UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Diagnóstico y prevalencia de la enfermedad de Lyme en el suroccidente asturiano

Lucía Barreiro Hurlé

2020

Universidad de Oviedo

Departamento Bioquímica y Biología Molecular

Programa Biología Molecular y Celular

Diagnóstico y prevalencia de la enfermedad de Lyme en el suroccidente asturiano

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Lucía Barreiro Hurlé

Oviedo, 2020

Universidad de Oviedo

Departamento Bioquímica y Biología Molecular
Programa Biología Molecular y Celular

Tesis Doctoral

Diagnóstico y prevalencia de la enfermedad de Lyme en el suroccidente asturiano

Diagnosis and prevalence of Lyme disease in the southwest of Asturias

Autor: Lucía Barreiro Hurlé

Directores: Dra. Mercedes Rodríguez Pérez

Dr. Santiago Melón García

Oviedo, 2020

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2019 / 2020

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: BARREIRO HURLE	Nombre: LUCIA	
DNI/Pasaporte/NIE: 05409491Y	Teléfono: 630441085	Correo electrónico: tandeslucia@hotmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR	
Órgano responsable: UNIVERSIDAD DE OVIEDO	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Diagnóstico y prevalencia de la enfermedad de Lyme en el suroccidente asturiano.	Inglés: Diagnosis and prevalence of Lyme disease in the southwest of Asturias.
Rama de conocimiento: CIENCIAS DE LA SALUD	

3.- Autorización del Director/es y Tutor de la tesis	
D/Dª: MERCEDES RODRIGUEZ PEREZ	DNI/Pasaporte/NIE: 09365308F
Departamento/Instituto: SERVICIO DE MICROBIOLOGIA/ HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS	
D/Dª: SANTIAGO MELON GARCIA	DNI/Pasaporte/NIE: 11066309C
Departamento/Instituto/Institución: SERVICIO DE MICROBIOLOGIA/ HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS	
Autorización del Tutor de la tesis	
D/Dª: BEATRIZ CABALLERO GARCÍA	DNI/Pasaporte/NIE: 71878391X
Departamento/Instituto: MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR/UNIVERSIDAD DE OVIEDO	

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el Art. 32 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Oviedo, 21 de febrero de 2020

Director/es de la Tesis
Dra. Mercedes Rodríguez Pérez
Dr. Santiago Melón García

Fdo.:

Tutor de la Tesis
Dra. Beatriz Caballero García

Fdo.:

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR

FOR-MAT-VOA-009 (Reg.2018)

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESOLUCIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2019 / 2020

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Barreiro Hurlé	Nombre: Lucía	
DNI/Pasaporte/NIE: 05409491Y	Teléfono: 630441085	Correo electrónico: tandeslucia@hotmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: Bioquímica y Biología Molecular	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Diagnóstico y prevalencia de la enfermedad de Lyme en el suroccidente asturiano	Inglés: Diagnosis and prevalence of Lyme disease in the southwest of Asturias
Rama de conocimiento: Ciencias de la salud	
Señale si procede: ☐ Mención Internacional ☐ Idioma de presentación de la Tesis distinto al español ☐ Presentación como compendio de publicaciones	

3.- Autorización del Presidente de la Comisión Académica	
D/Dª: Pedro Sánchez Lazo	DNI/Pasaporte/NIE: 75308736C
Departamento/Instituto: Bioquímica y Biología Molecular	

Resolución: La Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biología Moelcular y Celular, en su reunión de fecha 19 de febrero de 2020 , acordó la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, previa comprobación de que la tesis presentada y la documentación que la acompaña cumplen con la normativa vigente, según lo establecido en el Art.32.8 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Además, informa:

	Favorable	Desfavorable
• Mención Internacional	☐	☐
• Idioma	☐	☐
• Presentación como compendio de publicaciones	☐	☐

FOR-MAT-VOA-012 (Reg. 2018)

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Justificación

Oviedo, 19 de febrero de 2020

Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado

Fdo.: Pedro Sánchez Lazo

Contra la presente Resolución, podrá interponer recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la presente notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

SR.DIRECTOR DEL CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO

FOR-MAT-VOA-012 (Reg. 2018)

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Diagnóstico y prevalencia de la enfermedad de Lyme en el suroccidente asturiano.	Inglés: Diagnosis and prevalence of Lyme disease in the southwest of Asturias.

2.- Autor	
Nombre: Lucía Barreiro Hurlé	DNI/Pasaporte/NIE: 05409491Y
Programa de Doctorado: Biología molecular y celular	
Órgano responsable: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo.	

RESUMEN (en español)

La enfermedad de Lyme (EL) está causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l). Es la infección transmitida por garrapatas más frecuente en regiones templadas del hemisferio Norte. El suroccidente asturiano es una comarca que reúne las condiciones medioambientales y climatológicas propicias para el desarrollo del vector y se considera una zona endémica de la enfermedad con un elevado número de casos. La tesis se diseñó para conocer la situación de EL en el suroccidente de Asturias, mediante el estudio de la población afectada y las manifestaciones clínicas que presenta, junto con la distribución del vector y la presencia de *Borrelia burgdorferi* s.l en él. Además, se planteó optimizar su diagnóstico con el desarrollo de una nueva técnica basada en la detección genómica que permita complementar los resultados de las pruebas de detección de anticuerpos empleadas hoy en día en los laboratorios de microbiología clínica. Este proyecto se realizó en un periodo de tres años comprendidos entre 2013 y 2016.

Se elaboró un estudio de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en 1432 personas pertenecientes al área Sanitaria II del Principado de Asturias, clasificadas en tres grupos: donantes de sangre, personas con patología no relacionada con la EL y personas que tenían solicitada una serología de *B. burgdorferi* s.l como parte del diagnóstico diferencial de su enfermedad. La seroprevalencia global obtenida fue del 13,2%, obteniendo valores de 5,1%, 14,4% y 16,2% en cada uno de los grupos. En 1183 pacientes se realizaron ensayos de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l de los que 36 cumplieron criterios de EL. La manifestación clínica más frecuente encontrada fue la afectación dermatológica (2,04%), seguida de la afectación neurológica (0,51%) y articular (0,51%). En el laboratorio se diseñó una técnica de amplificación genómica a tiempo real (PCR-tr) que fue capaz de detectar la

FOR-MAT-VOA-010 (Reg.2018)

presencia de *B. burgdorferi* s.l de manera rápida y sencilla. Se clasificaron 899 garrapatas recolectadas de la vegetación y 183 recolectadas de individuos. El tipo de garrapata más frecuente encontrado pertenecía al género *Ixodes* (90,85%), seguido de *Dermacentor* (6,28%), *Rhipicephalus* (2,13%) y *Haemaphysalis* (0,74%). La distribución fue similar en los dos escenarios estudiados. Se detectó *B. burgdorferi* s.l en un 13,84% de estos ejemplares.

En 195 de las garrapatas se estudió la presencia de *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum. Rickettsia* spp se encontró en un 6,66% de los ejemplares y *Anaplasma phagocytophilum en* un 1,02%.

El conjunto de resultados obtenidos permiten alcanzar un amplio conocimiento de la EL en la zona, demuestran la importancia de la misma y aportan datos para ayudar a mejorar su diagnóstico y prevenir su expansión.

RESUMEN (en Inglés)

Lyme disease (LD) is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l). It is the most common reported tick-borne infection in the temperate zones of the Northern Hemisphere. The south-western region of Asturias is characterized by environmental and climatic conditions that favour the development of the vector and it is therefore considered endemic presenting with a high number of cases of infection. The thesis was designed to gain a deeper understanding of LD in southwestern Asturias through the study of those affected by the disease and the clinical manifestations thereof. In addition it examined the distribution of the vector and whether it presents with *Borrelia burgdorferi* s.l. In order to optimize diagnosis, the development of a new technique based on genomic detection complemented the results of antibody detection tests currently used by clinical microbiology laboratories. This project was carried out over a period of three years between 2013 and 2016.

An antibody study against *B. burgdorferi s.l* was initiated in 1432 people belonging to the Health Area II of the Principado de Asturias. They were classified into three groups: blood donors, people who sought a consultation not related to LD, and people who had requested a serology of *B. burgdorferi s.l.* as part of a differential diagnosis. The overall seroprevalence obtained was 13,2%, with values of 5,1%, 14,4% and 16,2% in each of the respective groups. In 1183 patients antibody tests were undertaken against *B. burgdorferi s.l* of which 36 met the diagnostic criteria for LD. The most frequent clinical manifestation found was that

of dermatological involvement (2,04%), followed by neurological (0,51%) and joint involvement (0,51%). A real-time genomic amplification technique (PCR-tr) was designed and developed in the laboratory that was able to detect the presence of *B. burgdorferi s.l.* quickly and easily. A total of eight hundred ninety nine ticks collected from vegetation, and 183 collected from individuals, were classified. The most frequent type of tick found belonged to the genus *Ixodes* (90,85%), followed by *Dermacentor* (6,28%), *Rhipicephalus* (2,13%) and *Haemaphysalis* (0,74%). The distribution was similar in the two scenarios studied. *B. burgdorferi s.l.* in 13.84% of these specimens.

In 195 of ticks, the presence of *Rickettsia* spp and *Anaplasma phagocytophilum* was studied. Rickettsia spp was found in 6,66% of the specimens and *Anaplasma phagocytophilum* in 1,02%.

The set of results obtained significantly deepens the understanding of Lyme disease in the area, demonstrates the impact of the disease, and provides data to help improve its diagnosis and support efforts to prevent further expansion of the disease.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

“Lo importante es no tener arrugas en el cerebro”

Margarita Salas

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Mercedes Rodríguez Pérez y al Dr. Santiago Melón García darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección. Gracias por regalarme su tiempo, por compartir su conocimiento y por su inmensa paciencia.

Agradecer y recordar a mis maestros de la Microbiología, mis compañeros del Laboratorio de Microbiología del antiguo Centro Materno Infantil. Cada día tengo más claro que de todos y cada uno de ellos conseguí aprender algo.

Al personal y a los pacientes del área sanitaria II del Principado de Asturias que participaron en este trabajo. En especial, a mis compañeras del Laboratorio de Microbiología y a Gely, a Vevi, a Luisa, a Olga y a Toni. A este último agradecerle su participación activa ayudándome con la informática, un gran compañero que jamás dijo no cuando solicité su ayuda.

A los trabajadores del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias, que me permitieron trabajar allí como uno más y me prestaron su apoyo en todo momento. Particular mención para Ana Palacio, Marta Elena y José Antonio Boga, su ayuda desinteresada no tiene precio.

A Ana Coto, tutora, que realizó el seguimiento del trabajo con enorme entusiasmo.

A los miembros del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias por su colaboración en el estudio de Seroprevalencia.

A mis compañeras de Doctorado, a Ana Morilla, a Zulema y a Xana, por su ayuda y por esos buenos y no tan buenos momentos compartidos que no se olvidan.

A mis amigas y compañeras, a Laura, a Maribel, a María José y a Paula.

A mi familia y amigos. Ellos siempre me apoyaron, compartieron mis ánimos y entendieron mis ausencias. José y Benito, campeones en la captura de garrapatas. Chita, Pepito, Julia y mis tías, que bien me aguantaron. Jesús, aburriéndome a consejos. Sofie Bosma, por sus traducciones de los textos. Jesús Feito, por su corrección de estilo. Marcos, por sus peines para los geles. A José Ramón Puerto, creador de la portada.

Aunque no es tarea fácil, espero no haber olvidado mencionar a nadie. Si ello ocurriera pido disculpas.

Sinceramente, muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 27

1.1 La enfermedad de Lyme: historia y epidemiología 29

1.2 El agente etiológico: *Borrelia burgdorferi* 30

1.3 El vector y la transmisión del agente etiológico 33

1.4 Características clínicas de la enfermedad de Lyme 36

1.5 Prevención y tratamiento 40

1.6 Diagnóstico de laboratorio 43

1.6.1 Examen directo 44

1.6.2 Cultivo 44

1.6.3 Detección de anticuerpos específicos 45

1.6.4 Detección genómica 47

1.6.5 Otras técnicas diagnósticas 48

1.7 Descripción de la zona de estudio 49

2. OBJETIVOS 51

3. MATERIAL Y MÉTODOS 55

3.1 Pacientes y muestras 57

3.1.1 Estudio de seroprevalencia 57

3.1.2 Estudio de la enfermedad 58

3.1.3 Obtención de las muestras de los pacientes 60

3.2 Muestras del vector 60

3.3 Recolección y clasificación de las garrapatas 61

3.4 Detección de anticuerpos específicos 62

3.5 Estudio genómico de *B. burgdorferi* s.l 64

3.5.1 Extracción de material genómico 64

3.5.2 Detección de *B.burgdorferi* s.l 65

3.5.3 Caracterización de *B. burgdorferi* s.l. Secuenciación 70

3.6 Detección de otros patógenos en las garrapatas 72

3.7 Análisis estadístico 73

3.8 Evaluación del comité ético de investigación clínica 73

3.9 Anexos..... 74

4. RESULTADOS 77

4.1 Estudio de prevalencia de la enfermedad de Lyme 79

4.2 Enfermedad de Lyme en el área sanitaria II 82

4.2.1 Enfermedad de Lyme con presentación clínica dermatológica..... 86

4.2.2 Enfermedad de Lyme con presentación clínica articular 89

4.2.3 Enfermedad de Lyme con presentación clínica neurológica 90

4.2.4 Estacionalidad de la enfermedad de Lyme 91

4.3 Estudio del vector 93

4.3.1 Caracterización de los ectoparásitos y distribución geográfica 93

4.3.2 Episodios de retirada de garrapatas en pacientes 95

4.4 Evaluación y aplicación de la amplificación genómica a tiempo real 97

4.4.1 Verificación de la técnica 97

4.4.2 Aplicación en muestras de pacientes.....101

4.4.3 Detección de *B. burgdorferi* s.l en garrapatas 101

4.4.4 Caracterización de las genoespecies de *B. burgdorferi* s.l. 103

4.5 Presencia de otros patógenos en el vector.....106

5. DISCUSIÓN 109

6. CONCLUSIONES 131

7. BIBLIOGRAFÍA 135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genoespecies de *B. burgdorferi* s.l agrupadas según su procedencia. 31
Tabla 2. Recomendaciones de tratamiento de la enfermedad de Lyme. 43
Tabla 3. Distribución de los grupos de población estudiados 57
Tabla 4. Distribución de los pacientes 58
Tabla 5. Definición de caso de borreliosis de Lyme. 59
Tabla 6. Esquema de interpretación de resultados de la inmunotransferencia. 63
Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos y proporciones de los componentes de la PCR..... 66
Tabla 8. Condiciones de la amplificación genómica. 66
Tabla 9. Oligonucleótidos para la detección de *B. burgdorferi* s.l. 68
Tabla 10. Perfil térmico de PCR-rt. 68
Tabla 11. Componentes y condiciones de la PCR previa a la secuenciación. 70
Tabla 12. Mezcla y condiciones de reacción para la secuenciación. 71
Tabla 13. Secuencias de oligonucleotidos utilizados en la PCR..... 73
Tabla 14. Tasa de individuos con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l 80
Tabla 15. Resultados de la población del grupo 3 en función del factor de riesgo..... 81
Tabla 16. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con anticuerpos 83
Tabla 17. Casos de enfermedad de Lymes en distintos grupos de edad. 85
Tabla 18.Características clínico-epidemiológicas de pacientes con clínica dermatológica. 86
Tabla 19. Características clínico-epidemiológicas de pacientes con clínica articular. 89
Tabla 20. Pacientes con anticuerpos frente a *B.burgdorferi* s.l en suero y LCR. 90
Tabla 21. Características clínico-epidemiológicas de pacientes con clínica neurológica..... 91
Tabla 22. Casos de enfermedad deLyme y manifestaciones clínicas 91
Tabla 23. Clasificación de las garrapatas recolectadas y concejo de procedencia. 93
Tabla 24. Clasificación y origen de las garrapatas recolectadas en el estudio. 94
Tabla 25. Concordancia de las amplificaciones genómicas. 98
Tabla 26. Microorganismos ensayados para el estudio de especificidad. 99
Tabla 27. Relación de reacciones de amplificación genómica: lectura en gel y con sonda.... 99
Tabla 28. Diluciones del control de genoma de *B .burgdorferi*. 100
Tabla 29. Detección de *B. burgdorferi* en las garrapatas recolectadas de la vegetación. 102
Tabla 30. Detección de *B. burgdorferi* en las garrapatas retiradas de personas. 103
Tabla 31. Genoespecies secuenciadas de *B.burgdorferi* s.l.....104
Tabla 32. Presencia de *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum* en el vector 106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Borrelia burgdorferi*, microscopía de campo oscuro 31
Figura 2. Ciclo vital de *Ixodes* … 35
Figura 3**.** Garrapata anclada en la piel de un paciente.. 36
Figura 4. Eritema migratorio..... 37
Figura 5. Etapas y manifestaciones de la Enfermedad de Lyme. 40
Figura 6. Diagnóstico en 2 etapas de enfermedad de Lyme. 46
Figura 7. Mapa del Principado de Asturias y detalle del Area sanitaria II..... 49
Figura 8. Imagen de un ensayo de inmunotrasferencia. 63
Figura 9. Método de extracción de la garrapata del paciente. 61
Figura 10. Imágenes de garrapatas en distinta etapa de desarrollo.. 61
Figura 11. Gel de agarosa con bandas de 491 pb. 67
Figura 12. Gel de agarosa con bandas de 380 pb. 71
Figura 13. Pacientes con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l 79
Figura 14. Presencia de anticuerpos en los grupos de pacientes según sexo. 80
Figura 15. Pacientes con factor de riesgo y anticuerpos frente a *B. burgdorferi* 83
Figura 16. Casos de enfermedad de Lyme y tipo de manifestación clínica..... 84
Figura 17. Distribución de la Enfermedad de Lyme según el sexo y la edad. 85
Figura 18. Eritema migratorio en pierna y en glúteo.. 87
Figura 19. Distribución de los individuos según sus manifestaciones dermatológicas..... 87
Figura 20. Distribución de tasa de pacientes con manifestaciones dermatológicas. 88
Figura 21. Pacientes con enfermedad de Lyme en las diferentes estaciones..... 92
Figura 22. Manifestaciones de la enfermedad de Lyme..... 92
Figura 23. Garrapatas recolectadas. *Rhipicephalus* sp, *Ixodes* sp, *Dermacentor* sp. 93
Figura 24. Tipo y distribución geográfica de las garrapatas..... 94
Figura 25. Tipo de garrapatas según género y estado evolutivo. 95
Figura 26. Localización anatómica de donde fue retirada la garrapata..... 96
Figura 27. Genoespecies de *B.burgdorferi* s.l relacionadas con los oligonucleótidos. 97
Figura 28. Diluciones de los controles para construir la curva estándar. 100
Figura 29. Curva estándar con las diluciones de la bacteria. 101
Figura 30. Tipo de garrapatas portadoras de *B. burgdorferi* según su procedencia.....103
Figura 31. Esquema filogenético de las especies encontradas de *B. burgdorferi* 105
Figura 32. Presencia de patógenos en las garrapatas estudiadas.....107

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
ACA	Acrodermatitis crónica atrófica
AEL	Ausencia de enfermedad de Lyme
CDC	Centro para el control y la prevención de las enfermedades
CNM	Centro Nacional de Microbiología
Ctx	Ceftriaxona
DEET	N,N,-dietil-metatoluamida
Dox	Doxiciclina
DS	Desviación estándar
EL	Enfermedad de Lyme
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)
EM	Eritema migratorio
FR	Factor de riesgo
FRO	Factor de riesgo ocupacional
ha	Hectárea
HCSO	Hospital Carmen y Severo Ochoa
IFA	Immunofluorescence assay (ensayo de inmunofluorescencia)
ISCIII	Instituto de Salud Carlos III
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NBL	Neuroborreliosis
Osp	Outer surface protein (lipoproteínas externas de superficie)
pb	Pares de bases
PCR-tr	PCR tiempo real
PG	Picadura de garrapata
rpm	revoluciones por minuto
s.l	sensu lato
s.s	sensu stricto
TAE	Tris-ácido acético- EDTA
VSG	Velocidad de sedimentación globular

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Lyme: historia y epidemiología

La enfermedad de Lyme se describió en 1977 a raíz de una serie de casos epidémicos de artritis a orillas del río Connecticut, en las localidades de Old Lyme, Lyme y East Haddam. Ya en aquel momento se pensaba que podía estar en relación con la picadura de garrapata [1]. Esta artritis se consideró una de las posibles manifestaciones incluida en una enfermedad multisistémica que se conocía con anterioridad en Europa bajo otras denominaciones como eritema crónico migratorio, síndrome de Bannwarth o acrodermatitis crónica atrófica. Finalmente adoptó el nombre de enfermedad de Lyme la cual podía afectar a diferentes tejidos u órganos, no solo a las articulaciones [2].

En 1982 se aisló una espiroqueta del intestino de las garrapatas. Recibió el nombre de *Borrelia burgdorferi* en honor a su descubridor Willy Burgdorfer [3]. Este mismo microorganismo fue aislado de muestras clínicas de pacientes que presentaban características clínicas propias de la enfermedad de Lyme [4].

En el hombre, la enfermedad está producida por un grupo relacionado de espiroquetas del género *Borrelia*, denominado *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l).

La enfermedad de Lyme es transmitida por picadura de garrapata y se presenta principalmente en zonas templadas del hemisferio Norte. Se encuentra ampliamente distribuida y es la enfermedad por picadura de garrapata más común en Europa y en Estados Unidos [5].

Así pues, la enfermedad está condicionada por la presencia de las garrapatas. Su distribución se relaciona con los hábitats donde éstas se localizan, esencialmente ambientes rurales o relacionados con el campo. Existen una serie de factores de riesgo relacionados con esta enfermedad entre los que se incluye el desarrollo de actividades ocupacionales y/o de recreo en zonas donde la garrapata está presente [6].

En Estados Unidos, donde la enfermedad es de declaración obligatoria desde 1991, el número estimado de casos supera los 300.000 al año [7].

En Europa, la incidencia de la enfermedad es desconocida y es difícil estimar los datos porque solamente es de declaración obligatoria en determinados países. Las tasas de incidencia por país varían de menos de uno a 632 casos por 100 000 habitantes año [8]. En los últimos años se constata un claro aumento sobretodo de oeste a este, con las mayores tasas de incidencia en Europa Central. España es el país que presenta la segunda incidencia más

baja de Europa con 0.06 casos por 100 000 habitantes año en el año 2010. Muestra un incremento anual entre el 5% y 15% en la incidencia. En el año 2015 en la provincia de Lugo se registran 11,6 casos por 100 000 habitantes/año [8,9].

1.2 El agente etiológico: *Borrelia burgdorferi*

Las bacterias del género *Borrelia* pertenecen a la familia Spirochaetaceae, orden Spirochaetales [10]. El género comprende 37 especies con capacidad de producir patogenicidad en aves y mamíferos, entre los que se incluye el hombre. Estos microorganismos se transmiten por artrópodo vector, característica que lo diferencia de otros géneros de la familia [11].

Dentro del género se distinguen dos grupos de microorganismos según la patología que producen: los agentes causantes de la enfermedad de Lyme, conocidos como complejo *Borrelia burgdorferi* s.l y el grupo compuesto por los agentes responsables de las fiebres recurrentes. En función de marcadores moleculares específicos y los distintos perfiles de patogenicidad de las diferentes especies de *Borrelia* spp, el género se ha dividido recientemente en dos géneros: uno nuevo, *Borreliella* gen. nov., que engloba los microorganismos responsables de la enfermedad de Lyme y otro que mantiene la nomenclatura que ya existía, *Borrelia*, que contiene los agentes causantes de las fiebres recurrentes [12].

B. burgdorferi s.l está compuesto al menos por 20 genoespecies aisladas de vertebrados y garrapatas. Catorce especies están incluidas en el nuevo género *Borreliella* [12]. Aunque esta nueva división en dos géneros diferentes no está del todo aclarada y aún existe controversia y discusión sobre el tema [12–15].

En el hombre no todas las genoespecies son patógenas. Sólo un pequeño número de ellas ha sido aislado de muestras humanas. En Europa y Asia, las genoespecies que afectan al hombre, son principalmente *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* y *B. garinii*. Es esta última, la genoespecie predominante en Asia y la única, hasta el momento, aislada en España [16,17]. Por otro lado en Europa, genoespecies como *B. bavariensis y B. spielmanii* también son capaces de causar enfermedad, mientras que *B. bissetti*, *B. lusitaniae*, y *B. valaisiana* parecen tener menos importancia clínica ya que han sido aisladas esporádicamente en muestras de pacientes [16].

En América del Norte, estaba descrita *B. burgdorferi* s.s como único patógeno humano, pero recientemente otras genoespecies, *B. americana, B. andersoni* y *B. mayonii* han sido relacionadas con la enfermedad [18–20].

En la Tabla 1 se recogen las distintas genoespecies conjunto *B. burgdorferi* s.l.

Tabla 1. Genoespecies de *B. burgdorferi* s.l agrupadas según su procedencia.

EUROPA	ASIA	NORTE AMERICA
B. afzelii *[a]	*B. afzelii* [a]	*B. americana* [a]
B .bavariensis *[a]	*B. bavariensis* [a]	*B. andersonii*
B. bissetti *	*B. bissettii* [a]	*B. bissettii* [a]
B. burgdorferi s.s *[a]	*B. garinii* [a]	*B. burgdorferi* s.s [a]
B. filandensis	*B. japonica* [a]	*B. californiensis*
B .garinii *	*B. sinica* [a]	*B. carolinensis* [a]
B. kurtenbachii [a]	*B. tanukii* [a]	*B. kurtenbachii* [a]
B. spielmanii *[a]	*B. turdi*	*B. mayonii*
B. lusitaniae *[a]	*B. valaisiana*	
B. turdi	*B. yangtze*	
B. valaisiana *[a]		

*Especies que producen enfermedad de Lyme en Europa; [a] Especies propuestas para el nuevo género *Borreliella.*

Las espiroquetas del género *Borrelia* son bacterias largas y delgadas (Figura 1). Presentan forma espiral y una gran motilidad gracias a un número variable de flagelos. Su estructura está basada en un cilindro protoplasmático rodeado de un periplasma, donde se insertan los flagelos, y una membrana externa.

Figura 1. *Borrelia burgdorferi*, microscopía de campo oscuro [21].

Los miembros del complejo de *B. burgdorferi* s.l son parásitos obligados, tienen una capacidad metabólica limitada y dependen mayoritariamente de los huéspedes para su soporte nutricional, porque por si solos no pueden llevar a cabo la síntesis de los componentes necesarios para su supervivencia.

La estructura genómica es compleja, altamente segmentada y de pequeño tamaño. Está compuesta por un cromosoma lineal y 21 plásmidos, 9 lineales y 12 circulares de diferentes tamaños.

Los genes codificados en el cromosoma son similares a los encontrados en otras bacterias, sin embargo, gran parte de los genes codificados en los plásmidos parecen ser propios del género *Borrelia*.

En el cromosoma están codificados transportadores de membrana que facilitan el aporte de los componentes necesarios para su desarrollo. También está codificada la flagelina (p41) o Fla B que le facilita su entrada en el hospedador, su diseminación y la penetración en los tejidos, así como la posibilidad de movilidad en medios viscosos como es el líquido articular.

Un importante número de los genes que se encuentran en los plásmidos, codifican un grupo de lipoproteínas externas de superficie denominadas Osp (outer surface protein). Estas lipoproteínas son esenciales para establecer el ciclo zoonótico. Permiten a la espiroqueta mantenerse en su vector o en su hospedador mediante cambios de expresión. Así, cuando las espiroquetas se encuentran dentro de la garrapata expresan Osp A, lipoproteína que permite su supervivencia y adhesión en el intestino. Cuando la garrapata alcanza al vertebrado para alimentarse, al llegar la sangre al intestino, las espiroquetas van a desplazarse hacia las glándulas salivares y se va a producir un cambio de expresión: dejan de expresar Osp A y comienzan a expresar Osp C. Esta lipoproteína Osp C va a facilitar la invasión a través de la piel y dejará de expresarse al poco tiempo para evadir la muerte mediada por anticuerpos. Al mismo tiempo, la proteína VIsE (proteína de superficie de membrana) se empezará a expresar reemplazando las funciones de Osp C durante la infección tardía. La espiroqueta consigue también su permanencia en el hospedador mediante variaciones antigénicas de VIsE [22].

El cromosoma lineal no presenta variaciones considerables entre las distintas genoesepcies de *B. burgdorferi*, mientras que en los plásmidos están descritas variaciones notables que pueden ser una de las causas más importantes de las diferencias que existen en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme en las distintas regiones geográficas [23].

1.3 El vector y la transmisión del agente etiológico

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados que se encuentran distribuidos a nivel mundial. Pertenecen al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, clase Aracnida, subclase Acari, orden Acarina, suborden Ixodida (Metastigmata) y familias Argasidae (garrapatas blandas), Ixodidae (garrapatas duras) y Nutellidae. El grupo incluye alrededor de 820 especies, divididas entre las tres familias [24].

En el hombre, la mayor repercusión clínica la tienen las garrapatas de la familia Ixodidae que contiene agentes transmisores de diferentes enfermedades bacterianas, víricas y parasitarias [25].

Existe un gran número de especies dentro de la familia Ixodidae, clasificadas en 12 géneros. Todos ellos poseen cuatro estados evolutivos: huevo, larva, ninfa y adulto.

Las larvas son de pequeño tamaño que se diferencian por tener tres pares de patas. Las ninfas son más parecidas a los adultos, ambos poseen cuatro pares de patas, pero se distinguen bien de estos por el tamaño. Los adultos, una vez definido su sexo, a diferencia de las larvas y las ninfas, presentan un poro genital en su cara ventral.

El cuerpo de las garrapatas de la familia Ixodidae está formado por dos partes diferenciadas el gnasthosoma o capítulo y el idiosoma o cuerpo donde están unidas las patas que utilizan para la locomoción. En el gnasthosoma o capítulo se localizan los órganos bucales: el hipostoma, pieza especializada que presenta varias filas de dientes, los quelíceros y los palpos, que le facilitan el anclaje en el huésped y su alimentación. El cuerpo presenta un escudo dorsal quitinizado del que reciben su calificativo de "garrapatas duras". Este escudo muestra una clara diferencia en los adultos machos, que ocupa la práctica totalidad de la superficie dorsal, mientras que en las hembras queda limitado a la mitad. Esta desigualdad va a permitir a las hembras aumentar su volumen corporal consiguiendo realizar un acopio mayor de sangre necesaria para la producción de los huevos.

Las garrapatas adquieren *B. burgdorferi* durante su ciclo vital. Su picadura generalmente es indolora e indetectable. Ello, unido a su pausada alimentación, facilita su función de vector, aunque en señaladas ocasiones actúen también como reservorio de las bacterias [26].

El ciclo biológico de las garrapatas suele durar entre uno y tres años, en función de la especie y de las condiciones medioambientales. La mayoría del tiempo la garrapata se encuentra libre en el medio ambiente y necesita alimentarse para pasar a un nuevo estado

evolutivo. En todas las etapas se alimenta sólo una vez, proceso que dura varios días. La garrapata busca su presa y cuando se fija, permanece en ella mientras se alimenta. Después regresan al suelo donde se producirá el cambio de etapa [25]. Normalmente el tiempo empleando por los adultos es mayor, lo cual resulta determinante en la transmisión de la enfermedad.

