



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

*UTILIDAD DEL LABORATORIO CLINICO EN EL
DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE LYME*

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTAN:

**NAVARRO SOTO CÉSAR RENÉ
QUIROZ CONTRERAS OSCAR**

NAVOJOA, SONORA

JUNIO 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



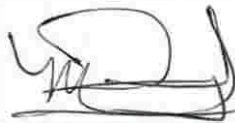
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACION

Los miembros del jurado asignado para revisar la tesis teórica de **Navarro Soto Cesar René y Quiroz Contreras Oscar**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.



Q.B. Imay Jacobo Manuel Ignacio
Presidente



Q.B. Ech everría Jacobo Martin Gustavo
Secretario

M.C. Vázquez Curiel Rosa Amelia
Vocal



Dra. Adán Bante Norma Patricia
Suplente

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta Tesis Teórica, sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente a los autores y a la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur.

Para la publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta Tesis Teórica, se deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación por escrito del documento en cuestión, por el Director de tesis.

M.C Ramona Icedo García

Jefa del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por sus bendiciones constantes y por permitirme llegar a este momento y cumplir la meta impuesta.

A mis padres: A mi padre: José Loreto Salas Velázquez, por sus innumerables consejos y apoyo a lo largo de mi formación académica pero sobre en la vida, por hacerme la persona de bien que soy hoy en día, por todo eso papa, muchas gracias un abrazo hasta el cielo. A mi madre: Eleuteria Soto Mendoza, a ti mama, nada en este mudo me alcanza para pagarte todo lo que has hecho por mí, tu eres la vida en mi camino sin ti jamás habría lograda nada, gracias por todo mama.

A mi hermano mayor: José Salas Ibáñez que a pesar de no ser hermanos de sangre siempre te he visto como tal, tú me has dado apoyo y muchos consejos, m has enseñado a enfrentar la vida la vida y a no dejar mis ideales gracias también por todo.

A mis maestros: a cada uno de ellos mi reconocimiento eterno, ellos son quienes me facilitaron el intercambio de ideas en un ambiente de confianza y respeto, siempre dispuestos a brindarnos su apoyo o un consejo.

A mis Sinodales: Manuel Ignacio Imay Jacobo, Martin Gustavo Echeverría, Jacobo, Norma Patricia Adán Bante y a la maestra Rosa Amelia Vázquez Curiel por habernos apoyado durante todo este proceso de la preparación para la titulación de la carrera.

Navarro Soto César René

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por sus bendiciones constantes y por permitirme llegar a este momento y cumplir la meta impuesta.

A mis Padres: Por todo su apoyo incondicional, su confianza y comprensión para la realización de mi carrera.

A mi Esposa: Por la confianza, comprensión y el apoyo incondicional durante todo el proceso de mi titulación. Te amo.

A mi hija: Por todo su amor y confianza, apoyo y comprensión. Te amo hija.

A mis Maestros: Especialmente al maestro **Manuel Ignacio Imay Jacobo** por su apoyo, ya que fue uno de los que me motivo a culminar este trabajo. Gracias y muy agradecido. Y a todos aquellos maestros que me brindaron su confianza, apoyo y comprensión.

A mis Sinodales: Manuel Ignacio Imay Jacobo, Martín Gustavo Echeverría, Jacobo, Norma Patricia Adán Bante y a la maestra Rosa Amelia Vázquez Curiel por habernos apoyado durante todo este proceso de la preparación para la titulación de la carrera.



DEDICATORIAS

A mis padres, José Loreto y Eleuteria por todas las bendiciones que me han dado en el transcurso de mi vida, por su apoyo su amor y sus consejos por sus regaños y sobre todo por la confianza que depositaron en mí, para que yo me realizara como profesionista.

A mis tíos por las grandes lecciones de vida que me han brindado, sus consejos y su apoyo a todos ellos.

