casos de eritema migrans, hacer de la clínica cutánea la manifestación más frecuente y en definitiva, incrementar todavía más la incidencia de enfermedad en el área de estudio.

En el 49% de los casos las lesiones cutáneas constituyeron la única manifestación de la enfermedad. El resto asociaban patología neurológica (35%), reumatológica (8%), cardíaca (4%), o incluso una combinación de tres o más sistemas afectados (4%) como corresponde a una enfermedad multisistémica (Skinner *et al.*, 2007; García-Meléndez *et al.*, 2014). Se identificó un paciente con acrodermatitis crónica atrófica lo que supone el 2% de las manifestaciones cutáneas, dato ligeramente superior al 0,9% descrito por Glatz *et al.* (2015) entre la población austríaca. En el presente estudio, no se identificó ningún caso de linfocitoma cutáneo.

Tabla 4.14. Principales manifestaciones dermatológicas y su localización

CLÍNICA	Nº (%)	LOCALIZACIÓN	
		Jóvenes	Adultos + Mayores
EM	19 (37,2%)	1 cuello, 1 brazo, 1 pierna	9 pierna, 1 espalda 2 abdomen, 4 desconocidos
ECM	5 (9,8%)	1 tórax	3 pierna, 1 tórax
ACA	1 (2%)	0	1 mano
EM+ N	18 (35,2%)	1 axila, 1 tórax	8 pierna, 3 brazo, 1 cabeza, 2 tórax, 1 espalda, 1 abdomen
EM+ R	3 (5,8%)		1 cabeza, 1 pierna, 1 tórax
EM+ C	2 (4%)		1 pierna, 1 tórax
EM+N+R	1 (2%)		1 desconocido
EM+ R+ N+C	1 (2%)		1 desconocido
ECM + R	1 (2%)		1 mano

El eritema migrans fue la manifestación cutánea más frecuente (86,3%) coincidiendo con lo descrito en otros estudios (Skinner *et al.*, 2007; Esposito *et al.*, 2013; Glatz *et al.*, 2015). Su localización preferente en los adultos fue en las extremidades inferiores (48,7%), mientras que en los menores de 15 años se localizó fundamentalmente en la mitad superior del cuerpo (80%) como ya ha sido observado por otros autores (Moniuszko *et al.*, 2015; Esposito *et al.*, 2013; Pérez *et al.* 2013).

Como ya había sido descrito en otros estudios (Pérez *et al.*, 2013), casi la mitad de los pacientes con eritema migrans (43%), fueron diagnosticados de forma retrospectiva. Se llegó a conocer el antecedente de la lesión patognomónica, una vez hecho el diagnóstico de la enfermedad en fases diseminadas y preguntar directamente a los enfermos por la posibilidad de haber padecido una lesión compatible. En estos casos los pacientes no habían consultado al médico o éste no fue capaz de identificar la lesión cutánea como manifestación localizada de la enfermedad por lo que no recibieron tratamiento antibiótico de forma precoz y evolucionaron hacia una forma diseminada. Esto es posible porque esta lesión se puede resolver espontáneamente (Biesada *et al.*, 2012; Glatz *et al.*, 2015) aunque la enfermedad en este caso, como hemos observado en nuestro estudio, podrá evolucionar hacia una forma diseminada.

En los 6 pacientes con eritema crónico migrans la lesión se localizó en las extremidades inferiores en tres casos, en el tórax en dos casos y en la mano en un caso. En este último fue

necesario realizar la toma de una biopsia para el diagnóstico definitivo, realizándose una PCR sobre la piel biopsiada con un resultado positivo para *Borrelia afzelii* que es la genoespecie más específicamente relacionada con lesiones crónicas de la piel (Weber *et al.*, 2001; Rizzoli *et al.*, 2011; Biesiada *et al.*, 2012). La rentabilidad de la PCR sobre piel con eritema migrans se considera buena al alcanzar una alta especificidad con una sensibilidad de hasta el 59% (Moniuszko *et al.*, 2015).

La mayoría de los enfermos con manifestaciones cutáneas se encontraban en Fase I (55%) y en menor proporción en Fase II (35%) y III (10%).

Como se aprecia en la Tabla 4.15., en la mayoría de los pacientes (96,4%) diagnosticados y tratados en Fase I, se observó una remisión completa de la EL. Por este motivo, el objetivo fundamental del tratamiento antibiótico en la fase localizada, es evitar la progresión de la enfermedad y sus secuelas, aunque esto no se consiga en la totalidad de los casos (Moniuszko *et al.*, 2015; Esposito *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013).

Tabla 4.15. Evolución de los pacientes teniendo en cuenta el tratamiento administrado y la fase de la enfermedad.

FASE	TRATAMIENTO (fármaco, semanas, vía)	CURACIÓN	SECUELAS	NO MEJORIA
I	Doxiciclina, 3, vo	18	1	0
	Amoxicilina, 2 o 3, vo	4	0	0
	Amox-clavulánico, 2 o 3, vo	4	0	0
	Ceftriaxona, 3, iv	1	0	0
II	Doxiciclina, 3, vo	2	0	0
	Eritromicina, 3, vo	1	0	0
	Ceftriaxona, 2 o 3 o 4, iv	10	3	0
	No tratamiento	0	0	2
III	Doxiciclina, 3, vo	1	3	0
	Ceftriaxona, 3, iv	0	1	0

Los pacientes tratados en Fase II, en su mayoría (72,2%) consiguieron la remisión completa de los síntomas, mientras que en el 16,6% se observó una mejoría parcial, presentando secuelas de tipo neurológico. En los 2 pacientes no tratados no se objetivó mejoría alguna. Por el contrario, la mayoría de los enfermos tratados en Fase III (80%) tuvieron secuelas articulares y neurológicas.

Como hemos observado en este estudio, el porcentaje de secuelas observado en los pacientes diagnosticados y tratados en fases diseminadas de la enfermedad (39,1%) fue netamente superior al 3,6% observado en los tratados precozmente; demostrándose una vez más, la importancia de un mayor conocimiento de esta enfermedad entre los facultativos y entre la población para evitar retrasos en el diagnóstico (Pérez *et al.*, 2013).

De los 44 pacientes con eritema migrans, más de la mitad (61%) recordaban el antecedente de picadura de garrapata y el 60% eran varones dato que contrasta con lo observado por Strle *et al.* (2013) entre la población eslovena, en la que las manifestaciones cutáneas predominaron en el sexo femenino.

4.3.3. Articulares.

De los 108 enfermos de Lyme, el 15,7% ($n= 17$) mostraron clínica articular. La localización y prevalencia de estas manifestaciones se resumen en la Tabla 4.16. La mayoría de los pacientes (64,7%) presentaron artritis, el 29,4% artralgiyas y el 5,9% bursitis. En todos los casos la rodilla fue la articulación más afectada. Estos resultados, coinciden, en general,

con los señalados por otros autores (Nau *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; Daikh *et al.*, 2013; Aiyer *et al.*, 2014; Nimmrich *et al.*, 2014).

Tabla 4.16. Localización y prevalencia de las manifestaciones articulares.

	TOTAL N (%)	TOBILLO N (%)	RODILLA N (%)	MANO N (%)	CODO N (%)
ARTRITIS	11 (64,7)	1 (9,1)	7 (63,6)	3 (27,3)	0 (0,0)
ARTRALGIAS	5 (29,4)	0 (0,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	0 (0,0)
BURSITIS	1 (5,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)

En los enfermos de Lyme que presentaron artritis (Tabla 4.17.), en la mayoría de los casos (72,7%) esta se asoció a otras manifestaciones neurológicas, dermatológicas o cardíacas, lo que concuerda con lo observado en otros estudios (Nau *et al.*, 2009; Olmo *et al.*, 2014; Portillo *et al.*, 2014).

En los pacientes que tenían artritis, excepto en 1 enfermo (caso 5) en el que se observó EM y se realizó el diagnóstico temprano (5 días), en el resto (90,9%) hubo un retraso medio de 402 días. La mayoría de los pacientes que tenían artritis, estaban en Fase III de la EL acumulando un importante retraso en el diagnóstico, lo que concuerda con lo observado por otros autores (Schoen *et al.*, 2011; Olmo *et al.*, 2014).

En el líquido articular de los EL que padecían artritis se observó un incremento en el número de leucocitos a expensas de polimorfonucleares por lo que es necesario realizar un diagnóstico diferencial con la artritis séptica (Daikh *et al.*, 2013). Esto hace que en ocasiones el diagnóstico diferencial entre ambas entidades sea difícil e incluso pueda llegar a someterse a estos enfermos a tratamientos agresivos e innecesarios como el drenaje quirúrgico (Aiyer *et al.*, 2014). Por este motivo la artritis de Lyme debe ser considerada en pacientes de zonas endémicas con monoartritis u oligoartritis y sobre todo si la articulación afectada es la rodilla (Daikh *et al.*, 2013).

De los 6 pacientes que presentaron EM, cuatro se trataron con amoxicilina, amoxicilina-clavulánico o doxiciclina, que este último el tratamiento de elección para los mayores de ocho años (Esposito *et al.*, 2013a; Portillo *et al.*, 2014). Todos los pacientes tratados evolucionaron hacia la curación sin secuelas, corroborando lo descrito en otras publicaciones en las que el tratamiento se asocia con remisión de la enfermedad en el 99% de los casos (Biesada *et al.*, 2012; Glatz *et al.*, 2015). Por el contrario, los dos pacientes en los que el EM se resolvió espontáneamente al no ser adecuadamente diagnosticados y tratados, evolucionaron hacia una neuroborreliosis (Fase II). Está descrita la resolución espontánea del EM, aunque en los casos que no reciben tratamiento antibiótico su resolución es más lenta y la posibilidad de progresión de la enfermedad es mucho mayor (Biesada *et al.*, 2012; Glatz *et al.*, 2015).

A la mayoría de los pacientes con artritis sin clínica neurológica asociada, se les administró doxiciclina o amoxicilina vía oral, como tratamiento de elección (Nau *et al.*, 2009; Strle *et al.*, 2013). En caso de no obtener una adecuada respuesta al tratamiento inicial, estaría indicado administrar un nuevo ciclo antibiótico durante 2 o 3 semanas seguido, según la evolución, de fármacos antirreumáticos moduladores de la enfermedad como el metotrexato y tratamiento corticoideo intrarticular como se realizó en los casos 1 y 9 (Daikh *et al.*, 2013; Sordet *et al.*, 2014). No obstante, a pesar del tratamiento, tres pacientes presentaron secuelas

de tipo neurológico (dolor radicular en el brazo) y 2 desarrollaron una artritis crónica recidivante, por lo que además se les administró corticoides y metrotexato.

Tabla 4.17. Características de la EL en pacientes con clínica articular

Nº	Clínica	Fase	RD (días)	Bioquímica (LA) PCR	Antibiótico (días/admón) RT ^(1,2,3,4,5)	Secuelas	Sexo	Edad
1	Artritis (R)	III	60	Leuc: 19627 (88% PMN). PCR en LA: <i>B. garinii</i>	Amoxicilina (28/vo) ¹ Ceftriaxona (15/iv) ¹ Metotrexato (sc) ¹ Corticosteroide intraarticular ²	Artritis crónica recurrente	M	4
2	Artritis (R)	III	1380	Leuc: 28500 (90% PMN)	Doxiciclina (60/vo)	NO	M	47
3	Artritis (R)	III	60	Leuc: 32000 (85% PMN)	Doxiciclina (30/vo)	NO	M	52
4	Artritis (D+R)	III	150	No disponible	Doxiciclina (21/vo)	NO	M	62
5	Artritis (D+R)	III	5	No disponible	Doxiciclina (21/vo)	NO	M	60
6	Artritis (R+N)	II	450	No disponible	NO	Dolor radicular en brazo	M	58
7	Artritis (R+N)	III	300	No disponible	Ceftriaxona (21/iv)	NO	V	87
8	Artritis (R+N)	III	60	No disponible	Ceftriaxona (21/iv)	NO	M	79
9	Artritis (D+R+N)	III	30	Leuc: 39440 (99% PMN)	Doxiciclina (60/vo) ³ . Metotrexato sc ⁴ Corticosteroide intraarticular ⁵	Artritis crónica recurrente	V	46
10	Artritis (R+N+C)	III	Desconocido	No disponible	Doxiciclina (21/vo) ⁷ Clavulanico/amoxicilina (10/vo) ⁸ Ciprofloxacino (30/vo) ⁹	Dolor radicular brazo	V	75
11	Artritis (D+R+N+C)	III	730	No disponible	Doxiciclina (21/vo) ¹⁰ Ciprofloxacino (10/vo) ¹¹	Dolor radicular brazo	V	74
12	Artralgias (D+R)	I	90	PCR en piel (EM): <i>B. afzelli</i>	Doxiciclina (60/vo)	NO	V	54
13	Artralgias (D+R)	I	1	No disponible	Doxiciclina (21/vo)	NO	M	70
14	Artralgias (R+N)	II	90	No disponible	Azitromicina (10/vo)	NO	V	58
15	Artralgias (R+N)	II	3	No disponible	Doxiciclina (30/vo)	NO	M	81
16	Artralgias (R+N+C)	II	2	No disponible	Ceftriaxona (27/iv)	NO	V	34
17	Bursitis (R+N+C)	II	1277	No disponible	NO	Pérdida de fuerza y dolor radicular brazo	V	54

RT: Reiteran tratamiento (¹ en 2012; ² en 2013; ³ en 2011; ⁴ en 2012; ⁵ en 2013; ⁶ en 2014; ⁷ en 2006; ⁸ en 2011; ⁹ en 2012; ¹⁰ en 2006; ¹¹ en 2013)

En aquellos pacientes con artritis y clínica neurológica asociada se les administró, el tratamiento de elección, ceftriaxona endovenosa durante 21 días (Wormser *et al.*, 2006; Bockenstedt *et al.*, 2014) como se hizo en los pacientes 7 y 8 de nuestro estudio. No se observó clínica articular residual tras el tratamiento en el 88,2% de los pacientes, lo que concuerda con lo descrito por otros autores (Nau *et al.*, 2009; Daikh *et al.*, 2013).