Cuando las larvas eclosionan de los huevos no están infectadas porque la transmisión transovárica es rara o inexistente. Se infectan al alimentarse de sangre de pequeños mamíferos salvajes, roedores principalmente y algunas especies de aves, que pueden actuar como reservorios de la bacteria sin desarrollar la enfermedad. Las espiroquetas se multiplican y mantienen en el intestino mientras que las larvas mudan a la etapa de ninfa. Cuando la ninfa infectada va a alimentarse, las espiroquetas pasan del intestino a las glándulas salivares, desde donde pueden ser transmitidas a un nuevo hospedador. En caso de que la ninfa no estuviese infectada podría adquirir la infección en este punto. Finalmente, las ninfas mudan a estado adulto. Los adultos se alimentarán una vez más. Los grandes mamíferos suelen ser los ejemplares preferidos por las garrapatas adultas para alimentarse. Los machos utilizarán la sangre para producir la espermatogénesis y como fuente de energía para el apareamiento. Las hembras, por su parte, se ocuparán de la producción de los huevos, depositándolos en la vegetación para posteriormente terminar el ciclo con su muerte [26]. Estos grandes mamíferos no suelen actuar como reservorios e incluso en ocasiones pueden producir un aclaramiento del contenido de las espiroquetas en las garrapatas [27].

El hombre es un hospedador accidental susceptible de la picadura por cualquiera de las etapas de la garrapata. Sin embargo, las larvas no van a transmitir las espiroquetas salvo en casos excepcionales de alimentaciones parciales en dos hospedadores diferentes. Por otro lado, las ninfas cuando están infectadas tienen mayor probabilidad de transmitir la infección debido a su pequeño tamaño y a que su picadura suele ser indolora. La Figura 2 muestra el ciclo de vida de las garrapatas del género *Ixodes*.

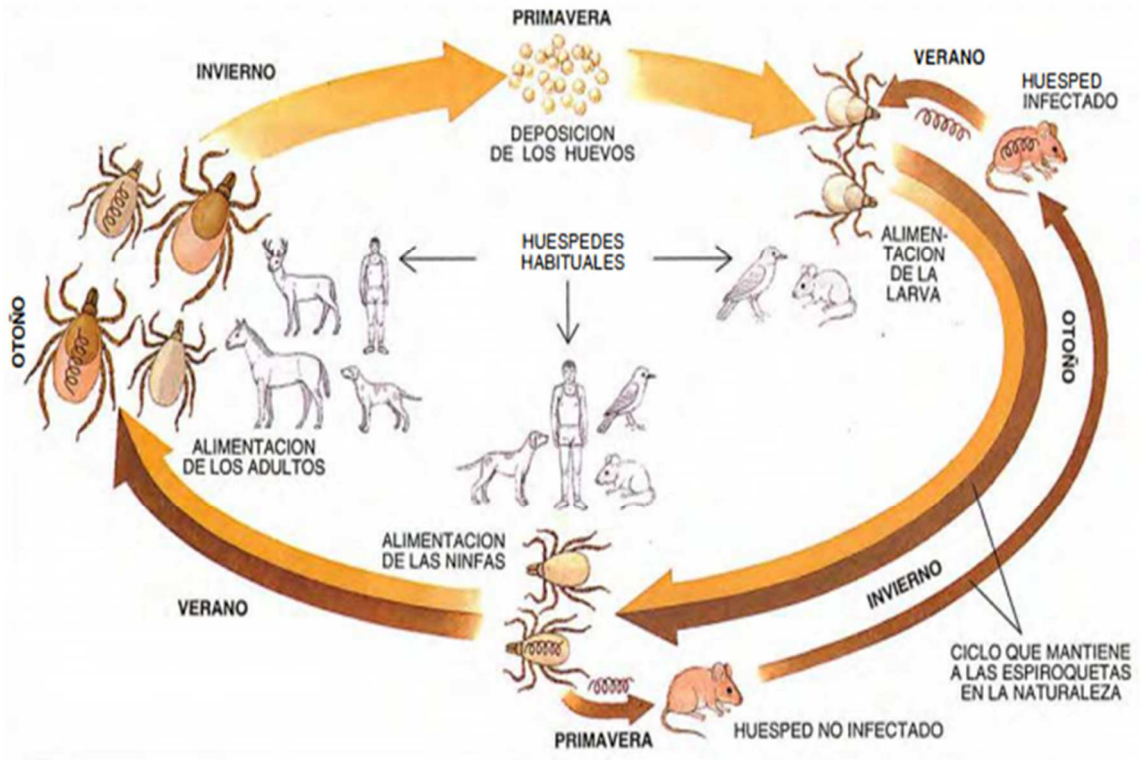


Figura 2. Ciclo vital de *Ixodes.* Adaptado de kantor, 1994 [28].

La transmisión de la espiroqueta al hombre se produce cuando la garrapata se adhiere a su piel para alimentarse. La garrapata inserta el hipostoma permaneciendo el resto del cuerpo en el exterior. Los palpos no penetran en la herida, simplemente se apoyan horizontalmente contra la piel permitiendo una penetración más profunda (Figura 3). No suele ser un proceso doloroso debido a que la garrapata en su saliva aporta sustancias anestésicas junto con una sustancia cementada que afianza su fijación. Se establece un canal de alimentación por el cual la garrapata ingiere la sangre y permite el paso de su saliva hacia el huésped. Este proceso de alimentación resulta más fácil debido a que su saliva contiene enzimas proteolíticas que evitan la coagulación de la sangre, dilatan los capilares, al tiempo que digieren y licúan los tejidos.

Las larvas y las ninfas se alimentan durante dos a cinco días, mientras que los adultos lo hacen de cinco a doce días. Durante los primeros días es un proceso lento. Al principio

ingieren una mezcla de células lisadas, terminando con la ingesta de volúmenes notables de sangre. Al finalizar la ingesta la garrapata se suelta dejándose caer de nuevo a la vegetación.

Una vez adquirida la infección en el hombre, la espiroqueta se multiplica en el lugar de inoculación propagándose a otras áreas como el corazón, el sistema nervioso central, los ojos, los músculos, el hígado y el bazo.

Figura 3**.** Garrapata anclada en la piel de un paciente. Colección particular.

1.4 Características clínicas de la enfermedad de Lyme

La enfermedad de Lyme presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas, principalmente cutáneas, neurológicas, cardiacas, articulares y en menor frecuencia, oculares. Por lo general, la enfermedad se divide en etapas. En la etapa temprana aparece una lesión cutánea localizada seguida de una infección diseminada, semanas o meses más tarde. La etapa tardía o crónica se presenta meses o años después de adquirir la infección. No siempre están presentes todas las manifestaciones clínicas propias de cada etapa e incluso pueden aparecer síntomas de una etapa sin haberse desarrollado la etapa anterior.

La presentación clínica temprana más característica es una lesión dermatológica localizada que recibe el nombre de eritema migratorio. Se localiza en un alto porcentaje de los infectados en el lugar de la picadura entre 3 y 30 días. Consiste en una pápula o mácula rojiza en la piel que aumenta de tamaño lentamente hacia el exterior y que, con el paso del tiempo, suele ir aclarando la zona central. Presenta de manera general una forma anular. Su tamaño es variable y está en función de su duración. Se considera que debe tener un diámetro mínimo

de 5 cm para diferenciarlo de otras entidades o posibles reacciones alérgicas de la piel, que pueden estar producidas, entre otros motivos, por la saliva de la garrapata [29]. El eritema presenta bordes regulares, siendo la mayoría de las veces asintomático, aunque en ocasiones se acompaña de síntomas generales de baja intensidad que recuerdan un cuadro pseudo-gripal: fiebre, astenia, mialgias y cefalea. Se localiza en cualquier región corporal, apareciendo con mayor frecuencia en las ingles, las axilas, la cintura o la espalda. En los niños su aparición ocurre con mayor frecuencia en la zona de la cabeza y el cuello. El eritema puede alcanzar un gran tamaño pero termina desapareciendo en pocos días o semanas. En un 80% de los pacientes se manifiesta como una lesión única (Figura 4).

Figura 4. Eritema migratorio. Colección particular.

Si no se administra un tratamiento adecuado, no es raro que aparezcan pequeñas lesiones diseminadas en localizaciones próximas al lugar de la picadura e incluso en localizaciones extracutáneas, con o sin presencia del EM, semanas o pocos meses después como consecuencia de la diseminación hematógena de la bacterias [6]. Estas lesiones secundarias de la piel suelen ser más irregulares y pequeñas que la lesión primaria.

La aparición de las lesiones cutáneas secundarias es menos frecuente en infecciones por *B. garinii* y *B. afzelii* que por otros tipos pertenecientes al grupo *B. burgdorferi* s.l. Estas dos

genoespecies son predominantes en Europa donde los síntomas generales no suelen estar presentes y el eritema tiene un desarrollo lento, adquiriendo la forma típica anular.

En América del Norte, el eritema se caracteriza por aparecer más precozmente como una lesión acompañada de los síntomas generales anteriormente mencionados (fiebre, astenia, mialgias, cefalea) en la que no es habitual presenciar su aclaramiento central. También es más frecuente que aparezcan múltiples lesiones [6,23,30].

En Europa, existen otras dos manifestaciones de la piel muy poco comunes, que han sido descritas puntualmente en Norte América: el linfocitoma o linfadenosis benigna cutis, nódulo rojo azulado no doloroso, localizado preferentemente en el lóbulo de la oreja en los niños y en el pezón o en la zona genital en el adulto, secundaria a la diseminación temprana de la enfermedad; y la segunda, la acrodermatitis crónica atrófica, lesión inflamatoria debida a la progresión lenta de la enfermedad que evoluciona a una atrofia de la piel. Esta última, aparece en la superficie de las extremidades y suele presentarse principalmente de forma tardía en mujeres adultas y muy rara vez en niños.

La afectación neurológica aparece como una enfermedad aguda en un 15% de los pacientes que no recibe tratamiento semanas o meses tras la picadura de la garrapata [31]. En Europa, la manifestación más común es la triada clásica: radiculoneuritis dolorosa (síndrome de Bannwarth), meningitis linfocitaria y neuropatía craneal. El signo más precoz, a veces el único, es el dolor. No es rara la presencia de rigidez de nuca. En ocasiones aparecen cuando aún está presente el EM. El par craneal que se ve involucrado con mayor frecuencia es el facial y puede aparecer la afectación en ambos lados, incluso durante la administración del tratamiento del EM puede aparecer parálisis facial sin que se trate de un fracaso terapéutico [32].

También pueden verse involucrados otros pares craneales o nervios extracraneales periféricos, acompañados de dolor con importantes contracturas musculares. La neuropatía periférica como único signo aislado no es frecuente pero sí puede estar presente en pacientes con ACA [33].

Las manifestaciones tardías del SNC como meningitis crónica, encefalomielitis y radiculomielitis son poco frecuentes. En niños y adolescentes las presentaciones neurológicas más comunes suelen ser la meningitis linfocitaria y la parálisis facial [32].

Las manifestaciones cardiacas, aunque poco habituales, se presentan también pasados días o semanas después de la picadura. Aparecen en cerca del 5% de los pacientes no tratados. Abarcan desde simples alteraciones en el electrocardiograma hasta bloqueos en la conducción

auriculo-ventricular de distinto grado, que pueden llegar a ser completos. En ocasiones se presentan mareos, dolor torácico, palpitaciones o disnea. En etapas más avanzadas de la enfermedad es posible la aparición de miocarditis o pericarditis, pero es poco común [5].

Las manifestaciones de la artritis de Lyme comprenden ataques recurrentes o inflamación persistente de las articulaciones. Se desarrolla pasadas semanas o incluso meses después de la infección original hasta en un 60% de los pacientes infectados por *Borrelia* spp que no reciben tratamiento. Generalmente, es una artritis inflamatoria, asimétrica, mono u oligoarticular, que afecta a grandes articulaciones. La articulación afectada más frecuente es la rodilla. No suele ser muy dolorosa. Si bien suele presentar leves signos de inflamación, el derrame puede ser acusado y presentar un aumento local de la temperatura. Si no se trata, la afección puede persistir durante meses o incluso años. Se caracteriza por ser recidivante con episodios de distinta duración e intensidad, cuya frecuencia va disminuyendo con el tiempo. La presentación clínica de la artritis es muy similar en los dos continentes, siendo más frecuente en Norte América que en Europa [5].

La afectación oftalmológica es muy poco frecuente. Generalmente suele presentarse de manera temprana como una conjuntivitis. Muy ocasionalmente aparecen cuadros de uveítis, papilitis, queratitis o epiescleritis [34].

Existe un pequeño porcentaje de casos en los que persisten síntomas, articulares y neurológicos principalmente, durante más de seis meses, incluso tras recibir el tratamiento antibiótico adecuado. Esta patología se conoce como síndrome Post-Lyme o enfermedad de Lyme crónica. Aún no está claro si estas manifestaciones son causa de esta misma etiología o se trata de otro tipo de afectación [7,33].

Están descritas relaciones entre las distintas manifestaciones clínicas y las diferentes genoespecies, aunque no de forma exclusiva. Así, *B. burgdorferi* s.s se relaciona principalmente con manifestaciones articulares, *B. afzelii* con manifestaciones dermatológicas y *B. garinii* con manifestaciones neurológicas [23].

La Figura 5 muestra las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme en sus distintas etapas de aparición y sus variaciones según diferentes localizaciones geográficas.

Figura 5. Etapas y manifestaciones de la Enfermedad de Lyme. Traducido y adaptado de Miraglia, 2016 [23].

1.5 Prevención y tratamiento

Como ocurre con otras enfermedades infecciosas, la manera más eficaz de evitar la enfermedad es la prevención. La prevención puede realizarse tanto en la fase anterior a la exposición como después de ésta.

Una de las medidas más eficaces para evitar la infección, es prescindir de frecuentar lugares donde puedan estar presentes las garrapatas. En caso de no poder evitarlo, se aconseja el uso de ropas adecuadas que protejan gran parte de la superficie corporal: pantalón largo y camisa o camiseta de manga larga. El pantalón debe cubrirse con el calcetín, la camiseta o camisa introducirse por dentro del pantalón y preferiblemente que presente un puño elástico. El uso de gorro es importante para proteger la cabeza, zona frecuente de picaduras, sobre todo en niños. Se aconsejan las prendas de colores claros con el fin de visualizar antes y mejor la garrapata.

El uso de repelentes, como el DEET (N,N,-dietil-meta-toluamida), o de insecticidas, como la permetrina, también pueden ser útiles a la hora de intentar evitar el contacto con garrapatas. Es importante tener en cuenta que la permetrina únicamente debe aplicarse sobre la ropa y que el DEET si se aplica en cantidades excesivas sobre la piel puede llegar a resultar tóxico [35].

Se recomienda la inspección del cuerpo y la ropa después de realizar cualquier actividad o desplazamiento en el que pueda existir contacto con garrapatas. Una ducha o baño podría facilitar su eliminación por arrastre antes de producirse la picadura. El uso de la secadora para la ropa a alta temperatura durante 60 minutos ayuda a terminar con las garrapatas que no hayan sido detectadas tras la inspección visual [6].

En caso que la garrapata haya logrado fijarse en el cuerpo humano, esta debe retirarse con ayuda de unas pinzas lo más pronto posible, intentando que el tiempo que la garrapata está en contacto con los fluidos corporales quede reducido al máximo, con el fin de disminuir la probabilidad de infección. La extracción se realizará sujetando a la garrapata lo más próximo a la piel y tirando de ella de manera constante y suave para intentar extirparla por completo, evitando que parte de ella quede introducida en la piel. Una vez retirada conviene aplicar un desinfectante sobre la piel.

El uso de antibióticos en la profilaxis frente a la infección es controvertido. Algunos autores recomiendan administrar una dosis única de 200 mg de doxiciclina en las primeras 72 horas después de la picadura de la garrapata en aquellas zonas donde la prevalencia de la infección por *Borrelia* sea superior al 20% [36]. Cuando la administración de doxiciclina esté contraindicada el tratamiento puede realizarse con amoxicilina pero la pauta de una sola dosis presenta una eficacia incierta [7,36]. Sin embargo, para otros autores el uso de profilaxis antibiótica es innecesario en la mayoría de las personas incluso en las áreas endémicas [6, 37– 39], sobre todo porque la incidencia de la infección es del 0,3% a 1,4% después de 48 horas de la picadura [32].

En Europa, no se aconseja el uso habitual de profilaxis antibiótica después de una picadura [40]. En general, las recomendaciones están encaminadas a la inspección minuciosa de la presencia de la garrapata, y en caso de picadura a la observación de la aparición de los signos o síntomas clínicos.

Un porcentaje importante de los pacientes no recuerdan la picadura de la garrapata ni desarrollan EM, lo que hace que una vez contraída la infección soliciten atención médica en etapas más avanzadas de la enfermedad.

Aunque las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden desaparecer con el tiempo en ausencia de tratamiento antibiótico, este está indicado porque acorta la duración de los síntomas y, lo que es más relevante, evita la diseminación de la espiroqueta y la aparición de complicaciones tardías.

Ante una infección por *B. burgdorferi* s.l, el antibiótico elegido y la vía de administración varían según la gravedad de las manifestaciones. El antibiótico más utilizado es la doxiciclina que es muy efectivo en las etapas tempranas de la enfermedad. Su uso está contraindicado en mujeres embarazadas y niños menores de 8 años. En estos casos se utilizan amoxicilina o cefuroxima. Los macrólidos, aunque se consideran otra alternativa al tratamiento de elección, presentan menor efectividad y por ello no se contemplan como segunda línea de tratamiento [35].

En presencia de alteraciones neurológicas o múltiples eritemas el tratamiento de elección es la ceftriaxona. El eritema migratorio múltiple y la parálisis facial pueden tratarse con doxiciclina por vía oral y resulta igual de efectiva que la ceftriaxona parenteral, lo que está demostrado también en casos de meningitis en Europa [35]. En los casos en que se presenta una parálisis facial el tratamiento antibiótico no la evita pero sí detiene la aparición de nuevas complicaciones.

En casos de afectación cardiaca, la terapia está indicada por vía intravenosa cuando hay necesidad de ingreso del paciente, por lo menos hasta que desparezca el bloqueo auriculoventricular, momento en el que se puede continuar la terapia por vía oral. En ocasiones es necesaria la implantación de un marcapasos temporalmente.

Las dosis y las pautas de administración de los distintos antibióticos según las distintas patologías se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Recomendaciones de tratamiento de la enfermedad de Lyme.

Manifestación clínica	Antibiótico	Vía	Adulto (A) Niños (N)	Dosis diaria	Duración (días)
EM, Linfocitoma					
	Doxiciclina	Oral	A	2x 100 mg	14 (10-21)
			N	2x 2mg/kg	14 (10-21)
	Amoxicilina	Oral	A	3x 500-1000 mg	14 (10-21)
			N	25-50 mg/kg	14 (10-21)
	Cefuroxima	Oral	A	2x 500 mg	14 (10-21)
			N	30-40 mg/kg	14 (10-21)
	Azitromicina	Oral	A	2x 500 mg (primer día) 500 mg (siguientes 4 días)	5
			N	20 mg/kg (primer día) 10 mg/kg (siguientes 4 días)	5
EM diseminado, NBL					
	Ceftriaxona	I.V.	A	2 gr	14 (10-30)
			N	50-100mg/kg	14 (10-30)
	Penicilina G	I.V.	A	20 mill	14 (10-30)
			N	0,25-0,50 mill	14 (10-30)
	Cefotaxima	I.V.	A	2 gr cada 8 horas	
			N	150-200 mg/kg	
Artritis					
	Doxiciclina	Oral	A	2x 100 mg	21 (14-30)
	Amoxicilina	Oral	A	3x 500-1000 mg	21 (14-30)
			N	25-50 mg/kg	
	Ceftriaxona	I.V.	A	2 gr	21 (14-30)
			N	50-100 mg/kg	
ACA					
	Ceftriaxona	I.V.	A	2 gr	21 (14-30)
			N	50-100 mg/kg	
	Doxiciclina	Oral	A	2x 100 mg	21 (14-30)
	Amoxicilina	Oral	A	3x 500-1000 mg	21 (14-30)
Afectación cardiaca*	Ceftriaxona	I.V.	A	2 gr	14 (10-30)**
	Doxiciclina	Oral	A	2x 100 mg	14 (10-21)***

* Tratamiento combinado **durante ingreso o hasta mejoría *** hasta completar tratamiento
Adaptado de Borchers et al, 2015 [41].

1.6 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme está relacionado con la presencia de criterios epidemiológicos como son la picadura de garrapata o su posibilidad, la existencia del vector en la zona y las manifestaciones clínicas compatibles.

La presencia del eritema migratorio establece el diagnóstico clínico aunque no siempre es patognomónico de la enfermedad [42,43]. Una historia de picadura de garrapata previa, así como la localización geográfica donde tuvo lugar, sirven de refuerzo al diagnóstico. No acordarse del hecho de la picadura no descarta la posibilidad de infección.

Cuando el paciente presenta la lesión dermatológica característica en una zona geográfica donde además se ha confirmado la existencia de la espiroqueta en el vector, es motivo suficiente para el diagnóstico la enfermedad. Pero debido a las diferentes presentaciones que en ocasiones tiene el eritema, a su posible ausencia y a la gran variedad de síntomas que puede presentar en los distintos estadios, es necesario completar el diagnóstico con métodos microbiológicos.

1.6.1 Examen directo

La bacteria puede observarse en muestras de sangre o LCR, en las fases tempranas de la enfermedad, mediante microscopía de campo oscuro o el uso de tinciones fluorescentes (naranja de acridina, anticuerpos marcados con fluoresceína); y en muestras de tejidos mediante tinciones con impregnación argéntica. Hoy día, estos métodos están en desuso al presentar una baja rentabilidad diagnóstica. Por un lado, requieren un buen entrenamiento del observador y por el otro, suele resultar difícil ver las espiroquetas en las muestras por su escaso número o su confusión con otros componentes de los tejidos. Mantiene su utilidad para confirmar el crecimiento en los cultivos [44].

1.6.2 Cultivo

El cultivo es considerado el método de referencia para el diagnóstico. Es útil en la obtención de espiroquetas del intestino de las garrapatas, pero no tanto en los fluidos y tejidos de los pacientes. Además son necesarios largos periodos de incubación hasta obtener su crecimiento, lo que hace que se contamine con frecuencia, retrasando o invalidando el diagnóstico. Por ello, no tiene utilidad como técnica de primera linea.

Para el cultivo se utilizan, entre otros, medios enriquecidos como BSK-I (Barbour-Stoenner-Kelly) o el mismo medio sin glutamina (BSK-II) [45]. Presenta una sensibilidad muy variable en función de la muestra estudiada y el número de espiroquetas presentes en ella [5].

El cultivo de los bordes del eritema migratorio y de otras afectaciones cutáneas suele ser positivo. Por contraposición, el cultivo de otro tipo de muestras es menos eficaz y además deben ser recogidas en los primeros días de aparición de los síntomas para obtener un mejor rendimiento [46]. Ante una infección diseminada precoz, la sensibildad del cultivo en muestra de LCR es del 10-30%. Rara vez se aísla la espiroqueta en casos de artritis. La baja cantidad de

bacterias que se encuentran en sangre colabora a que el aislamiento de la bacteria en esta muestra sea poco práctico [22].

Debido a las necesidades especiales de crecimiento que presentan las espiroquetas, un cultivo negativo no descarta su presencia en la muestra [47]. Pero, a diferencia de otros métodos, el cultivo permite confirmar la viabilidad del microorganismo.

Por norma general, no suele estar disponible en la mayoría de los laboratorios, quedando su uso limitado a los centros de referencia.

1.6.3 Detección de anticuerpos específicos

Las pruebas diagnosticas más utilizadas en la mayoría de los laboratorios clínicos son las técnicas indirectas que permiten detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a *B. burgdorferi* s.l en muestra de suero o LCR.

Existen diferentes clases, pero son las de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia (IFA) y las de inmunotransferencia (inmunoblot, western blot) las más utilizadas. Estas técnicas están diseñadas para detectar anticuerpos frente a diferentes antígenos de *B.burgdorferi* s.l. Los antígenos utilizados en su diseño son muy variados porque las espiroquetas cambian su expresión en las distintas etapas de la enfermedad. Esto, junto al hecho de la variedad de genoespecies de *B.burgdorferi* s.l supone que no exista un ensayo universal. La principal diferencia que presenta la inmunotransferencia respecto al ELISA o la IFA, es que los antígenos utilizados en su fabricación se separan por electroforesis y se transfieren a una tira de nitrocelulosa, permitiendo definir los distintos anticuerpos detectados y aumentando con ello la especificidad de la técnica.

Las técnicas han ido evolucionando introduciendo cambios con el uso de antígenos purificados, antígenos recombinantes o de péptidos sintéticos, que evitan reacciones cruzadas con otros posibles patógenos y mejoran sus prestaciones. Las técnicas de ELISA diseñadas para la detección de anticuerpos de clase IgM suelen utilizar el antígeno OpsC, cuya expresión empieza cuando la garrapata comienza a alimentarse en el huésped, mientras que los utilizados para la detección de anticuerpos IgG suelen utilizar una proteína de la región conservada de *Borrelia burgdorferi* s.l VIsE o un fragmento de la misma, el péptido sintético C6. Con este último, los resultados son similares a los obtenidos con ensayos anteriores pero

mejora la sensibilidad diagnostica de la enfermedad en las etapas tempranas producida por genoespecies como *B. garinii* y *B. afzelii* presentes en Europa [31,48].

Tanto las guías del CDC como las guías europeas de diagnóstico recomiendan el uso de las técnicas serológicas en un estudio en dos etapas: una primera etapa en la cual se realiza la detección de anticuerpos por técnicas enzimáticas tipo ELISA o IFA y en caso de obtener un resultado positivo o dudoso, una segunda etapa en la que se realiza un ensayo de inmunotransferencia [41]. Las técnicas de inmunotransferencia son laboriosas, su interpretación es subjetiva y suponen un elevado coste. Como resultado de esto, en la actualidad se plantea realizar el análisis en dos etapas utilizando dos técnicas ELISA [49]. Esto supondría una pérdida de información, al no poder interpretar todos los anticuerpos presentes en un paciente, pero podría ser más asequible en la práctica diaria [50]. La inmunotrasnferencia se aplicaría en casos de mayor dificultad diagnostica. Un estudio reciente afirma que no se aprecia mejoría en el diagnóstico al realizar el ensayo en dos etapas frente a realizar un único ensayo [51].

La Figura 6 muestra el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Lyme mediante detección de anticuerpos según el CDC.

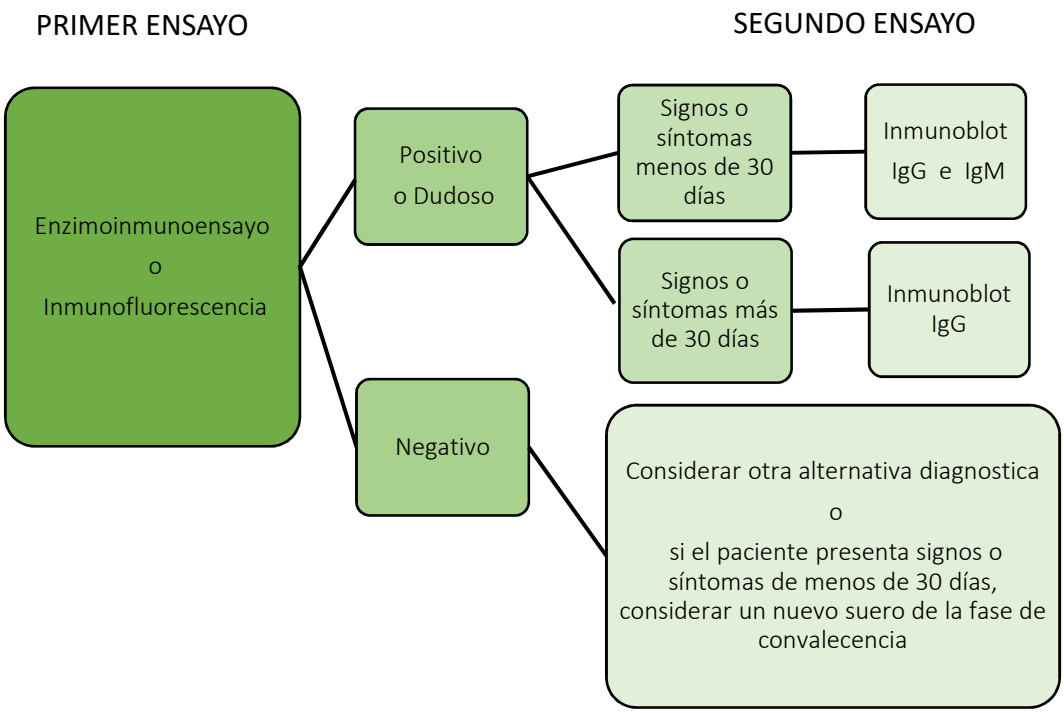


Figura 6. Diagnóstico en 2 etapas de enfermedad de Lyme. Traducido de Miraglia, 2016 [52].

Los anticuerpos, tanto de clase IgG como de clase IgM, pueden no ser detectados en etapas muy tempranas de la infección (periodo ventana).

Los anticuerpos de clase IgG, como en otras infecciones, no distinguen entre infección temprana o tardía o es difícil determinar la reinfección sobre todo cuando se dispone de muestra única. Además su prevalencia puede estar condicionada por el tratamiento.

Las técnicas serológicas también se aplican en el diagnóstico de la enfermedad con afectación neurológica determinando la presencia de anticuerpos en LCR. En la neuroborreliosis la detección de la síntesis intratecal de anticuerpos es necesaria para establecer el diagnóstico aunque pueden no detectarse en etapas tempranas, principalmente en niños [53].

Estas pruebas no deben utilizarse para valorar la eficacia del tratamiento, ya que los anticuerpos pueden aumentar después del tratamiento y detectarse durante años incluso tras una terapia adecuada [54].

Es evidente que el diagnóstico de la enfermedad, incluso con el apoyo de las técnicas serológicas, se presenta en muchas ocasiones complicado. Un resultado de detección de anticuerpos siempre debe ir acompañado de manifestaciones clínicas junto con las condiciones epidemiológicas o factores de riesgo que lo amparen.

En cualquier caso, son las herramientas más utilizadas en los laboratorios de microbiología clínica y permiten no solo realizar un diagnóstico si no conocer la epidemiología del entorno.

1.6.4 Detección genómica

La mayoría de las técnicas de detección genómica se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se obtiene un gran número de copias de forma exponencial de un determinado genoma. Son utilizadas para demostrar la presencia o ausencia del ADN de la espiroqueta, agente difícil de visualizar o cultivar. Presenta un buen rendimiento en muestra de líquido articular, donde resulta positiva en más de un 75% de las veces. Sin embargo, en muestras de LCR el rendimiento es mucho menor; suele ser positiva en determinaciones realizadas en muestras obtenidas al poco tiempo de aparecer los síntomas, pero sólo alrededor del 40% de los casos [55].

Las técnicas de amplificación genómica bien diseñadas permiten realizar un diagnóstico rápido y además ofrecen la posibilidad de poder diferenciar las diferentes genosespecies que

constituyen el complejo *B. burgdorferi* s.l [56].

Estas técnicas también han sido utilizadas para detectar la presencia de la espiroqueta en garrapatas retiradas de paciente pero, si bien nos permite conocer si son portadoras o no del agente infeccioso, no permite conocer si el paciente desarrollará la enfermedad. Esto dependerá en parte de la existencia de una transmisión eficiente durante su alimentación y por otro lado de la respuesta inmune del paciente. En cualquier caso, con esta tecnología se podría determinar la fuente de la infección.