A mis primos que han sido mis hermanos más que primos, benjamín, Daniel, Luis, Francisco y Hernán.

A mi novia Maria Carolina Flores Valencia, por todos los consejos y el apoyo que me has dado en el tiempo te conozco, por darme tu cariño y comprensión en los momentos difíciles, gracias por todo amor.

A mis sinodales por ser los últimos en evaluarme para la titulación de mi carrera, por el apoyo y comprensión brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos, los que me apoyaron en el transcurso de la carrera.

Navarro Soto César René

DEDICATORIAS

La dedico muy especialmente a mi hija y esposa que son el motor de mi vida para salir adelante.

A mis padres, hermanos y abuelos por todo el apoyo brindado, por su comprensión, por sus consejos, sus regaños y sobre todo por la confianza que depositaron en mí, para que yo me realizara como profesionalista.

A mis maestros por haberme dado todos los conocimientos necesarios, para el desarrollo en el ámbito laboral y profesional.

A mis sinodales por ser los últimos en evaluarme para la titulación de mi carrera, por el apoyo y comprensión brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos, los que me apoyaron en el transcurso de la carrera.



Quiroz Contreras Oscar

CONTENIDO

	Páginas
APROBACION	i
DECLARACION INSTITUCIONAL	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	v
CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
OBJETIVOS	xi
JUSTIFICACION	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
IXODES RICINUS	5
Ciclo de vida	12
Hábitat	14
Criterios Ambientales	14
Distribución Geográfica	15
BORRELIA BURGDORFERI	18
Agente Etiológico, Características y Ciclo de vida	18
ENFERMEDAD DE LYME	22
Etapas de la Enfermedad de Lyme	25
DIAGNOSTICO POR EL LABORATORIO CLINICO	28
Medios de Cultivo	29
ELISA	30
Western Blots	31

PCR	33
La Captura de Antígenos	36
Las Punciones Lumbares	37
Prueba CD57	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43

LISTA DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1: Especie del complejo <i>Borrelia burgdorferi</i>	21
Tabla 2: Métodos de inmunodiagnostico y moleculares para la detección de <i>Borrelia burgdorferi</i> en nuestras clínicas de pacientes	41

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Garrapatas en espera de un posible huésped	7
Figura 2. Hembra ovopositando.	8
Figura 3. Dimorfismo entre macho y hembra	9
Figura 4. Características de la garrapata.	10
Figura 5. Garrapatas en cúpula.	11
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Ixodes ricinus</i>	13
Figura 7. Distribución en Europa de <i>Ixodes ricinus</i>	15
Figura 8. Prevalencia de infección de <i>Borrelia burgdorferi</i> en la ciudad de México y zona noroeste de la República Mexicana.	16
Figura 9. Reporte de casos en Estados Unidos de <i>Ixodes ricinus</i> .	16
Figura 10. <i>Borrelia burgdorferi</i>	20

OBJETIVO GENERAL

Resaltar la importancia que tiene el Laboratorio Clínico en el Diagnóstico de la Enfermedad de Lyme

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Describir la Enfermedad de Lyme.

Mencionar los exámenes de Laboratorio Clínico, con los que se puede apoyar para el diagnóstico de la Enfermedad de Lyme

Explicar la utilidad de los exámenes de Laboratorio Clínico, que apoyan a un buen diagnóstico de la Enfermedad de Lyme.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad la enfermedad de Lyme se presenta principalmente en personas que realizan actividades al aire libre así como también en personas que viven en áreas donde se desarrolla la ganadería, áreas serranas y boscosas con presencia de animales que favorecen la proliferación de garrapatas, por lo general en esta enfermedad se presenta en las primeras etapas siendo pacientes asintomáticos o como un simple cuadro gripal y cuyas pruebas de laboratorio clínico comúnmente usadas no revelan información útil para llegar a un buen diagnóstico.