En los pacientes de nuestro estudio, se observó que las artralgiyas y bursitis, sin artritis asociada, fueron relativamente frecuentes y se observaron con mayor frecuencia en la fase II de la enfermedad (Nau *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2011a). Estas manifestaciones siempre estuvieron asociadas a clínica dermatológica, neurológica o cardíaca. A 5 de los 6 pacientes (83,3%) se les administró tratamiento antibiótico y no presentaron secuelas. Por el contrario, hubo 1 paciente con bursitis que tuvo un retraso en el diagnóstico de 1277 días, no fue tratado y presentó secuelas de tipo neurológico.

No se apreciaron diferencias en la clínica articular al considerar el sexo de los pacientes, lo que coincide con lo observado en otros estudios (Olmo *et al.*, 2014; Wilking *et al.*, 2014).

La edad de los pacientes osciló entre 4 y 87 años (mediana 58 años), constatándose una mayor prevalencia de manifestaciones articulares en los pacientes adultos (52,9%) y mayores (41,2%) que en los jóvenes (5,9%), por lo que no se observó la distribución bimodal observada en la EL (Rizzoli *et al.*, 2011; Wilking *et al.*, 2014; Vázquez-López *et al.*, 2015).

4.3.4. Cardíacas.

De los 108 casos confirmados de enfermedad de Lyme, 15 (13,90%) tenían afectación cardíaca, siendo este porcentaje superior al 0,3-4% descrito en Europa (Semmler *et al.*, 2010; Dersch *et al.*, 2014; Shenthara *et al.*, 2014; Schelffold *et al.*, 2015) o al hallado (4-10%) en América (Karmacharya *et al.*, 2013; Shenthara *et al.*, 2014; Schelffold *et al.*, 2015).

Como se observa en la Tabla 4.18., la mayoría de los pacientes (86,7%) asociaban otro tipo de manifestación clínica y sólo dos padecían únicamente problemas cardíacos. La alteración del ritmo cardíaco fue la manifestación más frecuente (93%) y consistió en un bloqueo auriculoventricular (Bloq AV), siendo de primer grado (1^{er} G), en el 50% de los pacientes, de segundo grado (2^o G) en el 35,7% y de tercer grado (3^{er} G) en el 14,3%. Estos resultados coinciden con las observaciones de otros autores (Semmler *et al.*, 2010; Biesiada *et al.*, 2012; Esposito *et al.* 2013b; Robinson *et al.*, 2015) que incluso llegan a relacionar esta clínica con una invasión directa del tejido cardíaco por la espiroqueta y la consiguiente respuesta inflamatoria que genera a este nivel.

Solo se observó pericarditis en el 7% de los casos, lo que coincide con lo hallado por otros autores (Semmler *et al.* 2010; Karmacharya *et al.* 2010; Shenthara *et al.* 2014; Robinson *et al.* 2015) que consideran a la pericarditis como una manifestación rara. Por el contrario, Schelffold *et al.* (2015) observaron afectación del pericardio en el 60% de los pacientes con patología cardíaca.

En el momento del diagnóstico, la mayoría se encontraban en fase II y el 20% en fase III como ya habían señalado Semmler *et al.* (2010) y Shenthara *et al.* (2014). No se observó el predominio estacional propio de otras manifestaciones de la enfermedad como el eritema migrans o la parálisis facial (Kindler *et al.*, 2015).

Tabla 4.18. Características de la EL en pacientes con clínica cardíaca

Nº caso	Manifestaciones cardíacas	Clínica asociada	Fase	RD (días)	Antibiótico (días/vía administración)	Secuelas	Sexo	Edad
1	Bloq AV 3ºG	NO	II	Desconocido	Ceftriaxona (14/iv)	NO	V	36
2	Bloq AV 2ºG	NO	II	Desconocido	NO	Bloq AV 2ºG	M	65
3	Pericarditis	D	II	Desconocido	Eritromicina (21/vo)	NO	V	63
4	Bloq AV 1ºG	D	II	1	Doxiciclina (21/vo)	NO	M	63
5	Bloq AV 1ºG	N	II	60	Ceftriaxona (16/iv)	NO	M	70
6	Bloq AV 1ºG	N	II	60	Ceftriaxona (21/iv)	Pérdida de fuerza pierna	V	83
7	Bloq AV 2ºG	N	II	30	Ceftriaxona (14/iv)	NO	V	62
8	Bloq AV 1ºG	N	II	30	Ceftriaxona (21/iv)	NO	V	82
9	Bloq AV 1ºG	N	II	60	Ceftriaxona (21/iv)	NO	V	83
10	Bloq AV 1ºG	N	II	10	Ceftriaxona (21/iv)	NO	V	81
11	Bloq AV 3ºG	D N	III	120	Ceftriaxona (21/iv) Marcapasos temporal	Encefalopatía	V	59
12	Bloq AV 2ºG	N R	II	Desconocido	NO	Pérdida de fuerza brazo	V	54
13	Bloq AV 2ºG	N R	II	2	Ceftriaxona (27/iv)	NO	V	34
14	Bloq AV 1ºG	N R	III	1	Ciprofloxacino (10/vo)	Bloq AV 1ºG Dolor radicular	V	75
15	Bloq AV 2ºG	D N R	III	720	Doxiciclina (21/vo)	Dolor radicular	V	74

El 87% de los pacientes recibieron tratamiento antibiótico fundamentalmente con ceftriaxona iv o doxiciclina en consonancia con las guías de práctica clínica (Wormser *et al.*, 2006; Forrester *et al.*, 2014). El 70% de los casos evolucionaron hacia la curación, mientras que el resto presentaron secuelas de tipo neurológico y/o cardíaco que no necesitaron la colocación de un marcapasos permanente. Nuestros resultados coinciden con la respuesta favorable al tratamiento antibiótico observada en otros estudios, en los que la colocación de un marcapasos permanente o la evolución hacia una miocardiopatía dilatada es también excepcional (Semmler *et al.*, 2010; Karmacharya *et al.*, 2013; Shenthara *et al.*, 2014; Schelffold *et al.*, 2015).

Los dos pacientes que no fueron adecuadamente diagnosticados ni tratados mantuvieron las alteraciones del ritmo y secuelas neurológicas asociadas, por lo que una sospecha clínica fundamentada en la presencia de un bloqueo auriculoventricular en un enfermo que resida o haya viajado a una zona endémica de EL, nos permitirá realizar un diagnóstico y tratamiento precoz que son fundamentales para reducir al máximo la posibilidad de secuelas y por tanto mejorar la calidad de vida de los pacientes (Karmacharya *et al.*, 2013; Shenthara *et al.*, 2014).

La mediana y la media de edad de los pacientes, con patología cardíaca, fue de 65 años. La mayoría eran varones con una relación 4:1, este predominio del sexo masculino ya

fue apuntado por otros autores aunque con un ratio algo menor (3:1) en enfermos de Lyme con clínica cardiaca (Semmler *et al.*, 2010; Shenthar *et al.*, 2014; Schelffold *et al.*, 2015).

4.3.5. En edad pediátrica.

Durante los 8 años que duró el estudio, se identificaron 10 pacientes pediátricos como casos confirmados de EL y todos, excepto 1 que presentaba EM, se confirmaron serológicamente mediante ELISA y Western Blot.

La EL es una enfermedad emergente con un pico de incidencia en edad infantil y cuyo diagnóstico y tratamiento antibiótico precoz es fundamental para reducir su morbilidad (Esposito *et al.*, 2013a); así mismo, según estos autores, la gran variedad de posibles manifestaciones clínicas y el hecho de que estas puedan confundirse con los síntomas propios de enfermedades pediátricas, hacen que su diagnóstico sea más difícil a esta edad y esto nos obliga a un mayor conocimiento de esta entidad.

Como se observa en la Tabla 4.19., al diagnóstico, el 40% de los pacientes se encontraban en Fase I, el 50% en Fase II y el 10% en Fase III, lo que concuerda con lo descrito por otros autores (Gordillo y Solórzano, 2010; Portillo *et al.*, 2014).

Tabla 4.19. Características de la EL en pacientes pediátricos

Nº caso	Clínica asociada	Fase	RD (días)	Bioquímica	Antibiótico (días/vía administración)	Sexo	Edad
1	EM (cuello)	I	5		Doxiciclina (21/vo)	V	10
2	EM (hombro)	I	5		Amoxicilina (21/vo)	V	7
3	EM (rodilla)	I	1		Amoxicilina- clavulánico (10/vo)	V	11
4	EM (costado)	I	30		Doxiciclina (21/vo)	V	9
5	Meningitis	II	4	LCR: Prot: 102 mg/dl Leuc:1500 (99% Li)	Ceftriaxona (21/iv)	M	12
6	Meningitis Parálisis facial	II	1	LCR: Prot: 100mg/dl Leuc: 465 (90% Li)	Ceftriaxona (16/iv+5/im)	V	4
7	Meningitis Parálisis facial	II	4	LCR: Prot: 36mg/dl Leuc: 60(95% Li)	Ceftriaxona (14/iv+7/im)	V	1
8	EM (costado) Meningitis	II	10	LCR: Prot: 53mg/dl Leuc: 400(98%Li)	Ceftriaxona (14/iv+7/im)	V	6
9	EM (axila) Meningitis Radiculitis	II	30	LCR: Prot: 77mg/dl Leuc: 976 (85%Li)	Ceftriaxona (14/iv+7/im)	M	7
10	Artritis	III	60	LA: Leuc: 19627 (88%PMN)	Amoxicilina (28/ vo) Ceftriaxona (15/iv) Metotrexato (sc) Corticoide intraarticular	M	4

La clínica predominante fue la dermatológica (40%), seguida de la neurológica (30%) y con menor frecuencia de la articular (10%); además, el 20% de los enfermos presentaron manifestaciones dermatológicas y neurológicas. No se detectaron casos de afectación cardíaca u oftalmológica. Al igual que Skogman *et al.* (2010) la única manifestación cutánea de la EL,

observada entre los pacientes pediátricos de nuestro estudio, fue el eritema migrans. Esta lesión se localizó, en la mayoría de los casos, en la mitad superior del cuerpo en contraposición a lo que sucede en la edad adulta cuya localización más habitual es en las piernas. Este hecho ha sido también observado en otros estudios realizados sobre población infantil (Esposito *et al.* 2013b). En ningún paciente se observó linfocitoma cutáneo ni acrodermatitis crónica atrófica que son excepcionales a esta edad (Huppertz *et al.*, 2012; Glatz *et al.*, 2015).

De los 6 pacientes que presentaron EM, cuatro se trataron con amoxicilina, amoxicilina-clavulánico o doxiciclina, que este último el tratamiento de elección para los mayores de ocho años (Esposito *et al.*, 2013a; Portillo *et al.*, 2014). Todos los pacientes tratados evolucionaron hacia la curación sin secuelas, corroborando lo descrito en otras publicaciones en las que el tratamiento se asocia con remisión de la enfermedad en el 99% de los casos (Biesada *et al.*, 2012; Glatz *et al.*, 2015). Por el contrario, los dos pacientes en los que el EM se resolvió espontáneamente al no ser adecuadamente diagnosticados y tratados, evolucionaron hacia una neuroborreliosis (Fase II). Está descrita la resolución espontánea del EM, aunque en los casos que no reciben tratamiento antibiótico su resolución es más lenta y la posibilidad de progresión de la enfermedad es mucho mayor (Biesada *et al.*, 2012; Glatz *et al.*, 2015).

Las manifestaciones neurológicas más frecuentemente encontradas fueron la meningitis y la parálisis facial, que constituyen la clínica fundamental de la neuroborreliosis infantil (Ewers *et al.*, 2015; Kurian *et al.*, 2015). En nuestro estudio, todos los pacientes con clínica neurológica tenían meningitis, y en la bioquímica del LCR se hallaron niveles elevados de proteínas con aumento de las células de predominio mononuclear. Aunque desde el punto de vista clínico es difícil diferenciar entre la meningitis de Lyme y la producida por otro tipo de bacterias o de virus; los valores obtenidos en la bioquímica del líquido cefalorraquídeo nos pueden ayudar en el diagnóstico diferencial (Esposito *et al.*, 2013b). El tratamiento administrado a todos los pacientes fue ceftriaxona (im/iv), durante 21 días, que constituye el fármaco de primera elección (Esposito *et al.*, 2013b; Pérez *et al.*, 2013; Portillo *et al.*, 2014).

Se observó que todos los casos de parálisis facial tenían meningitis asociada, lo que concuerda con lo señalado por Bremell y Hagberg (2011); además, para facilitar el diagnóstico en zonas endémicas de EL, estos autores sugirieron que se realizase una punción lumbar de rutina. El pronóstico de esta entidad en edad pediátrica es habitualmente excelente si se establece un tratamiento precoz, sin embargo en la edad adulta las secuelas tanto motoras como cognitivas son más frecuentes (Esposito *et al.*, 2013b).

Como sucedió en nuestro estudio, Esposito *et al.* (2013b) señalaron que, aproximadamente el 5% de los casos de Lyme pediátrico desarrollarán parálisis facial, incluso en ausencia de eritema migrans previo. Asimismo, estos autores consideran que, en zonas endémicas de EL, la parálisis facial periférica, sobre todo si es bilateral, con frecuencia será secundaria a la infección por *Borrelia*. Por ello, consideramos que es fundamental incluir esta entidad en el diagnóstico diferencial ante una parálisis facial periférica, para no correr el riesgo de catalogarla inadecuadamente como una parálisis de Bell, lo que impediría la administración del tratamiento antibiótico adecuado (Pérez *et al.*, 2013).

Sólo se observó meningorradiculitis en un paciente, lo que concuerda con lo observado por Esposito *et al.* (2013b) que consideran que es una manifestación muy frecuente en edad adulta, pero rara en la infancia.