1.6.5 Otras técnicas diagnósticas

En los últimos años se han intentado desarrollar ensayos alternativos no convencionales con la intención de mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Lyme.

Existen pruebas diseñadas para evaluar la respuesta inflamatoria o auotoinmune como la quimiocina CXCL-13, que es producida por las células presentadoras de antígenos y en casos de neuroborreliosis su concentración en LCR es alta. Se detecta en el LCR incluso antes que los anticuerpos y su nivel presenta un rápido descenso después de la administración del tratamiento antibiótico, lo que refleja un presumible valor como marcador terapéutico. En algunos laboratorios es utilizado como apoyo al diagnóstico de pacientes con síntomas clínicos neurológicos tempranos propios de la enfermedad y que no presentan aún anticuerpos específicos en LCR. El inconveniente es que puede estar elevado en otros trastornos del sistema nervioso central. Su práctica diaria aún no está recomendada en los laboratorios [57].

Hay también pruebas que exploran la inmunidad celular como la prueba de transformación de linfocitos que mide la respuesta linfoproliferativa de las células mononucleares de sangre periférica frente a antígenos específicos de *B. burgdorferi*, pero en la actualidad prácticamente ninguna guía de diagnóstico recomienda su uso debido a la falta de especificidad [58].

Otras técnicas son la detección de antígeno en orina y sangre, el recuento de células CD57, células natural killer positivas, xenodiagnóstico, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT, del acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay). No están lo suficientemente estandarizadas o evaluadas como para establecer su uso habitual para el diagnóstico en los laboratorios. Como consecuencia tampoco se recomiendan en las guías de diagnóstico para su uso en la práctica clínica diaria.

El futuro está centrado en encontrar pruebas de detección directa de ácido nucleicos y proteínas, simples de realizar que utilicen muestras fáciles de obtener y que complementen o sustituyan a las pruebas indirectas basadas en la detección de anticuerpos para un diagnóstico más completo de la enfermedad.

1.7 Descripción de la zona de estudio

El Servicio de Salud del Principado de Asturias está ordenado en 8 áreas sanitarias. El área II, correspondiente al suroccidente asturiano, comprende cinco concejos: Allande, Cangas del Narcea (al que nos referiremos como Cangas de ahora en adelante), Degaña, Ibias y Tineo (Figura 7).

Figura 7. Mapa del Principado de Asturias y detalle del Area sanitaria II.

El área sanitaria II consta de un hospital, Carmen y Severo Ochoa, situado en Cangas y diferentes centros de salud y consultorios periféricos repartidos por los distintos municipios [59].

Abarca una extensión 2156,18 Km^2, el 20% del territorio asturiano, es una zona bastante despoblada con una densidad de población de 11,13 habitantes/Km^2 y una tasa de crecimiento demográfico negativa.

Con relación al uso de la superficie, 18,34 Km^2 pertenecen a tierras de cultivo, 328,82Km^2 corresponden a superficies forestales arboladas y de matorral y 434,5 Km^2 a pastos. Las explotaciones ganaderas son principalmente de ganado bovino seguido, con bastante distancia, de ganado ovino.

El servicio sanitario atiende una población de 26069 habitantes. La población está envejecida, aunque el 60,36% pertenece al rango de edad de entre 16 y 64 años [60]. Entre los

años 2014 y 2016, un 24,66% de la población desarrolla actividades relacionadas con la agricultura y la pesca y existen en total 2279 explotaciones bovinas en todo el territorio.

En relación con las actividades recreativas, todos los concejos cuentan con coto de caza, excepto Degaña. Estos ocupan una extensión total de 155 153 ha. (20% de la superficie total de todos los cotos de Asturias). Existen cientos de kilómetros para realizar actividades de pesca fluvial repartidos por los cinco concejos. El suroccidente asturiano también cuenta con una amplia gama de rutas de senderismo y varios puntos de observación medioambiental, actividades recreacionales que si bien están destinadas al desarrollo del turismo, son igualmente practicadas con frecuencia por la población autóctona [61].

Este entorno, con la climatología adecuada (ambientes húmedos y temperaturas moderadas) junto con la existencia de fauna y flora propicia, es hábitat fundamental para el mantenimiento y desarrollo de las garrapatas. Los mamíferos de gran tamaño sirven de sustento a las garrapatas mediante la succión de sangre durante su picadura. Por otra parte, mamíferos de pequeño tamaño son a su vez reservorios ideales de diferentes agentes, incluido *B. burgdorferi*, permitiendo establecer un ciclo biológico en el que accidentalmente también se encuentra el hombre. La existencia de actividades tanto laborales como recreacionales asociadas a la posibilidad de picadura de garrapata suponen factores de riesgo de contraer zoonosis, como la enfermedad de Lyme, en esta zona.

2. OBJETIVOS

La enfermedad de Lyme, producida por el complejo bacteriano *B. burgdorferi* s.l, es la infección transmitida por garrapatas más frecuente en las zonas templadas del hemisferio Norte. El suroccidente asturiano por sus características se considera una zona endémica y es frecuente la demanda de asistencia sanitaria en relación con la picadura de garrapata y las infecciones que ésta puede transmitir.

En esta zona se conoce la existencia de diferentes tipos de garrapatas, pero no tenemos datos científicos referentes a qué clase pertenecen ni cuáles son los microrganismos patógenos que están presentes en las mismas. Estos datos son importantes para establecer la probabilidad de sufrir una infección por *B. burgdorferi* s.l después de una picadura.

El diagnóstico de la infección por *B. burgdorferi* s.l se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos. A la hora de valorar estos resultados es importante conocer la prevalencia de la infección en la zona. Hasta la fecha no existe ningún trabajo o estudio de detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en la población general de esta área sanitaria que nos permita establecerla.

Las técnicas de detección genómica suponen un gran avance en el campo de la microbiología clínica, no sólo en la mejora de la sensibilidad de técnicas utilizadas tradicionalmente sino en la importante reducción del tiempo empleado para establecer el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, por lo que su aplicación puede suponer una mejora en el diagnóstico de la infección.

Así pues, la enfermedad de Lyme es un problema de salud importante en el suroccidente de Asturias que plantea interrogantes tanto desde el punto de vista del laboratorio de Microbiología, dada la dificultad para su diagnóstico microbiológico, desde el punto de vista clínico, por la gravedad y amplia variedad de manifestaciones que en ocasiones presenta, como desde el punto de vista del paciente, porque actualmente es una enfermedad que cada vez está más difundida entre la población y genera más preocupación en las personas que han sufrido una picadura de garrapata.

Teniendo en cuenta estas premisas se planteó el estudio global de la enfermedad de Lyme en el área Sanitaria II mediante los siguientes objetivos:

1. Conocer la prevalencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en distintos grupos de población del suroccidente asturiano.
2. Analizar las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme en dicha área.
3. Diseñar y ensayar una prueba de diagnóstico de *B. burgdorferi* s.l basada en técnicas de detección genómica.
4. Aplicar la técnica de detección genómica en muestras clínicas.
5. Identificar los distintos tipos de garrapatas presentes en la zona y la tasa de la infección *por B. burgdorferi* s.l en ellas.
6. Estudiar la presencia de otros patógenos en las garrapatas*: Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras

3.1.1 Estudio de seroprevalencia

En los años 2014 y 2015 se realizó un estudio de detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en el que se incluyeron 1432 individuos con distintas características poblacionales pertenecientes al área sanitaria II del Servicio de Salud del Principado de Asturias. Presentaban un rango de edad entre 16 y 93 años (52,8±6,5 años) de los que 656 eran mujeres (52±16,7 años) y 776 hombres (54±16,3 años). Para realizar un mejor análisis de los datos, los individuos estudiados se estratificaron en tres intervalos de edad: 16-45, 45-65 y mayores de 65 años.

La población estudiada se clasificó en tres grupos:

Grupo 1 (donantes de sangre): 316 personas que acudieron a donar sangre a alguna de las unidades móviles de donación situadas en la zona, que aceptaron voluntariamente participar en el estudio.

Grupo 2 (pacientes sin infección): 432 pacientes que acudieron al hospital o a uno de los centros de salud del área sanitaria con un proceso no relacionado con causa infecciosa y que tenían solicitada una muestra para estudios de bioquímica en suero.

Grupo 3: 684 pacientes que acudieron al hospital Carmen y Severo Ochoa (HCSO) o a cualquiera de los centros de salud del área sanitaria a los que se les solicitó serología de Lyme como parte del diagnóstico diferencial de su enfermedad. En este grupo 3 se registró la presencia o ausencia de factor de riesgo ocupacional clasificando a los individuos en dos subgrupos: 3a aquellos sin factor de riesgo y 3b los que presentaban dicho factor de riesgo.

Las características epidemiológicas de las personas incluidas en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de los grupos de población estudiados según la Edad media, el sexo y el factor de riesgo ocupacional.

Grupo	n	EM±DS [Rango]	Mujeres	EM±DS [Rango]	Hombres	EM±DS [Rango]	FRO
Grupo 1	316	46±8,5 [18-70]	131	45±11,8 [22-69]	185	46±10,3 [18-70]	NO
Grupo 2	432	54±14,1 [16-90]	222	52±18,6 [16-90]	210	55±16,6 [16-88]	NO
Grupo 3	684	55±16,9 [16-93]	303	56±16,3 [16-93]	381	56±17,2 [16-93]	NO
3a	420	52±17 [16-91]	177	50±17 [16-91]	243	54±16,8 [16-90]	NO
3b	264	59±15,8 [22-93]	126	58±14 [31-91]	138	60±17,3 [22-93]	SI

RO: factor de riesgo ocupacional; EM: Edad media; DS: Desviación estándar

3.1.2 Estudio de la enfermedad

Entre septiembre de 2013 y diciembre de 2016, se analizaron un total de 1387 muestras (1343 sueros y 44 LCR) que tenían solicitada una determinación de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l para descartar enfermedad de Lyme por presentar manifestaciones clínicas relacionadas con la enfermedad.

Las muestras pertenecían a 1183 pacientes adscritos al Área sanitaria II del Principado de Asturias, 584 (49,36%) mujeres y 599 (50,63%) hombres, con una edad media de 54,98±19,61 años (10-96 años). De 146 de estos pacientes se recibió más de una muestra de suero, y de 44, además de suero se recibió muestra de LCR.

En aquellos pacientes con varias muestras, pertenecientes a un mismo episodio clínico, se consideró únicamente la primera porque no se observaron cambios en los resultados.

En la Tabla 4 se recoge el motivo de petición registrado en el volante de solicitud de estos pacientes.

Tabla 4. Distribución de los pacientes según los motivos de petición de los estudios de enfermedad de Lyme.

Motivos de petición	n (%)
Deterioro cognitivo, dolor neuropático, parestesias, hipoacusia, parálisis facial	338 (28,57)
Poliartralgias, artritis, artropatía	240 (20,28)
Picadura de garrapata	215 (18,17)
Eritema migratorio, lesión cutánea, lesión diana, exantema	110 (9,29)
Síntomas sistémicos (astenia, fiebre, dolor de cabeza...)	92 (7,77)
Clínica cardiológica	47 (3,97)
Otros motivos no relacionados con patología infecciosa y diferentes al resto	36 (3,04)
Analítica básica alterada	26 (2,20)
Adenopatía	21 (1,77)
Picadura de insecto	19 (1,60)
Actividades preventivas	18 (1,52)
Otros procesos infecciosos	18 (1,52)
Sospecha enfermedad Lyme	3 (0,25)
Pacientes totales	1183

Para establecer el diagnóstico de la enfermedad de Lyme y determinar las características clínicas y epidemiológicas de esta infección en nuestra población, se revisaron las historias clínicas de los pacientes. Se recogieron datos clínicos y epidemiológicos de acuerdo a un protocolo de trabajo previamente elaborado (anexo I).

Los casos de enfermedad de Lyme se determinaron conforme a las definiciones de caso clínico en Europa [5] detalladas en Tabla 5.

Tabla 5. Definición de caso de borreliosis de Lyme.

MANIFESTACION CLINICA	DEFINICION CLINICA DE CASO	EVIDENCIA DE LABORATORIO NECESARIA
Eritema migratorio	Lesión rojiza en expansión (≥5 cm de diámetro)[a] con o sin aclaramiento central. El borde de avance típicamente distinto, a menudo de color intenso, no muy elevado	Ninguna
Linfocitoma borrelial	Nódulo o placa azulada rojiza indolora, generalmente en el lóbulo o helix de la oreja, pezón o escroto, más frecuente en niños (especialmente en las orejas) que en adultos	Seroconversión[b] o serología positiva Histología en casos poco evidentes
Acrodermatitis crónica atrófica	Lesiones amplias de color rojo o violáceo, generalmente en las superficies extensoras de las extremidades. Al principio edematosa. La lesión eventualmente se vuelve atrófica. Es posible que la piel presente induración y nódulos fibroides sobre prominencias óseas	Nivel alto de anticuerpos específicos de clase IgG en suero
Neuroborreliosis de Lyme	En adultos principalmente meningoradiculitis, meningitis. Es poco frecuente la encefalitis, la mielitis y muy pocas veces vasculitis cerebral. En niños principalmente meningitis y parálisis facial	Pleocitosis y demostración de síntesis intratecal de anticuerpos específicos[c]
Artritis de Lyme	Episodios recurrentes o persistencia objetiva de hinchazón de articulaciones. Otras causas deben ser excluidas	Anticuerpos específicos de clase IgG en suero, generalmente en altas concentraciones
Carditis de Lyme	Inicio agudo de trastornos de la conducción atrio-ventricular (I-III), alteraciones de la conducción, alteraciones del ritmo, en ocasiones miocarditis o pancarditis. Otras causas deben ser excluidas	Anticuerpos específicos en suero
Manifestaciones oculares	Conjuntivitis, uveitis, papilitis, epiescleritis, queratitis	Anticuerpos específicos en suero

a Si el diámetro es <de 5 cm, es necesaria una historia de picadura de garrapata reciente , un retraso en la aparición (después de la picadura) o al menos dos días y un rash en expansión en el lugar de la picadura.
b Como norma general, la muestras iniciales y de seguimiento deben estudiarse en paralelo para evitar cambios debido a la variación inter-ensayo.
c En los casos tempranos la producción intratecal de anticuerpos específicos puede estar ausente.

Traducido y adaptado de Stanek et al, 2011 [5].

Los pacientes con parálisis facial y detección anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en suero, después de descartadas otras posibles etiologías, fueron clasificados casos confirmados de enfermedad de Lyme con afectación neurológica.

3.1.3 Obtención de las muestras de los pacientes

La sangre de las personas incluidas en todos los estudios se obtuvieron mediante punción venosa siguiendo los protocolos de extracciones del área sanitaria. Una vez en el laboratorio se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos recogiendo el suero. Se realizaron dos alícuotas:

- Alícuota de trabajo: conservada entre 4-8ºC hasta su uso, tiempo inferior a una semana.
- Alícuota para seroteca: conservada a -30ºC.

El LCR se obtuvo mediante punción lumbar. Se recogió en un contendor estéril y se realizaron también dos alícuotas:

- Alícuota de trabajo: conservada entre 4-8ºC hasta su uso, tiempo inferior a una semana.
- Alícuota para seroteca: conservada a -30ºC.

El mismo día que se obtuvo el LCR se extrajo una muestra de sangre para realizar los estudios en paralelo.

3.2 Muestras del vector

Entre febrero de 2014 y septiembre de 2017 se recogieron un total de 1082 garrapatas. Se recolectaron 899 de ellas de la vegetación en los distintos concejos del área sanitaria: Allande (90), Cangas (376), Degaña (163), Ibias (45) y Tineo (225).

Ciento ochenta y tres procedían de 135 personas que habían sufrido una o varias picaduras de garrapata y que acudieron buscando atención médica para su retirada a los distintos Centros de Salud o al Servicio de Urgencias del hospital del área II. Excluyendo tres pacientes de los que no se recuperó el dato de la edad, estos tenían una edad media de 46,40±25,66 años (1-97 años). De ellos 48 (35,55%) eran mujeres y 87 (64,44%) hombres. Durante su visita se les realizó una breve encuesta epidemiológica (anexo II).

3.3 Recolección y clasificación de las garrapatas

Las garrapatas retiradas de los pacientes se obtenían mediante tracción mecánica utilizando una pinza de borde romo sujetado la garrapata cerca de la superficie de la piel (Figura 8).

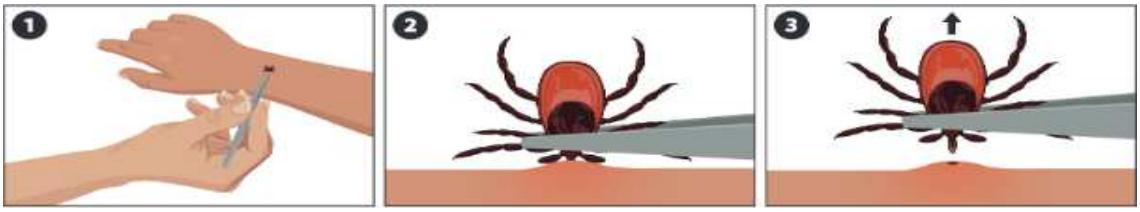


Figura 8. Método de extracción de la garrapata del paciente. Tomado de https://www.cdc.gov/ticks/pdfs/FS_TickBite.pdf [62].

Las garrapatas recuperadas de la vegetación se recolectaban utilizando una manta blanca de felpa que se iba arrastrando con ayuda de una vara sobre la superficie del terreno al caminar. Cada 2-5 minutos, de manera periódica, se inspeccionaba la manta y se iban retirando las capturas.

Una vez obtenidas las garrapatas se transportaban y se enviaban al laboratorio en un recipiente estéril donde se conservaban individualmente a una temperatura entre 4-8ºC.

Se examinaron de manera individualizada realizando la identificación a nivel de género, registrando la fase evolutiva y el sexo en los ejemplares adultos, mediante el uso de una lupa estereoscópica y con la ayuda de distintas claves taxonómicas (Figura 9) [63,64].

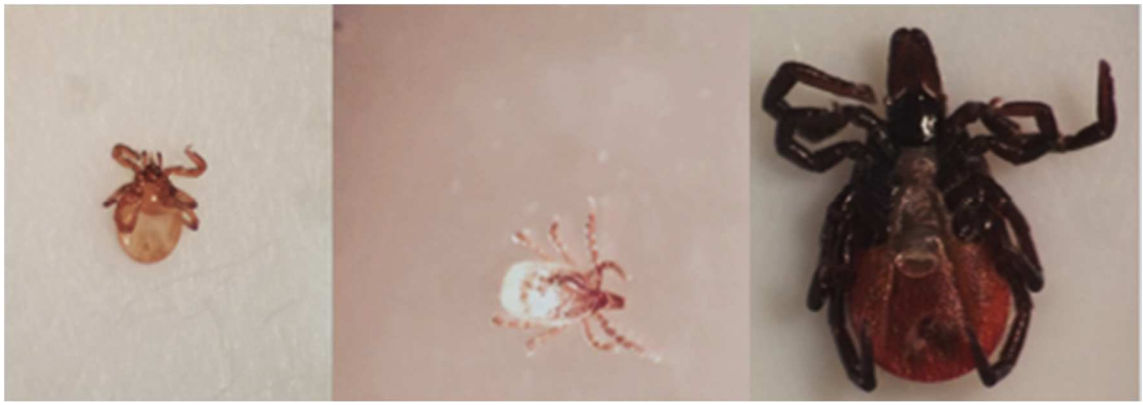


Figura 9. Imágenes de garrapatas en distinta etapa de desarrollo. Colección particular.

Una vez clasificadas las garrapatas se conservaban individualmente en un tubo Eppendorf® a 8ºC hasta su procesamiento que se realizaba dentro de los ocho días posteriores.

3.4 Detección de anticuerpos específicos

La detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en suero y en LCR se realizó en un procedimiento en dos etapas siguiendo las recomendaciones europeas y del CDC [52,65]: se realizó un inmunoensayo enzimático seguido, en aquellas muestras con resultados positivo o dudoso, de una técnica de inmunotransferencia.

El enzimoinmunoensayo empleado para la detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l fue el semi-automatizado VIDAS® Lyme G y VIDAS® Lyme M (bioMérieux SA, France), realizado según las instrucciones del fabricante. Es una técnica ELISA tipo sandwich donde la detección final se realiza por fluorescencia (ELFA, Enzyme Linked Fluorescent Assay). Los resultados son analizados automáticamente por el equipo, obteniendo un índice que se interpreta como ausencia de anticuerpos cuando es menor de 0,20. Presencia de anticuerpos cuando el valor del índice es mayor o igual de 0,20 para los anticuerpos de clase IgG y mayores de 0,32 para los anticuerpos de clase IgM. En las determinaciones de anticuerpos de clase IgM, los resultados del índice con valores entre 0,20 y 0,32 se consideran dudosos.

En la prueba de inmunotransferencia se utilizó el equipo Borrelia LINE IgG/IgM (Sekisui Virotech GmbH, Alemania) utilizado según las indicaciones técnicas del fabricante. Es un inmunoblot que detecta cualitativamente anticuerpos de clase IgG e IgM frente a distintas proteínas de la espiroqueta. El ensayo se realiza utilizando dos bandas de nitrocelulosa, una para cada tipo de inmunoglobulina. La banda para la confirmación de los anticuerpos de clase IgG presenta la secuencia de antígenos: VIsE, p39 (BmpA), p83, iv1 (BBA36), iv2 (BBO323), iv3 (Crasp3) y iv4 (pG); estos últimos con nomenclatura iv son antígenos recombinantes expresados in vivo. La banda utilizada para la confirmación de anticuerpos IgM presenta la secuencia de antígenos: p23 (OspC), VIsE y p39 (BmpA). Se consideran positivas las bandas que presentan una intensidad igual o superior a una banda de control siguiendo el esquema del fabricante para su interpretación como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Esquema de interpretación de resultados de la inmunotransferencia atendiendo indicaciones del fabricante.

Banda o bandas IgM visualizadas		Banda o bandas IgG visualizadas	Valoración
Ninguna banda/ bandas inferiores a nivel de corte	o	Ninguna banda/ bandas inferiores a nivel de corte o 1 banda IgG (salvo VIsE)	negativo
1 banda IgM (salvo OspC)	o	Banda IgG VisE	valor límite
Banda IgM OspC o 2 o más bandas IgM	o	2 o más bandas IgG	positivo
1 banda IgM	y	1 banda IgG	positivo

En la Figura 10 se observa el ensayo de inmunotransferencia donde se aprecian las bandas de reacción.

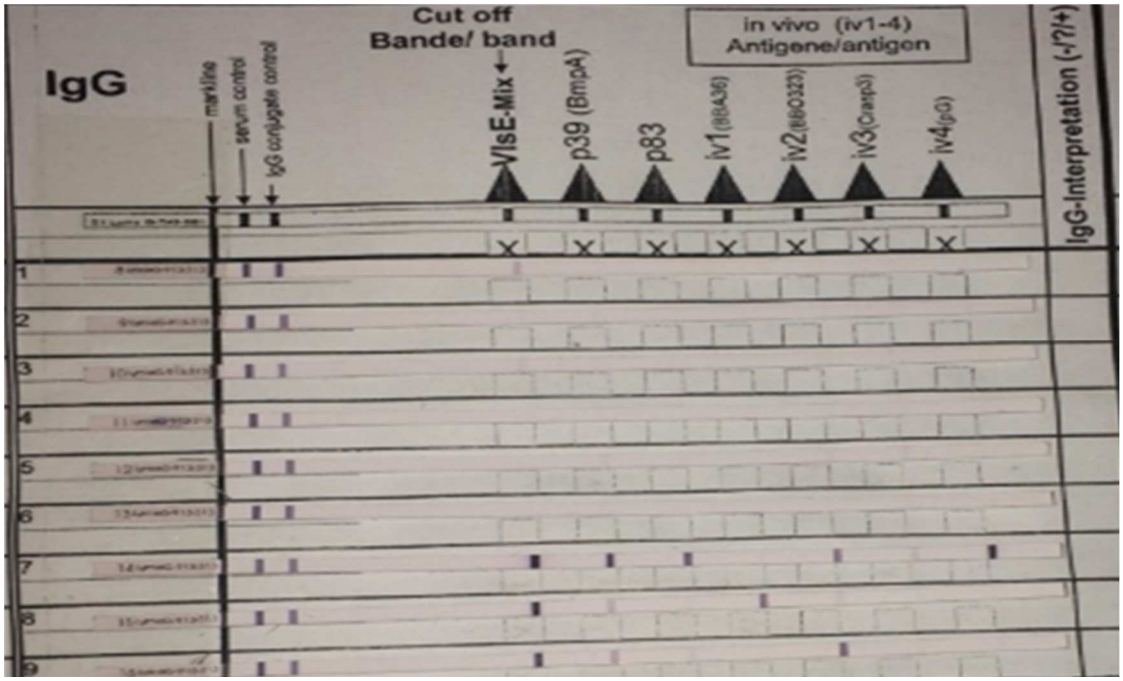


Figura 10. Imagen de un ensayo de inmunotrasferencia.

El estudio de muestras de suero y LCR del mismo paciente se realizó en paralelo bajo las mismas condiciones de ensayo. En este caso se realizaba el ensayo LIAISON® Borrelia IgG (DiaSorin S.p.A, Italia) que utiliza una técnica automatizada de quimioluminiscencia para la

determinación cuantitativa de anticuerpos de clase IgG frente a *B. burgdorferi* s.l. El equipo calcula de manera automática la concentración de IgG expresada en unidades arbitrarias (UA/mL); las muestras con concentraciones por debajo de 10 UA/mL se interpretan como ausencia de anticuerpos, concentraciones entre 10 y 15 UA/mL se consideran dudosas y concentraciones iguales o por encima de 15 UA/mL representan presencia de anticuerpos en la muestra.

3.5 Estudio genómico de *B. burgdorferi* s.l

3.5.1 Extracción de material genómico

Para la obtención de ADN de las garrapatas y de los sueros se utilizó resina Chelex® 100 al 5% (anexo III). Se adoptó este método porque es simple, rápido y produce ADN suficientemente puro para nuestros objetivos.

Las garrapatas eran previamente troceadas con un bisturí en el tubo *Eppendorf*® donde permanecían conservadas. Realizando luego los siguientes pasos:

- Adición de 400 μL de solución de Chelex.
- Agitación vigorosa durante 15 segundos.
- Incubación al baño María a 56ºC durante dos horas con agitación cada 20 minutos.
- Incubación a 96ºC durante 10 minutos.
- Agitación vigorosa durante 15 segundos.
- Centrifugación 5 minutos a 15 000 rpm.
- Recogida del sobrenadante a un tubo estéril.

El material genómico de las muestras de suero se obtenía, con un protocolo similar al anterior, de la siguiente manera:

- A un volumen inicial de 100 μL de suero se añadían 250 μL de solución de Chelex.
- Agitación vigorosa durante 15segundos.

- Incubación al baño María a 56ºC durante dos horas con agitación cada 20 minutos.
- Incubación a 96ºC durante 10 minutos.
- Agitación vigorosa durante 15 segundos.
- Centrifugación 5 minutos a 15.000 rpm.
- Recogida del sobrenadante a un tubo estéril.

Para la extracción del material genómico de las muestras de LCR se utilizó un método automatizado. A partir de un volumen inicial de 200 µL, se hacía la extracción y purificación del material genómico mediante tecnología de partículas magnéticas recubiertas de sílice, utilizando un extractor Magnapure 96 (Roche Diagnostics S.L, Alemania) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Todas las muestras extraídas se conservaban a –30ºC hasta su uso.

3.5.2 Detección de *B.burgdorferi* s.l

Para la detección del genoma de *B. burgdorferi* s.l se emplearon dos técnicas de amplificación diferentes, una descrita por el Centro Nacional de Microbiología [56] y otra de amplificación a tiempo real diseñada y validada en el laboratorio, método Hospital Carmen y Severo Ochoa (HCSO).

a. Método de detección genómica CNM (Centro Nacional de Microbiología)

En la primera parte del estudio se empleó una técnica de amplificación genómica para estudiar la presencia de *Borrelia spp* utilizando los oligonucleótidos BORF y 16S3B [56,66].

La reacción de amplificación se llevaba a cabo en un volumen final de 25 µl. Con el fin de evitar trabajar con cantidades muy pequeñas, se elaboraba una solución madre que contenía los componentes comunes de la reacción para todo el ensayo a razón de las cantidades recogidas en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos y proporciones de los componentes de la PCR.

Reactivos	Secuencias	Volumen
Tampón (10x)		2,5 µL
Magnesio2+ (50mM)		1 µL
dNTP (1mM c/u)		5 µL
Oligonucleótido (12,5 µM c/u)		1 µL
	BORF: CGCTGGCAGTGCGTCTTAA 16S3B: GCGGCTGCTGGCACGTAATTAGC	
Taq (5U/ µL)		0,125 µL
Agua		10,4 µL

c/u: cada uno

Una vez preparada la mezcla se dispensaba en alícuotas de 20 µl a las que finalmente se les añadía 5 µl de la muestra a analizar.

La elaboración de las mezclas de reacción y su dispensación se hacían utilizando un alicuotador *QIAgility* (*QIAGEN*, Alemania).

El proceso de amplificación se realizaba en un termociclador Veriti (Applied Byosistems®, Estados Unidos) siguiendo el perfil térmico recogido en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de la amplificación genómica.

Perfil térmico	Repeticiones	Tª	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94°C	9’
Ciclos	40		
Desnaturalización		94°C	15”
Hibridación		60ºC	1’
Extensión		65°C	4’
Elongación final	1	65°C	7’

Las etapas de elaboración de la mezcla y amplificación se realizaban en salas separadas con el objetivo de minimizar las posibles contaminaciones.

En cada ensayo se utilizó como control positivo un fragmento de 183 pb de ADN purificado de *B. burgdorferi* (Amplirun® Borrelia burgdorferi, Vircell España) diluido a un décimo en la solución de reconstitución proporcionada por el fabricante. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

El producto de las amplificaciones se sometía a una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, 8 µL de la muestra y 2 µL de tampón de carga (anexo III). Las muestras positivas se identificaron examinando el gel en un transiluminador de luz

ultravioleta. Se consideró positiva la presencia de una banda del tamaño aproximado de 491 pb, en comparación con el control positivo y un control de peso molecular de ADN (Perfect 100b DNA Ladder, ERUx) (Figura 11).

Figura 11. Gel de agarosa con bandas de 491 pb.

b. Método de detección genómica HCSO

Diseño y aplicación de PCR a tiempo real (PCR-tr)

Con el fin de agilizar y simplificar el proceso y poder cuantificar el material genómico de *B. burgdorferi* s.l se elaboró un protocolo de PCR a tiempo real. Se diseñaron dos cebadores y una sonda Taqman MGB marcada con el fluoróforo FAM, utilizando el programa Primer Express 3.0 (AppliedByosistems®, Estados Unidos) y la secuencia publicada del gen del ARNr 16S de la cepa de referencia *B. burgdorferi* B31. (GenBank acces no.04432.2) como patrón.

A los oligonucleótidos se les asignó el nombre de Borre TR-S y Borre TR-A. Este conjunto de cebadores permite la amplificación específica de *B. burgdorferi* s.l de un fragmento de 105 pb.

La composición oligonucleotídica de los cebadores y la sonda se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Oligonucleótidos para la detección de *B. burgdorferi* s.l.