En el 2011, se notificaron casi 28,921 casos confirmados y 7,500 casos probables de la enfermedad de Lyme a los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). La enfermedad de Lyme se transmite a los seres humanos por la picadura de la garrapata de patas negras (también conocida como la garrapata de venado en el este de Estados Unidos) y la garrapata de patas negras del oeste, infectadas con la bacteria *Borrelia burgdorferi*. La bacteria de la enfermedad de Lyme normalmente vive en ratones, ardillas y otros mamíferos pequeños.

Sin embargo, existen pocos casos en los estados de baja california norte y sur, parte serrana de sonora, Durango y Yucatán.

Por tanto, este trabajo se realiza con la finalidad de proporcionar conocimientos teóricos sobre la utilidad del laboratorio clínico en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme y los estudios más acertados en cuanto a esta problemática, ya que es posible en gran parte de nuestro estado.

RESUMEN

El propósito de este trabajo es presentar los resultados obtenidos de una revisión bibliográfica, para dar a conocer información general de la utilidad del laboratorio clínico en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, así como también los estudios que en él se realizan para llegar a un buen diagnóstico, *Ixodes ricinus* es una garrapata de tres hospedadores. Las larvas, ninfas y adultos tienden a alimentarse en animales de distintos tamaños. A menudo se encuentran *Ixodes ricinus* alrededor de la boca, en las orejas y los párpados de ovejas, perros y gatos, y alrededor de la ubre y región axilar del ganado. En los humanos se puede encontrar en el vello púbico, en las piernas, axilas etc. La enfermedad de Lyme está definida como una enfermedad infecciosa causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Técnicamente esta definición es la correcta, pero clínicamente la enfermedad es a menudo mucho más que solo eso, especialmente en sus etapas diseminada y crónica etapas 2 y 3 tres. (19)

En términos más generales la enfermedad de Lyme es una enfermedad que resulta después de la picadura de una garrapata infectada. Esto incluye la infección causada no sólo por *Borrelia burgdorferi* sino también las diversas co-infecciones que además puedan resultar después de adquirir la Borreliosis de Lyme puesto que debilita mucho al sistema inmunológico en la barrera de las llamadas Natural Killer Cells. De hecho en la forma crónica de la enfermedad, otros factores pueden asumir un papel todavía más significativo la disfunción inmunológica, infecciones oportunistas, co-infecciones, toxinas biológicas, desequilibrios metabólicos y hormonales, de condicionamiento, etc. (3)

Las pruebas de laboratorio clínico comúnmente usadas no revelan información útil para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, puesto que los resultados de hemoglobina, hematocrito, creatinina y de orina son usualmente normales y el

conteo de leucocitos puede ser indistintamente normal o elevado. Si existe afectación neurológica, en muestras de LCR puede observarse una pleocitosis linfocítica moderada, concentraciones de proteínas elevadas y de glucosa, de normal a ligeramente baja.

El diagnóstico de esta enfermedad requiere de ensayos microbiológicos, excepto en casos con manifestaciones patognómicas con los eritemas migratorios. Entre ellos se encuentran los métodos de detección directa y los de detección de anticuerpos.

La detección microscópica directa del *Borrelia burgdorferi* sensu lato en campo oscuro y los métodos de detección de antígenos, tienen una aplicación limitada debido al número de casos de microorganismos presentes en las muestras clínicas. (3)

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Lyme o Borreliosis de Lyme es una enfermedad infecciosa emergente causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Esta bacteria es transmitida por la mordedura de las garrapatas del género *Ixodes*. En los Estados Unidos de América (EUA) y en Europa, la borreliosis de Lyme representa 90% de las infecciones transmitidas por garrapatas. Se detectó en la Ciudad de Lyme, Connecticut, USA. Por eso le pusieron Enfermedad de Lyme, pero la Borreliosis o enfermedad de Lyme esta diseminada por todo el mundo. (28)