En el presente estudio no observamos ningún caso de encefalopatía, lo que coincide con Esposito *et al.* (2013b) quienes consideran que esta manifestación de la neuroborreliosis es excepcional en edad pediátrica. Tampoco observamos otras manifestaciones neurológicas menos frecuentes como ataxia, corea, vértigo, mielitis, vasculitis cerebral, neuropatía

periférica, mononeuritis o radiculitis, descritas por otros autores (López-Alberola *et al.*, 2012; Esposito *et al.*, 2013b; Kurian *et al.*, 2015).

Todos los enfermos evolucionaron hacia la curación sin secuelas excepto el paciente con manifestaciones articulares que desarrolló una artritis crónica recidivante, probablemente debido a que fue el que acumuló mayor retraso en el diagnóstico, aunque según Nimmrich *et al.* (2014) no se ha encontrado ningún marcador clínico o serológico fiable para identificar los casos de riesgo elevado para evolucionar hacia la cronicidad. Sin embargo, estos autores recomiendan que, en caso de recurrencia de la artritis tras finalizar un tratamiento adecuado, se podría pautar un ciclo con ceftriaxona durante 2 o 3 semanas, fármacos antirreumáticos moduladores de la enfermedad como el metotrexato y tratamiento corticoideo intraarticular como se realizó en nuestro caso.

El hecho de que este paciente presentase una monoartritis recurrente de rodilla, coincide con lo señalado por diversos autores (Daikh *et al.*, 2013; Nimmrich *et al.*, 2014) quienes también observaron que en edad infantil, la rodilla es la articulación más frecuentemente afectada. En la bioquímica del líquido articular, al igual que en la artritis séptica, se observó un aumento de leucocitos con predominio de neutrófilos (Daikh *et al.*, 2013; Deanehan *et al.*, 2014). Por este motivo, y para evitar tratamientos más agresivos, es importante disponer de cultivos negativos para otros gérmenes tanto en sangre como en líquido articular, así como de una serología positiva frente a *Borrelia* (ELISA y Western Blot), como sucedió en nuestro caso, en el que además se aisló *B. garinii*.

En el presente estudio, todos los pacientes residían en núcleos rurales, lo que se relaciona con un mayor riesgo de picadura de garrapata y por tanto de adquirir la EL, dato que coincide con lo observado por otros autores (Dehnert *et al.*, 2012; Esposito *et al.*, 2013b). Además, se debe tener en cuenta que, las actividades diarias de juego infantil realizadas en contacto con la naturaleza favorecen la exposición a la picadura de garrapata y convierten a la infancia en una edad de riesgo para adquirir la EL (López-Alberola, 2006; Esposito *et al.*, 2013b).

El hecho de que solo la mitad de los pacientes recordaran el antecedente de picadura de garrapata se corresponde con el porcentaje descrito en la población general (Olmo *et al.*, 2014, Vázquez-López *et al.*, 2015).

La edad al diagnóstico osciló entre 1 y 12 años coincidiendo la media y la mediana con la edad de 7 años. Estos resultados concuerdan con otros estudios, en los que se señala un pico de incidencia de la enfermedad entre los 5 y 9 años (Dehnert *et al.*, 2012; Skogman *et al.*, 2012; Stanek *et al.*, 2012; Esposito *et al.*, 2013b; Wilking *et al.*, 2014). Se observó mayor prevalencia en el sexo masculino (70%).



5 CONCLUSIONES



5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, se deducen las siguientes conclusiones:

1^a. La seroprevalencia de *Borrelia* en personas con sospecha de padecer enfermedad de Lyme fue similar a la hallada en otras localidades del Norte de España. No obstante, se constató un aumento en la tendencia durante los años de estudio.

2^a. Existe una correlación positiva y significativa entre la tasa de incidencia de enfermedad de Lyme y la seroprevalencia, por lo que la detección de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* es útil para un primer cribado serológico mediante ELISA, aunque es imprescindible su posterior confirmación mediante Western-Blot, excepto en aquellos pacientes con eritema migrans.

3^a. La zona de procedencia y el hábitat en el que residen los pacientes influyen sobre la prevalencia y la tasa de incidencia de Enfermedad de Lyme, siendo ambos parámetros significativamente superiores en los residentes en la montaña lucense y en los habitantes del medio rural.

4^a. Las tasas de incidencia anuales por 100.000 habitantes son netamente superiores a las señaladas en España, siendo la zona de estudio endémica para la Enfermedad de Lyme. La tasa de incidencia sigue una distribución bimodal respecto a la edad de los enfermos; por el contrario, el sexo de los pacientes no influye en la tasa de infección.

5^a. Un elevado número de casos de enfermedad de Lyme se diagnosticaron entre los meses de junio y octubre, coincidiendo con la mayor densidad de garrapatas en los corzos y en la naturaleza. No obstante, un considerable porcentaje de enfermos no recordaban la picadura de garrapata.

6^a. La mayoría de las garrapatas obtenidas de los corzos y de la naturaleza eran *Ixodes ricinus*. El porcentaje de ixódidos infectados con *Borrelia* fue superior en los recolectados en la naturaleza que en los de los corzos; en ambos casos, la prevalencia de infección fue mayor en los *I. ricinus* procedentes de la zona de meseta, lo que contrasta con la seroprevalencia y tasa de incidencia de la EL en la población, ya que esta fue superior en los habitantes de la montaña. De lo que se deduce que existen diversos factores que intervienen en la infección de *I. ricinus* por *Borrelia*, siendo necesario realizar estudios más amplios que permitan identificarlos.

7^a. Se identificaron seis genoespecies de *Borrelia*: *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* y *B. miyamotoi*. Las cinco primeras se consideran genoespecies patógenas pertenecientes al grupo *B. burgdorferi sensu lato* y se encuentran entre las de mayor interés como causantes de enfermedad de Lyme. Todas las genoespecies se detectaron en las garrapatas recuperadas de los corzos y de la vegetación, excepto *B. burgdorferi s.s.*, que únicamente se identificó en *I. ricinus* de la vegetación.

8ª. Predominaron los pacientes con un solo tipo de manifestación clínica, aunque también fueron frecuentes las combinaciones de dos o más como corresponde a una enfermedad multisistémica. Predominó la sintomatología neurológica y dermatológica y, en menor proporción, se observaron manifestaciones articulares y cardíacas.

9ª. En el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes estaban en Fase II de la enfermedad. Un elevado porcentaje de enfermos que estaban en Fase I presentaban exclusivamente afectación cutánea. La mayoría de los pacientes en Fase II presentaban clínica neurológica aislada o asociada a patología dermatológica y cardíaca. En la Fase III la clínica reumatológica sola o asociada fue la más frecuente.

10ª. La neuroborreliosis fue la forma presentación más frecuente entre los enfermos de Lyme, lo que se corresponde con el especial tropismo que tiene *B. garinii* por el sistema nervioso y con que esta fuese la genoespecie más frecuentemente aislada en los *I. ricinus* recogidos en la vegetación del área sanitaria. La radiculitis fue la manifestación neurológica predominante, seguida de la meningitis y la parálisis facial.

11ª. En los enfermos de Lyme, las manifestaciones cutáneas, articulares y cardíacas más frecuentes fueron el eritema migrans, la artritis de rodilla y el bloqueo aurículo-ventricular, respectivamente.

12ª. En los pacientes pediátricos, la manifestación cutánea más frecuente fue el eritema migrans localizado, sobre todo, en la mitad superior del cuerpo. La meningitis linfocitaria y la parálisis facial periférica constituyeron las manifestaciones neurológicas más frecuentes. Todos los enfermos evolucionaron favorablemente tras el tratamiento antibiótico, excepto uno que desarrolló una artritis recurrente de rodilla; identificándose *B. garinii* en el líquido articular.

13ª. La incidencia de enfermedad de Lyme, en el área sanitaria de estudio, fue superior a la hallada en otras zonas de España. No obstante, dada la prevalencia de infección por *Borrelia* hallada en *I. ricinus*, no está indicado el tratamiento antibiótico profiláctico de forma sistemática tras su picadura.

14ª. El mejor conocimiento epidemiológico de la enfermedad nos permitirá no sólo alcanzar un mejor índice de sospecha desde el punto de vista médico, optimizando diagnóstico y tratamiento; sino además, actuar activamente para que la población adopte las medidas de protección necesarias para evitar la picadura de garrapata o reducir al máximo el tiempo de alimentación de la misma, en especial, si viven en zonas rurales o realizan actividades al aire libre en zonas de riesgo.



6 RESUMEN



6 RESUMEN

La población objeto de estudio pertenece al área de influencia del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) que da cobertura asistencial a una media de 223.374 personas distribuidas en 41 ayuntamientos que se corresponde geográficamente con la franja central de la provincia de Lugo.

Entre los años 2006 y 2013, ambos incluidos, se analizaron los resultados serológicos de 2.845 personas consideradas de riesgo para la enfermedad de Lyme (EL). Se les había solicitado la determinación de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* por presentar clínica infecciosa inespecífica, lesiones cutáneas u otro tipo de manifestaciones clínicas compatibles con EL. El test serológico empleado fue un ELISA "sandwich" ligado a fluorescencia de alta sensibilidad (100%) y especificidad (92%). En el análisis de los resultados de las serologías, y debido a la confidencialidad de los datos personales, solo se dispuso de la zona de residencia y el hábitat de los pacientes.

Además, con objeto de calcular la tasa de incidencia de EL, se revisaron 199 historias clínicas que incluían a los pacientes ingresados en el HULA con diagnóstico al alta de EL y todas aquellas personas que en este periodo presentaron Western Blot positivo a *Borrelia*. De las historias se recogieron; previa autorización del Comité de Ética, los datos relativos a zona y hábitat de de residencia, edad y sexo de los pacientes, antecedente de picadura de garrapata, así como las manifestaciones clínicas, mes y año de diagnóstico. También se recopilaron los datos de laboratorio de mayor relevancia, el tratamiento administrado y la evolución de los pacientes.

La zona de la Montaña se caracteriza por altitudes elevadas (650-1.500 m), temperaturas medias bajas (10°C) y elevadas precipitaciones anuales (>1.500 mm), y en ella residen 31.397 habitantes. La Meseta tiene menor altitud (200-600 metros), temperaturas medias moderadas (12°C) y precipitaciones más bajas (<1.300 mm) y en ella habitan 191.977 personas. Según el MAGRAMA se consideran habitantes del medio rural a los que residen en núcleos de menos de 2.000 personas (nº= 118.447) y el resto se consideran de hábitat urbano (nº= 104.927). Según criterios de la OMS, los pacientes se agruparon en jóvenes (< 15 años, nº= 23.947), adultos (15-60 años, nº = 128.750) y mayores (> 60 años, nº= 70.677). En relación con el sexo, 108.483 eran varones y 114.891 mujeres.

Asimismo para cada ayuntamiento se tuvo en cuenta la densidad de corzos (número de ejemplares/100 ha) que varió entre 2,428 y 7,143y el porcentaje de superficie forestal calculado sobre la superficie total que osciló entre el 26% y 90%.

La tasa de incidencia anual por 100.000 habitantes (TI) se calculó dividiendo el número de casos nuevos entre el número de personas en riesgo de adquirir la enfermedad en ese año, considerando la población total al inicio del mismo. Asimismo, para el cálculo de las tasas de incidencia anuales específicas (TIE) respecto a las variables consideradas, se tuvo en cuenta la población de cada categoría al inicio de ese año. Para calcular la tasa de incidencia acumulada (TIA) se consideró todo el periodo de estudio. Para el cálculo de las tasas de incidencia acumuladas específicas (TIAE) en relación con las variables estudiadas se consideró la población de cada categoría durante todo el periodo de estudio.

En algunos de los ayuntamientos de procedencia de los enfermos de Lyme, además, se dispuso de garrapatas procedentes de 175 corzos cazados, durante las temporadas de caza

(Abril-Octubre) de los años 2007 y 2008. Con objeto de determinar el porcentaje de garrapatas infectadas por *Borrelia*, se analizaron únicamente los machos de *Ixodes ricinus* ya que al no alimentarse de su tercer hospedador, se elimina la posibilidad de que la fracción del complemento del corzo haya destruido la espiroqueta. Asimismo, entre los meses de abril y junio de 2013, en los ayuntamientos en los que se dispuso de machos de *I. ricinus* de corzos, se realizaron diversos muestreos en los que se recolectaron garrapatas de la naturaleza. En ambos casos, se realizaron pools de, como máximo, 10 garrapatas, aunque este número varió dependiendo de la cantidad de *Ixodes* obtenidas en cada uno de los municipios. La extracción de ADN de *Borrelia* se realizó mediante un kit comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Alemania), siguiendo el protocolo específico para sangre y tejidos recomendado por el fabricante. Para la amplificación del ADN se utilizaron PCRs anidadas y para determinar cuáles eran las genoespecies de *Borrelia* implicadas en la infección de las garrapatas se amplificó un fragmento del gen de la flagelina (flaB). Las 2 etapas de la PCR anidada estuvieron constituidas por una reacción independiente, incluyéndose controles negativos y positivos en todos los ensayos. Los fragmentos obtenidos tras la realización de la segunda reacción de amplificación se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa. La determinación de la secuencia nucleotídica se realizó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la USC. La identificación de las genoespecies presentes se realizó mediante la comparación de las secuencias de ADN obtenidas con aquellas depositadas en la base de datos del GenBank.

El 15,1% de los sueros examinados presentaban anticuerpos específicos frente a *Borrelia*. La seroprevalencia anual de *Borrelia* osciló entre 8,8% en 2007 y 22,3% en 2012, constatándose un aumento en la tendencia.

La seroprevalencia fue superior en las personas de la Montaña (24,4%) que en las de la Meseta (12,5%) y en los residentes en el medio rural (19,9%) que en el urbano (10,5%), constatándose que estas diferencias eran significativas tanto al considerar la zona ($\chi^2= 53,78$; $p<0,001$) como el hábitat ($\chi^2= 48,86$; $p<0,001$).