Región	Oligonucleótidos	Secuencia
ARN ribosómico 16S	Borre TR-S (sentido)	5'-GCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTA-3'
	Borre TR-A (antisentido)	5'-CAGTTCCAGTGTGACCGTTCA-3'
	SONDA	(FAM)5'-TTGGTAGGGTAAATGC

La reacción de amplificación de ADN a tiempo real tenía lugar en un volumen final de 10 µL. La solución madre contenía 4 µL de la Mezcla Brillant III Ultra-Fast QPCR Master Mix lista para su uso (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) junto con 1 µL de la mezcla de la sonda a 125 nM y los oligonucleótidos a 450 nM cada uno. A esta mezcla se les añadían 5 µL de la muestra a analizar o de los controles.

El proceso de amplificación se realizaba en un termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Byosistems®, Estados Unidos). Las condiciones del ciclo térmico se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Perfil térmico de PCR-rt.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	10 min.
45	95°C	5 seg.
	55°C	10 seg.
	60°C	30 seg.
1	40°C	40 seg.

En una primera fase los productos amplificados se ponían de manifiesto con un gel de agarosa en vez de utilizar la sonda Taqman MGB.

Idoneidad de los oligonucleótidos y el método

Para conocer el límite de detección o sensibilidad analítica de la PCR-tr diseñada, los oligonucleótidos y la sonda se ensayaron con un control positivo de *B. burgdorferi* (Amplirun® Borrelia burgdorferi, Vircell, Epaña) que contenía 15000 copias/µL. Se realizaron diluciones seriadas del control: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, con las que se formó una curva

relacionando las distintas concentraciones con los correspondientes ciclos de amplificación (Ct).

Cada vez que se realizaba la PCR-tr se incluían controles negativos, agua destilada estéril, para verificar su buen funcionamiento y detectar las posibles contaminaciones que pudiesen ocurrir durante el proceso.

Para comprobar la especificidad de la PCR-tr para el diagnóstico de *B. burgdorferi* s.l se empleó la técnica con muestras de genomas de cepas de distintos microorganismos:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Proteus mirabilis*
- *Escherichia coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Citrobacter* spp
- *Morganella morganii*
- *Candida albicans*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Treponema pallidum*

Cada una de estos genomas se extrajo utilizando el protocolo de extracción de ADN con Chelex® al 5% y se les aplicó el protocolo de amplificación en cuatro ocasiones diferentes utilizando los controles negativo y positivo descritos anteriormente.

Aplicación en muestras de pacientes y vectores

Una vez realizado los estudios de idoneidad de la técnica diseñada se procedió a utilizar la PCR-tr para la detección de *B burgdorferi* s.l en el material recogido de los pacientes y de los vectores.

En una primera fase la PCR-tr se utilizó sin sonda fluorescente y los productos de amplificación se ponían de manifiesto con un gel de agarosa al 2%. En 220 muestras del material obtenido de las garrapatas se añadió la sonda para realizar el estudio de correlación entre los dos ensayos.

Estas pruebas se efectuaron utilizando las mismas proporciones en la mezcla de reacción y las mismas condiciones de ensayo antes comentadas.

Posteriormente, se analizaron 141 muestras de 61 pacientes, 40 LCR y 101 de suero. Ochenta correspondían a parejas de LCR y suero del mismo paciente extraídos en el mismo día.

3.5.3 Caracterización de *B. burgdorferi* s.l. Secuenciación

La secuenciación es un proceso que sirve para determinar la composición nucleotídica de una especie con el fin de caracterizarla genotípicamente. Este método se utilizó para estudiar las diferentes genoespecies de *B. burgdorferi* s.l que se habían detectado.

Previo a la secuenciación se realizó una amplificación del fragmento de ADN de la región espaciadora intergénica ARNr 5S/23S [67] en una mezcla de amplificación con los reactivos y bajo el perfil térmico indicados en la Tabla 11.

Tabla 11. Componentes y condiciones de la PCR previa a la secuenciación.

Reactivos	Secuencias	Cantidades	
Brilliant III Ultra fast QPCR Master Mix*		12 µL	
Oligonucleotidos		1 µL	
	5´ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC		
	5´TAAGCTGACTAATACTAATTACCC		
H2O		7 µL	
Muestra		5 µL	
Perfil térmico	Ciclos	Tª	Tiempo
Preciclo	1	95°C	10’
Ciclos	40		
Desnaturalización		95°C	15”
Hibridación		55°C	15’
Elongación		72°C	2’
Finalización	1	72ºC	7’

*Agilent Technologies, Estados Unidos

Las bandas de amplificación obtenidas en las distintas PCR, de un tamaño aproximado de 380 pb (Figura 12), se separaron en un gel de agarosa se cortaron y se purificaron utilizando el equipo de extracción de gel Montage DNA (Montage DNA Gel Extraction Kit, Millipore, Estados Unidos). Posteriormente para conocer su composición, las bandas se secuenciaron según el método de Sanger con el equipo de secuenciación de ciclos “Big Dye Terminator”

(Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación del fragmento por separado.

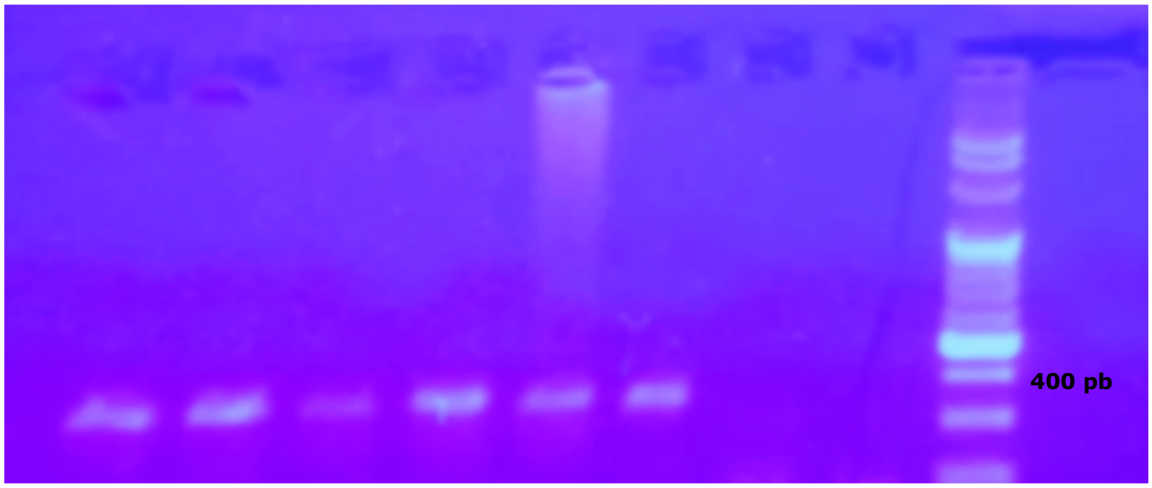


Figura 12. Gel de agarosa con bandas de 380 pb.

La mezcla de reacción y el perfil térmico utilizados en los ensayos de secuenciación se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Mezcla y condiciones de reacción para la secuenciación.

Reactivo	Volumen	Concentración/volumen final	
Tampón (5x)	2 µL	1x	
Mezcla de secuenciación (5x)	2 µL	1x	
DMSO (5%)	0.5 µL	0,25%	
Oligonucleotido (5 µM) sentido o antisentido	0.5 µL	0,25 µL	
Muestra	3 µL	-	
Agua	2 µL	-	
Perfil térmico	**Ciclos**	**Tª**	**Tiempo**
Preciclo	1	94°C	5’
Ciclos	30		
Desnaturalización		94°C	30”
Anillamiento/hibridación		50°C	20”
Elongación		60°C	4’

Antes de proceder al revelado de la secuencia se realizó una purificación del producto obtenido añadiendo 40 µL de BigDye®Xterminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En una última etapa, se cargaron 20 µL de la muestra en el secuenciador 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos) con un tiempo de análisis de 36 minutos, que permite la identificación de un fragmento de unos 400pb.

Las secuencias obtenidas se alinearon y editaron en el programa CROMAS Pro (Technelysium Pty Ltd, Australia) y se compararon con las depositadas en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la identificación de especies.

Finalmente, se construyó un árbol filogenético con el programa Treeview (versión 1.6.6) donde se incluyeron las cepas previamente secuenciadas en relación a cepas de referencia. Las cepas de referencia incluidas en el árbol fueron: *B.garinii*: CP003151.1; *B.lusitaniae*: EU078961.1; *B. bavariensis:* CP028872.1; *B.bissettii:* CP002746.1; *B.afzelii*: CP009058.1; *B.valaisiana*: CP009117.1; *B.mayonii*: CP015780.1; *B.spielmanii*: JX910054.1; *B.burgdorferi*: CP019767.1[68].

3.6 Detección de otros patógenos en las garrapatas

La presencia *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum* fue estudiada en 195 garrapatas con un protocolo similar al de detección genómica de *B. burgdorferi* y aprovechando el material utilizado para éste.

El material genómico extraído de cada garrapata se analizó mediante PCR convencional para determinar la presencia de ADN de *Rickettsia* spp utilizando oligonucleótidos dirigidos a la región variable del espaciador intergénico 23S-5S (IGS)[56] y para determinar la presencia de ADN de *Anaplasma phagocytophilum* utilizando los oligonucleótidos MSP3F y MSP3R que son específicos para una porción del gen p44 del agente de la erliquiosis granulocítica humana [69]. Las secuencias de los oligonucleotidos utilizados se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13. Secuencias de oligonucleotidos utilizados en la PCR.

Microorganismo	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño
Rickettsia spp.	RCK/23-5-F	GATAGGTCRGRTGTGGAAGCAC	366 pb
	RCK/23-5-R	TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC	
Anaplasma phagocytophilum	MSP3F	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	334 pb
	MSP3R	GCCCAGTAACAACATCATAAGC	

Cada vez que se realizaba una PCR se incluía un control negativo (agua destilada estéril) cada siete muestras analizadas.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el mismo perfil térmico y el mismo termociclador empleado para realizar la PCR convencional en el estudio de *Borrelia burgdorferi* s.l (Tabla 8).

Utilizando la técnica de secuenciación previamente descrita se confirmó la especificidad de las bandas obtenidas, según el método explicado anteriormente y con los cebadores específicos para cada uno.

3.7 Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa para ordenador GraphPad InStat V2.04ª (GraphPad Software, Estados Unidos).

El significado estadístico de la diferencia entre las proporciones se determinó usando la prueba χ^2 con corrección de Yates o el test exacto de Fisher para variables cualitativas en celdas 2x2 cuando en la tabla teórica existía un dato menor de 5, o el global de los datos no llegaba a 50. Se aplicó el test de t-Students para datos no apareados cuando se compararon medias aritméticas, aplicándose la corrección de Welch cuando las diferencias entre las varianzas eran estadísticamente significativas.

El nivel de significación requerido en todos los casos fue $p<0,05$, así como para el cálculo de intervalos de confianza [IC 95%].

3.8 Evaluación del comité ético de investigación clínica

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Principado de Asturias (nº78/19).

3.9 Anexos

- Anexo I: Hoja de recogida de datos en el protocolo de enfermedad de Lyme

1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.

Apellidos, Nombre:

Hª Sexo Edad

Zona de procedencia: Factor de riesgo:

Fecha de la picadura: Embarazada si/no

2. CLÍNICA.

Clínica general:

Cefalea Fiebre Artralgias Adenopatías

Clínica cutánea:

Lesión en la zona de la picadura Eritema Crónico Migrans

Urticaria Rash

Clínica articular

Artralgias migratorias Artritis autolimitada

Artritis crónica Miositis

Entesopatia

Clínica neurológica:

Parálisis facial Mononeuritis

Parálisis de otros pares craneales Meningitis/Encefalitis

Clínica cardíaca:

Bloqueo A-V Miocarditis/pericarditis.

Clínica Ocular:

Queratitis Conjuntivitis

Uveítis Otras

3. ANALITICA

HB	Leucos	Plaquetas	GOT
GPT	GGT	BRB	LDH
FA	VSG	PCR	

4. DIAGNÓSTICO.

5. TRATAMIENTO.

Tipo Duración: Adecuado si/no.

6. EVOLUCION:

Ingreso: si/no Curación si/no Recidiva si/no Reinfección si/no.

- Anexo II: Encuesta de pacientes con picadura de garrapata

Etiqueta con datos de paciente

A. Datos relacionados con la picadura actual:

FECHA PICADURA

ZONA GEOGRAFICA PICADURA

ACTIVIDAD RELACIONADA CON LA PICADURA

OCUPACIONAL

Ganadero, veterinario, labranza…

RECREACIONAL

Senderismo, camping, caza, pesca

LUGAR ANATOMICO

TRATAMIENTO

B. Datos generales del paciente:

Zona habitual de residencia

¿Aude con frecuencia al campo? Zona

¿Ha sufrido alguna picadura previa de garrapata?

¿Recuerda haber tenido eritema?

¿Tiene animales en casa?

¿Cuáles?

¿Tienen garrapatas?

- Anexo III: Reactivos utilizados

  - Solución de extracción Chelex®
    - 5 gramos Chelex® 100 (BioRad)
    - 100 ml agua estéril desionizada
    - Someter a ligero calentamiento y agitación durante su dispensación para que se mantenga bien homogeneizada

  - Tampón TAE 1X
    - 20 ml de Modified Tris-Acetate EDTA buffer Concentrate (50X), (Millipore, Estados Unidos)
    - 980 ml agua destilada

  - Gel de agarosa al 2%
    - 2 g de agarosa NuSieve®GTG®, de BioWhittaker Molecular Applications
    - 100 ml de Tampón TAE 1x (Millipore, Estados Unidos)
    - 5 µL Bromuro de etidio (Sigma Aldrich, Estados Unidos)

  - Tampón de carga 6X
    - 0,25% de azul de bromofenol
    - 40% (P/V) de sucrosa en agua

  - Solución cebadores y sonda para PCR a tiempo real
    - 18 µL oligonucleótido sentido 100 µM
    - 18 µL oligonucleótido antisentido 100 µM
    - 5 µL sonda 100 µM
    - 359 µL agua

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de prevalencia de la enfermedad de Lyme

Los participantes en el estudio de seroprevalencia frente a *B. burgdorferi* s.l del área sanitaria II del Principado de Asturias se clasificaron en tres grupos:

Grupo 1: donantes de sangre.

Grupo 2: pacientes con un proceso no relacionado con causa infecciosa.

Grupo 3: pacientes a los que se les solicitó estudio de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l como parte del diagnóstico diferencial de su enfermedad. Este grupo 3 se diferenciaba en dos, 3a y 3b, en función de presentar o no factor de riesgo de picadura de garrapata.

Se detectaron anticuerpos de clase IgG frente a *B. burgdorferi* s.l en 189 (13,2%) individuos, 16 (5,1%) donantes, 62 (14,4%) del grupo 2 y 111 (16,2%) del grupo 3 ($p<0.0001$).

En la Figura 13 se recogen el porcentaje de pacientes con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en los distintos grupos de estudio.

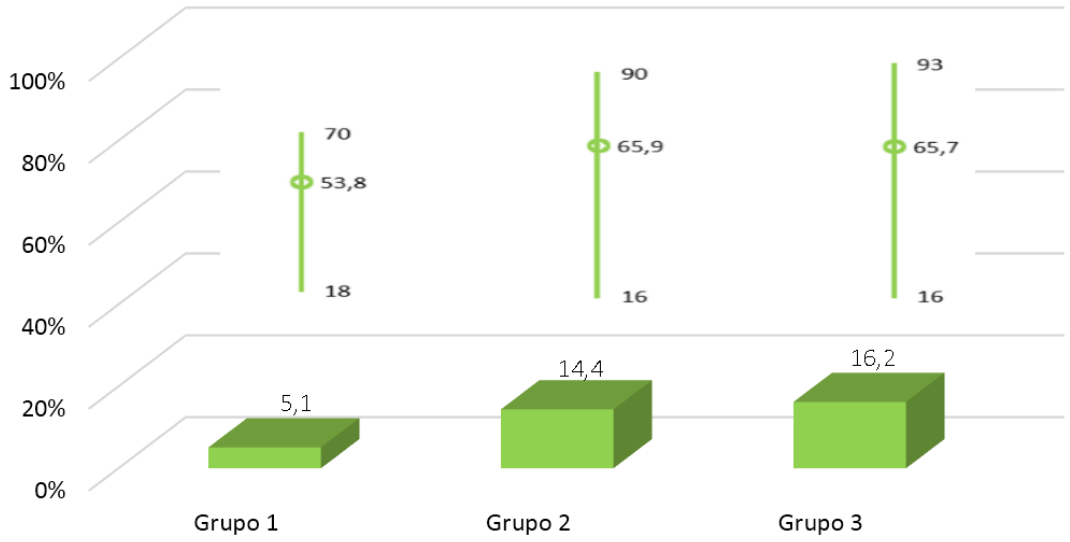


Figura 13. Pacientes con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l y rangos de edad en los distintos grupos estudiados.

Los resultados de prevalencia del estudio atendiendo al sexo y a la edad se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Tasa de individuos con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l según edad y sexo en cada grupo de estudio.

Grupo			P	EM±DS	Rango de edad (años)			
					16-45	45-65	>65	p
	Sexo	n			P/N	P/N	P/N	
Grupo 1		316	16 (5,1%)	53,8±9,4	2/147 (1,3%)	12/147 (7,5%)	2/6 (-)*	p=0.0090
	Mujeres	131	4 (3,1%)	59,5±9,3	0/64 (0%)	3/60 (4,8%)	1/3 (-)*	
	Hombres	185	12 (6,5%)	52,0±9,1	2/83 (2,3%)	9/87 (9,4%)	1/3 (-)*	
Grupo 2		432	62 (14,4%)	65,9±16,3	2/131 (1,5%)	23/153 (13,1%)	37/86 (30,1%)	p<0.0001
	Mujeres	222	21 (9,5%)	65,4±16,2	2/80 (2,4%)	7/73 (8,8%)	12/48 (20,0%)	
	Hombres	210	41 (19,5%)	66,3±16,2	0/51 (0,0%)	16/80 (16,7%)	25/38 (39,7%)	
Grupo 3		684	111 (16,2%)	65,7±13,2	5/184 (2,6%)	50/250 (16,7%)	56/139 (28,7%)	P<0.0001
	Mujeres	303	33 (10,9%)	63,8±14,1	2/84 (2,3%)	17/128 (11,7%)	14/58 (19,4%)	
	Hombres	381	78 (20,5%)	66,5±12,8	3/100 (2,9%)	33/122 (21,3%)	42/81 (34,1%)	

P/N: Positivo/Negativo; *No realizado

En el grupo de los donantes, se detectaron anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en 4 (3,1%) mujeres y en 12 (6,5%) hombres (p=0.17); en el grupo 2 se detectaron en 21 (9,5%) mujeres y en 41 (19,5%) hombres (p=0.044); y en el último grupo 3 (10,9%) mujeres y 78 (20,5%) hombres (p=0.0007), Figura 14.

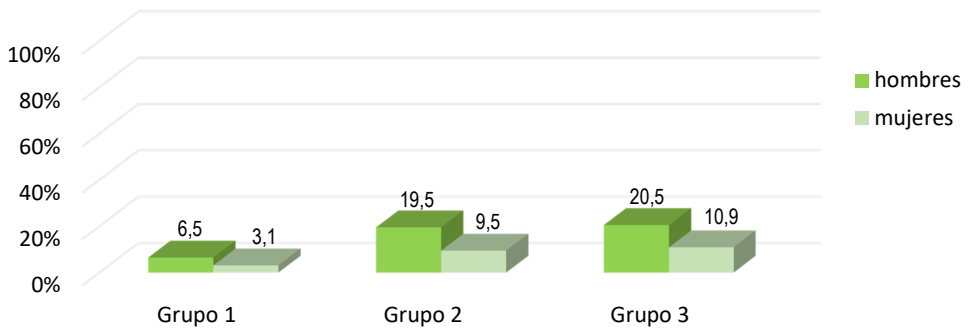


Figura 14. Presencia de anticuerpos en los grupos de pacientes según sexo.

En el grupo de los donantes la edad media de las mujeres con anticuerpos fue de 59,5±9,3 años y en hombres de 52±9,1 años (p<0.0001). En el grupo 2 la edad media de las mujeres con anticuerpos es de 65,4±16,2 y en los hombres de 66,3±16,2 años (p=0.83) y en el grupo 3 de 63,8±14,1 en mujeres y 66,5±12,8 en hombres (p=0.009).

Centrándonos en el grupo 3, se detectaron anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en 49 (11,7%) individuos en el grupo 3a y 62 (23,5%) en el grupo 3b (p=0.0051).

La Tabla 15 muestra los datos de los individuos del grupo 3 según el riesgo de contacto con el vector por su labor ocupacional (3b) o la falta de riesgo (3a).

Tabla 15. Resultados de la población del grupo 3 en función del factor de riesgo ocupacional (3b) o sin riesgo (3a).

Grupo			Positivos (prevalencia)	Edad media Positivos	Rango de edad (años)			
	Sexo	n			16-45 P/N	45-65 P/N	>65 P/N	p
Grupo 3a		420	49 (11,7%)	63,5±12,1	2/133 (1,5%)	27/161 (14,4%)	20/77 (20,6%)	p<0.0001
	M	177	16 (9,0%)	60,6±15,5	2/63 (3,1%)	9/70 (11,4%)	5/28 (15,1%)	
	H	243	33 (13,6%)	65,0±10,1	0/70 (0%)	18/91 (16,5%)	15/49 (23,4%)	
Grupo 3b		264	62 (23,5%)	67,4±13,9	3/51 (5,5%)	23/89 (20,5%)	36/62 (36,7%)	p<0.0001
	M	126	17 (13,5%)	66,9±12,3	0/21 (0%)	8/58 (12,1%)	9/30 (23%)	
	H	138	45 (32,6%)	67,5±14,5	3/30 (9,1%)	15/31 (32,6%)	27/32 (45,8%)	

M: mujeres; H: hombres; P/N: Positivos/Negativos

En el grupo 3a 16 (9%) mujeres y 33 (13,6%) hombres presentaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (p=0.15); la edad media de los positivos era de 60,6±15,5 años en las primeras y de 65,0±10,1 en los segundos (p=0.0005). En el grupo 3b presentaban anticuerpos 17 (13,5%) mujeres y 45 (32,6%) hombres (p=0.00048). La edad media de los positivos fue de 66,9±12,3 y 67,5±14,5 años respectivamente (p=0.71).

4.2 Enfermedad de Lyme en el área sanitaria II

En el Laboratorio de Microbiología del Hospital Carmen y Severo Ochoa se analizaron 1183 muestras de suero con solicitud de estudio para la enfermedad de Lyme entre septiembre de 2013 y diciembre de 2016.

Se detectaron anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en 224 (18,93%) muestras de otros tantos pacientes mediante el enzimoinmunoensayo de cribado. De ellos, se confirmó la especificidad de los anticuerpos en 191 (16,14%). Presentaban anticuerpos de clase IgG 189 (15,97%) pacientes, de clase IgM 2 (0.17%); y 49 (4,14%) presentaban las dos clases de anticuerpos en la misma muestra.

Del total de pacientes que presentaron anticuerpos 68 (11,64%) eran mujeres y 123 (20,53%) hombres ($p<0.0001$). La media de edad fue de 64,90±15,79 años [16-91] en las mujeres y 66,58±14,45 años [23-90] en los hombres.

De los 1183 pacientes, 46 estaban ingresados y 1058 fueron atendidos ambulatoriamente (766 en atención primaria, 292 en atención especializada y 10 en el servicio de urgencias del hospital). De los ingresados, 7 (15,21%) presentaron anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l y 184 (17,39%) en el grupo de los ambulatorios. De estos últimos, 123 (16,06%) atendidos en la consulta de atención primaria, 55 (18,83%) en consulta de atención especializada y 10 (12,66%) en el servicio de urgencias. Las especialidades que recibieron un mayor número de pacientes fueron medicina interna y otorrinolaringología.

Se recuperaron datos de presencia o ausencia de factor de riesgo de sufrir enfermedad de Lyme y de picadura de garrapata (actividades ganaderas, agrícolas o de labranza, actividades recreacionales relacionadas con la naturaleza) en 753 individuos. Entre los 270 con factor de riesgo (Figura 15), 61 (22,59%) presentaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l, mientras que de los 483 pacientes que no tenían factor de riesgo, 50 (10,35%) presentaban anticuerpos ($p<0.0001$).

De los 318 pacientes que recordaban haber sufrido una picadura de garrapata, 63 (19,8%) presentaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l. Por el contrario, de los 839 pacientes desconocían haber tenido una picadura, 118 (14,06%) presentaban anticuerpos ($p=0.018$).

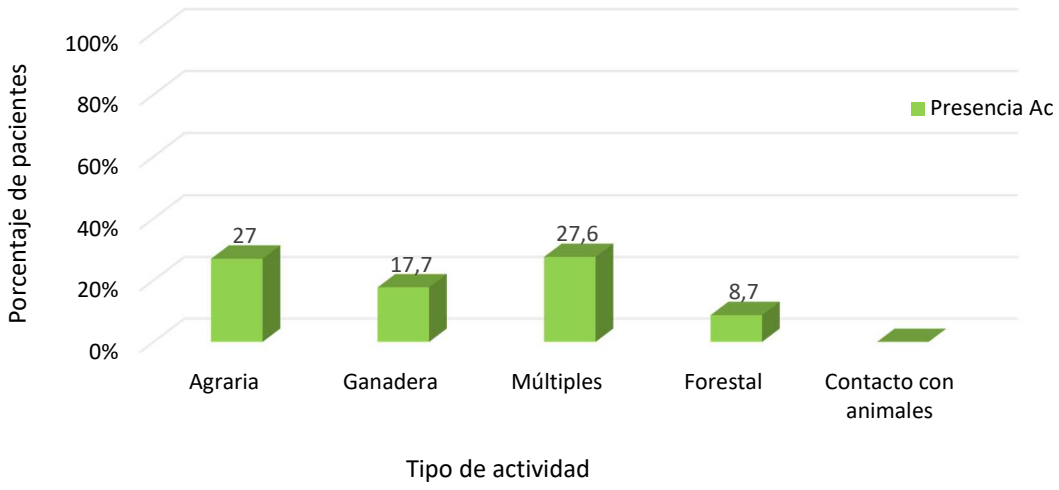


Figura 15. Pacientes con factor de riesgo y anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en relación con actividad realizada.

En la Tabla 16 se recogen características clínicas y epidemiológicas de los pacientes que presentaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en el estudio.

Tabla 16. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l.

		n	%	Edad media (años)	Rango edad (años)	FR SI/NO/Nd	Antecedente PG
Pacientes		191		65,98±14,92	16-91	61/51/79	64
	Hombres	123	64,40	66,58±14,45	23-90	44/34/45	41
	Mujeres	68	35,6	64,90±15,79	16-91	17/17/34	23
Cuadro clínico	Neurológico	59	30,89	69,76±13,48	23-90	15/23/21	12
	No definido	29	15,18	61,96±14,95	35-88	6/11/12	20
	Articular	29	15,18	65,24±11,78	37-84	9/4/16	11
	Dermatológico	28	14,66	63,32±16,92	29-91	8/7/13	16
	Infeccioso	14	7,33	55±19,70	16-86	7/2/5	1
	Otros	8	4,19	69±11,26	53-84	6/-/2	1
	Pérdida de audición	7	3,66	63,86±10,25	52-79	4/2/1	-
	Síntomas generales	7	3,66	66,43±17,32	32-88	5/-/2	2
	Vascular	7	3,66	81±1,91	79-83	3/1/3	-
	Cardiaco	3	1,57	78,33±11,59	65-86	1/1/1	1

FR: factor de riesgo; PG: picadura de garrapata; Nd: sin datos

Se consultaron las historias clínicas de los 191 pacientes con presencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en suero y de 5 pacientes con sospecha de eritema migratorio en los que no se detectaron anticuerpos por ser una entidad patognomónica de la enfermedad de Lyme.

De los 196 pacientes, 36 (3,04%) cumplían criterios de enfermedad de Lyme (18 hombres y 18 mujeres): 24 (2,03%) presentaban afectación dermatológica, 6 (0,51%) afectación neurológica y 6 (0,51%) afectación articular.

Ciento cincuenta y cinco pacientes fueron descartados por no cumplir los criterios de enfermedad de Lyme.

En la Figura 16 se recogen los casos de enfermedad de Lyme y el tipo de manifestación clínica que presentan.

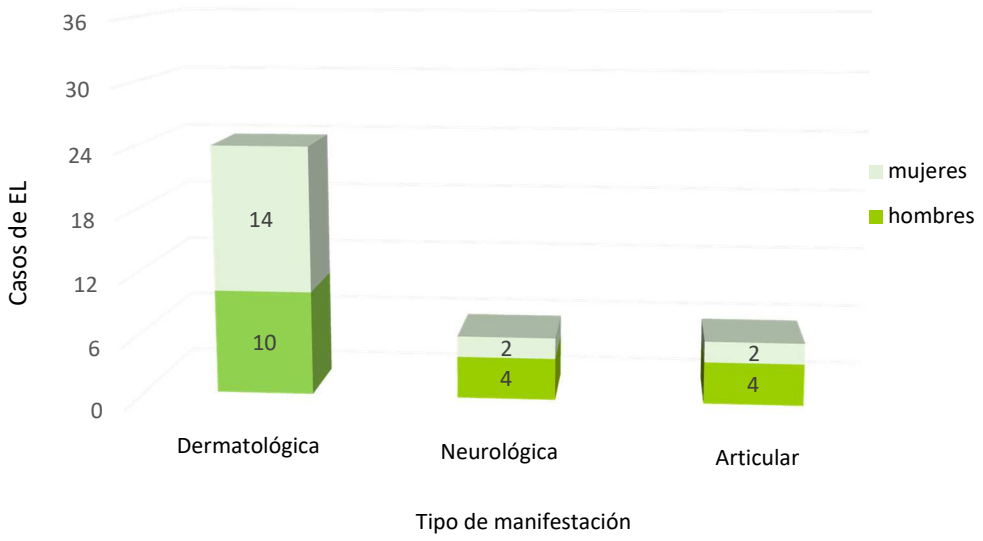


Figura 16. Casos de enfermedad de Lyme y tipo de manifestación clínica en función del sexo.

Se establecieron tres grupos de edad: pacientes menores de 45, entre 45 y 65, y mayores de 65 años. La incidencia del número de casos se recoge en la Tabla 17 y Figura 17.

Tabla 17. Casos de enfermedad de Lyme respecto al total de pacientes en distintos grupos de edad.

Casos	Sexo	Grupos de edad <45	45-65	>65	Total
		EL/AEL	EL/AEL	EL/AEL	EL/AEL
	Mujeres	4/160 (2,44%)	9/229 (3,78%)	5/177 (2,43%)	18/566 (3,08%)
	Hombres	3/173 (1,70%)	6/211 (2,76%)	9/197 (4,37%)	18/581 (3,%)
Total		7 /333 (2,10%)	15/440 (3,30%)	14/374(3,61%)	36/1147 (3,04%)

EL: enfermedad de Lyme AEL: ausencia de enfermedad de Lyme

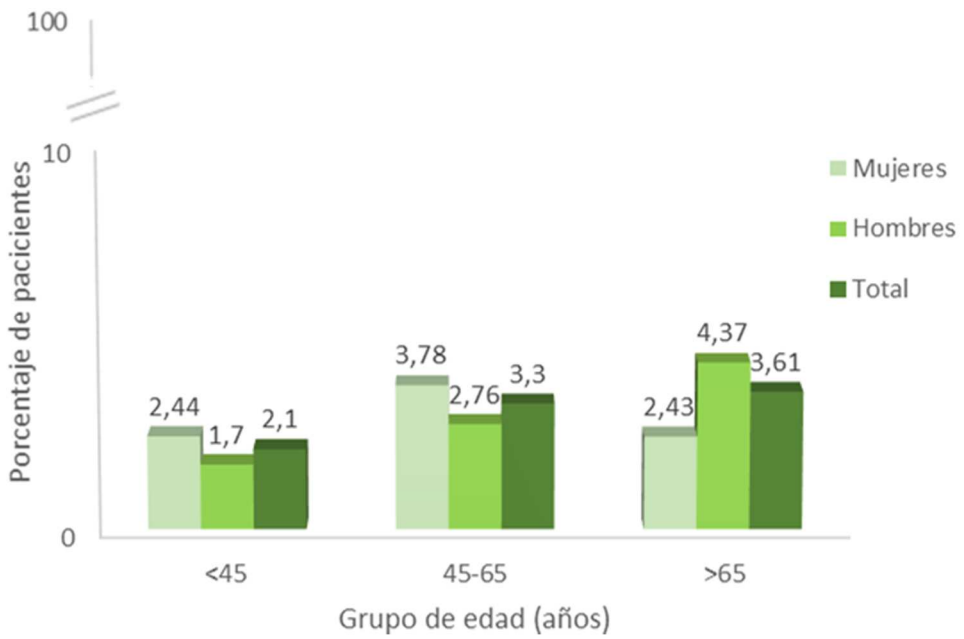


Figura 17. Distribución de la Enfermedad de Lyme según el sexo y la edad.

4.2.1 Enfermedad de Lyme con presentación clínica dermatológica

En el periodo de estudio se encontraron 24 (2,03%) pacientes que presentaban enfermedad de Lyme con afectación cutánea. La edad media de los pacientes fue de 56,37±18,25 [28-89] años. Catorce (58,33%) eran mujeres. En la Tabla 18 se resumen las características de estos pacientes.

Tabla 18.Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con clínica dermatológica.

Caso	Sexo	Edad	PG	FR	Ac IgG	Ac IgM	Estación	Localización lesión
1	M	28	-	-	-	-	Verano	Espalda
2	F	29	+	-	-	+	Otoño	Glúteo
3	F	31	-	Nc	-	-	Otoño	Muslo
4	F	34	-	+	-	-	Verano	Brazo
5	M	34	-	Nc	+	+	Verano	Pierna
6	F	41	-	Nc	+	-	Verano	Pierna
7	M	43	+	+	+	-	Primavera	Pierna
8	F	46	+	Nc	-	(+)/-	Primavera	Pierna
9	F	48	+	Nc	-	+	Otoño	Pie
10	M	50	+	+	+	-	Verano	Muslo
11	F	53	+	Nc	+	+	Verano	Abdomen
12	F	56	-	-	+	-	Otoño	Diseminado
13	F	60	-	Nc	+	+	Verano	Brazo
14	M	61	+	-	+	-	Verano	Diseminado
15	M	64	-	-	+	+	Verano	Costado
16	M	65	+	+	+	-	Verano	Axila
17	F	66	+	-	+	-	Otoño	Rodilla
18	F	69	+	+	+	-	Verano	Costado
19	M	69	-	Nc	+	-	Verano	Muslo
20	F	74	-	+	+	-	Verano	Pierna
21	F	76	-	Nc	+	-	Verano	Diseminado
22	M	82	+	-	+	+	Invierno	Abdomen
23	M	85	+	+	+	+	Primavera	Brazo
24	F	89	-	Nc	+	-	Verano	No consta

M: masculino; F: femenino; PG:picadura garrapata; FR:factor riesgo; Nc:no consta

Presentaban eritema migratorio 23 pacientes y 1 acrodermatitis crónica atrófica. En 21 casos se documentaba un eritema migratorio único característico, uno de los cuales era consecuencia de una reinfección. Tres pacientes presentaban múltiples lesiones diseminadas. Solo en tres lesiones, de las que se presentaban aisladas, se describía un aclaramiento central recordando la lesión característica en diana. Cinco pacientes manifestaban, acompañando al

EM, algún síntoma general de los siguientes: fiebre, dolor de cabeza, adenopatía o dolor inespecífico.

En la Figura 18 se observan lesiones de eritema migratorio presentes en los pacientes 2 y 8 del estudio.

Figura 18. Eritema migratorio en pierna y en glúteo. Colección particular.

En relación a la localización anatómica de la lesión, esta información se recogía en las historias de 23 pacientes: 11 aparecían en las extremidades inferiores, 4 en las extremidades superiores, 4 en el tronco, 1 en las zonas distales de ambas extremidades, y otros 2 pacientes presentaban múltiples lesiones distribuidas por el cuerpo (Figura 19).

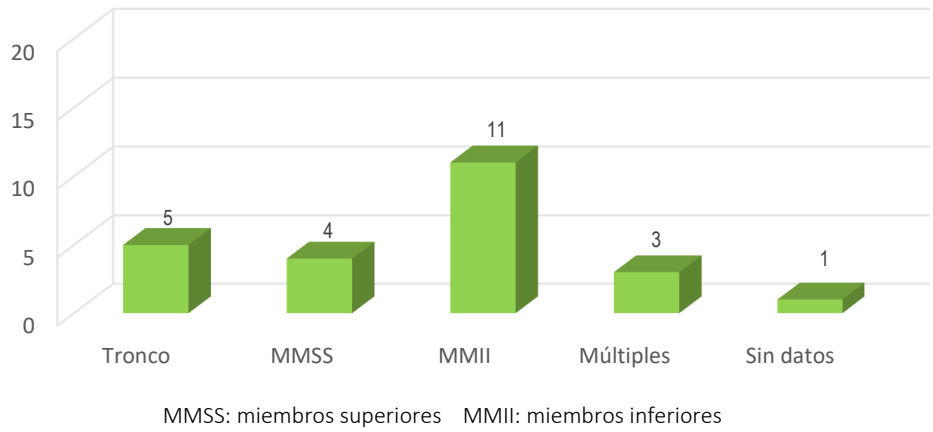


Figura 19. Distribución de los individuos según sus manifestaciones dermatológicas.

El paciente 12, con clínica correspondiente a la etapa tardía de la enfermedad (ACA), presentaba además polineuropatía periférica.

En la mitad de los casos el paciente recordaba haber sufrido una picadura por garrapata previa.

La actividad de riesgo, relacionada con la picadura de garrapata, estaba reflejada en la historia de 14 pacientes, de los cuales 7 (50%) presentaban al menos una causa: 5 relacionados con actividad agraria, 1 con actividad ganadera y 1 con ambas actividades.

Según la estacionalidad se observa que en verano se encuentran 15 casos (4,35%) y 9 casos (1,07%) en el resto del año (p=0.0009).

En la Figura 20 se recogen el número de casos en los distintos meses del año.

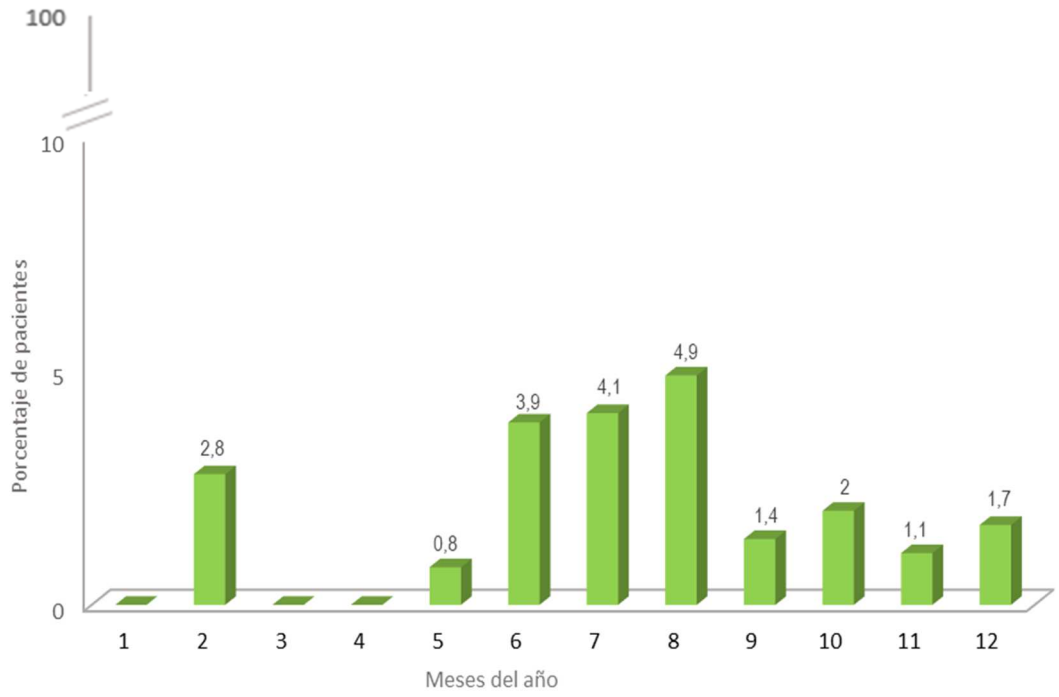


Figura 20. Distribución de tasa de pacientes con manifestaciones dermatológicas en el año.

Todos los pacientes que presentaban clínica dermatológica recibieron tratamiento antibiótico. Un paciente con ceftriaxona intravenosa, 17 con doxiciclina oral y el resto, también por vía oral con un antibiótico del grupo de los betalactámicos (amoxicilina, cefuroxima y amoxicilina-ácido clavulánico). En un caso fue necesario cambiar de antibiótico durante el tratamiento debido a intolerancia a la doxiciclina. Dos pacientes recibieron más de un

tratamiento por falta de evolución satisfactoria de los síntomas, ambos presentaban clínica general acompañando a la lesión cutánea. Solamente el paciente con ACA fue ingresado en el hospital para recibir el tratamiento por vía intravenosa.

4.2.2 Enfermedad de Lyme con presentación clínica articular

Entre los pacientes que presentaban clínica articular y anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l. se cumplían criterios de enfermedad de Lyme en seis casos. Dos mujeres y cuatro hombres, con edades comprendidas entre 55 y 72 años.

Las características de los pacientes y de la enfermedad se reflejan en la Tabla 19.

Tabla 19. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con clínica articular.

Caso	Sexo	Edad	PG	FR	Ac IgG	Ac IgM	Estación	Localización
1	M	70	+	+	+	+	Otoño	Migratorias
2	M	70	-	+	+	+	Primavera	Rodilla
3	M	64	+	Nc	+	-	Otoño	Rodilla
4	M	72	-	-	+	-	Verano	Migratorias
5	F	59	+	+	+	-	Otoño	Hombro
6	F	55	+	+	+	+	Primavera	Migratorias

M: masculino; F: femenino; PG: picadura garrapata; FR: factor riesgo; Nc: no consta

Tres pacientes sufrían artralgias migratorias y otros tres artralgias localizadas en una gran articulación (dos en rodilla y una en hombro). En todos se había descartado el diagnóstico de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y fibromialgia. Solamente dos pacientes presentaban alteraciones en las pruebas bioquímicas con valores de VSG y Proteína C Reactiva discretamente elevados.

Cuatro pacientes presentaban factor de riesgo en relación con la picadura, tres desarrollaban labores de labranza y uno actividades ganaderas.

Todos los pacientes con enfermedad de Lyme con presentación de clínica articular se trataron con doxiciclina. La administración fue por vía oral con una media de 23,83±5,77 [15- 30] días de tratamiento. Todos tuvieron una evolución clínica favorable con remisión completa de los síntomas.

4.2.3 Enfermedad de Lyme con presentación clínica neurológica

En 19 pacientes se detectaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en LCR. Las características de estos pacientes se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Pacientes con anticuerpos frente a *B.burgdorferi* s.l en suero y LCR.

Caso	Sexo	Edad	Ac IgG/IgM suero	Ac IgG LCR	Mes	Recuerdo EM	Pleocitosis (LCR)	Proteínas elevadas (LCR)
1	F	58	+/-	+	11	No	No	N
2	M	59	+/ d	+	2	No	No	N
3	M	59	+/+	+	4	No	No	61
4	M	60	+/-	+	5	No	No	N
5	F	83	+/-	+	10	No	No	N
6	M	81	+/+	+	10	No	No	48
7	F	58	+/-	+	12	No	No	N
8	M	88	+/-	+	1	No	No	N
9	M	57	+/+	+	3	No	No	46
10	M	87	+/+	+	6	No	No	N
11	M	67	+/+	+	9	No	No	46
12	F	56	+/-	+	12	Sí	No	N
13	M	72	+/-	+	1	No	No	96
14	M	81	+/-	+	1	No	No	75
15	M	72	+/-	+	1	No	No	NC
16	F	74	+/+	+	4	No	No	69
17	F	79	+/d	+	4	No	No	N
18	M	69	+/-	+	5	No	No	49
19	F	60	+/-	+	9	No	Si	53

d: dudoso; N: valor normal

Se descartaron 18 de ellos porque no cumplían la definición de caso (presencia de anticuerpos en LCR y pleocitosis) aunque clínicamente habían sido categorizados como posible enfermedad de Lyme, y todos fueron tratados con ceftriaxona intravenosa.

Se diagnosticó como neuroborreliosis el paciente 19 con plexopatía braquial que presentaba pleocitosis de predominio mononuclear y proteínas discretamente elevadas en LCR, y 5 pacientes que tenían parálisis facial a los que no se les había realizado el estudio de anticuerpos ni de alteraciones celulares ni parámetros analíticos en LCR. La edad de estos pacientes estaba comprendida entre 58 y 83 años.

Las características de la enfermedad y de los pacientes con clínica neurológica se recogen en la Tabla 21.

Tabla 21. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con clínica neurológica.

Caso	Sexo	Edad	PG	FR	Ac IgG suero	Ac IgM suero	Estación	Clínica	Tto
1	F	65	-	Nc	+	d	Otoño	Parálisis facial	Dox
2	M	58	+	-	+	-	Invierno	Parálisis facial	Dox
3	M	71	-	-	+	-	Otoño	Parálisis facial	Dox
4	M	75	+	-	+	-	Verano	Parálisis facial	Dox
5	M	83	-	-	+	d	Invierno	Parálisis facial	Dox
6	F	60	-	+	+	-	Otoño	Plexopatía braquial	Ctx

Nc: no consta; d: dudoso; Tto: tratamiento; Dox: doxiciclina; Ctx: ceftriaxona

4.2.4 Estacionalidad de la enfermedad de Lyme

Se estudiaron los pacientes con enfermedad de Lyme según la época del año en la que se estableció el diagnóstico. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22. Casos de EL y manifestaciones clínicas según las distintas estaciones

	n	Invierno EL/AEL	Primavera EL/AEL	Verano EL/AEL	Otoño EL/AEL
Mujeres (n= 584)	18	-/101	2/160 (1,23%)	8/171 (4,47%)	8/134 (5,63%)
Hombres (n=599)	18	3/130 (2,25%)	3/179 (1,6%)	9/157 (5,73%)	3/115 (2,54%)
Total	36	3/231 (1,28%)a	5/339 (1,45%)b,c	17/328 (4,92%)a,b	11/249 (4,23%)c
Presentación clínica	n	n: 234	n: 344	n: 345	n: 260
Dermatológica	24 (2,03%)	1 (0,43%)	3 (0,90%)	15 (4,35%)	5 (1,92%)
Neurológica	6 (0,51%)	2 (0,85%)	-	1 (0,29%)	3 (1,15%)
Articular	6 (0,51%)	-	2 (0,58%)	1 (0,29%)	3 (1,15%)

EL: enfermedad Lyme; AEL: ausencia enfermedad Lyme; $^{a}p=0.0197$;$^{b}p=0.0152$;$^{c}p=0.0419$

En el grupo de los hombres encontramos casos en todas las estaciones del año. Sin embargo, en las mujeres, no se registran casos en la época de invierno y hay una marcada diferencia entre verano, otoño con respecto a la de primavera (Figura 21 y Figura 22).

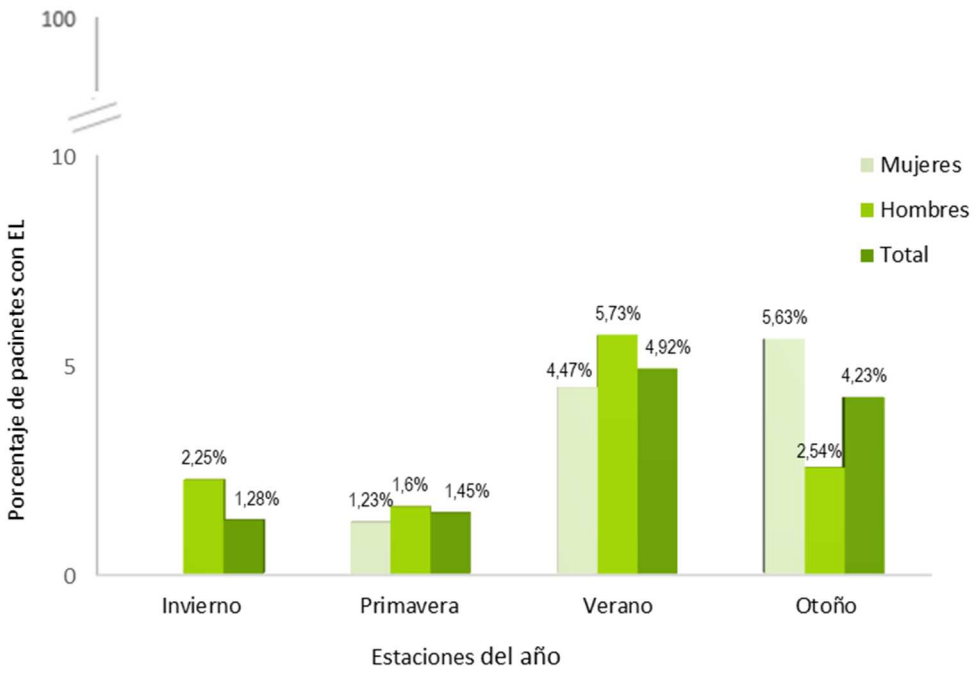


Figura 21. Pacientes con enfermedad de Lyme en las diferentes estaciones.

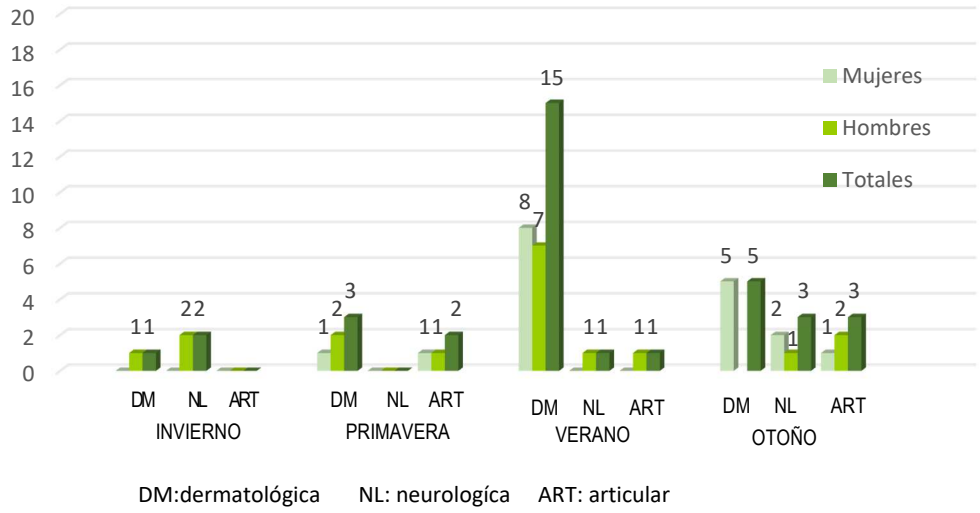


Figura 22. Manifestaciones de la EL distribuidas por época del año y sexo de pacientes.

4.3 Estudio del vector

Durante el periodo de estudio se recogieron un total de 1082 garrapatas: 899 (83,09%) fueron recolectadas de la vegetación en los distintos concejos del área, mientras que 183 (16,91%) se retiraron de pacientes que solicitaron atención sanitaria.

4.3.1 Caracterización de los ectoparásitos y distribución geográfica

Se identificaron 4 tipos diferentes de garrapatas duras, 983 (90,85%) *Ixodes* spp, 68 (6,28%) *Dermacentor* spp, 23 (2,13%) *Rhipicephalus* spp y 8 (0,74%) *Haemaphysalis* spp.

Se localizaron garrapatas en todos los concejos estudiados. Cangas fue el concejo donde se encontró mayor variedad. En la Tabla 23 se recogen los ejemplares recolectados por concejos y por tipo (en 10 de ellos no se recuperó el dato de procedencia). La Figura 23 muestra distintos tipos de garrapatas.

Tabla 23. Clasificación de las garrapatas recolectadas y concejo de procedencia.

	Allande	Cangas	Degaña	Ibias	Tineo
Ixodes spp	110 (94,01%)	408 (82,25%)	167 (100%)	47 (97,92%)	243 (99,59%)
Dermacentor spp	5 (4,27%)	61 (12,3%)	-	1 (2,08%)	1 (0,41%)
Rhipicephalus spp	2 (1,71%)	19 (3,83%)	-	-	-
Haemaphysalis spp	-	8 (1,61%)	-	-	-
Total (1072)	117	496	167	48	244

Figura 23. Garrapatas recolectadas. *Rhipicephalus* sp, *Ixodes* sp, *Dermacentor* sp. Colección particular.

En la Figura 24 se observa el tipo de garrapata recogida y su municipio de origen.

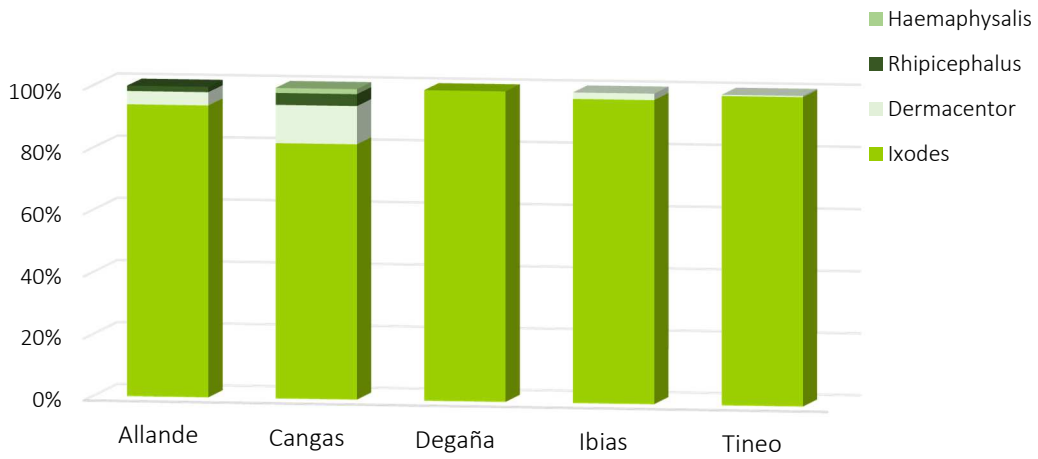


Figura 24. Tipo y distribución geográfica de las garrapatas recuperadas.

Se hallaron garrapatas en las distintas etapas evolutivas, 6 larvas, 572 ninfas y 504 adultos (298 hembras y 206 machos). En la Tabla 24 se recogen los tipos de garrapatas encontrados junto con su etapa evolutiva y su origen.

Tabla 24. Clasificación y origen de las garrapatas recolectadas en el estudio.

GENERO	ETAPA	n		ORIGEN	
				Pacientes	Vegetación
Ixodes spp (n=983)	Larvas	6		3	3
	Ninfas	572		125	447
	Adultos	405			
			Hembras	35	208
			Machos	1	161
Dermacentor spp (n=68)	Adultos	68			
			Hembras	12	27
			Machos	7	22
Rhipicephalus spp (n=23)	Adultos	23			
			Hembras	-	12
			Machos	-	11
Haemaphysalis spp (n=8)	Adultos	8			
			Hembras	-	4
			Machos	-	4
Total		1082		183	899

En la Figura 25 se recoge el tipo de garrapata y sus distintos estados evolutivos.

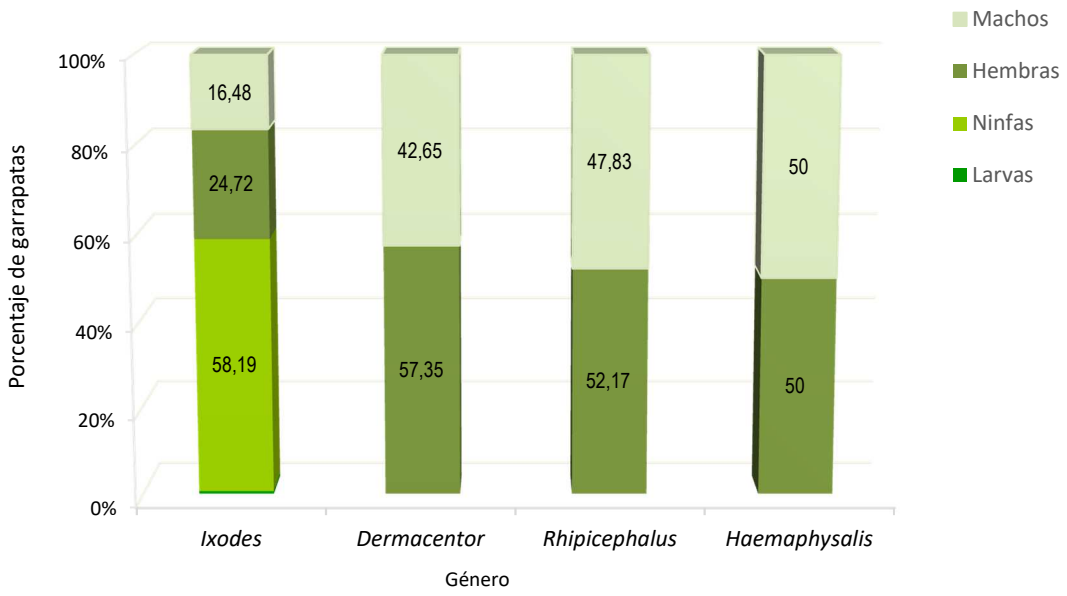


Figura 25. Tipo de garrapatas según género y estado evolutivo.

4.3.2 Episodios de retirada de garrapatas en pacientes

Excepto en el mes de diciembre, acudieron a los centros sanitarios pacientes solicitando atención médica para la retirada de garrapatas de la piel.

De 183 garrapatas retiradas de personas, 170 pertenecían a 135 pacientes en episodios diferentes y se recibieron en el laboratorio junto con una encuesta realizada al paciente, detallada anteriormente en el anexo II. En las 13 restantes únicamente se conocía el dato de origen humano, por lo que no están incluidas en el siguiente análisis.

En los episodios registrados de retirada de garrapata, a dieciocho pacientes se les quitó más de un ejemplar: a once pacientes se le quitaron 2 garrapatas, a tres pacientes 3, a dos pacientes 4 y hubo dos pacientes a los que se le quitó seis y ocho garrapatas respectivamente.

La edad media era de 46,40 ± 25,66 [1-97] años (86 hombres, 46 mujeres). En tres pacientes se desconocía este dato.

Cuatro garrapatas no se recibieron en buen estado por lo que no se pudieron identificar. Entre las clasificadas, 152 (89,41%) pertenecían al género *Ixodes* spp y 17 (10,24%) al género

Dermacentor spp. Entre las garrapatas del género *Ixodes* spp, 111 (74,5%) se encontraban en etapa de ninfa, 35 (23,49%) eran adultos, (97,14% hembras) y 6 (2,01%) eran larvas. Los ejemplares de *Dermacentor* spp eran todos adultos, 11 hembras y 6 machos.

Del total de pacientes, 64 (47,41%) tenían animales en casa y en 24 (37,5%) hacían referencia a la presencia de garrapatas en ellos.

Se registró la localización anatómica de la picadura de la garrapata en 159 ocasiones: 46 (28,93%) ejemplares en las extremidades inferiores, 36 (22,64%) en las extremidades superiores, 25 (15,72%) en la zona de la cabeza y el cuello, 22 (13,84%) en la zona del abdomen, 15 (9,43%) en la espalda, 9 (5,66%) en el tórax y 6 (3,77%) garrapatas en la zona inguinal (Figura 26).

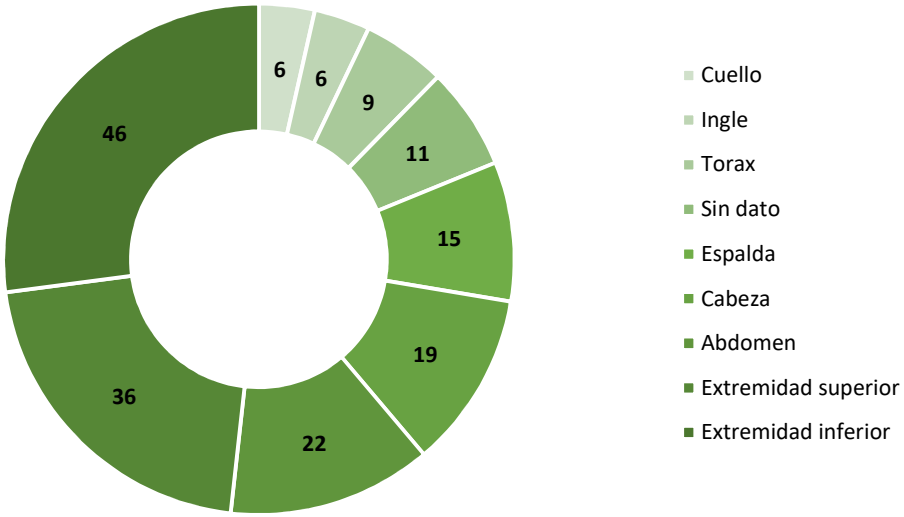


Figura 26. Localización anatómica de donde fue retirada la garrapata de los pacientes atendidos en el sistema de salud.

Todos los ejemplares de *Dermacentor* spp se retiraron de la parte superior del cuerpo. Se recuperaron en mayor proporción de la cabeza y el cuello, 13 (86,67%) de los 15 ejemplares. Los ejemplares de *Ixodes* spp, se retiraron 11 de 149 (7,38%) de la cabeza y cuello ($p<0.001$).

Sólo 31 pacientes tenían estudios de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l. En 8 (5,92%) casos se confirmaba la presencia de anticuerpos antes de la retirada de la garrapata.

En 2 casos se detectaban anticuerpos en el momento de la retirada y 2 presentaban anticuerpos en muestras estudiadas tres meses más tarde.

De los 135 pacientes, con episodio de retirada de garrapata, 19 (14,07%) recibieron tratamiento antibiótico oral, cinco de ellos una dosis única de doxiciclina.

4.4 Evaluación y aplicación de la amplificación genómica a tiempo real

4.4.1 Verificación de la técnica

Como se comentó en el apartado material y métodos se diseñó una PCR-tr para el diagnóstico de la bacteria. Se eligieron unos oligonucleótidos para la detección de espiroquetas pertenecientes al complejo *B. burgdorferi* s.l y se comprobó, su idoneidad introduciendo las secuencias en Standard Nucleotide BLAST del National Center for Biotechnology Information, que ambos se unían específicamente a distintas genoespecies de *Borrelia burgdorferi* s.l entre las que se incluían las descritas en Europa como patógenas (Figura 27).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Borreliella afzelii isolate HLJ177 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121664.1
Borreliella garinii isolate HLJ156 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121661.1
Borreliella garinii isolate HLJ157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121660.1
Borreliella garinii isolate HLJ158 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121659.1
Borreliella bissettii isolate HLJ230 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121658.1
Borreliella bissettii isolate HLJ231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121657.1
Borreliella bissettii isolate HLJ232 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121656.1
Borreliella bavariensis isolate HLJ61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121655.1
Borreliella bavariensis isolate HLJ62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121654.1
Borreliella bavariensis isolate HLJ63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	MK121653.1
Uncultured Borrelia sp. clone YN67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.091	100.00%	KY622012.1

Figura 27. Genoespecies de *B.burgdorferi* s.l relacionadas con los oligonucleótidos.