Asimismo, al considerar los ayuntamientos de procedencia de las personas, se constató que existía una correlación positiva y significativa entre la seroprevalencia y la densidad de corzos ($r= 0,343$; $p= 0,028$). También se observó una correlación positiva, aunque no fue significativa, entre la seroprevalencia y la masa forestal ($r= 0,174$; $p>0,05$).

De las 199 historias clínicas seleccionadas como casos posibles de EL, únicamente 108 cumplían los criterios establecidos por los CDC para ser considerados casos confirmados de enfermedad. La tasa de incidencia anual por 100.000 habitantes osciló entre 2,6 en 2007 y 11,6 en 2012, constatándose una tendencia ascendente con el tiempo. Las tasas de incidencia anual específicas (TIE) fueron superiores en los habitantes de la Montaña que en los de la Meseta y en los del hábitat rural que en los del urbano. En ambos casos se comprobó que las TIE mostraron una tendencia ascendente con el tiempo. Al considerar la edad, se observó que la TIE era superior en los mayores y en los jóvenes. Por el contrario, aunque la TIE fue mayor en los hombres, la tendencia fue similar en ambos sexos.

La tasa de incidencia acumulada (TIA) en los 8 años de estudio fue de 48,34/100.000 habitantes, constatándose que existía una correlación positiva y significativa entre esta tasa de incidencia acumulada y la seroprevalencia ($r= 0,726$; $p<0,01$).

La TIA fue superior en los habitantes de la Montaña (125,27) que en los de la Meseta (34,37), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2= 55,16$; $p<0,001$). Asimismo, fue superior en los del hábitat rural (99,91) que en los del urbano (5,62), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2= 71,12$; $p<0,001$). La TIA siguió una distribución bimodal siendo superior

en los mayores (79,55) que en los jóvenes (44,30) y en los adultos (30,75). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente en las TIAE entre los adultos y los de mayor edad. En relación con el sexo, la TIAE fue ligeramente superior en los hombres (56,23) que en las mujeres (40,53), pero estas diferencias carecieron de significación estadística.

Se observó una correlación positiva y significativa entre la TIA y la densidad de corzos ($r=0,310$; $p=0,048$) y entre esta última y la masa forestal ($r=0,597$; $p<0,01$). Sin embargo, aunque se comprobó que existía una correlación positiva entre la TIA y la masa forestal ($r=0,148$; $p>0,05$) esta careció de significación estadística.

El 45,4% de los enfermos recordaban la picadura de garrapata y entre los meses de junio y octubre fueron diagnosticados la mayoría (68,5%) de ellos.

La mayoría de las garrapatas obtenidas tanto de los corzos como de la naturaleza eran de la especie *I. ricinus*. En los corzos abatidos en la meseta se hallaron cifras medias ($59,5\pm 57,7$) superiores que en los de la montaña ($45,7\pm 49$), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2=4,214$; $p=0,040$). Mediante PCR, se detectó ADN de *B. burgdorferi s.l.* en el 5,1% de los 178 pools de machos de *I. ricinus* procesados. Al considerar la zona de procedencia de los animales se observó que el porcentaje de pools positivos fue superior en las garrapatas obtenidas de corzos de la meseta, aunque estas diferencias no resultaron significativas.

En los *I. ricinus* recolectados de la naturaleza, el estadio predominante fue el de ninfa (82,7%) y en menor proporción se hallaron hembras (7,2%), machos (6,5%) y larvas (3,6%). Se detectó ADN de *Borrelia* en el 59,9% de los 142 pools procesados. Este porcentaje fue superior en las hembras (75,7%) que en los machos (37,5%). Al considerar la zona de recogida de las garrapatas, se obtuvo un mayor porcentaje de pools positivos en la meseta (72,7%) que en la montaña (48,7%), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2=8,498$; $p=0,003$).

Al analizar las secuencias de los pools positivos, se identificaron cinco genoespecies de *B. burgdorferi s.l.*, que se encuentran entre las de mayor interés desde el punto de vista médico, como causantes de EL: *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto (s.s.)*, *B. garinii*, *B. lusitaniae* y *B. valaisiana*. Todas las genoespecies se detectaron tanto en garrapatas recuperadas de los corzos como en las recogidas de la vegetación, excepto *B. burgdorferi s.s.*, que únicamente se identificó en un pool de *I. ricinus* procedentes de la naturaleza. *B. garinii* fue la genoespecie detectada en un mayor porcentaje de pools positivos, tanto en las garrapatas recogidas del medio como en los machos adultos obtenidos de los corzos, siendo *B. afzelii* la menos frecuente en ambos casos. No obstante, los porcentajes de pools positivos de las diferentes genoespecies fueron siempre muy superiores en las garrapatas recogidas de vegetación que en las obtenidas de los corzos.

En la mayoría de los enfermos de Lyme se observó un solo tipo de manifestación clínica y fueron menos frecuentes las combinaciones de dos (32,5%), tres (4,6%) o cuatro (0,9%). Los síntomas neurológicos (67,5%) y dermatológicos (47,2%) fueron los más prevalentes y, en menor proporción, se observaron los articulares (15,7%) y los cardíacos (13,9%).

En el momento del diagnóstico, el 25,9% de los enfermos de Lyme se encontraban en Fase I, el 62,1% en Fase II y el 12,0% en Fase III. De los 28 pacientes que estaban en Fase I, la mayoría (85,7%) presentaban exclusivamente afectación cutánea. De los 67 pacientes que estaban en Fase II, el 95,5% presentaban clínica neurológica aislada o asociada a patología dermatológica y cardíaca. En la Fase III la clínica reumatológica sola o asociada (76,9%) fue la más frecuente.

El 67,6% de los enfermos de Lyme padecían neuroborreliosis. En el 52,1% de los casos los síntomas neurológicos fueron la única manifestación de la enfermedad y el resto, asociaba alteraciones cutáneas (24,7%), cardíacas (8,2%), articulares (6,8%) o una combinación de tres

o más de estas (8,2%). El 87,6% de los pacientes con clínica neurológica se encontraban en fase II, el 11% en fase III y sólo el 1,4% en fase I de la enfermedad.

La mayoría de los pacientes con neuroborreliosis padecían radiculitis (79,5%) siendo la zona lumbar la más afectada y asociaban frecuentemente meningitis de predominio linfocitario con hiperproteínorraquia y niveles de glucosa normales. El 11% presentaban meningorradiculoneuritis o Síndrome de Bannwart. En el 26% de los casos existía afectación de pares craneales, siendo la parálisis facial la neuropatía craneal predominante (84,4%) aunque también se vieron afectados el motor ocular común (5,2%), el motor ocular externo (5,2%) y el nervio vago (5,2%). Un paciente sufrió afectación simultánea del VI y VII par craneal. Todos los pacientes con parálisis facial a los que se realizó punción lumbar asociaban meningitis linfocitaria. En cuatro pacientes se detectó una polineuropatía sensitivomotora de tipo mixto sin un claro predominio axonal y únicamente en 2 pacientes se detectaron manifestaciones neurológicas tardías de la EL, como encefalopatía y mielitis.

Del total de enfermos con neuroborreliosis, el 86,3% fueron tratados con antibióticos (fundamentalmente ceftriaxona o doxiciclina), y evolucionaron hacia la curación completa en el 67% de los casos, se obtuvo una respuesta parcial en el 22% y no se observó mejoría en el 11%. El porcentaje de enfermos que alcanzó la curación completa tras el tratamiento con ceftriaxona (81,1%) fue superior al observado en los tratados oralmente con doxiciclina (62,5%). El 13,7% de los pacientes que no recibieron tratamiento antibiótico, permanecieron con secuelas en el 90% de los casos. Las secuelas observadas consistieron en dolor radicular residual en 7 casos, parestesias en 5, debilidad muscular en 3 y en 1 caso se resolvió la clínica neurológica pero persistió la artritis que asociaba. En el líquido cefalorraquídeo de un paciente con neuroborreliosis se identificó por PCR *B. garinii*.

En 51 pacientes (47,2%) se observaron manifestaciones cutáneas consistentes en eritema migrans (86,3%), eritema crónico migrans (11,7%) y acrodermatitis crónica atrófica (2%). No se identificó ningún caso de linfocitoma cutáneo. La mayoría de los enfermos estaban en Fase I (55%) y en menor proporción en Fase II (35%) y III (10%). En el 49% de los casos las lesiones cutáneas constituyeron la única manifestación de la enfermedad. El resto asociaban patología neurológica (35%), reumatológica (8%), cardíaca (4%), o incluso una combinación de tres o más sistemas afectados (4%) como corresponde a una enfermedad multisistémica. El EM se localizó preferente en las extremidades inferiores en los adultos. La mayoría de los pacientes respondieron adecuadamente al tratamiento antibiótico, especialmente a los que se les administró en Fase I (96,4%). Se observó una remisión completa de la EL en los tratados en Fase II (72,2%) y tan sólo el 20% de los tratados en Fase III. Se realizó una PCR sobre biopsia de piel con eritema crónico migrans en la que se identificó *B. afzelii*.

El 15,7% de los enfermos de Lyme presentaban clínica articular. De estos, el 64,7% presentaron artritis, el 29,4% artralgias y el 5,9% bursitis. La rodilla fue la articulación más afectada. La clínica articular se asoció frecuentemente a manifestaciones neurológicas, dermatológicas o cardíacas. La mayoría de los pacientes estaban en Fase III de la enfermedad. La mayoría de los pacientes respondieron adecuadamente al tratamiento antibiótico, aunque en algunos casos fue necesario asociar metotrexato y corticoides intrarticulares, a pesar de lo cual el 11,8% evolucionaron a una artritis crónica recidivante.

El 13,9% de los enfermos de Lyme tenían afectación cardíaca. La mayoría (86,7%) asociaban otro tipo de manifestación clínica y sólo dos padecían únicamente problemas cardíacos. En el momento del diagnóstico, la mayoría se encontraban en fase II y el 20% en fase III. La alteración del ritmo cardíaco fue la manifestación más frecuente (93%) y consistió en un bloqueo auriculoventricular, siendo de primer grado en la mitad, de segundo grado en el 35,7% y de tercer grado en el 14,3%. Solo se observó pericarditis en el 7% de los casos. El

87% de los pacientes recibieron tratamiento antibiótico y en su mayoría (70%) evolucionaron hacia la curación, mientras que el resto presentaron secuelas de tipo neurológico y/o cardíaco que no necesitaron la colocación de un marcapasos permanente.

Se identificaron 10 pacientes pediátricos con EL, lo que supone una tasa de incidencia media de 5,5 casos/100.000 habitantes/año. La clínica predominante fue la dermatológica (40%), seguida de la neurológica (30%) y la articular (10%); además, el 20% de los enfermos presentaron manifestaciones dermatológicas y neurológicas. La manifestación cutánea más frecuente fue el eritema migrans de localización en la mitad superior del cuerpo. La meningitis linfocitaria y la parálisis facial periférica constituyeron las manifestaciones neurológicas más frecuentes. Todos los pacientes evolucionaron favorablemente tras el tratamiento antibiótico, salvo el que presentó artritis de rodilla que evolucionó hacia una forma crónica recurrente. En el líquido articular de este paciente se identificó por PCR *B. garinii*.







7 BIBLIOGRAFÍA



7 BIBLIOGRAFIA

- Abele DC, Anders KH. The many faces and phases of borreliosis. Lyme disease. **J Am Acad Dermatol** 1990; 23: 167-186.
- Abul-Kasim, K. Neuroborreliosis with enhancement of the third, fifth, sixth and twelfth cranial nerves. **Acta Neurol Belg** 2010; 110: 215.
- Aeschlimann A, Chamot E, Gigon F, Jaenneret JP, Kessler D, Walther C. *B.burgdorferi* in Switzerland. **Zbl Bakt Hyg A** 1986; 263: 450-458.
- Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. **Clin Microbiol Rev** 2005; 18: 484-509.
- Aiyer A, Hennrijus W, Walrath J, Groh B, Ostrov B. Lyme arthritis of the pediatric lower extremity in the setting of polyarticular disease. **J Child Orthop** 2014; 8:359–65.
- Alcalde-Encinas E, Peñalver-González A, Rodríguez G, Tornel G. Utilidad diagnóstica de la serología a *B.burgdorferi* en Cartagena. **Rev Clin Esp** 2005; 210: 314.
- Alcande-Encinas MDM, Peñalver-González E Rodríguez-Pavía A, Tornel G. Utilidad diagnóstica de la serología a *B. burgdorferi* en Cartagena. **Rev Clin Esp** 2010; 314.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Rijpkema SGT, Schouls LM. Sexual transmission of *Borrelia garinii* by male *Ixodes persulcatus* ticks (Acari, Ixodidae). **Exp Appl Acarol** 1999; 23: 65-169.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Jushkova OV. **Influence of Anthropogenic Pressure on the System.** En: **Tick-tick-borne Pathogens.** Pensoft Pub, 2010.
- Alonso FD, Gomis J, Ruiz De Ybanez MR, Gutierrez A, Sierra J, Martinez-Carrasco C. Tick infestation on wild ruminants in the Sierra de Cazorla, Segura y Las Villas natural park, Spain. **Proceedings of the XII Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants**, 16–19 Septiembre 2004, Estambul, Turquía.
- Alonso M. Enfermedad de Lyme. ¿Es tan infrecuente? **Semergen** 2012; 38: 118-21.
- Alonso S, Márquez FJ, Solano-Gallego L. *Borrelia burgdorferi* serosurvey in wild deer in England and Wales. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2012; 12:448-55.
- Anda P, Rodríguez I, de la Loma A, Fernández MV, Lozano A. A serological survey and review of clinical Lyme borreliosis in Spain. **Clin Infect Dis** 1993; 16: 310-319.
- Anda P, Sánchez-Yebra W, Vitutia MM, Pérez E Rodríguez I, Miller NS, Backenson PB, Benach JL. A new *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever in Spain. **Lancet** 1996; 348: 162-165.
- Anderson JF, Barthold SW, Magnarelli, LA. Infectious but nonpathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. **J Clin Microbiol** 1990; 28: 2693-2699.
- Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. **Infect Dis Clin North Am** 2008; 22:195-215.
- Arapovic J, Skocibusic S, Grgic S, Nilolic J. The first evidencie of lyme neuroborreliosis in stouthern bosnia and Herzegovina. **Case Rep Infect Dis** 2014; 2014: 231969 doi 10.1155.
- Arteaga F, García-Moncó JC. Association of Lyme disease with work and leisure activities. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 1998; 16: 265-268.
- Asbrink E. Cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Clinical definitions and differential diagnosis. **Scand J Infect Dis Suppl** 1991; 77: 44-50.
- Asbrink E, Hovmark A. Classification, geographic variations, and epidemiology of Lyme borreliosis. **Clin Dermatol** 1993; 11: 353-357.