Sensibilidad y especificidad

Para comprobar la validez de la técnica se ensayaron los oligonucleótidos en muestras de garrapatas que habían sido estudiadas previamente con la PCR clásica del Centro Nacional de Microbiología. Se compararon los resultados obtenidos en ambos ensayos, después de realizar las determinaciones en paralelo, el mismo día y bajo las mismas condiciones de trabajo. Los productos amplificados de ambas pruebas se revelaron utilizado un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El control positivo utilizado, cada vez que se realizaba un estudio, resultó siempre positivo. Siempre se incluyeron controles negativos para comprobar que no existían contaminaciones o amplificaciones inespecíficas que resultaron siempre negativos.

En la Tabla 25. Concordancia de las amplificaciones genómicas. se recogen los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

Tabla 25. Concordancia de las amplificaciones genómicas.

		Oligonucleótidos ISCIII		TOTAL
		Positivo	Negativo	
Oligonucleotidos HCSO	Positivo	30	3	33
	Negativo	1	66	67
Total		31	69	100

Para la PCR HCSO se obtuvo una sensibilidad del 96,87 %. La concordancia de ambos ensayos fue del 96%.

Para comprobar la especificidad de la técnica, se ensayó el método en cepas de distintos microorganismos que habían sido obtenidas de cultivos identificados previamente. Cada cepa se probó en cuatro ocasiones diferentes. Los resultados se recogen en la Tabla 26.

Tabla 26. Microorganismos ensayados para el estudio de especificidad.

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
E. coli	NA	NA	NA	NA
P. mirabilis	NA	NA	NA	NA
C. jejuni	NA	NA	NA	NA
C. jejuni	NA	NA	NA	NA
Citrobacter spp.	NA	NA	NA	NA
P. aeruginosa	NA	NA	NA	NA
P. aeruginosa	NA	NA	NA	NA
S.agalactiae	NA	NA	NA	NA
Staphylococcus aureus	NA	NA	NA	NA
M. morganii	NA	NA	NA	NA
Candida spp	NA	NA	NA	NA
Amplirun® *Borrelia burgdorferi*	+	+	+	+

NA: no amplifica

El control positivo amplificó correctamente en todas las ocasiones descartando posibles inhibiciones en el desarrollo de la técnica. Se utilizaron controles negativos (agua destilada) de los cuales en ninguna ocasión se obtuvieron resultados de productos amplificados.

Comparación del revelado en gel de agarosa y con el uso de la sonda

En la primera fase del estudio, el producto de la PCR se ponía de manifiesto con un gel de agarosa al igual que cuando se realizaba la PCR del Centro Nacional de Microbiología (CNM). Posteriormente, se realizaron estudios en paralelo utilizando los oligonucleótidos sin y con la nueva sonda diseñada. Estos ensayos se realizaron el mismo día y bajo las mismas condiciones de reacción, utilizando el mismo termociclador y estudiando las mismas muestras. En cada grupo de muestras estudiadas se incluyeron varios controles negativos para descartar posibles contaminaciones, no detectándose estas en ningún caso. Los resultados obtenidos utilizando la sonda y con el revelado utilizando el gel de agarosa se recogen en la Tabla 27.

Tabla 27. Relación de las reacciones de amplificación genómica: lectura en gel y con sonda.

		Oligonucleótidos con sonda		n (Total)
		Positivo	Negativo	
Oligonucleótidos	Positivo	86	5	91
	Negativo	9	120	129
n (Total)		95	125	220

La concordancia obtenida entre ambos métodos fue del 94 %. La sensibilidad del método utilizando el revelado con gel fue del 91% y con la sonda del 95%.

Límite de detección (cuantificación genómica)

Del control positivo se realizaron diluciones seriadas que se probaron en cuatro ensayos diferentes. En la Tabla 28 y en la Figura 28 se recogen los valores y la representación obtenidos en la amplificación de los mismos.

Tabla 28. Datos de las diluciones del control de genoma de *B .burgdorferi*.

	Copias/µl	Ct	Ct	Ct	Ct
Amplirun® Borrelia burgdorferi	1500	27,94	27,49	28,50	28,49
	150	31,71	31,34	31,32	31,52
	15	34,9	34,85	34,43	34,00
	1,5	-	38,51	38,57	38,8

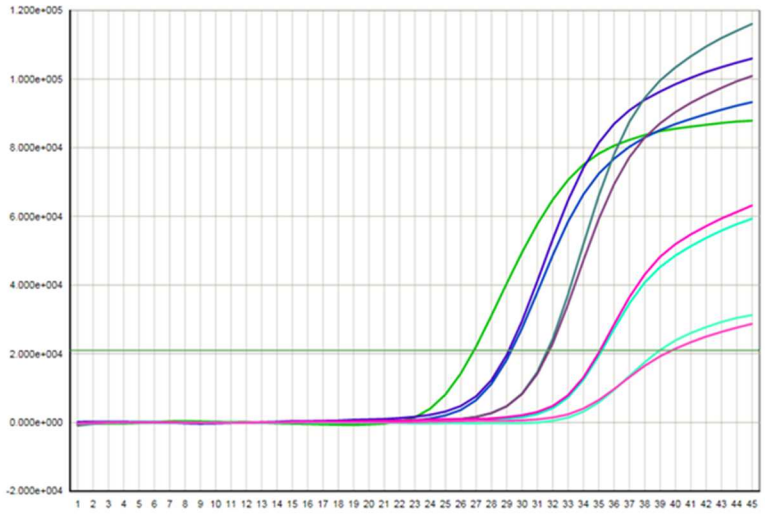


Figura 28. Diluciones de los controles para construir la curva estándar.

Con estos resultados se elaboró una curva estándar (Figura 29) para determinar el límite de detección y comprobar la cinética de amplificación y la correlación entre la cantidad de genoma y el Ct de amplificación.

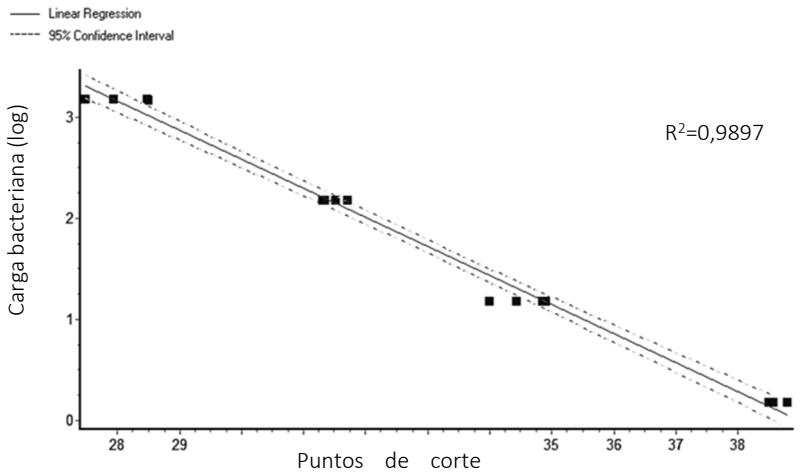


Figura 29. Curva estándar, compara la amplificación (Ct) con las diluciones de la bacteria.

El límite de detección fue de 14 copias en el ciclo 35, límite estándar universal, y se llegaron a detectar 1,5 copias en el ciclo 38 en 3 de los 4 casos en los que se ensayaron.

4.4.2 Aplicación en muestras de pacientes

Una vez diseñada y evaluada la nueva técnica de PCR-tr para la detección de *B. burgdorferi* s.l, se empleó en muestras clínicas obtenidas de los pacientes del estudio. La técnica se aplicó 101 sueros y 39 LCR. De ellas, 39 correspondían a parejas de suero y LCR de un mismo paciente.

En ninguna de las muestras clínicas ensayadas se detectó la presencia de *B. burgdorferi* s.l.

4.4.3 Detección de *B. burgdorferi* s.l en garrapatas

De las 1082 garrapatas recolectadas, siete tuvieron problemas técnicos durante la extracción y no se pudieron analizar. Un total de 1075 garrapatas fueron investigadas por técnica de amplificación genómica para detectar la presencia de *B. burgdorferi* s.l. Seis ejemplares eran larvas de *Ixodes* spp todas fueron negativas y se excluyeron del análisis de

datos debido por una parte a que la infección transovárica de *B. burgdorferi* en el género *Ixodes* es prácticamente inexistente y, por otra parte, por ser un número muy limitado de ejemplares.

Finalmente, se analizaron 1069 garrapatas. Se detectó *B. burgdorferi* s.l en 148 (13,84%) de los ejemplares, en 39 de 568 (6,86%) en ninfas y en 109 de 501 (21,75%) en adultos, 75 (25,42%) hembras y 34 (16,5%) machos.

En la Tabla 29 se recogen las características y los resultados obtenidos de las garrapatas retiradas de la vegetación incluidas en el análisis.

Tabla 29. Detección de *B. burgdorferi* en las garrapatas recolectadas de la vegetación.

GENERO	Total +/-	Ninfas +/-	Adultos H +/-	Adultos M +/-	p
Ixodes spp (n=814)	123/691 (15,11%)	29/416 (6,52%)	64/144 (30,77%)	30/131 (18,63)	<0.0001
Dermacentor spp (n=47)	2/45 (4,25%)	-	1/24 (4%)	1/21 (4,54%)	ns
Rhipicephalus spp (n=23)	3/20 (13,04%)	-	1/11 (8,33%)	2/9 (9,09%)	ns
Haemaphysalis spp(n=8)	0/8	-	0/4	0/4	
TOTAL (n=892)	128/764 (14,35%)	29/416 (6,52%)	66/183 (26,5%)	33/165 (16,67%)	

ns: no significativo

Se observó la presencia de *B. burgdorferi* en 123 ejemplares de *Ixodes* spp, y en 2 ejemplares de *Dermacentor* spp (p=0.05). No se detectó *B. burgdorferi* s.l en ninguna garrapata perteneciente al género *Haemaphysalis* spp.

De las garrapatas recolectadas al ser retiradas de la piel de personas que habían sufrido picaduras, se analizaron un total de 177 ejemplares. Los resultados obtenidos se recogen Tabla 30.

Tabla 30. Detección de *B. burgdorferi* en las garrapatas retiradas de personas.

GENERO	Total +/-	Ninfas +/-	Adultos H +/-	Adultos M +/-
Ixodes spp (n=159)	20/139 (12,58%)	10/113 (8,13%)	9/26 (25,71%)	1/0 (*)
Dermacentor spp (n=18)	0/18	-	0/11	0/7
TOTAL (n=177)	20/157 (11,30%)	10/113 (8,13%)	9/37 (19,56%)	1/7 (*)

En la Figura 30 se observa el tipo y la etapa evolutiva de las garrapatas donde se detectó *B. burgdorferi,* tanto recogidas de la vegetación como de los pacientes que acudieron a los servicios de salud.

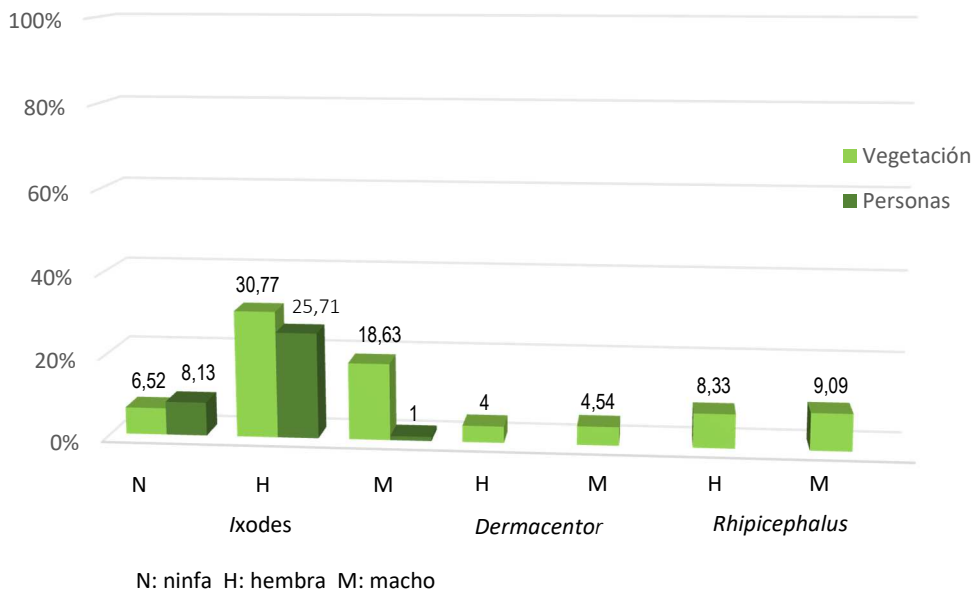


Figura 30. Tipo de garrapatas portadoras de *B. burgdorferi* según su procedencia.

4.4.4 Caracterización de las genoespecies de *B. burgdorferi* s.l.

Se recuperó el fragmento de ADN obtenido de la amplificación de la región espaciadora intergénica ARNr 5S/23S de 50 muestras que posteriormente se analizó por secuenciación.

En 17 de ellas no se lograron resultados con éxito. En las restantes se identificaron cinco genoespecies del complejo *B. burgdorferi* s.l diferentes.

En la Tabla 31 se recogen en detalle los datos de las distintas genoespecie.

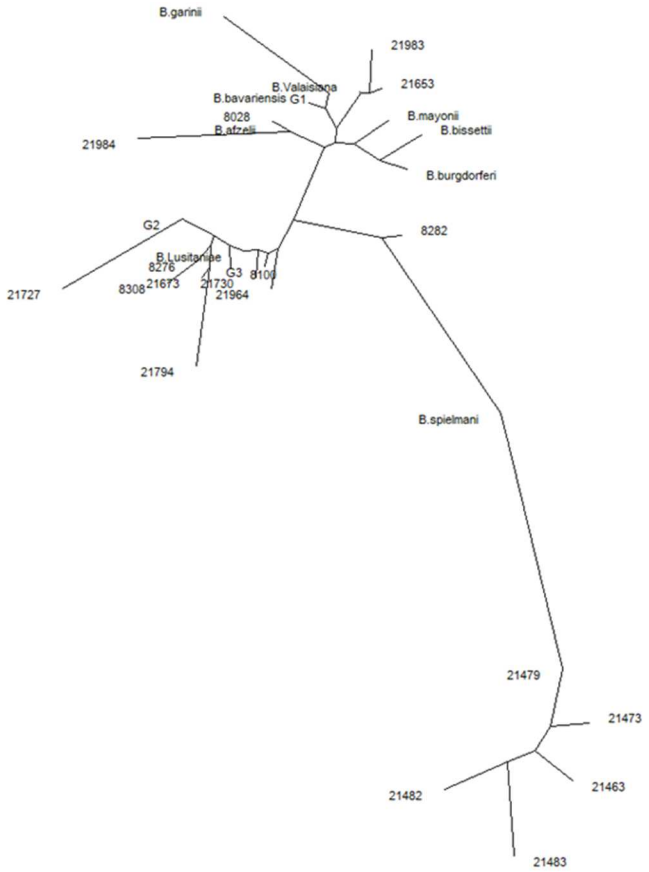
Tabla 31. Genoespecies secuenciadas de *B.burgdorferi* s.l.

		Etapa evolutiva de *Ixodes* spp		
Genoespecie	Total	ninfas	adulto macho	adulto hembra
B. lusitaniae	20	-	8	12
B. garinii	5	2	1	2
B. afzelii	4	-	2	2
B. valaisiana	3	-	1	2
B. burgdorferi s.s	1	-	-	1
Total	33	2	12	19

La genoespecie más encontrada en estas garrapatas fue *B. lusitaniae.* Dos de ellas, del género *Ixodes,* habían sido retiradas de pacientes que durante el periodo de estudio no solicitaron atención médica. El resto de las genoespecies secuenciadas se encontraban en garrapata de la vegetación.

Algunas cepas secuenciadas se agruparon seleccionando un único ejemplar en representación. En el grupo G1 las secuencias de las cepas 21795, 21776, 21787, 21927, 21717, en el grupo G2 las cepas 8477, 21648, 21985, 21685, 8109 y en el grupo G3 las cepas 21986, 21612, 21725, 21722 y 8275. La Figura 31 muestra la relación filogenética de estas especies con las cepas de referencia.

a)



b)

Figura 31. Esquema filogenético con raíz (a) y sin raíz (b) de las especies encontradas de *B. burgdorferi* en este estudio en relación con las cepas de referencia.

4.5 Presencia de otros patógenos en el vector

Las garrapatas además de ser vectores de *B. burgdorferi* s.l también pueden albergar otros microorganismos como *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum*. Se estudió la presencia de estos dos patógenos en 195 ejemplares (150 adultos y 45 ninfas) de garrapata, 189 de ellos eran comunes en ambos estudios.

En la Tabla 32 y la Figura 32 se muestran los datos obtenidos de estos patógenos junto los resultados obtenidos de la detección de *B. burgdorferi* s.l.

Tabla 32. Presencia de *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum* en el vector en comparación con *B. burgdorferi* s.l.

	Patógeno estudiado		
	Anaplasma phagocytophilum n=195	*Rickettsia* spp n=195	*B.burgdorferi* s.l n= 1069
Tipo de garrapata	+/- (%)	+/- (%)	+/- (%)
Ixodes spp (n=167)	2/193 (1,20%)	2/165* (1,20%)	143/830 (14,70%)
Dermacentor spp (n=21)	0/21 -	9/12* (42,85%)	2/63 (3,08%)
Riphicephalus spp (n=5)	0/5 -	2/3 (40%)	3/20 (13,04%)
Haemaphysalis spp (n=2)	0/2 -	0/2 -	0/8 (-)
TOTAL (n=195)	2/193[a,b] (1,02%)	13/182 [a,b] (6,66%)	148/921 [a] (13,84%)

[a], *p <0.0001; [b] p= 0.006

Rickettsia spp se encontró en 9 de 12 (42,85%) ejemplares en el género *Dermacentor* spp, hallándose únicamente en un 2 de 165 (1,20%) ejemplares de garrapatas del género *Ixodes* spp.

En todas las garrapatas donde se encontró presente *Rickettsia* spp se encontraban en fase adulto. *Anaplasma phagocytophilum* se detectó en una ninfa y un adulto. *B. burgdorferi* s.l se detectó en garrapatas en los estados de adulto y ninfa (comentado anteriormente). En un ejemplar se detectó una co-infección de *Anaplasma phagocytophilum* y *B. burgdorferi* s.l.

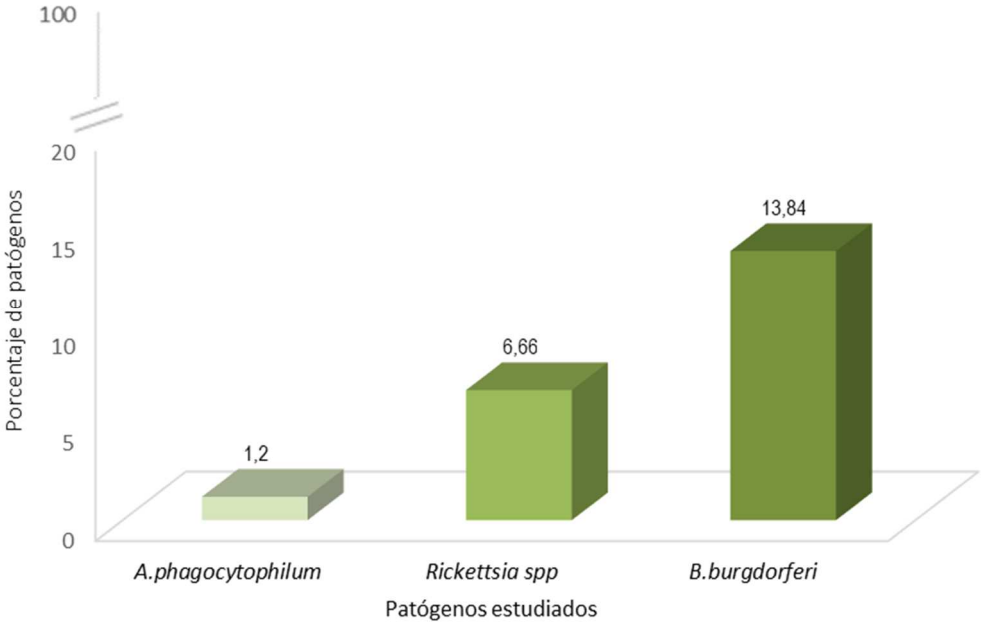


Figura 32. Presencia de patógenos en las garrapatas estudiadas.

En ningún ejemplar se detectaron los tres patógenos simultáneamente.

5. DISCUSIÓN

Desde hace ya dos décadas, la Sierra del Sueve en la comunidad autónoma del Principado de Asturias se considera zona endémica de borreliosis de Lyme (Guerrero, 2000), una enfermedad multisistémica que provoca, por lo general, síntomas cutáneos, articulares, cardiacos y/o neurológicos transmitida por garrapatas. Los procesos neurológicos y los articulares pueden afectar en un 15% y un 60% respectivamente a los pacientes que no reciben un tratamiento antibiótico adecuado [71].

La mejor vía de control, como en otras infecciones, es la prevención y para ello es muy importante conocer el entorno.

Esta situación de borreliosis endémica que ocurre en la Sierra del Sueve bien puede extenderse a otras zonas de Asturias con características similares. La parte suroccidental de Asturias es una zona boscosa y húmeda con una superficie forestal del 85% en la que abundan las garrapatas [72]. Además, es el área sanitaria asturiana con un mayor número de casos hospitalizados por borreliosis [73], sin embargo, hasta la fecha se desconoce la dimensión real de la infección.

Así pues, el primer objetivo de esta tesis fue conocer el alcance del problema de esta enfermedad en la zona suroccidental de Asturias.

Se planteó un estudio de seroprevalencia frente a *B. burgdorferi* s.l en tres grupos distintos de individuos señalados previamente en el apartado de material y métodos: donantes de sangre, pacientes que acudían al servicio de salud a realizar analíticas no relacionadas con procesos infecciosos y pacientes con posibilidad de padecer una infección por *Borrelia burgdorferi.*

En el análisis de los datos se encontró una tasa de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l del 13,2%, similar a la que se informaba en Soria (13,1%) hace un par de décadas [74] y supera a la encontrada en otras zonas del país como el 4,4% en Navarra o el 3,45% en Madrid en trabajos más recientes [75,76]. Cabe resaltar que estos trabajos ya tienen más de una década y quizás los datos de seroprevalencia están subestimados.

Estos niveles bajos de infección son similares a la que se encuentran en el grupo de donantes de sangre (5,1%) de este estudio. La baja seroprevalencia de *B. burgdorferi* encontrada en donantes puede ser debida a la edad de estos, pues solo 8 donantes eran mayores de 65 años (el grupo de edad con mayor prevalencia). Estudios en otros países informan porcentajes similares, 4,2% en Escocia y 4,3% en Rumanía [77,78]. Estas tasas pueden incluso variar dentro de un mismo país. Así, en el norte de Noruega se registra un 0,48% y en

el sur del 9,25% [79]. En Bélgica no encuentran diferencias entre donantes de zona rural y urbana con prevalencias del 2,6 y del 2,9% [80]. A pesar de que estos porcentajes no son nada desdeñables y de que en las primeras etapas de la enfermedad de Lyme se produce una diseminación hematógena de la bacteria, no se ha informado hasta la fecha ningún caso de transmisión de enfermedad de Lyme mediante transfusiones de sangre [81].

En los otros grupos analizados, los que acudían al hospital sin causa infecciosa y el grupo de los que tenían clínica compatible con enfermedad de Lyme, la detección de anticuerpos frente a la bacteria supera el 14%.

Anteriormente se comentaba que la prevalencia era superior a zonas con características similares de nuestro país, pero está en la media de lo publicado en otras regiones europeas. Así, en Alemania informan prevalencias del 9,40%, en Bélgica del orden del 21-23% y en Eslovaquia del 25,3%, tasa ligeramente más alta pero que corresponde a un estudio realizado en personas de riesgo por su trabajo o actividad [82–84].

Es lógico pensar que aquellas poblaciones con un contacto con zona forestal y con ocupaciones en ese ámbito, presenten una mayor tasa de infección. En la recogida de datos en los pacientes del grupo con sospecha de enfermedad de Lyme (grupo 3), se pudo registrar esta variable. Se pudo constatar que aquellas personas con mayor riesgo de sufrir picaduras por garrapatas por su ocupación laboral (con mayor riesgo de exposición al vector) y de mayor edad llegaban a tasas de prevalencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l de hasta el 45%. Es más, en este grupo los más jóvenes ya alcanzaban tasas de anticuerpos del 9%. En España existen trabajos en los que constatan una mayor seroprevalencia en personas de riesgo por su profesión o zona geográfica de residencia y que alcanzan prevalencias de hasta el 38% en ganaderos y guardas forestales en La Rioja [85].

El aumento de la tasa de infección está estrechamente relacionado con la mayor exposición al vector, como se acaba de comentar. Pero, además del riesgo ocupacional, la edad es otra variable que aumenta esa exposición.

En este trabajo se observa un incremento significativo en la prevalencia de anticuerpos con la edad del paciente y se alcanzan porcentajes cercanos al 30% en personas mayores de 65 años. Esto contrasta con otros trabajos [75,76,85,86] en los que no encuentran diferencias significativas. Sin embargo, los estudios europeos mencionados de Alemania y Bélgica también confirman un aumento de prevalencia con la edad, que por encima de 65 años alcanza niveles del 30% [82,83].

Como en otros estudios, también se observa una mayor seroprevalencia en hombres, sobre todo en los mayores de 45 años [83]. Este dato parece relacionado con una mayor participación del hombre en actividades al aire libre hasta la fecha. La mayor participación de la mujer en actividades agrarias y recreativas al aire libre puede revertir este dato en el futuro.

Analizando la prevalencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l de los distintos grupos establecidos llama la atención que entre personas en las que el motivo de consulta no estaba relacionado con patología infecciosa (grupo 2), la prevalencia sea similar a la de aquellos con clínica compatible con enfermedad de Lyme (grupo 3). Esto puede explicarse por el amplio espectro de manifestaciones clínicas producidas por *B. burgdorferi* s.l que puedan semejar cuadros que ni siquiera se consideran infecciosos. De hecho, una gran parte de las peticiones solicitadas a los laboratorios de Microbiología no cumplen definiciones de caso de enfermedad de Lyme. En un estudio en Holanda, sólo el 9% de los pacientes estudiados presentaban criterios clínicos compatibles [87]. Por otra parte, el diagnóstico debe realizarse en presencia de un ambiente epidemiológico adecuado y con posibilidad de picadura de garrapata [17]. Según los datos de este trabajo, parece evidente que el factor que más peso tiene a la hora de decidir solicitar un estudio de enfermedad de Lyme es la presencia de factor de riesgo (actividades al aire libre), sobre todo en individuos menores de 65 años.

En cualquier caso, la prevalencia de la infección por *B.burgdorferi* s.l en la zona estudiada es alta y se asocia al sexo, la edad y la actividad ocupacional o recreativa. Es importante señalar que es el primer estudio de prevalencia en España realizado en donantes de sangre.

Como se comentaba anteriormente, a la hora de establecer un diagnóstico de enfermedad de Lyme, nos encontramos con pacientes que presentan manifestaciones clínicas muy variadas. La presencia de un eritema migratorio, o recordar haberlo tenido con anterioridad, permitiría diagnosticar clínicamente a estos pacientes o apoyar su diagnóstico. Pero éste no siempre aparece. También en muchas ocasiones encontramos pacientes que ni recuerdan haber tenido una picadura de garrapata previa ni ningún otro tipo de lesión cutánea que puedan hacer pensar en dicha enfermedad. Hoy en día, la mayoría de los casos diagnósticos, salvo la infección cutánea temprana, se establecen según los resultados de las pruebas serológicas.

Para conocer las características clínicas de la enfermedad de Lyme, se estudiaron los datos de más de mil pacientes en los que se analizaron una serie de variables. Ciento noventa y un (16,14%) pacientes presentaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l. Treinta y seis

(3,04%) tenían una enfermedad de Lyme confirmada en el momento en que se analizaron los datos. Las manifestaciones clínicas presentes fueron todas propias de la infección. Se encontraron 24 (2,03%) pacintes con afectación dermatológica, 6 (0,51%) con afectación neurológica y 6 (0,51%) con afectación articular. La mayor frecuencia de las afectaciones dermatológicas sugiere que los enfermos acuden a la atención sanitaria en las fases tempranas de la enfermedad. El hecho de que se encuentren tasas superiores de detección de anticuerpos que de enfermedad, sugiere que estos estudios microbiológicos deben estar mejor dirigidos por la presentación clínica compatible para no malinterpretar los resultados.

Los 36 pacientes con enfermedad de Lyme se diagnosticaron en un periodo de tres años y medio. Según la población de estudio y los datos de población existente en la zona en el periodo analizado, la incidencia estimada aproximada en nuestra área sanitaria es de 35,70 casos por 100 000 habitantes/año, superior a la señalada en España en el año 2005, con 0,25 casos por 100 000 habitantes/año [88,89]. Debido a que en nuestro país no es una enfermedad de declaración obligatoria se encuentran datos muy variados de incidencia, con cifras de 0,32 por 100 000 habitantes/año en La Coruña [90] a 3-5 casos por 100 000 habitantes/año en La Rioja [17]. El dato más alto y más reciente es el que encuentra Vázquez-López; con 11,6 casos por 100 000 habitantes/año en Lugo en el año 2015, provincia limítrofe con la zona de estudio.

En Francia, se encuentra una incidencia media un poco más elevada, 42 casos por 100 000 habitantes/año, pero los datos varían mucho según la región estudiada: se encuentran zonas con ausencia de casos y zonas que alcanzan 184 casos 100 000 por habitantes/año [91]. En Europa occidental esta cifra se sitúa en 22 casos por 100 000 habitantes/año; también hay importantes variaciones, con cifras desde 0,001 hasta 464 casos por 100 000 habitantes en Italia y Suecia respectivamente [92].

A pesar de esta disparidad de datos lo encontrado en esta tesis sugiere que la enfermedad puede estar infradiagnosticada debido a esos signos inespecíficos que ya se comentaban anteriormente.

Entre los enfermos, se encontró el mismo número de hombres que de mujeres. En otros estudios tampoco se observaron diferencias importantes [93–95]. La mayoría de los casos se presentaron en verano y en otoño lo cual parece lógico porque coincide pasada la temporada de mayor actividad de las garrapatas que en esta época buscan alimento para la muda o la puesta de huevos. Por tanto, existe una mayor probabilidad de que se produzcan las picaduras

en las personas y una mayor tasa de infección, lo que concuerda con este estudio, donde son más frecuentes las manifestaciones tempranas.

Lo que si se aprecia es que las mujeres presentaban más EM (manifestación temprana y relacionada con una infección reciente) y los hombres más manifestaciones extracutáneas. Esto podría explicar que se encuentren más casos en mujeres en verano, cuando *Ixodes* presenta mayor actividad, y los casos de enfermedad en los hombres aparezcan durante todo el año con manifestaciones correspondientes a las etapas diseminadas o tardías.