- Asensi JM, Martínez AM, Guerrero A, Asensi V, Escudero R, de la Iglesia P, Arribas JM. Epidemiologic study of Lyme disease in Asturias. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 1993; 11: 420-423.
- Barandika JF, Hurtado A, García-Sanmartín J, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2008; 8: 829-835.
- Barandika JF, Olmeda SA, Casado-Nistal MA, Hurtado A, Juste RA, Valcárcel F, Anda P, García-Pérez AL. Differences in questing ticks species distribution between atlantic and continental climate regions in Spain. *J Med Entomol* 2011; 48: 13-19.
- Barandika Iza, JF. **Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: Estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos.** Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco; 2012.
- Barandon G, Postic D, Saint-Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. **Int J Syst Bacteriol** 1992; 42: 378-383.
- Barbour AG, Maupin GO, Teltow GJ, Carter CJ, Piesman J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*. Possible agent of a Lyme disease-like illness. **J Infect Dis** 1986; 173: 403-409.
- Barbour MT, Gerritsen J, Griffith GE, Frydenborg R, McCarron E, White JS, Bastian ML. A framework for biological criteria for Florida streams using benthic macro invertebrates. **J N Am Benthol Soc** 1996; 15: 185-211.
- Barral M, García-Pérez AL, Juste RA, Fernández de Lucó D, Dehesa V. **Distribución y actividad de los ixodidos presentes en la vegetación de la Comunidad Autónoma Vasca.** Informes técnico nº 54. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. 1993:78.
- Barral M, García A, Juste R, Fernández de Lucó M D, Dehesa V. **Distribución y actividad de los ixodidos presentes en la vegetación de la Comunidad Autónoma Vasca.** Informes técnicos nº 54, Dpto. de Agricultura y Pesca, Dpto. de Sanidad del Gobierno Vasco, 1994: 65.
- Barral M, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A, Escudero R, Sellek RE, Anda P. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. **J Med Entomol** 2002; 39:177-184.
- Bauerfeind R, Kreis U, Weiss R, Wieler LH, Baljer G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction. **Zentralbl Bakteriol** 1998; 287: 347-361.
- Bumgarten BU, Röllinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. **J Clin Microbiol** 1999; 37: 3448-3451.
- Beceiro A, Zúñiga C, Guerrero A. Low incidence of Lyme's disease in Northwestern Galicia. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2001; 19:505.
- Berendse A, Oosting M, Kullberg BJ, Netea MG, Joosten LA. Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. **Eur Cytokine Netw** 2010; 21: 7-18.
- Bettridge J, Renard M, Zhao F, Bown KJ, Birtles RJ. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* populations across central Britain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2013; 13: 139-146.

- Bhattacharjee A, Oemig JS, Kolodziejczyk R, Meri T, Kajander T, Lehtinen MJ, Iwai H, Jokiranta S, Goldman A. Structural Basis for Complement Evasion by Lyme Disease Pathogen *Borrelia burgdorferi*. **J Biol Chem** **2013**; 288: 18685-18695.
- Bhide MR, Curlik J, Travnicek M, Lazar P. Protein A/G dependent ELISA a promising diagnostic tool in Lyme disease seroprevalence in game animals and hunting dogs. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** **2004**; 27:191-199.
- Bhide MR, Travnicek M, Levkutova M, Curlik J, Revajova V, Levkut M. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. **FEMS Immunol Med Microbiol** **2005**; 43: 165-172.
- Biesiada G, Czepiel J, Leśniak MR, Garlicki A, Mach T. Lyme disease: review. Chair of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases. **Arch Med Sci** **2012**; 6: 978-982.
- Bigi S, Aebi C, Nauer C, Bigler S, Steinlin M. Acute transverse myelitis in Lyme neuroborreliosis. **Infection** **2010**; 38: 413-416.
- Bockenstedt LK, Wormser GP. Unraveling Lyme Disease. **Arthritis Rheumatol** **2014**; 66: 2313-23.
- Boletín Epidemiológico de Galicia. A enfermidade de Lyme en Galicia: 2000-2013. **Boletín Epidemiológico de Galicia** **2014**; 26.
- Borowik T, Cornulier T, Jędrzejewska B. Environmental factors shaping ungulate abundances in Poland. **Acta Theriologica** **2013**; 58: 403-413.
- Bødker B, Kjølseth J, Møller, Jakob O. Season is an unreliable predictor of Lyme neuroborreliosis. **Dan Med J** **2015**; 62: A5084.
- Bremell D, Hagberg L. Clinical characteristics and cerebrospinal fluid parameters in patients with peripheral facial palsy caused by lyme neuroborreliosis compared with facial palsy of unknown origin (Bell's palsy). **BMC Infect Dis** **2011**; 11:215.
- Bremell D, Dotevall L. Oral doxycycline for Lyme neuroborreliosis with symptoms of encephalitis, myelitis, vasculitis or intracranial hypertension. **Eur J Neurol** **2014**; 21: 1162-1167.
- Brissette CA, Kees ED, Burke MM, Gaultney RA, Floden AM, Watt JA. The multifaceted responses of primary human astrocytes and brain microvascular endothelial cells to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **ASN Neuro** **2013**; 5: 221-229.
- Brouqui P, Bacellar F, Barandon G, Birtles RJ, Bjoérdsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M; ESCMID Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin Microbiol Infect** **2004**; 10: 1108-1132.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grundwaldt E, Davis JP. Lyme disease- a tick-borne spirochetosis? **Science** **1982**; 216:1317-1319.
- Burgess EC, Windberg LA. *Borrelia sp.* Infection in coyotes, black-tailed Jack rabbits and desert cottontails in southern Texas. **J Wildl Dis** 1989; 25: 47-51.
- Calvo C, Aguado I. Enfermedad de Lyme. Revista En Familia. <http://enfamilia.aeped.es/temas-salud/enfermedad-lyme#>. Acceso 4 Septiembre 2015.
- Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. **Scand J Infect Dis** **1993**; 25:441-448.

- Caride E. **Epidemiología de *Borrelia burgdorferi* sl (Enfermedad de Lyme) en un ecosistema de pinar de montaña supramediterráneo**. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid; 2002.
- Carpi G, Cagnacci F, Neterler M, Rizzoli A.(2008). Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. **Epidemiol Infect** **2008**; 136: 1416–1424.
- Carrasco I, Condom MJ, Sabria M, Pedro-Bonet ML. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in an área of Barcelona. **Enferm Infecc Microbiol Clin** **1992**; 10: 242.
- Casjens SR, Fraser-Liggett CM, Mongodin EF, Qiu WG, Dun JJ, Luft BJ, Schutzer SE. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. **J Bacteriol** **2011**; 193: 1489-1490.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) <http://wwwn.cdc.gov/nndss/script/casedef.aspx?CondYrID=752&DatePub=1/1/2011>). Acceso 12 Febrero 2015.
- Cisak E, Wójcik-Fatla A, Stojek N, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). **Ann Agric Environ Med** **2006**; 13: 301-6.
- Clover JR, Lane RS. Evidence implicating nymphal *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of Lyme disease in California. **Am J Trop Med Hyg** **1995**; 53 :237-240.
- Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Goncalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. **J Clin Microbiol** **2004**; 42: 1316-1318.
- Consellería do Medio Rural e do Mar. **Anuario de Estatística Agraria 2007**. Xunta de Galicia, 2012: 239.
- Correll MH, Datta N, Arvidsson HS, Melsom HA, Thielberg AK, Bjerager M, Brodsky MC, Saunte JP. Lyme borreliosis: a treatable cause of acute ocular motor disturbances in children. **Br J Ophthalmol** **2015**; 13 doi: 10.1136.
- Craine NG, Nuttall PA, Marriot AC, Randolph SE. Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato , the Lyme disease spirochaete, in the U.K. **Folia Parasitol** **1997**; 44: 155-160.
- Croche B, Sánchez A, Campos e, Toro C, Marcos L, Vargas JC, Tort T. Tick-borne relapsing fever in a rural área of southern Spain. **An Pediatr (Barc)** **2015**; 82: 73-77.
- Daikh BE, Emerson FE, Smith RP, Lucas L, McCarthy CA. Lyme arthritis: A comparison of presentation, synovial fluid analysis, and treatment course in children and adults. **Arthritis Care Res** **2013**; 65: 1986-90.
- Danielova V, Daniel M, Rudenko N, Golovchenko M. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in selected South Bohemian locations (Czech Republic). **Cent Eur J Public Health** **2004**; 12: 151-156.
- De la Fuente J, Kocan KM, Almazan C, Blouin EF. Targeting the tick-pathogen interface for novel control strategies. **Front Biosc** **2008**; 13: 6947-6956.
- De Silva AM, Fikrig E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. **Am J Trop Med Hyg** **1996**; 53: 397-404.
- Deanehan JK, Nigrovic PA, Milewski MD, Tan SP, Kimia AA, Smith BG. Synovial fluid findings in children with knee monoarthritis in Lyme disease endemic areas. **Pediatr Emerg Care** **2014**; 30:16-9.

- Dehnert M, Fingerle V, Klier C, Talaska T, Schlaud M, Krause G, Wilking H, Poggensee G. Seropositivity of Lyme borreliosis and associated risk factors: a population-based study in children and adolescents in Germany (KiGGS). **PLoS ONE** **2012**; **7**: e41321.
- Demet A, Haydar A, Elif C, Behceti M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. **New Microbiol** **2008**; **31**: 2013-209.
- Derdáková M, Lencakova D. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi sensu lato* with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. **Ann Agric Environ Med** **2005**; **12**: 165-172.
- Dersch R, Freitag MH, Schmidt SS, Sommer H, Rücker G, Rauer S, Meerpohl JJ. Efficacy and safety of pharmacological treatments for neuroborreliosis, protocol for a systematic review. **Syst Rev** **2014**; **3**:117.
- Dillon R, O'Connell S, Wright S. Lyme disease in the U.K.: clinical and laboratory features and response to treatment. **Clin Med** **2010**; **10**: 454-57.
- Dister SW, Fish D, Bros SM, Frank DH, Wood BL. Landscape characterization of peridomestic risk for Lyme disease using satellite imagery. **Am J Trop Med Hyg** **1997**; **57**:687-92.
- Djukic M, Schmidt-Samoa C, Lange P, Spreer A, Neubieser K, Eiffert H, Nau R, Schmidt H. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. **J Neurol** **2012**; **259**: 630-636.
- Doby JM, Betremieux C, Barrat J, Rolland C. Tick spirochetosis by *Borrelia burgdorferi* in wild carnivores in France. Results of serologic tests in 372 foxes. **Bull Soc Pathol Exot** **1991**; **84**: 46-53.
- Elliott DJ, Eppes SC, Klein JD. Teratogen update: Lyme disease. **Teratology** **2001**; **64**: 276-281.
- Erol I, Kılıçarslan B, Saygi S, Senay D, Alehan F. Acute Transverse Myelitis in a Child With Lyme Disease and a Review of Literature. **Pediatr Neurol** **2013**; **48**: 325-328.
- Escudero-Nieto R, Barral M, Pérez A, Vitutia MM, García-Pérez AL, Jiménez S, Sellek RE, Anda P. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates from Spain. **J Clin Microbiol** **2000**; **38**: 4026-4033.
- Escudero-Nieto R, Guerrero-Espejo A. Enfermedades producidas por *Borrelia*. **Enferm Infecc Microbiol Clin** **2005**; **23**:232-40.
- Esposito S, Baggi E, Villani A, Norbedo S, Pellegrini G, Bozzola E, Palumbo E, Bosis S, Nigro G, Garazzino S, Principi N. Management of paediatric Lyme disease in non-endemic and endemic areas: data from the registry of the Italian Society for pediatric infectious diseases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **2013a**; **32**: 523-529.
- Esposito S, Bosis S, Sabatini C, Tagliaferri L, Principi N. *Borrelia burgdorferi* infection and Lyme disease in children. **Int J Infect Dis** **2013b**; **17**:153-158.
- Estrada-Peña A. **Las garrapatas en España: introducción**. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar social, 1994: 1-86.
- Estrada-Peña A, Oteo JA, Estrada-Peña R, Gortazar C, Osácar JJ, Moreno JA, Castellá J. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks (*Acari: Ixodidae*) from two different foci in Spain. **Exp Appl Acarol** **1995**; **19**: 173-180.
- Estrada-Peña A. Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) in northern Spain. **J Med Entomol** **2001**; **38**: 361-70.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. **Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. A Guide to Identification of Species**. Universidad de Zaragoza, España. 2004: 43-131.

- Estrada-Peña A, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Gortázar C, de la Fuente J. Evidence of the importance of host habitat use in predicting the dilution. Effect of wild boar for deer exposure to *Anaplasma ssp.* **PLoS ONE** **2008**; 3: e2999.
- Estrada-Peña A, Ortega C, Sánchez N, DeSimone L, Sudre B, Suk JE, Semenza JC. Correlation of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks with Specific Abiotic Traits in the Western Palearctic. **Appl Environ Microbiol** **2011**; 77: 3838-3845.
- Estrada-Peña A, Ayllón N, De la Fuente J. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. **Front Physiol** **2012**; 3: 64.
- EUCALB. <http://medynio9.edis.at/eucalb/cms/index.php?lang=en>. Acceso 4 Septiembre 2015.
- Ewers EC, Dennison DH, Stagliano DR. A unique case of adolescent neuroborreliosis presenting with multiple cranial neuritis and cochlear inflammation on magnetic resonance imaging. **Pediatr Neurol** **2015**; 52:107-9.
- Fernández-Soto, P. **Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan**. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca; 2003.
- Forrester JD, Mead P. Third-Degree heart block associated with Lyme carditis: review of published cases. **Clin Infect Dis** **2014**; 59: 996-1000.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Doygherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Plamer N, Adams MC, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature** **1997**; 390:580-586.
- Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from *ixodid* ticks in Japan: rapid species indentification by 16S Rna gene-trageted PCR analysis. **Microbiol Immunol** **1996**; 40: 877-881.
- García-Meléndez ME, Skinner C, Salas JC, Ocampo J. Enfermedad de Lyme: actualizaciones. **Gac Méd Méx** **2014**; 150:84-95.
- García-Moncó JL, Benach JL, Coleman JL, Galbe JL, Szczepanski A, Fernández-Villar B, Norton CA, Johnson RC. Caracterización de una cepa española de *Borrelia burgdorferi*. **Med Clín** **1992**; 98: 89-93.
- García-Moncó JC. La borreliosis de Lyme simuladora y enigmática. **Med Clin** **2002**; 119: 693-694.
- Gassner F, Takken W, Plas CL, Kastelein P, Hoetmer AJ, Holdinga M, van Overbeek LS. Rodent species as natural reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in different habitats of *Ixodes ricinus* in The Netherlands. **Ticks Tick Borne Dis** **2013**; 4: 452-458.
- Geller J, Nazarova L, Katargina O, Golovljova I. *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in tick populations in Estonia. **Parasit Vectors** **2013**; 6: 202.
- Gern L, Siegenthaler M, Hu CM, Leuba-Garcia S, Humair PF, Moret J. *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. **Eur J Epidemiol** **1994**; 10: 75-80.
- Gern L, Humair PF. Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Wien Klin Wochenschr** **1998**; 110: 856-858.
- Gern L, Falco RC. Lyme disease. **Rev Sci Tech** **2000**; 19:121-135.

- Gern L. *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. **Parasite** 2008; 15: 244-247.
- Gern L, Humair PF. **Ecology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Europe In Lyme Borreliosis**. En: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G. (ed.). **Biology, Epidemiology and Control**. CABI Publishing, 2002: 149–174.
- Gerrikagoitia, X., 2010. **Los carnívoros silvestres como reservorios de enfermedades de interés en sanidad animal y salud pública**. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla – La Mancha; 2010.
- Gil H, Barral M, Escudero R, García-Pérez AL, Anda P. Identification of a New *Borrelia* Species among Small Mammals in Areas of Northern Spain Where Lyme Disease Is Endemic. **Appl Environ Microbiol** 2005; 71: 1336-1345.
- Gil-Collado J, Guillén-Llera JL, Zapatero-Ramos LM. Claves para la identificación de los *Ixodoidea* españoles (adultos). **Rev Iber Parasitol** 1979; 39:107-118.
- Girschick HJ, Morbach H, Tappe D. Treatment of Lyme borreliosis. **Arthritis Res Ther** 2009; 11: 1-10.
- Gissler S, Heininger U. *Borrelia lymphocytoma* (“lymphadenosis benigna cutis”). **Arch Dis Child** 2002; 87: 12.
- Glatz M, Resinger A, Semmelweis K, Ambros-Rudolph CM, Mullegger, RR. The clinical spectrum of skin manifestations of Lyme borreliosis en 204 children in Austria. **Acta Derm Venereol** 2015; 95:191-6.
- Glaude PD, Huber AM, Mailman T, Ramsey S, Lang B, Stringer E. Lyme arthritis: an emerging clinical problem in Nova Scotia, Canada. **Arthritis Rheumatol** 2014; 66: 115.
- Gómez-Puerta JA, García-Melchor E. Mujer joven con artritis intermitente. **Reumatol Clin** 2010; 6(1):58–62.
- Gordillo MG, Solórzano F. Lyme disease. Experience in Mexican children. **Bol Med Hosp Infant Mex** 67:164-76.
- Gray JS, Kahl O, Janetzki C, Stein J. Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in Country Galway, Ireland. **J Med Entomol** 1992; 29: 915-920.
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. **Interdiscip Perspect Infect Dis** 2009; 2009: 593232 doi: 10.1155.
- Guerrero A. Lyme borreliosis: diagnostic criteria. Lyme borreliosis study group. **Rev Clin Esp** 1995; 195: 3.
- Guerrero A. Borreliosis de Lyme en España. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2001; 19: 244-246.
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiol** 2000; 146: 1491-1504.
- Halperin JJ, Shapiro ED, Logigian E, Belman AL, Dotevall L, Wormse GP, Krupp L, Gronseth G, Bever CT. Practice parameter: treatment of nervous system Lyme disease (an evidence-based review). **Neurology** 2007; 69: 91-102.
- Halperin JJ. Nervous system Lyme disease: diagnosis and treatment. **Curr treat Options neurol** 2013; 15:454-464.
- Halperin JJ. Chronic Lyme disease: misconceptions and challenges for patient management. **Infect Drug Resist** 2015a; 8: 119-128.
- Halperin JJ. Nervous system Lyme disease. **Infect Dis Clin North Am** 2015b; 29: 241-253.
- Hasle G, Aksel G, Midthjell L, Hakon K, Leinaas H. Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds. **Ticks Tick Borne Dis** 2011; 2:37-43.

- Hasle G. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. **Front Cell Infect Microbiol** **2013**; 3: 48 doi: 10.3389.
- Hildenbrand P, Craven DE, Jones R, Nemeskal P. Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. **AJNR Am J Neuroradiol** **2009**; 30: 1079-1087.
- Hoogstraal, H. **Ticks**. En: S.M., Gaafar; W.E., Howard & R.E., Marsh (ed.). **Parasites, Pest and Predators**. Elsevier, Oxford & New York, 1985: 575.
- Hou J, Ling F, Chai C, Lu Y, Yu X, Lin J, Sun J, Chang Y, Ye X, Gu S, Pang W, Wang C, Zheng X, Jiang J, Chen Z, Gong Z. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks from eastern China. **Am J Trop Med Hyg** **2015**; 92: 262-266.
- Hu L. **Treatment of Lyme disease**. En: Post TW (ed). **UpToDate**. <http://www.uptodate.com/contents/lyme-disease-symptoms-and-diagnosis-beyond-the-basics#H17>. Acceso 4 Septiembre 2015.
- Hubálek Z., Juřincová Z., Svobodová S., Halouska J. A serological survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. **J Wildlife Dis** **1993**; 29:604-607.
- Humair PF, Peter O, Wallich R, Gern L. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. **J Med Entomol** **1995**; 32: 433-438.
- Humair PF, Gern L. Relationship between *Borrelia burgdorferi sensu lato*, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. **Acta Trop** **1998**; 69: 213-227.
- Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **1999**; 18: 697-703.
- Huppertz, H.I.; Bartmann, P.; Heininger, U.; Fingerle V, Kinet M, Klein R, Korenke GC, Nentwich HJ. Rational diagnostic strategies for lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. **Eur J Pediatr** **2012**; 171:1619-24.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). <http://www.ine.es>. Acceso 12 Febrero 2015.
- Isogai E, Isogai H, Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y, Kimura K, Sakai T, Azuma Y, Fujii N, Ohno S. Lyme disease spirochetes in a wild fox (*Vulpes vulpes schrencki*) and in ticks. **J Wildl Dis** **1994a**; 30: 439-444.
- Isogai E, Kamewaka Y, Isogai H, Kimura K, Fujii N, Nishikawa T. Complement-mediated killing of *Borrelia garinii* – bactericidal activity of wild deer serum. **Microbiol Immunol** **1994b**; 38; 753-756.
- Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, Cabello J, Cabello C, Daniels TJ, Godfery HP, Cabello FC. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. **Environ Microbiol** **2014**; 16: 1069-1080.
- James MC, Bowman AS, Forbes KJ, Lewis F, McLeod JE, Gilbert L. Environmental determinants of *Ixodes ricinus* ticks and the incidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme borreliosis, in Scotland. **Parasitology** **2013**; 140: 237-246.
- James MC, Gilbert L, Bowman AS, Forbes KJ. The heterogeneity, distribution, and environmental associations of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the agent of Lyme borreliosis, in Scotland. **Front Public Health** **2014**; 2: 129 doi: 10.3389.
- Jassam YN, Thaler DE. Lyme meningo-radiculitis responsive to oral doxycycline therapy in the USA. **OMCR** **2014**; 12: 1-2.

- Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Monteil H, Sibilia J, Piémont Y. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in synovial samples from patients with Lyme arthritis. **J. Clin. Microbiol** **2000**; 38:1895–9000.
- Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG, Aakre RK, Strand L, Kleveland EJ, van de Pol I, Schouls L. *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia spp.* in *Ixodes* ticks from southern Norway. **J Clin Microbiol** **2001**; 39: 3666-3671.
- Jensen PM, Hansen H, Frandsen F. Spatial risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. **Scand J Infect Dis** **2000**; 32:545-50.
- Jouda F, Perret JL, Gern L. Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. **Vector Borne Zoonocit Dis** **2004**; 4: 23-32.
- Junta de Castilla y León. **Prevención y control de las antropozoonosis transmitidas por garrapatas**. Consejería de Sanidad y Bienestar Social, 1995. Pp: 48.
- Kampen H, Rötzel DC, Kurtenbach K, Maier WA, Seitz HM. Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. **Appl Environ Microbiol** **2004**; 70: 1576-1582.
- Kamradt T. Lyme disease and current aspects of immunization. **Arthritis Res** **2002**; 4: 20-29.
- Karmacharya P, Raj MA. Heart stopping tick. **Wold J Cardiol** **2013**; 5: 148-150.
- Kawata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica sp.nov.* isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. **Microbiol Immunol** **1993**; 37:843-848.
- Kindler W, Wolf H, Their K, Oberndorfer S. Peripheral facial palsy as an initial symptom of Lyme neuroborreliosis in an Austrian endemic area. **Wien Klin Wochenschr** **2015**; 10 doi 10.1007.
- Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genospecies in *Ixodes* ticks in Ireland. **Eur J Epidemiolo** **1997**; 13:67-72.
- Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in Southern Norway. **Acta Vet Scand** **2010**; 52: 59.
- Kjelland V, Ytrehus B, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks collected from moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in southern Norway. **Ticks Tick Borne Dis** **2011**; 2: 99-103.
- Kowalski TJ, Tata S, Berth W, Mathiason MA, Agger WA. Antibiotic treatment duration and long-term outcomes of patients with early Lyme disease from a Lyme disease-hyperendemic area. **Clin Infect Dis** **2010**; 50: 512-520.
- Kubiak K, Dzika E, Rowiak J, Dziedziech M, Dzisko J. Seroprevalence of Lyme disease and genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients diagnosed with borreliosis in the Province of Warmia-Masuria in north-eastern Poland. **Ann Agric Environ Med** **2012**; 19:203-7.
- Kurian M, Mendes V, Vargas MI, Fluss J. Stroke-like phenomena revealing multifocal cerebral vasculitis in pediatric Lyme neuroborreliosis. **J Child Neurol** **2015**; 30: 1226-1229.
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Raudolph SE. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by game, birds and small rodents en England. **Appl Environ Microbiol** **1998**; 64: 1169-1174.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczky P. Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the key role of host complement. **Trends Microbiol** **2002**; 10: 74-79.

- Lantos PM. Lyme disease vaccination: are we ready to try again?. **Lancet Infect Dis** 2013; 13: 643-644.
- Lacombe E, Rand PW, Smith RP. Disparity of *Borrelia burgdorferi* infection rates of adult *Ixodes dammini* on deer and vegetation. **J Infect Dis** 1993; 167: 1236-1238.
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **Int J Syst Bacteriol** 1997; 47: 921-925.
- Lebech AM. Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. **APMIS Suppl** 2002; 105: 1-40.
- Letrilliart L, Ragon B, Hanslik T, Flahault A. Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. **Epidemiol Infect** 2005; 133: 935-942.
- Levin M, Levine JF, Yang S, Howard P, Apperson CS. Reservoir competence of the southeastern five-lined skink (*Eumeces inexpectatus*) and the green anole (*Anolis carolinensis*) for *Borrelia burgdorferi*. **Am J Trop Med Hyg** 1996; 54: 92-97.
- Linard C, Lamarque P, Heyman P, Ducoffre G, Luyasu V, Tersago K, Vanwambeke SO, Lambiu EF. Determinants of the geographic distribution of Puumala virus and Lyme borreliosis infections in Belgium. **Int J Health Geographics** 2007; 6: 15.
- Lopes de Carvalho I, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, Nuncio MS. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. **Clin Rheumatol** 2008; 27:1587-1591
- López-Alberola RF. Neuroborreliosis and the pediatric population: a review. **Rev Neurol** 2006; 42: 91-96.
- López-Prieto MD, Borobio MV. Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en la población de Sevilla. **Enf Inf Microbiol Clin** 1989; 7: 498-490.
- Lledó L, Gegúndez MI, Giménez C, Álamo R, Fenández P, Nuncio MS, Vivente J. A seventeen-year epidemiological surveillance study of *Borrelia burgdorferi* infections in two provinces of northern Spain. **Int J Environ Res Public Health** 2014; 11:1661-1672.
- Maetzel D, Maier WA, Kampen H. *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*) in urban and suburban Bonn, western Germany. **Parasitol Res** 2005; 95: 5-12.
- Magnarelli L, Anderson JF. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. **J Clin Microbiol** 1988;26:1482-1486.
- Mäkinen J, Vuorinen I, Oksi J, Peltomaa M, He Q, Marjamäki M, Viljanen MK. Prevalence of granulocytic Ehrlichia and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from Southwestern Finland and from Vormsi Island in Estonia. **APMIS** 2003; 11: 355-362.
- Manincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. **Parasitology** 2003; 126: 11-20.
- Mannelli A, Boggiatto G, Grego E, Cinco M, Murgia R, Stefanelli S, De Meneghi D, Rosati S. Acarological risk of exposure to agents of tick-borne zoonoses in the first recognized Italian focus of Lyme borreliosis. **Epidemiol Infect** 2003; 131: 1139-1147.
- Maraspin V, Ruzic-Sablje E, Strle, F. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. **Emerg Infect Dis** 2006; 12: 1177.
- Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers

- in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **J Clin Microbiol** **1995**; 33: 2427-2434.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. **Appl Environ Microbiol** **2009**; 75: 5410-5416.
- Margos G, Hojgaard A, Lane RS, Cornet M, Fingerle V, Rudenko N, Ogden N, Aanensen DM, Fish D, Piesman J. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissetti* strains from North America reveals a new *Borrelia* species *Borrelia Kurtenbachii*. **Ticks tick Borne Dis** **2010**; 1: 151-158.
- Marques AR. Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. **Infect Dis Clin North Am** **2015**; 29: 295-307.
- Márquez-Jiménez FJ, Hidalgo-Pontiveros A, Contreras-Chova F, Rodríguez-Liébana JJ, Muniain-Ezcurra MA. Ticks (*Acarina: Ixodidae*) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain. **Enferm Infect Microbiol Clin** **2005**; 23: 94-102.
- Martínez A, Asensi JM, Iglesia R. Seroprevalence against *B. burgdorferi*. **Clin Microbiol Infect Dis** **1993**; 342: 127.
- Martínez AR, Cordero del Campillo M. **El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores**. En: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA (ed.). **Parasitología Veterinaria**. McGraw-Hill, Interamericana, 1999: 22-38.
- Masuzawa T, Yanagihara Y, Fujita H. A case of Lyme borreliosis which was suspected to be caused by *Borrelia japonica* infection in Shizuoka, Japan. **Kansenshogaku Zasshi** **1996**; 70: 264-267.
- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T. *Borrelia sinica* sp. Nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. **Int J Syst Evol Microbiol** **2001**; 51: 1817-1824.
- Matera G, Labate A, Quirino A, Angelo G, Lamberti AG, Borzì G, Barreca GS, Mumoli L, Peronace C, Giancotti A, Gambardella A, Focàl A, Quattrone A. (2014). Chronic neuroborreliosis by *B. garinii*: an unusual case presenting with epilepsy and multifocal brain MRI lesions. **New Microbiol** **2014**; 37: 393-397.
- Mather TN, Wilson ML, Moore SI, Ribeiro JM, Spielman A. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). **Am J Epidemiol** **1989**; 130: 143-50.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Richter D, Spielman A. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. **J Infect Dis** **1992**; 165: 479-483.
- Matuschka FR, Spielman A. Risk of infection from and treatment of tick bite. **Lancet** **1993**; 342: 529-530.
- Matuschka FR, Eiffert H, Ohlenbusch A, Spielman A. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. **J Infect Dis** **1994**; 170: 122-127.
- Medlock J, Hansford K, Bormane A, Derdakiva M, Estrada-Peña A, George JC, Golovljova I, Jaenso T, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo J, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph S, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. **Parasit Vectors** **2013**; 6: 1-11.
- Melis C, Jedrzejewska B, Apollonio M, Bartón KA, Jedrzejewski W, Linnell JDC, Kojola I, Kusak J, Ademic M, Ciuti S, Delehan I, Dykyy I, Krapinec K, Mattioli L, Sagaydak A, Samchuk N, Schmidt K, Shkvyrya M, Sidroovich VE, Zawadzka B, Zhyka S. Predation has a greater impact in less productive environments: variation in roe deer,

- Capreolus capreolus* population density across Europe. **Glob Ecol Biogeogr** **2009**; **18**: 724-734.
- MeteoGalicia.<http://www2.meteogalicia.es/galego/observacion/estacions/listaEstacions.asp>. Acceso 12 Febrero 2015.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino: Población y Sociedad rural. http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/Agrinfo12_tcm7-161562.pdf. Acceso 12 Febrero 2015.
- Miró G, Montoya A, Roura X, Gálvez R, Sainz A. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicenter study. **Parasit Vectors** **2013**; **6**: 117.
- Moestrup P, Hansen H, Frandsen F. Spatial risk assessment for Lyme Borreliosis in Denmark. **Scand J Infect Dis** **2000**; **32**: 545-550.
- Moniuszko A, Dunaj J, Zajkowska J, Czupryna P, Świerzbńska R, Guziejko K, Aleksiejczuk P, Barry G, Kondrusik M, Pancewicz S. Comparison of detection of *Borrelia burgdorferi* DNA and anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in patients with erythema migrans in north-eastern Poland. **Postepy Dermatol Alergol** **2015**; **32**: 11-4.
- Mygland A, Ljøstad U, Fingerled V, Rupprechte T, Schmutzhard E, Steinerg I. (2010). EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. **Eur J Neurol** **2010**; **17**: 8-16.
- Muderloh UG, Kurtti TJ. The ABCs of Lyme disease spirochaetes in ticks. **Lancet** **2005**; **366**: 962-964.
- Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, Falco RC, Freeman K, McKenna D, Welch P, Marcus R, Agüero-Rosenfeld ME, Dennis DT, Wormser GP. Prophylaxis with Single-Dose Doxycycline for the prevention of Lyme Disease after an *Ixodes scapularis* Tick Bite. **N Engl J Med** **2001**; **345**:79-94.
- Nadelman RB. Erythema migrans. **Infect Dis Clin N Am** **2015**; **29**: 211-232.
- Nau R, Christen HJ, Eiffert H. Lyme disease: current state of knowledge. **Dtsch Arztebl Int** **2009**; **106**: 72-81.
- Navarro AE. **Borreliosis de Lyme: estudio de posibles vectores ixódidos y evaluación de métodos de diagnóstico microbiológico**. Tesis doctoral. Universidad de Valencia; 2005.
- Nimmrich S, Becker I, Horneff G. Intraarticular corticosteroids in refractory childhood Lyme arthritis. **Rheumatol Int** **2014**; **34**:987-94.
- Olmo FJ, Sojo J, Peñas C, Muniain MA. Infecciones producidas por borrelias: enfermedad de Lyme y fiebre recurrente. **Medicine** **2014**; **11**: 3009-3017.
- Oteiza-Olaso J, Tiberio-López G, Martínez de Artola V, Belzunegui-Otano T. Seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en Navarra. **Med Clin (Barc)** **2011**; **136**: 336-339.
- Oteo-Revuelta JA, Martínez de Artola V, Casas JM, Estrada-Peña A. Enfermedad de Lyme en la Rioja. **Med Clin** **1991**; **96**: 599.
- Oteo-Revuelta JA, Backenson PB, Vitutia MM, García-Moncó JC, Rodríguez I, Escudero R, Anda P. Use of the C3H/He Lyme disease mouse model for the recovery of a Spanish isolate of *Borrelia garinii* from erythema migrans lesions. **Res Microbiol** **1998a**; **149**: 39-46.
- Oteo-Revuelta JA, Guerrero A. A proposal to define the endemic zone of Lyme borreliosis. **Med Clin (Barc)** **1998b**; **110**: 438.
- Oteo-Revuelta JA, Blanco JR, Martínez de Artola V, Grandival R, Ibarra V, Dopereiro R. Eritema migratorio (borreliosis de Lyme). Características clínicoepidemiológicas de 50 pacientes. **Rev Clin Espa** **2000**; **200**: 60-63.

- Pachner A, Zan W, Schaefer H, Schaefer S, O'Neil T. Detection of active infection in Nonhuman primates with Lyme neuroborreliosis: comparison of PCR, culture, and bioassay. **Clin Microbiol** 1998; 35: 47.
- Pachner AR, Steiner I. Lyme neuroborreliosis: infection, immunity, and inflammation. **Lancet Neurol** 2007; 6: 544-552.
- Palomar AM, Santibáñez P, Mazuelas D, Roncero L, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. **Emerg Infect Dis** 2012; 18: 1188-1191.
- Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clin Microbiol Infect** 2001; 7:80-3.
- Pato FJ, Panadero R, Vázquez L, López CM, Díaz P, Vázquez E, Díez-Baños P, Morrondo P, Fernández G. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Northwestern Spain. **J Zoo Wildl Med** 2013; 44: 660-665.
- Pazos A, Matesanz M, Rubal D, Iñiguez I, Rabuñal R, Monte R. Enfermedad de Lyme en el área sanitaria de Lugo. **Galicia Clínica** 2010; 71: 7-14.
- Pereyra J, Bernabeu J, Cañas E, Conejo J. Mácula eritematosa lentamente progresiva. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2011; 29: 68-9.
- Perronne, C. Lyme and associated tick-borne diseases: global challenges in the context of a public health threat. **Front Cell Infect Microbiol** 2014; 4:1-6.
- Per J, Hansen H, Frandsen F. Spatial risk assessment for Lyme Borreliosis in Denmark. **Scand J Infect Dis** 2000; 32: 545-550.
- Pérez A, Fernández RI, Arbesu E, Santos PM. Enfermedad de Lyme: a propósito de dos casos. **Rev Pediatr Aten Primaria** 2013; 15: 105-109.
- Pérez D, Kneubühler Y, Rais O, Gern L. Seasonality of *Ixodes ricinus* ticks on vegetation and on rodents and *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies diversity in two Lyme borreliosis-endemic areas in Switzerland. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2012; 12: 633-644.
- Pérez-Eid C. **Les tiques: identification biologie importance medicinale et veterinaire.** Lavoisier 2007.
- Picazo JJ, Fuertes A. **DSC Protocolos Clínicos de Diagnóstico Serológico Comentado 1999.** <http://coli.usal.es/web/abydl/biblioteca/bibelectro.alu/documentos/protocolos3/lyme/lyme.html#diaglab>.
- Pichon B, Mousson H, Figureau C, Rodhain F, Pérez-Eid C. Density of deer in relation to the prevalence of *Borrelia burgdorferi s.l.* in *Ixodes ricinus* nymphs in Rambouillet FOREST, France. **Exp Appl Acarol** 1999; 23: 267-275.
- Pichon B, Gilot B, Pérez-Eid C. Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. **Eur J Epidemiol** 2000; 16: 869-873.
- Picken MM, Picken RN, Han D, Cheng Y, Strle F. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 1996; 15:489-498.
- Piesman J. Dispersal of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari, Ixodidae). **J Med Entomol** 1995; 32:519-521.
- Pinto DS. Cardiac manifestations of Lyme disease. **Med Clin North Am** 2002; 86: 285-296.
- Portillo A, Santibáñez S, Oteo JA. Enfermedad de Lyme. **Enferm Infecc Microbiol. Clin** 2014; 32: 37-42.

- Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissetti* sp. nov. (formerly *Borrelia groyp* DN 127). **J Clin Microbiol** **1998**; 36: 3497-3504.
- Postic D, Garnier M, Baranton G. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. **Int J Med Microbiol** **2007**; 297: 263-271.
- Purser JE, Norris SJ. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. **Proc Natl Acad Sci USA** **2000**; 97: 13865-13870.
- Qin H, Zhen G, Xue H, Zhen T, Xiu J, Wei J, Yan S, Zhi Z, Guo L, De Shan Y, Hua W, Jian X, Kang W. Seroepidemiological investigation of Lyme disease and human granulocytic anaplasmosis among people living in forest areas of eight provinces in China. **Biomed Environ Sci** **2013**; 26: 185-189.
- Quessada T, Martial-Convert F, Arnaud S, Leudet De La Vallee H, Gilot B, Pichot J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* species and identification of *Borrelia valaisiana* in questing *Ixodes ricinus* in the Lyon region of France as determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Eur J Microbiol Infect Dis** **2003**; 22: 165-173.
- Radzijeuskaja J, Paulauskas A, Rosef O, Petkevičius S, Mažeika V, Rekašius T. The propensity of voles and mice to transmit *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection to feeding ticks. **Vet Parasitol** **2013**; 18: 318-325.
- Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitol Today** **1996**; 12, 472-479.
- Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes* ticks in Europe: a metaanalysis. **Appl Environ Microbiol** **2005**; 71: 7203-7216.
- Remesar-Alonso, S. **Identificación molecular de Borrelia en garrapatas procedentes de corzos de Galicia**. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Santiago de Compostela; 2015.
- Richter D, Postic D, Sertour N, Livey I, Matuschka FR, Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia Spielmanii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol** **2006**; 56: 873-881.
- Richter D, Schröder B, Hartmann NK, Matuschka FR. 2013. Spatial stratification of various Lyme disease spirochetes in a Central European site. **FEMS Microbiol Ecol** **2013**; 83:738-44.
- Rijpkema SG, Herbes RG, Verbeek-De Kruif N, Schellekens JF. Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. **Epidemiol Infect** **1996**; 117: 563-566.
- Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF. Detection of *Borrelia Afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia Garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with eritema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. **Clin Microbiol Infect** **1997**; 3:109-116.
- Rizzoli A, Rosà R, Mantelli B, Pecchioli E, Hauffe H, Tagliapietra V, Beninati T, Neteler M, Genchi C. *Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs. **Parassitologia** **2004**; 46: 119-122.
- Rizzoli A, Hauffe HC, Carpi G, Vourc'h GI, Neteler M, Rosà R. Lyme borreliosis in Europe. **Euro Surveill** **2011**; 16: 1-8.