La mitad de los pacientes estudiados recordaban haber sufrido una picadura de garrapata. Esta cifra es similar a la descrita en algunas series españolas que presentan tasas entre 45,37% y 55% [9,96], e inferior a otras series europeas en las que se alcanzan valores por encima del 70% [91,93]. En cualquier caso, no recordar la picadura de una garrapata o la presencia de lesiones cutáneas que asemejen un EM no deben ser razón para no realizar un estudio de *B. burgdorferi* s.l.

Las manifestaciones clínicas más frecuente de la enfermedad de Lyme en España, según Portillo et al. (2014) son el EM y los cuadros neurológicos tempranos [17]. En nuestra serie, el 63,16% de los casos presentó una clínica dermatológica, cifra próxima al 66,7 % descrita recientemente en un estudio realizado en el área sanitaria de Gijón perteneciente a nuestra comunidad autónoma [94] y ligeramente superior al 47,22% descrita en Lugo [9] comunidad autónoma vecina. Otras series españolas, sin embargo, presentan como la manifestación clínica más frecuente la afectación neurológica [97]. Es normal pensar que debido a un mayor conocimiento de la enfermedad y la alerta de la población sobre una picadura de garrapata, demande más atención médica y más temprana, lo que provoca que sea menos frecuente que aparezcan manifestaciones tardías de la misma. Los pacientes cada vez tienen más información sobre los signos y síntomas que pueden aparecer después de una posible infección por *Borrelia* spp lo que hace que acudan con anterioridad al médico y reciban el tratamiento antibiótico adecuado que evita el progreso de la infección.

En los 24 (2,02%) casos de enfermedad con afectación dermatológica todos se presentaron como una infección temprana localizada, eritema migratorio, salvo un paciente que presentó ACA. La cifra de casos de EM alcanzaría valores más elevados a los obtenidos si se incluyesen los pacientes diagnosticados clínicamente y a los que no se les solicitan pruebas de laboratorio. Muchos EM se suelen diagnosticar en los centros de atención primaria y resulta complicado recuperar el dato para conocer su incidencia real. Aunque la tasa de este trabajo

es superior a la observada en la zona occidental de Suiza (0,8%), en otros estudio realizados en Europa se alcanzan valores del 5,2% (3,4-7,5%)[98].

El paciente que presentaba ACA cumple con las características típicas de esta patología [23]: mujer mayor con afectación cutánea en ambas extremidades acompañada de polineuropatía. Además, esta paciente presentó el valor de anticuerpos de clase IgG más elevado de todo el estudio, lo que parecía ratificar su diagnóstico.

Los meses donde más casos de EM se diagnosticaron fueron junio, julio y agosto, que coincide con época de mayor actividad de la garrapata y con un periodo de alto contacto del hombre con la naturaleza. De hecho, fue en junio y julio la época del año en que más asistencia sanitaria se demandó para la retirada de garrapatas.

Entre los pacientes con EM, se encuentran diecisiete con presencia de anticuerpos de clase IgG en suero frente a *B. burgdorferi* s.l, de los cuales, once no presentaban anticuerpos de clase IgM. Se podría plantear varios motivos que expliquen la ausencia de anticuerpos de clase IgM. Por una parte, los pacientes tardaron mucho tiempo en solicitar atención médica y se produjo un aclaramiento de los mismos, no conceden a este tipo de lesión suficiente importancia (placa eritematosa por lo general no dolorosa) y/o desconocen las posibles complicaciones que pueden aparecer en ausencia de un tratamiento antibiótico adecuado como para acudir al médico de manera temprana. También es posible que los anticuerpos IgG sean resultado de una infección anterior y se trataría de una reinfección. La espiroqueta puede presentar antígenos ligeramente diferentes, de manera que los anticuerpos de clase IgG producidos con anterioridad no son capaces de evitar su desarrollo, ni la aparición de lesiones cutáneas. Los once pacientes a los que únicamente se les detectaba anticuerpos de clase IgG tenían una edad media por encima de los 60 años, seis tenían recuerdo de una picadura de garrapata previa y cinco presentaban algún factor de riesgo relacionado con la picadura. Prestando atención a los valores obtenidos en el estudio de seroprevalencia en esta región en el que se observa un claro aumento de ésta con la edad, más aún en los pacientes que tienen algún factor de riesgo de exposición a la picadura de garrapata, no es extraño pensar que los anticuerpos de tipo IgG detectados son fruto del recuerdo inmunológico, no detectándose anticuerpos de clase IgM como ocurre en la mayoría de las reinfecciones.

Un paciente con EM presentó anticuerpos de clase IgM mientras que el resultado de la prueba de inmunotransferencia fue negativa. Esta situación es propia de casos de infección muy reciente, donde la respuesta inmunológica aún está poco desarrollada. Podría

considerarse un hecho normal con el que hay que trabajar a diario en los laboratorios de Microbiología debido a que el ELISA muestra mayor sensibilidad que las pruebas de inmunotransferencia que se utilizan para confirmar la especificidad de los resultados.

Todos los pacientes con manifestaciones cutáneas salvo el que presentaba ACA, habían sido asistidos por equipos de atención primaria o en la unidad de urgencias del hospital y excepto dos, en la época de verano/ otoño en la cual la garrapata se considera que tienen más actividad. En todas estas historias se describía con claridad la lesión, por lo que cabe confirmar que los médicos del área están familiarizados con el EM. En estos casos, aunque la presentación cutánea es patognomónica de la enfermedad y no están recomendadas las determinaciones de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l, al igual que en el caso anterior, éstas tendrían utilidad para estudiar o detectar una posible seroconversión posterior que confirme el diagnóstico.

Las manifestaciones con afectación cutánea fueron las que aparecieron en edades más tempranas. En esta serie el paciente más joven tenía 28 años. Pero existe constancia de casos en pacientes con este tipo de manifestaciones con edades inferiores a 14 años en nuestro área sanitaria [99].

La clínica con afectación neurológica en esta serie representó el 0,51% de los casos estudiados (6 casos). La presentación más frecuente fue neuritis craneal en forma de parálisis facial (5 pacientes) en coherencia con ser el par craneal más comúnmente afectado de esta enfermedad. Se desconoce si estos pacientes presentaban pleocitosis linfocítica y respuesta intratecal de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* s.l, criterio diagnóstico de neuroborrelisis de Lyme en Europa [5]. En el área sanitaria estudiada se conoce que se dan las características epidemiológicas necesarias para la enfermedad de Lyme con manifestación neurológica. Ello hace que, en ausencia de otra etiología posible, la presencia de anticuerpos en suero se considere suficiente para admitir el diagnóstico definitivo y que no se realice la detección de anticuerpos en LCR cuando la afectación se limite al sistema nervioso periférico. A diferencia del estudio realizado por Rojko et al. (2019) [100], donde un tercio de los casos de enfermedad de Lyme con parálisis facial presentaban o recordaban un EM, en esta serie ninguno hacía referencia a haber presentado tal afectación. El trabajo mencionado recogía un importante número de casos, donde 64 pacientes cumplían todos los criterios necesarios para establecer el diagnóstico definitivo y hasta 120 cumplían criterios de casos posibles. En este

estudio el número de casos es pequeño como para determinar si esos valores son del todo correctos.

El otro paciente con enfermedad de Lyme y afectación neurológica presentaba una plexopatía braquial cuyo estudio en LCR tenía valores de proteínas por encima de lo normal y una marcada pleocitosis.

De los seis casos neurológicos solamente dos hombres recordaban haber tenido una picadura de garrapata previa y solo una mujer, que presentaba plexopatía braquial, hacía referencia al eritema migratorio.

El paciente más joven con manifestación clínica neurológica tenía 58 años, pero como señalábamos antes, existen casos en edades más tempranas. En el trabajo de Pérez et al. (2013) se describe un caso de parálisis facial en un niño de 13 años que había tenido una picadura por garrapata dos meses antes y que recordaba la aparición posterior a ésta de un eritema migratorio [99].

En la serie estudiada sorprende el gran número de pacientes, dieciocho, con posible afectación neurológica, por la presencia de anticuerpos en LCR, pero sin pruebas que lo confirmen (pleocitosis). Dos pacientes, aunque no presentaban pleocitosis, tenían una ligera alteración de las proteínas en LCR que hace pensar que podrían tratarse también de casos confirmados. Un paciente con síntomas de meningismo, había sido diagnosticado con anterioridad de neumonía recibiendo tratamiento con antibiótico. En esa atención se le había practicado la retirada de dos garrapatas del hemitórax derecho. En el momento del diagnóstico de la neuroborreliosis refería cefalea holocraneal y mialgias generalizadas en el último mes. La ausencia de pleocitosis podría relacionarse con el tratamiento antibiótico recibido a causa de la neumonía. Otro paciente con polineuropatía mixta, neuropatía sensitiva en guante y calcetín, presentaba leucocitos en el LCR por debajo de los valores considerados para establecer pleocitosis pero se observaba una elevación importante de las inmunoproteinas de clase IgG.

Los 18 pacientes con manifestaciones neurológicas que presentaban anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en suero y LCR al mismo tiempo y que no presentan pleocitosis u otras alteraciones en el LCR, se podían considerar que son reflejo de una neuroborreliosis pasada o no activa donde aún no se han aclarado los anticuerpos en el LCR. Puede ocurrir también que estos anticuerpos hayan logrado atravesar la barrera hematoencefálica de forma pasiva; este

hecho no se puede descartar ante la falta de la determinación del índice de albúmina y por eso no pueden incluirse como pacientes con diagnóstico de EL con presentación clínica neurológica.

En cuanto a los pacientes con clínica articular, al igual que los pacientes con patología neurológica, el número de casos en este estudio es escaso, sólo 6. En Europa las manifestaciones articulares también son poco frecuentes. Podemos señalar que aunque en ningún caso se reflejaba el recuerdo de eritema migratorio previo, en un estudio realizado por Stażyk et al (2019) solo la mitad de los pacientes con artritis de Lyme lo recordaban [101]. En los pacientes que tuvieron afectación en una única articulación, como suele ser habitual ésta se mostró, en una gran articulación: la rodilla y el hombro. La clínica articular de la enfermedad de Lyme es normal que se presente semanas o meses después de la picadura de la garrapata y por tanto los anticuerpos que se detectan son de clase IgG. Todos los casos los presentaban, aunque llama la atención que en cuatro de los seis pacientes también se detectaban anticuerpos de clase IgM. Este hecho ahonda la idea de que los anticuerpos de clase IgM no tienen un aclaramiento tan rápido como se pudiese esperar, y por tanto un resultado positivo no se traduce siempre en una infección reciente. Por otro lado, estos casos se observaron en otoño y en primavera, por lo que habría que comprobar si la afectación articular no es tan tardía como se afirma.

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme basado en los resultados de las determinaciones de anticuerpos detectadas en suero no es sencillo y plantea numerosos retos. Los estudios no siempre aportan la utilidad esperada. En áreas donde existe alta incidencia de enfermedad, se solicitan estudios de anticuerpos incluso cuando los síntomas no presentan una clara sospecha, lo que se convierte en numerosas ocasiones en un excesivo diagnóstico de la enfermedad y conlleva, en numerosas ocasiones, la administración de tratamientos antibióticos innecesarios.

Un 14,28% de los resultados positivos de la detección de anticuerpos no fueron confirmados, de ahí la importancia de realizar un segundo ensayo confirmatorio.

Por eso, siempre hay que valorar los resultados en un contexto clínico y epidemiológico y es muy importante conocer el entorno para un correcto diagnóstico y tratamiento.

Por otro lado, existen casos que no se llegan a diagnosticar debido a que los pacientes únicamente desarrollan una infección asintomática resolviéndose sin producir complicaciones que ni siquiera requieren solicitar atención médica.

En cualquier caso, los estudios microbiológicos de detección de anticuerpos tienen que complementarse con estudios epidemiológicos y de presencia y caracterización del vector para conocer el entorno en el que se realizan los diagnósticos. Por ello, otro objetivo de la tesis fue realizar un estudio de campo para determinar la distribución de las garrapatas en el área y la presencia de las distintas genoespecies de *Borrelia* spp patógenas en el vector, así como, en las garrapatas que se retiraban de los individuos que solicitaban la atención sanitaria.

Este estudio demuestra la presencia en la vegetación de cuatro géneros diferentes de garrapatas duras en el suroccidente asturiano: *Ixodes, Dermacentor, Rhipicephalus, Haemaphysalis*. La presencia de estos géneros se encuentra descrita en otras zonas de la comunidad autónoma [102] y la distribución coincide con otros trabajos realizados en el norte de España [94,103,104], sin embargo contrasta con estudios realizados en el centro peninsular donde prácticamente no se recuperaron ejemplares de *Ixodes* spp [56,105]. En el concejo de Cangas fue donde más variedad de géneros se recuperaron, pero puede ser debido a que el muestreo se hizo en más ocasiones y en zonas más variadas que en el resto de concejos, donde la recogida se realizó en uno o dos días y en el mismo lugar.

Por otra parte, se recuperaron garrapatas de los tres estados evolutivos diferentes del género *Ixodes* spp. De los otros géneros únicamente se encontraron ejemplares en la etapa adulta. La presencia de larvas del género *Ixodes* es muy escasa, podría estar en relación a su pequeño tamaño y su pálido color que hace que pasen más desapercibidas si no se buscan minuciosamente. Un estudio previo también refleja una baja presencia de estas larvas en la zona [106]. En los ejemplares del género *Dermacentor,* tanto las ninfas como las larvas habitan en madriguera y nidos de pequeños mamíferos, y resulta en este caso poco eficaz el método de recogida. Por otra parte, de las especies más habituales del género *Rhipicephalus*, bien las formas inmaduras tienen una marcada estacionalidad que no coincide con la temporada en que se realizó la recogida, o son nidícolas (con una cercana relación con los perros) siendo más difícil su recuperación fortuita.

Más del 90% de las garrapatas localizadas en la vegetación pertenecían al género *Ixodes*. Las ninfas de *Ixodes* spp fue el ejemplar que se encontró con mayor frecuencia. En este caso, el número de ejemplares en la vegetación de ninfas es ligeramente superior al de los adultos. Las larvas del género *Ixodes*, se recuperaron únicamente en tres ocasiones, quizás esto está justificado por su tamaño tan pequeño y por su escaso tiempo de alimentación, de

tres a cinco días. Además, las larvas suelen encontrarse en la parte más baja de la vegetación, para evitar la desecación que produciría su muerte, lo que dificulta su contacto con el hombre.

Si se analizan las retiradas de los individuos atendidos por los profesionales sanitarios, se recogieron con mayor frecuencia en los meses de Mayo, Junio y Julio que coincide en la época de actividad de este tipo de garrapatas.

En los episodios de picadura por una garrapata en estado adulto, tanto en el género *Ixodes* como en *Dermacentor*, se encontró mayor número de hembras que de machos. Las hembras necesitan mayor cantidad de sangre para alimentarse y poder después realizar la puesta de huevos, esto supone un mayor tiempo de contacto con el huésped. Su mayor permanencia en la piel permite detectar en más ocasiones estos ejemplares. Al contrario, los machos se alimentan más rápidamente soltándose primero del huésped; en el género *Ixodes*, incluso, estos tienen las piezas bucales menos desarrolladas, lo que dificulta aún más su fijación con éxito a la piel. También se observó que el número de hembras recogidas de la vegetación era superior al de los machos, en ambos géneros, lo que supone una mayor probabilidad de que la picadura se realice por una hembra.

Cabe destacar que el estado evolutivo de las garrapatas retiradas de los pacientes más frecuente fue el de ninfa, esto puede explicarse por la dificultad que tienen para ser visualizadas a razón de su menor tamaño. Por el contrario, los adultos se visualizan más fácil evitando incluso, en muchas ocasiones, mediante su retirada temprana que se lleguen a enganchar.

No se retiró de las personas ningún tipo de garrapata distinto a los encontrados en la vegetación.

En un estudio de Merino et al. (2005) [107] realizado en Soria durante cinco años, el mayor número de garrapatas retiradas de pacientes pertenecían al género *Dermacentor*, seguido de *Ixodes*. Esta diferencia puede deberse a la distinta distribución de géneros de garrapatas en las distintas zonas del país.

Por otro lado, se observa que la retirada de garrapatas se realizó con mayor frecuencia en hombres que en mujeres. Analizando los datos por tipo de garrapatas, esto mismo ocurre cuando la picadura es por un ejemplar del género *Ixodes* spp, pero al estudiar las picaduras por *Dermacentor* spp estas fueron más frecuentes en mujeres. Esta peculiaridad del género *Dermacentor* spp ya está descrita en anteriores trabajos pero no parece existir una causa que lo justifique, sobre todo si se tiene en cuenta que es más frecuente que ocurra en los meses

fríos [108–110]. Una explicación posible podría ser que en estos casos el vector esté vehiculizado (leña, animales de compañía…) y tengan menor impacto la realización de prácticas de riesgo ambientales o que en épocas de frío el ganado está más localizado en el entorno doméstico y aumente en mayor proporción el contacto con las personas. Aunque en el entorno rural las labores tanto de labranza como de ganadería se realizan indistintamente por ambos sexos, en el caso de las actividades de entretenimiento al aire libre (caza, pesca, bicicleta de montaña, etc.) se siguen realizando principalmente por hombres, lo que supone mayor contacto con la naturaleza, mayor tiempo de exposición a las garrapatas y por tanto, mayor riesgo de picadura. Posiblemente en el futuro exista un cambio al respecto: la práctica de la caza, donde quizás la presencia del hombre sea la más acusada, se práctica con menor frecuencia de día en día; y sin embargo, en el resto de actividades de práctica deportiva o de recreo al aire libre cada vez es más frecuente la presencia de la mujer.

Las picaduras de garrapata tuvieron lugar prácticamente todos los meses del año. Aunque las garrapatas presentan épocas de baja actividad y desarrollo, y cada tipo de garrapata presenta mayor o menor actividad según la época, se pueden encontrar especímenes activos durante todo el año. Esto se ve reflejado en los casos de enfermedad con manifestación clínica temprana, EM, donde en casi todos los meses del año se registró algún caso.

Todos los pacientes a los que se les retiró más de una garrapata en el mismo episodio, salvo uno, presentaban un factor de riesgo de tipo ocupacional o recreacional. Este dato se corrobora con la mayor detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* s.l en los individuos con dichas actividades frente a los que no indicaban las mismas.

En relación a la localización anatómica de la picadura, la mayor parte tuvo lugar en alguna extremidad, y su frecuencia fue un poco más elevada en las extremidades inferiores que en las superiores. La mayoría de las picaduras se produjeron en épocas donde se acusa el calor y las extremidades suelen ir destapadas, quedando más expuestas. Este hecho resalta la importancia de la prevención mediante el uso de prendas de manga larga y pantalones largos que evitarían que la garrapata llegara a engancharse en la piel. Sorprende que 25 picaduras de garrapata se produjeron en la zona de la cabeza o cuello y un tercio tuviera lugar en niños menores de 10 años, característica propia del género *Dermacentor* [111] . En este estudio el *Dermacentor* se encontró en esta localización en 13 de los 25 casos.

Las garrapatas retiradas de pacientes incluidas en este estudio se recogieron con la colaboración de los médicos del área sanitaria. Hubiese sido muy útil, recopilar datos clínicos y de aparición de enfermedad. Pero desafortunadamente no fue posible realizar el seguimiento de estos pacientes debido a que no volvieron a solicitar atención médica. De hecho, los estudios de anticuerpos que se realizaron no arrojaron muchos datos, bien por su precocidad o por su carencia.

Esto refuerza la idea de que los estudios de anticuerpos deben estar motivados por la presencia de manifestaciones clínicas cutáneas atípicas o dispersas o manifestaciones propias de la infección diseminada o tardía, donde ha pasado el tiempo suficiente para producirse el desarrollo de los anticuerpos. También es importante hacer hincapié en realizar una determinación de anticuerpos en una segunda muestra, cuando estos están ausentes en la primera y la clínica es sugerente, para valorar una posible seroconversión.

En la mayoría de los laboratorios se siguen utilizando las técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, pero cada vez es más habitual complementarlas con el uso de técnicas basadas en la detección del material genómico. Estas técnicas presentan la ventaja de permitir demostrar la presencia del agente causal en la muestra estudiada. Aunque en principio sería una prueba de infección activa, esto no siempre es del todo cierto, en ocasiones se detecta el ADN de la espiroqueta muerta después de haber realizado un tratamiento antibiótico adecuado [112].

A la recogida de las garrapatas se sumó un trabajo de laboratorio aplicando técnicas de detección genómica para valorar la presencia de la bacteria. Incluso se diseñó una técnica de PCR-tr con el fin de simplificar el ensayo y obtener mayor cantidad de datos, como la cuantificación bacteriana presente en cada muestra.

En este proyecto se comenzó utilizando una PCR para la detección de *B. burgdorferi* s.l descrita por Toledo et al. (2009)[56] que presentaba el inconveniente de su larga duración al amplificar un fragmento de casi 500 pb. Con el fin de reducir el tiempo de detección se diseñaron unos oligonucleótidos en el laboratorio, que si bien presentaban buenos resultados comparándolos con la técnica utilizada de referencia y reducían considerablemente el tiempo de desarrollo, de 4 horas a 1 hora y media escasa, seguía manteniendo el inconveniente de necesitar el uso de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para la lectura de los resultados. En ese momento, se introdujo la utilización de una sonda, también diseñada en el laboratorio, y se realizaron los ensayos oportunos para comprobar su utilidad. El resultado

final fue el desarrollo y validación de una técnica de amplificación genómica a tiempo real (PCR-tr) para la detección de *B. burgdorferi* s.l, con resultados en menos de una hora y media, con una especificidad del 100% y un límite de detección de 14 copias. Presenta la ventaja respecto a la técnica utilizada en un principio, que es más rápida y más sencilla de realizar, simplifica el equipamiento y disminuye la necesidad de espacio, realizando en un único equipo los procesos de amplificación y lectura del resultado. El inconveniente principal sería conseguir el termociclador oportuno, algo que no resulta difícil en los laboratorios de microbiología clínica de nivel 3, pero sí en los de niveles menores.

El uso de la sonda permitió aumentar la sensibilidad en la detección de *B. burgdorferi* s.l. y detecta *B. burgdorferi* s.l en nueve muestras más que cuando no se utiliza aunque en cinco muestras no se obtuvieron resultados. Una explicación a esto puede ser que la sonda diseñada no presente la misma sensibilidad para todas las genoespecies que comprenden el complejo *B. burgdorferi* s.l. Esta hipótesis no se pudo confirmar porque en ninguna de las cinco muestras se realizó la identificación de la genoespecie mediante secuenciación.

La utilización de esta PCR-tr permitiría hacer una cuantificación normalizada de *B.burgdorferi* s.l al aplicarla en muestras clínicas tomando de referencia el gen de la *β-globina* humana [113]. Incluso puede contemplarse la posibilidad, con el diseño de sondas específicas para determinadas genoespecies, de identificar diferentes genoespecies en una única determinación, sin la necesidad de procesos más complejos como la secuenciación, utilizando sondas marcadas con distintos fluoróforos.

La técnica de PCR-tr se aplicó en las muestras que habitualmente se reciben en el laboratorio para el diagnóstico de la infección, suero y LCR, no obteniendo resultados positivos en ninguna de ellas. Las técnicas de detección genómica han presentado una sensibilidad aceptable cuando se han utilizado en muestras de piel en casos de EM, o en muestras de líquido o tejido sinovial [31]. La sensibilidad de la detección de *B.burgdorferi* s.l en LCR no suele superar del 25%, alcanzando los valores más elevados (38%) en etapas tempranas de la enfermedad. En muestras de suero las espiroquetas han sido recuperadas en cultivo en pacientes con EM, incluso después de transcurrido más de un mes de aparecer la lesión, pero la sensibilidad de las técnicas de PCR es baja [53]. Es importante señalar que se desconoce el tiempo transcurrido desde la aparición de los signos o síntomas de la enfermedad hasta el momento en que se realiza la toma de la muestra. A pesar de que de la bacteria se disemina vía hematógena desde la piel a otros órganos o tejidos, la espiroquetemia es transitoria

pudiendo no coincidir la presencia del microorganismo en la sangre en el momento de la toma de muestra [114]; y aunque la técnica presentó un límite de detección de la bacteria muy bajo, hay que tener en cuenta que su presencia en el LCR y otros fluidos es muy escasa [22].

Por tanto y ante estos resultados de PCR en muestras de suero o LCR, en la práctica clínica la detección de anticuerpos es aún la herramienta para el diagnóstico de la enfermedad. Tienen que realizarse más ensayos utilizando otro tipo de muestra como plasma o sangre completa, e intentar determinar un momento óptimo para su obtención. Otro factor que puede explicar la baja sensibilidad en muestras clínicas es el uso de la resina Chelex® en el proceso de extracción del material genómico. Aunque es un producto económico, el protocolo es sencillo y sirvió para llevar a cabo el objetivo planteado de detectar las espiroquetas en las muestras de garrapatas, en el caso de las muestras clínicas, estaría más indicado el uso de métodos de extracción más sensibles mediante sistemas automatizados rápidos y minuciosos, como se hizo con las muestras de LCR, con los que se puedan obtener productos con menos impurezas que pueden interferir en el rendimiento de los resultados.

Aumque en las muestras clínicas los resultados no fueron los esperados, la nueva técnica permitió detectar *B.burgdorferi* s.l en las garrapatas. A pesar de su idoneidad el estudio en las garrapatas retiradas de las personas no puede utilizarse como diagnóstico de la enfermedad porque la simple picadura, incluso de garrapatas portadoras de *B. burgdorferi* u otro patógeno, no implica una transmisión efectiva. En estudios realizados en Europa se confirma el bajo riesgo de desarrollar enfermedad de Lyme después de una picadura y la posibilidad de que esta sea asintomática [115–117]. Sin embargo, la detección de ADN de *Borrelia* en las garrapatas aporta información valiosa sobre la epidemiologia de las infecciones que pueden ser transmitidas durante la picadura.

En este estudio se pudo determinar la presencia de *Borrelia* en las garrapatas retiradas de 20 (11%) individuos. Este porcentaje es similar al encontrado en el conjunto del trabajo.

En el total de las garrapatas analizadas, la presencia de *B .burgdorferi* s.l fue importante, ya que se detectó en un 13,84%, cifra que alcanzó el 14,70% en el género *Ixodes*.

En el género *Rhipicephalus* spp y en el género *Dermacentor* spp se encontró *B. burgdorferi* s.l en un 13,04% y un 4,25% respectivamente. Aunque ha sido descrita anteriormente su presencia en este tipo de garrapatas [94] no está bien establecida su capacidad de transmisión al hombre [118].

La tasa obtenida en el género *Ixodes* es inferior a la descrita en el noroeste de la península 18,75%, superior a la de la Península Ibérica 9,5% , a la de otras zonas del norte de España 9,3%, 1,7% [120], y similar a la prevalencia media general encontrada en Europa 14,13%, 13,7% [119–123].

Las tasas de infección de las garrapatas por *B. burgdorferi* presentan importantes variaciones según la localidad estudiada. La influencia por factores medioambientales como el clima, la vegetación y la diversidad de hospedadores provocan variaciones en los resultados.

En Europa, la prevalencia de *B. burgdorferi* spp en garrapatas del género *Ixodes ricinus*, presenta valores muy dispares alcanzando los más elevados en regiones de centro Europa [123]. Resulta difícil realizar conclusiones en las comparaciones obtenidas en los resultados de otros países y de otras regiones de España debido a la falta de uniformidad en el sistema de recogida de los ejemplares (método, época de año…) y en la diversidad de técnicas utilizadas para la detección de *B. burgdorferi* s.l (inmunofluorescencia, cultivo, detección genómica). Los resultados obtenidos en este trabajo estarían incluidos en el grupo europeo de las regiones de baja infección (en ejemplares adultos valores inferiores al 20% y en ninfas inferiores al 11%).

El porcentaje obtenido de la presencia de *B. burgdorferi* s.l en ejemplares de *Ixodes* spp y *Rhipicephalus* spp recolectados de la vegetación es parecido, pero este primer tipo de garrapata es 36 veces más abundante en el medio, lo que supone un mayor riesgo de su picadura. Sin olvidar que *Rhipicephalus* spp es un género que tiene poca afinidad por el hombre. De hecho, no se obtuvo ningún ejemplar retirado de personas. Las garrapatas del género *Dermacentor* spp también presentan una prevalecía menor que *Ixodes*, pero a diferencia de las anteriores, en este estudio sí se han recuperado ejemplares de personas, no pudiendo descartar que transmitan *Borrelia* durante la picadura.

Según la procedencia de estas garrapatas, solo pueden compararse los resultados de la presencia de *B. burgdorferi* s.l en el género *Ixodes*. Y por los datos analizados no se encuentran diferencias importantes en la prevalencia de *B. burgdorferi* recolectadas de la vegetación o de las retiradas de personas. La proporción de *B. burgdorferi* s.l es ligeramente inferior en las hembras retiradas en humanos. Esto podría explicarse porque el hombre no es un reservorio de *Borrelia*, es un hospedador final. Las garrapatas se alimentan de su sangre pero no obtienen agentes infecciosos en el intercambio de fluidos. Incluso podría ocurrir lo contrario, que existiese un aclaramiento de la garrapata al introducir toda la carga de la espiroqueta en el hombre durante la alimentación, como puede ocurrir cuando se alimentan en rumiantes [27].

En relación a la etapa de desarrollo de las garrapatas en el género *Ixodes* se observaron valores de infección por *B. burgdorferi* s.l en 25,68% de los ejemplares adultos (30,04% hembras, 19,13% machos) y en 6.96% de las ninfas. Esta peculiaridad ya está descrita con anterioridad en otros trabajos [124–126]. Parece normal pensar que los ejemplares adultos han realizado más ingestas de sangre que las ninfas por lo que presentan más probabilidad de haber adquirido la bacteria del hospedador.

Los análisis de caracterización genómica por métodos de secuenciación permitieron la identificación de cinco genoespecies diferentes, verificando la diversidad que ha sido encontrada anteriormente en España y que coincide con las más comunes que circulan en Europa y con las descritas en nuestra comunidad autónoma. La bacteria más frecuente fue *B. lusitaniae* seguido con diferencia de *B. garinii, B. afzelii, B. valaisiana* y *B. burgdorferi* s.s. Resultados diferentes se encontraron en la zona oriental del Principado de Asturias, donde la genoespecie más frecuente fue *B. afzelii* en *I. ricinus* [94]*;* probablemente en nuestra zona también exista en mayor proporción a la hallada y hay que recordar que la muestra del estudio era representativa, pero pequeña.

La manifestaciones más frecuentes en el estudio fueron de naturaleza cutánea y éstas están relacionadas principalmente con *B. afzelii*. En Europa, las genoespecies predominantes son *B. garinii* y *B. afzelii,* y se observa que la proporción de *B. afzelii* y *B. burgdorferi* s.s aumenta de sur a norte disminuyendo *B. lusitaniae* en la misma dirección lo que podría verse reflejado en estos datos [119].

La presencia de *B. lusitaniae* en la zona, en proporción superior al resto de las genoespecies, sugiere la posibilidad de que pueden existir más casos de infección por esta genoespecie que hasta le fecha ha sido recuperada ocasionalmente de muestras clínicas de pacientes y no está reconocida como un patógeno importante. Puede ser que las infecciones causadas por este tipo de *Borrelia* sean más leves o que presenten signos y síntomas clínicos no característicos de la enfermedad de Lyme y que no se lleguen a diagnosticar correctamente.