- Robinson ML, Kobayashi T, Higgins Y, Calkins H, Melia MT. Lyme carditis. *Infect Dis Clin North Am* **2015**; 29: 255-268.
- Roca, B. Borreliosis de Lyme. *Med. Clin. (Barc)* **2006**; 127: 265-8.
- Rodhain F. Transmission vectorielle: aspects actuels des recherches et perspectives. *Bull de l'Institut Pasteur* **1985**; 83: 221-243.
- Rodriguez-González I. Update on *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Lyme disease. *Rev Med Cub Trop* **2013**; 65: 149-165.
- Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Vet Scand* **2009**; 51: 47.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. *Borrelia corolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. *J Clin Microbiol* **2009a**; 47:134-141.
- Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato Complex, *Borrelia Americana* sp. nov. *J Clin Microbiol* **2009b**; 47: 3875-3880.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* **2011**; 2: 123–128.
- Ruiz-Fons F, Fernández de Mera IG, Acevedo P, Gortázar C, de la Fuente J. Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Appl Environ Microbiol* **2012**; 78: 2669-2676.
- Ryskova O, Vyslouzil L, Honegr K, Lesna J, Horacek J, Skrabkova Z. Lyme borreliosis, incidence of serum anti-myelin antibodies. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **2002**; 51: 60-65.
- Scharlemann JPW, Johnson PJ, Smith AA, Macdonald DW, Randolph SE. Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Med Vet Entomol* **2008**; 22: 238-47.
- Scheffold N, Herkommer B, Kandolf R, May AE. Lyme carditis: diagnosis, treatment and prognosis. *Dtsch Arztebl Int* **2015**; 112: 202-208.
- Schoen RT. A case revealing the natural history of untreated Lyme disease. *Nat Rev Rheumatol* **2011**; 7:179–84.
- Schwarz A, Hönig V, Vavrušková Z, Grubhoffer L, Balczun C, Albring A, Schaub GA. Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasit Vectors* **2012**; 5: 268 doi: 10.1186.
- Segura, F, Diestre, G, Sanfeliu, I, Cardeñosa N. Seroprevalencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* en el área del Vallés Occidental (Barcelona). *Med Clin (Barc)* **2004**; 123: 395-397.
- Semmel D, Blank R, Rupprecht HJ. Complete AV block in Lyme carditis: an important differential diagnosis. *Clin Res Cardiol* **2010**; 99: 519-526.
- Shenthar J, Bhujanga S, Krishnamurthy D. Diagnosis not to be missed: Lyme carditis, rare but reversible cause of complete atrioventricular block. *Indian Heart J* **2014**; 66:723-726.
- Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. *New Engl J Med* **1998**; 23: 216-222.
- Silva L, Sampaio L, Pinto J, Ventura FS. Arthritis and clinical history. *Acta Med Port* **2011**; 2: 629-32.

- Silberer M, Koszik F, Stingl G, Aberer E. Downregulation of class II molecules on epidermal Langerhans cells in Lyme borreliosis. **Br J Dermatol** 2000; 143: 786-794.
- Skarphedinsson S, Jensen PM, Kristiansen K. Survey of tick-borne infections in Denmark. **Emerg Infect Dis** 2005; 11:1055-1061.
- Skinner CM, Flores MS, Colunga IJ, Salinas K, Garza MA. Enfermedad de Lyme. **Medicina Universitaria** 2007; 9: 24-32.
- Skogman BH, Ekerfelt C, Ludvigsson J, Forsberg P. Seroprevalence of *Borrelia* IgG antibodies among young Swedish children in relation to reported tick bites, symptoms and previous treatment for Lyme borreliosis: a population-based survey. **Arch Dis Child** 2010; 95: 1013-1016.
- Skogman BH, Hellberg S, Ekerfelt C, Jenmalm MC, Forsberg P, Ludvigsson J, Forsberg P. Adaptive and innate immune responsiveness to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in exposed asymptomatic children and children with previous clinical Lyme Borreliosis. **Clin Dev Immunol** 2012; 294587 doi: 10.1155.
- Skotarczak B, Adamska M, Sawczuk M, Maciejewska A, Wodecka B, Rymaszewska A. Coexistence of tick-borne pathogens in game animals and ticks in western Poland. **Vet Med** 2008; 53: 668–675.
- Soleng A, Kjelland V. *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Brønnøysund in northern Norway. **Ticks Tick Borne Dis** 2013; 4: 218-221.
- Sordet CH. Chronic Lyme disease: Fact or fiction?. **Joint Bone Spine** 2014; 81:110–11.
- Sprong H, Hofhuis A, Gassner F, Takken W, Facobs F, van Vliet A, van Ballegooijen M, van der Giessen J, Takumi K. Circumstantial evidence for an increase in the total number and activity of *Borrelia*-infected *Ixodes ricinus* in the Netherlands. **Parasit Vectors** 2012; 5: 294-305.
- Stączak J, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Lozowska W, Kur J. Detection of three genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in different regions of Poland. **Int J Med Microbiol** 2000; 290: 559-566.
- Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. **The Lancet** 2003; 362: 1639-1647.
- Stanek, G, Strle F. Lyme disease: European perspective. **Infect Dis Clin North Am** 2008; 22:327-39.
- Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. **Clin Microbiol Infect** 2011 a; 17:69-79.
- Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia complex*, clinical significance of genomic species?. **Clin Microbiol Infect** 2011 b; 17: 487-493.
- Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. **Lancet** 2012; 379: 461-73.
- Steere, AC. Musculoskeletal manifestations of Lyme disease. **Am J Med** 1995; 24: 44-51.
- Steere AC. Lyme disease. **N Engl J Med** 2001; 345: 115-125.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. **J Clin Invest** 2004; 113: 1093-1011.
- Strle F, Wormser GP, Mead P, Dhaduvai K, Longo MV, Adenikinju O, Soman S, Tefera Y, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Ogrinc K, Cimperman J, Ružić-Sabljić E, Stupica D. Gender Disparity between Cutaneous and Non-Cutaneous Manifestations of Lyme Borreliosis. **PLoS One** 2013; 8: e64110.
- Stromdahl EY, Williamson PC, Kollars TM, Evans SR, Barry RK, Vince MA, Dobbs NA. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **J Clin Microbiol** 2003; 41:5557-5562.

- Suárez C, García V, Díaz E, López P, Pérez C. Enfermedad de Lyme en pediatría: distintas caras, una misma enfermedad. Serie de casos. **Arch Argent Pediatr** 2015; 113: e164-e167.
- Sultan SZ, Manne A, Stewart PE, Bestor A, Rosa PA, Charon NW, Motaleb MA. Motility is crucial for the infectious life cycle of *Borrelia burgdorferi*. **Infect Immun** 2013; 81: 2012-2021.
- Szekeres S, Coipan EC, Rigo K, Majoros G, Jahfari S, Sprong H, Folduári G. Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. **Parasit Vectors** 2015; 8: 309.
- Tamayo L, García-Moncó JC, Bratos MA, Orduña A, Ortiz de Lejarazu R, Rodríguez-Torres A. Anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en un grupo de población de Valladolid. **Enf Inf Microbiol Clin** 1990; 8: 661-664.
- Talleklint L, Jaenson TG. Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. **J Med Entomol** 1993; 30: 273-276.
- Travnicek M, Stefancikova A, Nadzamova D, Stanko M, Cisláková L, Pet'ko B, Mardzinová S, Bhide M. Immunoglobulin G antibodies to *Borrelia burgdorferi* in game animals and small mammals in eastern Slovakia. **Rev Sci Tech** 2003; 22: 1035-1041.
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcárcel F, Casado-Nistal MA, Rodríguez-Vargas M, Gil H, Anda P. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. **Am J Trop Med Hyg** 2009; 81: 67-74.
- Tomao P, Ciceroni L, D'Ovidio MC, De Rosa M, Vonesch N, Iavicoli S, Signorini S, Ciarrocchi S, Ciufolini MG, Fiorentini C, Papaleo B. Prevalence and incidence for antibodies to *Borrelia burgdorferi* and to tick-borne encephalitis virus in agricultural and forestry workers from Tuscany, Italy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2005; 24: 457-463.
- Tveten AK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia valaisiana* in *Ixodes ricinus* ticks from the northwest of Norway. **Scand J Infect Dis** 2013; 45: 581-687.
- Twizeyimana E, Pichard E, Lunel-Fabiani F, Fanello S, De Martino SJ. Impact of serodiagnosis on the management of Lyme borreliosis at Angers University Hospital. **Med Maladies Infect** 2014; 44:429-432.
- Uría DF, Calatayud M, Mongelos JM, Miguel MD, Cobos A, Suárez T. Meningopolineuritis como manifestación de la enfermedad de Lyme. **Med Clin (Barc)** 1987; 89: 381-383.
- Uruñuela J, Díaz D. Eritema crónico migrans. **Actas Dermosifiliogr** 1997; 68: 109-110.
- Vandenesch A, Turbelin C, Couturier E, Arena C, Jaulhac B, Ferquel E, Choumet V, Saugeon C, Coffinieres E, Blanchon T, Vaillant V, Hanslik T. Incidence and hospitalization rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. **Euro Surveill** 2014; 19: pii: 20883.
- Vázquez L, Panadero R, Dacal V, Pato FJ, López C, Díaz P, Arias MS, Fernández G, Díez-Baños P, Morrondo P. Tick infestation (Acari: Ixodidae) in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain: population dynamics and risk stratification. **Exp Appl Acarol** 2011; 53: 399-409.
- Vázquez-López ME, Pego-Reigosa R, Díez-Morrondo C, Castro-Gago M, Díaz P, Fernández G, Morrondo P. Epidemiología de la enfermedad de Lyme en un área sanitaria del Noroeste de España. **Gac Sanit** 2015; 29: 213-216.
- Verma V, Roman M, Shah D, Zaretskaya M, Yassin MH. A case of chronic progressive lyme encephalitis as a manifestation of late lyme neuroborreliosis. **Infect Dis Rep** 2014; 6: 51-54.

- Vor T, Kiffner C, Hagedorn P, Niedrig M, Rühle F. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). **Exp Appl Acarol** **2010**; 51:405-417.
- Wagemakers A, Staarink PJ, Sprong H, Hovius JW. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. **Trends Parasitol** **2015**; 31: 260-269.
- Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM. **Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species**. Bioscience Reports 2003. Pp: 221.
- Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Barandon G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M199). **Int J Syst Bacteriol** **1997**; 47: 926-932.
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. **Clin Microbiol Rev** **1999**; 12: 633-653.
- Wang E, Liveris D, Mukherjee P, Jungnick S, Margos G, Schwartz I. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi*. **Curr Protc Microbiol** **2014a**; 34: 12.
- Wang E, Shirvalkar PR, Maciel CB, Merkler AE, Safdieh J, Gupta A. American neuroborreliosis presenting as cranial polyneuritis and radiculoneuritis. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm** **2014b**; 4:1-2.
- Weber K. Erythema chroricum migrans meningitis, a bacterial infectious disease?. **Munch Med Wochenschr** **1974**; 116: 1993-1998.
- Weber K. Aspects of Lyme borreliosis in Europe. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **2001**; 20: 6-13.
- Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, De Boer A, De Vries A, Dimmers W, Op Jagers GA, Schouls LM, Borgsteede F, Van der Giessen JWB. Longitudinal Analysis of Tick Densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* Infections of *Ixodes ricinus* Ticks in Different Habitat Areas in The Netherlands. **Appl Environ Microbiol** **2006**; 72: 7594-7601.
- Wilking H, Stark K. Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009-2012. **Tick Tick-borne Dis** **2014**; 5: 219-224.
- Wormser GP, Dattwyler RJ, Shjapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Disease Society of America. **Clin Infect Dis** **2006**; 43:1089-1134.
- Wormser GP, Halperin JJ. Toward a better understanding of European Lyme neuroborreliosis. **CID** **2013**; 57: 1-3.
- Wressnigg N, Pöllabauer EM, Aichinger G, Portsmouth D, Löw-Baselli A, Fritsch S, Livey I, Crowe BA, Schwendinger M, Brühl P, Pilz A, Dvorak T, Singer J, Firth C, Luft B, Schmitt B, Zeitlinger M, Müller M, Kollaritsch H, Paulke-Korinek M, Esen M, Kremsner PG, Ehrlich HJ, Barrett PN. Safety and immunogenicity of a novel multivalent OspA vaccine against Lyme borreliosis in healthy adults: a double-blind, randomised, dose-escalation phase 1/2 trial. **Lancet Infect Dis** **2013**; 13: 680-689.
- Zimering JH, Williams MR, Eiras ME, Fallon BA, Logigian EL, Dworkin RH. Acute and chronic pain associated with Lyme borreliosis: Clinical characteristics and pathophysiologic mechanisms. **PAIN** **2014**;155: 1435-1438.



ANEXO I



Número de estudio

Edad:

Sexo:

Ayuntamiento de residencia:

Hábitat:

Rural

Urbano

Exposición a picadura de garrapata:

No

Si

Recuerda picadura de garrapata:

No

Si

Mes del año

Lugar del cuerpo

Eritema migrans

No

Si

Mes del año

Lugar del cuerpo

Duración

Otras lesiones cutáneas

No

Si

Cuales

Manifestaciones cardiológicas

No

Si

Mes del año

Cuales



Manifestaciones reumatológicas

No

Si Mes del año Cuales

Afectación del Sistema Nervioso Periférico

No

Si Mes del año Cual

Afectación del Sistema Nervioso Central

No

Si Mes del año Cual

Hemograma con leucocitosis

No

Si Desviación izquierda No Si

Elevación de reactantes de fase aguda

No

Si PCR PCT

Bioquímica en LCR

No

Si (Fecha) Glucosa Proteínas Leucocitos Li PMN

Bioquímica Líquido Articular

No

Si (Fecha) Glucosa Proteínas Leucocitos PMN Li

Serología a *Borrelia* por ELISA en suero

Negativa

Positiva Fecha



Serología a *Borrelia* por ELISA en LCR

Negativo

Positiva Fecha

Serología a *Borrelia* por Western Blot en suero

Negativo

Positivo Ig M Ig G Fecha

Serología a *Borrelia* por Western Blot en LCR

Negativo

Positivo Ig M Ig G Fecha

Detección de *Borrelia* por PCR en: sangre Líquido Sinovial LCR

Negativo

Positivo

Genoespecie de *Borrelia*

Fecha

Fármaco de elección para el tratamiento

Vía de administración

Oral No

Si Días

Intramuscular No

Si Días

Endovenoso No

Si Días

Uso de un fármaco alternativo



Vía de administración

Oral No

Si

Días

Intramuscular No

Si

Días

Endovenoso No

Si

Días

Evolución favorable

Si

No

Secuelas