Por otra parte, con trabajos de este tipo se pueden aclarar conceptos y quizás en el futuro el papel de *B. lusitaniae* en la enfermedad adquiera otra dimensión.

En el análisis de detección de microorganismos en las garrapatas de nuestra zona, no sólo encontramos *B. burgdorferi* s.l, también se demostró la presencia de *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum*. Estos microorganismos también provocan infecciones

importantes y que en ocasiones pueden confundirse con los síntomas provocados por la *Borrelia.*

Anaplasma phagocytophilum comparte vector con *B. burgdorferi* y aunque ha sido encontrado en otros géneros diferentes a *Ixodes,* siempre ha sido en menor proporción. El hecho de que en este trabajo únicamente se detecte en *Ixodes* puede ser debido al escaso número de ejemplares de otros géneros. En *Ixodes* encontramos menor proporción de *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum* que de *B. burgdorferi* s.l.

La picadura de *Dermacentor* spp en el hombre es menos frecuente, pero ha sido capaz de transmitir otros agentes patógenos entre los que se encuentran distintas especies de *Rickettsia* spp. En este estudio en *Dermacentor* spp la proporción de *Rickettsia* spp fue mayor que de *B. burgdorferi* s.l. Este dato resulta importante para dirigir el diagnóstico microbiológico, ya que si se conoce el tipo de garrapata y pertenece al género *Dermacentor,* se debería incluir en el algoritmo diagnóstico la *Rickettsia* spp. Pero no podemos olvidar que los estudios de prevalencia de agentes infecciosos en las garrapatas locales tienen un valor limitado en términos de evaluación de riesgo epidemiológico ya que depende en gran parte del éxito de la transmisión.

En el estudio se demostró la co-infección de *Borrelia* spp y *Anaplasma phagocytophilum* en las garrapatas. Esta co-infección también se podría sospechar en el hombre cuando se presenta un cuadro de picadura de garrapata con fiebre elevada y marcada afectación general.

El presente trabajo pone en conocimiento la tasa de prevalencia frente a *B. burgdorferi* s.l en el suroccidente de Asturias, un área donde la enfermedad de Lyme es endémica y donde se puede encontrar variedad de manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad, aunque la forma que predomina es la cutánea. El conocimiento de la población diana, época de ataque y vehículo de transmisión, además de los datos obtenidos de los vectores, permiten definir y mejorar el diagnóstico microbiológico. Otra manera de mejorar el diagnóstico, será realizar ensayos posteriores utilizando técnicas sencillas, como la desarrollada en este trabajo, que abarquen todos los agentes etiológicos relacionados con esta patología y en diferentes tipos de muestras.

Los datos aportados de prevalencia de anticuerpos y de infección de garrapatas permiten abordar el diagnóstico de esta infección con mejor criterio y pueden ser el punto de partida de

nuevos estudios que completen los datos en el mapa de Asturias y en el resto de España en relación a la Enfermedad de Lyme.

6. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* sensu lato en el suroccidente de Asturias es alta y alcanza su valor máximo en hombres mayores de 65 años. También es relevante en donantes de sangre.

2. Las personas con anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* sensu lato presentaban más factores de riesgo característicos de la enfermedad de Lyme y más episodios de picadura de garrapatas que los individuos que carecían de ellos.

3. La manifestación clínica más frecuente de la enfermedad en la zona estudiada fue la dermatológica, en forma de eritema migratorio aislado, seguida de afectación neurológica, principalmente parálisis facial, y afectación articular con artralgia como signo más común.

4. La técnica diseñada de amplificación genómica resultó válida y permitió la detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en las garrapatas.

5. En el suroccidente asturiano se encuentran cuatro tipos diferentes de garrapatas duras. El género *Ixodes* fue el más abundante, se recolectó en todos los concejos, fue el más numeroso en los episodios de picadura en las personas y se retiró con mayor frecuencia de las extremidades.

6. Existe un alto porcentaje de garrapatas en la zona estudiada infectadas con *Borrelia burgdorferi* sensu lato, mayoritariamente hembras del género *Ixodes*.

7. Se encontraron hasta cinco genoespecies diferentes de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en las garrapatas investigadas, la más frecuente fue *Borrelia lusitaniae.*

8. Los patógenos *Rickettsia* spp y *Anaplasma phagocytophilum* están presentes en las garrapatas en el suroccidente de Asturias, pero en menor frecuencia que *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Rickettsia spp* se encontró principalmente en garrapatas del género *Dermacentor.*

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Steere AC, Malawista SE, Snydman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, et al. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. Arthritis Rheumatol [Internet]. 1977 Jan 1 [cited 2018 Feb 27];20(1):7–17. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/art.1780200102

2. Weber K. Aspects of Lyme Borreliosis in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2001 [cited 2018 Apr 17]; Available from:

   https://outlook.live.com/owa/?mkt=es-es&path=/attachmentlightbox

3. Burgdorfer W, Barbour A, Hayes S, Benach J, Grunwaldt E, Davis J. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science (80-) [Internet]. 1982 Jun 18 [cited 2019 Jul 2];216(4552):1317–9. Available from:

   http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7043737

4. Steere AC. Lyme Disease. N Engl J Med [Internet]. 1989 Aug 12;345(2):586–96. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198908313210906

5. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld K-P, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, et al. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clin Microbiol Infect. 2011;17:69–79.

6. Solomon CG, Shapiro ED. Lyme Disease. Solomon CG, editor. N Engl J Med [Internet]. 2014 May 30 [cited 2018 Mar 5];370(18):1724–31. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1314325

7. Snydman DR. Lyme disease. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2017 [cited 2018 Feb 19];45:743–6. Available from:

   https://www-clinicalkey-es.bvgcsalud.a17.csinet.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S1357303917302451.pdf?locale=es_ES

8. Vandekerckhove O, De Buck E, Van Wijngaerden E. Lyme disease in Western Europe: an emerging problem? A systematic review. Acta Clinica Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine. Taylor and Francis Ltd.; 2019.

9. Vázquez-López, María Esther, Pego-Reigosa, Robustiano, Díez-Morrondo, Carolina, Castro-Gago M, Díaz P, Fernández, Gonzalo, Morrondo P. Epidemiología de la enfermedad de Lyme en un área sanitaria del noroeste de España. Gac Sanit. 2015;29(3):213–6.

10. Schramm F, Grillon A, Martino S De, Jaulhac B. La borréliose de Lyme. Rev Francoph des Lab. 2013 Dec;2013(457):35–49.

11. Brisson D, Drecktrah D, Eggers CH, Samuels DS. Genetics of Borrelia burgdorferi. Annu Rev Genet [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2018 Apr 10];46(1):515–36. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-011112-112140

12. Munson E, Carroll KC. An Update on the Novel Genera and Species and Revised

Taxonomic Status of Bacterial Organisms Described in 2016 and 2017. J Clin Microbiol [Internet]. 2019 Sep 1;57(2). Available from:

https://jcm.asm.org/content/57/2/e01181-18

13. Adeolu M, Gupta RS. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus Borrelia into two genera: The emended genus Borrelia containing only the members of the relapsing fever Borrelia, and the genus Borreliella gen. nov. containing the members of The Lyme disease Borrelia (Borrelia burgdorferi sensu lato complex). Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2014;105(6):1049–72.

14. Alan G. Barbour 1 Mobolaji Adeolu2, and Radhey S. Gupta. Division of the genus Borrelia into two genera (corresponding to Lyme disease and relapsing fever groups) reflects their genetic and phenotypic distinctiveness and will lead to a better understanding of these two groups of microbes (Margos et al. (2016) There is inadequate evidence to support the division of the genus Borrelia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. doi: 10.1099/ijsem.0.001717) [Internet]. Vol. 67, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Microbiology Society; 2017. p. 2058–67. Available from: https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=56bb84c0-c3db-b673-43fb-fbab96e0c525&documentId=e06c65da-30ee-30ff-8a11-1871cedaced0

15. Margos G, Marosevic D, Cutler S, Derdakova M, Diuk-Wasser M, Emler S, et al. There is inadequate evidence to support the division of the genus Borrelia. Vol. 67, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Microbiology Society; 2017. p. 1081–4.

16. Stanek G, Wormser G., Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet. 2012 Feb;379(9814):461–73.

17. Portillo A, Santibáñez S, Oteo JA. Enfermedad de Lyme. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;32(Supl.1):37–42.

18. Clark KL, Leydet BF, Hartman S. Lyme borreliosis in human patients in Florida and Georgia, USA. Int J Med Sci [Internet]. 2013;10(7):915–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781138

19. Clark KL, Leydet BF, Threlkeld C. Geographical and genospecies distribution of Borrelia burgdorferi sensu lato DNA detected in humans in the USA. J Med Microbiol [Internet]. 2014 May 1 [cited 2018 Oct 1];63(Pt_5):674–84. Available from: http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.073122-0

20. Pritt BS, Petersen JM. Borrelia mayonii: prying open Pandora's box of spirochetes – Authors' reply. Lancet Infect Dis [Internet]. 2016;16(6):637–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30053-6

21. Borrelia burgdorferi bacteria darkfield microscopy [Internet]. [cited 2018 Apr 18]. Available from: http://www.bacteriainphotos.com/borrelia_darkfield_microscopy.html

22. Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of Infection with Borrelia burgdorferi. Infect Dis

Clin North Am. 2008.

23. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JWR, et al. Lyme borreliosis. Nat Rev Dis Prim. 2016;2.

24. Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez F. Parasitología veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, editor. España; 2000.

25. Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of Ticks. Infectious Disease Clinics of North America. 2008.

26. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis [Internet]. 2001;32(6):897–928. Available from: http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/32/6/897

27. Richter D, Matuschka FR. Elimination of lyme disease spirochetes from ticks feeding on domestic ruminants. Appl Environ Microbiol. 2010 Nov;76(22):7650–2.

28. kantor F. La enfermedad de Lyme. Investig Cienc. 1994;nov:6–10.

29. Wormser GP. Early Lyme Disease. N Engl J Med [Internet]. 2006 Jun 29 [cited 2018 Mar 6];354(26):2794–801. Available from:

http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp061181

30. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. FEMS Microbiol Rev. 2018;

31. Bush LM, Vazquez-Pertejo MT. Tick borne illness—Lyme disease. Vol. 64, Disease-a-Month. Mosby Inc.; 2018. p. 195–212.

32. Nau R, Christen HJ, Eiffert H. Lyme-Borreliose -Current State of Knowledge. DtschÄrztebl [Internet]. 2009;106(5):72–81. Available from:

c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CBakteriologie-PDFs%5CBakt-2009%5CNau et al.-Lyme-Borreliose - aktueller Kenntnisstand.pdf

33. Biesiada GG, Czepiel J, Leśniak MR, Garlicki A, Mach T. Lyme disease: review. Arch Med Sci [Internet]. 2012 Dec 20;8(6):978–82. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319969

34. Gocko X, Lenormand C, Lemogne C, Bouiller K, Gehanno J-F, Rabaud C, et al. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies. Med Mal Infect [Internet]. 2019 Aug [cited 2019 Aug 31];49(5):296–317. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399077X19306201

35. Shapiro ED. Borrelia burgdorferi (Lyme disease). Pediatr Rev [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Oct 6];35(12):500–9. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452659

36. Sehgal V, Khurana A. Lyme disease/borreliosis as a systemic disease. Clin Dermatol [Internet]. 2015;33:542–50. Available from:

https://www-clinicalkey-es.bvgcsalud.a17.csinet.es/#!/content/journal/1-s2.0-S0738081X15001212

37. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis–from tick bite to diagnosis and treatment. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2018 May 1 [cited 2018 Dec 17];42(3):233–58. Available from: https://academic.oup.com/femsre/article/42/3/233/4904097

38. Olmo Montes FJ, Sojo Dorado J, Peñas Espinar C, Muniáin Ezcurra MA. Borrelia species: Lyme disease and relapsing fever | Infecciones producidas por borrelias: enfermedad de Lyme y fiebre recurrente. Med [Internet]. 2014 [cited 2018 Feb 19];11(51):3009–17. Available from:

https://www-clinicalkey-es.bvgcsalud.a17.csinet.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0304541214707310.pdf?locale=es_ES

39. Warshafsky S, Lee DH, Francois LK, Nowakowski J, Nadelman RB, Wormser GP. Efficacy of antibiotic prophylaxis for the prevention of Lyme disease: An updated systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2010 Apr 9;65(6):1137–44.

40. O 'connell S. Lyme borreliosis. 2014 [cited 2018 Feb 19]; Available from: https://www-clinicalkey-es.bvgcsalud.a17.csinet.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S1357303913002971.pdf?locale=es_ES

41. Borchers AT, Keen CL, Huntley AC, Gershwin ME. Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. J Autoimmun [Internet]. 2015 Feb [cited 2018 Nov 1];57:82–115. Available from:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841114001334

42. Tibbles CD, Edlow JA. Does this patient have erythema migrans? JAMA [Internet]. 2007 Jun 20 [cited 2018 Nov 1];297(23):2617–27. Available from:

http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.297.23.2617

43. Bockenstedt LK, Wormser GP. Unraveling Lyme Disease [Internet]. Vol. 66, Arthritis Rheumatol. NIH Public Access; 2014 [cited 2018 Nov 18]. p. 2313–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24965960

44. Aguero-Rosenfeld ME. Lyme Disease: Laboratory Issues [Internet]. Vol. 22, Infectious Disease Clinics of North America. 2008 [cited 2018 Mar 22]. p. 301–13. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552007001225

45. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med. 1984;57(4):521–5.

46. Wilske B. Diagnosis of lyme borreliosis in europe. Vector Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2003 Dec;3(4):215–27. Available from:

http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/153036603322662200

47. Cutler SJ, Rudenko N, Golovchenko M, Cramaro WJ, Kirpach J, Savic S, et al. Diagnosing

Borreliosis. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017;

48. Hu LT. Lyme Disease. Ann Intern Med [Internet]. 2016 May 3 [cited 2018 Nov 2];164(9):ITC65. Available from:

http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/AITC201605030

49. Mead P, Petersen J, Hinckley A. Updated CDC Recommendation for Serologic Diagnosis of Lyme Disease. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2019 Aug 16;68(32):703.

50. Branda JA, Linskey K, Kim YA, Steere AC, Ferraro MJ. Two-tiered antibody testing for lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole-cell sonicate enzyme immunoassay followed by a vlse c6 peptide enzyme immunoassay. Clin Infect Dis [Internet]. 2011 Sep 15 [cited 2018 Nov 27];53(6):541–7. Available from: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir464

51. Leeflang MMG, Ang CW, Berkhout J, Bijlmer HA, Van Bortel W, Brandenburg AH, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis [Internet]. 2016 Mar 25 [cited 2018 Nov 4];16:140. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4807538/

52. Miraglia CM. A Review of the Centers for Disease Control and Prevention's Guidelines for the Clinical Laboratory Diagnosis of Lyme Disease. Vol. 15, Journal of Chiropractic Medicine. Elsevier USA; 2016. p. 272–80.

53. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul 1;18(3):484–509.

54. Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. Lyme neuroborreliosis - Epidemiology, diagnosis and management. Vol. 11, Nature Reviews Neurology. Nature Publishing Group; 2015. p. 446–56.

55. Van Dam AP. Molecular diagnosis of Borrelia bacteria for the diagnosis of Lyme disease. Vol. 5, Expert Opinion on Medical Diagnostics. 2011. p. 135–49.

56. Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcárcel F, Casado-Nistal MA, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2009 Jul;81(1):67–74. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556569

57. Cardenas-de la Garza JA, De la Cruz-Valadez E, Ocampo-Candiani J, Welsh O. Clinical spectrum of Lyme disease. Vol. 38, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Springer Verlag; 2019. p. 201–8.

58. Raffetin A, Saunier A, Bouiller K, Caraux-Paz P, Eldin C, Gallien S, et al. Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: a systematic review. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2019 Jul 12 [cited 2019 Aug 31]; Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31306793

59. Astursalud - Mapa sanitario de Asturias [Internet]. [cited 2018 Jan 30]. Available from:

https://www.astursalud.es/en/noticias/-/noticias/mapa-sanitario-de-asturi-1

60. Astursalud - Población del padrón municipal 2018 de Asturias según el Mapa Sanitario [Internet]. [cited 2019 Jan 30]. Available from: https://www.astursalud.es/noticias/-/noticias/poblacion-del-padron-municipal-2018-de-asturias-segun-el-mapa-sanitario

61. SADEI - Sociedad Asturiana de Estudios Económicos e Industriales / Información estadística / Reseña estadística de los municipios asturianos [Internet]. [cited 2019 Jan 30]. Available from: http://www.sadei.es/es/portal.do?IDM=20&NM=2

62. U.S. Departament of Health and Human Services, CDC. Tick Bite:What to Do [Internet]. [cited 2019 Oct 20]. Available from: https://www.cdc.gov/ticks/pdfs/FS_TickBite-508.pdf

63. Gil-Collado J, Guillén-Llera J., Zapatero-Ramos L. Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). Rev Iberoam Parasitol. 1979;39:107–11.

64. Manilla G. Fauna D'Italia: Acari. Ixodida. Calderini. Bologna; 1998.

65. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2016 Nov 14];10(12):1108–32. Available from: http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14638581/fulltext

66. 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 Env Microbiol. 2005;

67. Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of Borrelia burgdorferi sensu lato in Dutch Ixodes ricinus ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J Clin Microbiol [Internet]. 1995 Dec;33(12):3091–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586679

68. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [cited 2020 Feb 27]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

69. Zeidner NSS, Burkot TRR, Massung R, Nicholson WLL, Dolan MCC, Rutherford JSS, et al. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by Ixodes spinipalpis ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with Borrelia burgdorferi in Northern Colorado. J Infect Dis [Internet]. 2000 Aug 1;182(2):616–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915099

70. Guerrero Espejo A. Borreliosis de Lyme: una enfermedad que la diagnostica quien piensa en ella. Rev clínica española. 2000;(2):55–6.

71. Steere AC. Lyme Disease. N Engl J Med [Internet]. 2001 Jul 12 [cited 2018 Dec 17];345(2):115–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11450660

72. Planificación, ordenación y gestión forestal. [Internet]. Gobierno del Principado de

Asturias. 2010 [cited 2019 Jan 21]. Available from:

https://www.asturias.es/portal/site/webasturias/menuiterm.4b280f821459ead3e2d6f77f2300030/?vgnextoid=b4d6faf6a0b59210VgnVCM10000097030a0aRCRD&vgnextcannel=11df7e1385dfe210VgnVCM10000097030a0aRCRD&i18n.http.lang=es

73. Alonso Vigil P, Rodríguez Suárez L. Borrelosis de Lyme. Características Clínico Epidemiológicas de la Infección en el Principado de Asturias [Internet]. Oviedo; 2014. p. 41. Available from: www.astursalud.es

74. Saz, JV., Nucio, S., Merino, JF., Aquiste, M., Medina, J., Filipe A. Enfermedad de Lyme en la provincia de Soria: estudio clínico epidemiológico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1994;12:52–9.

75. Lledó L, Gegúndez MI, Saz JV, Beltrán M. Screening of the prevalence of antibodies to Borrelia burgdorferi in Madrid province, Spain. Eur J Epidemiol. 2004;19(5):471–2.

76. Oteiza-Olaso J, Tiberio-López G, Martínez De Artola V, Belzunegui-Otano T. Seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en Navarra. Med Clin. 2011 Mar 26;136(8):336–9.

77. Munro H, Mavin S, Duffy K, Evans R, Jarvis LM. Seroprevalence of lyme borreliosis in Scottish blood donors. Transfus Med [Internet]. 2015 Aug;25(4):284–6. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/tme.12197

78. Hristea A, Hristescu S, Ciufecu C, Vasile A. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi in Romania. Eur J Epidemiol. 2001;17(9):891–6.

79. Hvidsten D, Mortensen L, Straume B, Arsenovic MG, Pedersen AB, Lyngås G, et al. Blood donor Borrelia burgdorferi sensu lato seroprevalence and history of tick bites at a northern limit of the vector distribution. APMIS. 2017 Aug;125(8):717–24.

80. De Keukeleire M, Vanwambeke SO, Cochez C, Heyman P, Fretin D, Deneys V, et al. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi , Anaplasma phagocytophilum , and Francisella tularensis Infections in Belgium: Results of Three Population-Based Samples. Vector-Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2018 Dec 17];17(2):108–15. Available from: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2016.1954

81. Ginzburg Y, Kessler D, Kang S, Shaz B, Wormser GP. Why has Borrelia burgdorferi not been transmitted by blood transfusion? Vol. 53, Transfusion. 2013. p. 2822–6.

82. De Keukeleire M, Robert A, Luyasu V, Kabamba B, Vanwambeke SO. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi in Belgian forestry workers and associated risk factors. Parasit Vectors. 2018 Dec 2;11(277):1–10.

83. Wilking H, Fingerle V, Klier C, Thamm M, Stark K. Antibodies against Borrelia burgdorferi sensu lato among Adults, Germany, 2008–2011. Emerg Infect Dis [Internet]. 2015 Jan;21(1):107–10. Available from:

http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0009_article.htm

84. Zákutná Ľ, Dorko E, Rimárová K, Kizeková M. Pilot Cross-Sectional Study of Three Zoonoses (Lyme Disease, Tularaemia, Leptospirosis) among Healthy Blood Donors in Eastern Slovakia. Cent Eur J Public Health [Internet]. 2015 Jun;23(2):100–6. Available from: http://apps.szu.cz/svi/cejph/show_en.php?kat=archiv/2015-2-02

85. Oteo, J A; Martínez de Artola, V; Fernández Calvo, J L; Casas, J M; Rivero, A; Grandival R. Prevalencia dea nticuerpos frente a la Borrelia burgdorferi en una poblacion en riesgo. Vol. 185, Rev Clin Esp. 1990. p. 215–7.

86. Williamson PK, Calabro JJ. Lyme disease, a review of the literature. Vol. 55, Acta Derm Venereol (Stock). 1984.

87. Coumou J, Hovius JWR, van Dam AP. Borrelia burgdorferi sensu lato serology in the Netherlands: guidelines versus daily practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Oct 17;33(10):1803–8.

88. Guerrero A. Borreliosis de Lyme en España. Vol. 19, Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. Ediciones Doyma, S.L.; 2001. p. 244–6.

89. Asturias: Población por municipios y sexo. (2886) [Internet]. [cited 2019 Oct 12]. Available from: https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=2886&L=0

90. Beceiro A, Zúñiga C, Guerrero A. Baja incidencia de la enfermedad de Lyme en el noroeste gallego. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2001 Jan;19(10):505. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X01727140

91. Vandenesch A, Turbelin C, Couturier E, Arena C, Jaulhac B, Ferquel E, et al. Incidence and hopstialisation rates of lyme borreliosis, Frans, 2004 to 2012. Eurosurveillance [Internet]. 2014;19:20883. Available from: e: http://www.eurosurveillance.org

92. Sykes RA, Makiello P. An estimate of Lyme borreliosis incidence inWestern Europe. J Public Heal (United Kingdom). 2017 Mar 1;39(1):74–81.

93. Enkelmann J, Böhmer M, Fingerle V, Siffczyk C, Werber D, Littmann M, et al. Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013–2017. Sci Rep [Internet]. 2018 Dec 8;8(1):14976. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-018-33136-0

94. Espí A, Del Cerro A, Somoano A, García V, M. Prieto J, Barandika JF, et al. Borrelia burgdorferi sensu lato prevalence and diversity in ticks and small mammals in a Lyme borreliosis endemic Nature Reserve in North-Western Spain. Incidence in surrounding human populations. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017 Nov 1;35(9):563–8.

95. Strle F. Lyme borreliosis in Slovenia. In: Zentralblatt fur Bakteriologie. Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG; 1999. p. 643–52.

96. Pazos Ferro A, Matesanz Fernández M, Rubal Bran D, Iñiguez Vázquez I, Rabuñal Rey R MSR. Enfermedad de Lyme en el área sanitaria de Lugo. Galicia Clin. 2010;71(1):7–14.

97. Guerrero A. Preguntas y respuestas Borreliosis de Lyme en España. Enferm Infecc

Microbiol Clin. 2001;19(5):244–6.

98. Huegli D, Moret J, Rais O, Moosmann Y, Erard P, Malinverni R, et al. Prospective study on the incidence of infection by borrelia burgdorferi sensu lato after a tick bite in a highly endemic area of Switzerland. Ticks Tick Borne Dis. 2011 Sep;2(3):129–36.

99. Pérez Guirado A, Fernández Fernández RI, Arbesu Fernández E, Santos Rodríguez PM. Nota clínica Enfermedad de Lyme: a propósito de dos casos. Rev Pediatr Aten Primaria. 2013;15(249):105–9.

100. Rojko T, Bogovič P, Lotrič-Furlan S, Ogrinc K, Cerar-Kišek T, Glinšek Biškup U, et al. Borrelia burgdorferi sensu lato infection in patients with peripheral facial palsy. Ticks Tick Borne Dis. 2019 Feb 1;10(2):398–406.

101. Stażyk K, Czepiel J, Gumulska M, Garlicki A, Biesiada G. Analysis of cases of Lyme arthritis in patients hospitalized in Infectious Diseases Department, University Hospital in Cracow. Folia Med Cracov. 2019;LIX:5–14.

102. García-Pérez AL, Oporto B, Espí A, del Cerro A, Barral M, Povedano I, et al. Anaplasmataceae in wild ungulates and carnivores in northern Spain. Ticks Tick Borne Dis [Internet]. 2016 Mar;7(2):264–9. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596894

103. Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. Appl Env Microbiol [Internet]. 2007 Oct;73(19):6166–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693556

104. Remesar S, Fernández PD, Venzal JM, Pérez-Creo A, Prieto A, Estrada-Peña A, et al. Tick species diversity and population dynamics of Ixodes ricinus in Galicia (north-western Spain). Ticks Tick Borne Dis. 2019 Jan 1;10(1):132–7.

105. Barandika JF, Olmeda SA, Casado-Nistal MA, Hurtado A, Juste RA, Valcárcel F, et al. Differences in Questing Tick Species Distribution Between Atlantic and Continental Climate Regions in Spain. J Med Entomol. 2011 Jan 31;48(1):13–9.

106. 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 Apr 15;78(8):2669–76.

107. Merino F, Nebreda T, Serrano J, Fernández-Soto P, Encinas A, Pérez-Sánchez R. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. Epidemiol Infect [Internet]. 2005 Apr 25;133(05):943. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268805004061

108. Dubourg G, Socolovschi C, Del Giudice P, Fournier PE, Raoult D. Scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite: An emerging syndrome with multiple causes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(8):1449–56.

109. Oteo Revuelta J. Flashes pediátricos AEPap Espectro de las enfermedades transmitidas por garrapatas. Rev Pediatr Aten Primaria Spl [Internet]. 2016;25:47–51. Available from: www.pap.es

110. Arranz R, Antonio Oteo Revuelta J. Enfermedades transmitidas por garrapatas en pediatría Documento elaborado con la colaboración especial del experto Dr [Internet]. 2016. Available from:

http://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosaAtenciónprimaria.Junio2016.Enfermedadestransmitidasporgarrapatasenpediatría.[Disponibleenhttp://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologiainfecciosa/contenido/documentos]

111. Arranz R, Antonio Oteo Revuelta J. Enfermedades transmitidas por garrapatas en pediatría Documento elaborado con la colaboración especial del experto Dr. 2016.

112. Cervantes J. Doctor says you are cured, but you still feel the pain. Borrelia DNA persistence in Lyme disease. Vol. 19, Microbes and Infection. Elsevier Masson SAS; 2017. p. 459–63.

113. Álvarez-Argüelles ME, Oña-Navarro M de, Rojo-Alba S, Torrens-Muns M, Junquera-Llaneza ML, Antonio-Boga J, et al. Quantification of human papilloma virus (HPV) DNA using the Cobas 4800 system in women with and without pathological alterations attributable to the virus. J Virol Methods. 2015;222:95–102.

114. Moore A, Nelson C, Molins C, Mead P, Schriefer M. Current guidelines, common clinical pitfalls, and future directions for laboratory diagnosis of lyme disease, United States. Emerg Infect Dis. 2016 Jul 1;22(7):1169–77.

115. Nahimana I, Gern L, Blanc DS, Praz G, Francioli P, Péter O. Risk of Borrelia burgdorferi infection in western Switzerland following a tick bite. Vol. 23, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004. p. 603–8.

116. Hofhuis A, Herremans T, Notermans DW, Sprong H, Fonville M, van der Giessen JWB, et al. A Prospective Study among Patients Presenting at the General Practitioner with a Tick Bite or Erythema Migrans in the Netherlands. PLoS One. 2013 May 16;8(5).

117. Wilhelmsson P, Fryland L, Lindblom P, Sjöwall J, Ahlm C, Berglund J, et al. A prospective study on the incidence of Borrelia burgdorferi sensu lato infection after a tick bite in Sweden and on the Åland Islands, Finland (2008-2009). Ticks Tick Borne Dis. 2016 Feb 1;7(1):71–9.

118. Estrada-Peña A, Mihalca A, Petney T. Ticks of Europe and North Africa. A Guide to Species Identification [Internet]. Agustín Estrada-Peña ADM and TP, editor. Switzerland: Springer International Publishing; 2017. 404 p. Available from: onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mve.12410

119. Strnad M, Hönig V, Růžek D, Grubhoffer L, Rego ROM. Europe-Wide Meta-Analysis of Borrelia burgdorferi Sensu Lato Prevalence in Questing Ixodes ricinus Ticks. Appl

Environ Microbiol. 2017 Aug 1;83(15).

120. 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(6).

121. Díaz P, Arnal JL, Remesar S, Pérez-Creo A, Venzal JM, Vázquez-López ME, et al. Molecular identification of Borrelia spirochetes in questing Ixodes ricinus from northwestern Spain. Parasites and Vectors. 2017 Dec 20;10(1).

122. Barral M, Garci AL, Rez A, Juste NA, Hurtado A, Escudero R, et al. Distribution of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) Ticks from the Basque Country, Spain [Internet]. Vol. 39, J. Med. Entomol. 2002. Available from: https://academic.oup.com/jme/article-abstract/39/1/177/879785

123. Rauter C, Hartung T. Prevalence of Borrelia burgdorferi Sensu Lato Genospecies in Ixodes ricinus Ticks in Europe : a Metaanalysis Prevalence of Borrelia burgdorferi Sensu Lato Genospecies in Ixodes ricinus Ticks in Europe : a Metaanalysis. Appl Env Microbiol [Internet]. 2005;71(11):7203–16. Available from:

http://aem.asm.org/content/71/11/7203.full.pdf

124. Geller J, Nazarova L, Katargina O, Golovljova I. Borrelia burgdorferi sensu lato prevalence in tick populations in Estonia. 2013;

125. Klitgaard K, Kjær LJ, Isbrand A, Hansen MF, Bødker R. Multiple infections in questing nymphs and adult female Ixodes ricinus ticks collected in a recreational forest in Denmark. Ticks Tick Borne Dis [Internet]. 2019 May 31 [cited 2019 Jul 3]; Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X18302309

126. Kubiak K, Dziekońska-Rynko J, Szymańska H, Kubiak D, Dmitryjuk M, Dzika E. Questing Ixodes ricinus ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of Borrelia burgdorferi sensu lato and Borrelia miyamotoi in an urban area of north-eastern Poland. Exp Appl Acarol [Internet]. 2019 May 17 [cited 2019 Jul 3];78(1):113–26. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10493-019-00379-z

UNIVERSIDAD DE OVIEDO