Fue en los Estados Unidos, en el año de 1970 que se reportó la primera vez el Eritema migrans causada por la picadura de una Garrapata y en 1977 Steer y colaboradores detectaron un brote de Artritis Juvenil en Connecticut, USA. En 1978 se estableció la relación entre Artritis, Parálisis Facial y la picadura de la garrapata *Ixodes*. En 1982 Burgdorferi y colaboradores aislaron el agente etiológico de la garrapata *Ixodes*, fue una espiroqueta que al momento se conoce como *Borrelia burgdorferi*. Al inicio se comenzó el tratamiento con Penicilina que demostró una mejoría de la enfermedad. (29)

La Borreliosis o enfermedad de Lyme, puede afectar desde su inicio al Sistema Musculo-esquelético y Nervioso Central, causando dolores del musculo y huesos, síntomas Neurológicos y Psiquiátricos. Un paciente puede estar contaminado desde su nacimiento o en cualquier tiempo de su vida, los síntomas de la Borreliosis o enfermedad de Lyme, al inicio pueden ser leves o muy intensos. Puede haber problemas Neurológicos de, Encefalitis, Meningitis, Neuritis, Encefalopatías, etc., Problemas Psiquiátricos como, Depresión, Paranoia, Esquizofrenia, Ataques de Pánico, Enfermedad Bipolar y Obsesivo-Compulsivo, Anorexia Nerviosa, etc. (30)

Esta enfermedad puede progresar desde una picadura de insecto, hasta una enfermedad multisistémica, el primer vector y el más conocido es la garrapata del venado, pero no se ha estudiado la gran cantidad de insectos que gustan de la sangre del hombre y de los animales de sangre caliente.(31)

El diagnóstico de esta enfermedad requiere de varios estudios de laboratorio como de la detección directa del antígeno, cultivo para el aislamiento de la espiroqueta, así como también estudios serológicos de inmunofluorescencia indirecta, enzimoimmunoanálisis, Westerns Blots, serología LCR y la valoración de las técnicas serológicas.

Esta enfermedad es tratada solo con antibiótico como Doxiciclinas, Azitromicinas, Penicilinas, Claritromicina, etc., la Ceftriaxona es problemática puesto que el paciente permanece junto al médico el primer mes. (31)

ANTECEDENTES

Desde que en Octubre de 1975 dos madres le comunicaron al Departamento de Salud de Connecticut que un número importante de los hijos de mujeres de tres pequeñas comunidades (Old Lyme, Lyme e East Haddam) estaban sufriendo una artritis reumatoide juvenil, un grupo de reumatólogos de la Universidad de Yale, encabezados por el profesor Allen Steere, Malawista y otros, describieron la enfermedad con el nombre de artritis de Lyme y hallaron una prevalencia de 12,2 por 1 000, frecuencia 100 veces superior a la artritis reumatoide juvenil en EE.UU. (36)

Ya los primeros estudios sugirieron evidencias epidemiológicas de que se diseminaba por la picadura de una garrapata. El rash eritematoso característico que precede a la artritis había sido descrito en 1909 por un dermatólogo sueco, Afzelius, con el nombre de eritema migrans, y adelantó la posibilidad de que fuera causado por picadura de garrapatas o algún otro insecto, pero la primera descripción de esta enfermedad correspondió a Buchwald en 1883, quien reportó una lesión atrófica de la piel, llamada por Herxheimer y Hartmann en 1902 acrodermatitis crónica atrófica. En 1922 Garin y Bujadoux reportaron una paciente picada por garrapata que presentó el eritema y posteriormente desarrolló dolor radicular con parálisis de un brazo y pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR).²⁴ Hellestrom, otro dermatólogo sueco, describió en 1930 un paciente con EM y meningitis, y asoció ambas enfermedades. En 1941 y 1944, Bannwarth describió pacientes con meningitis crónica y radículo neuropatía con o sin parálisis de nervios craneales, síndrome que hoy lleva su nombre y es patognomónico de la neuroborreliosis temprana. (21)

La enfermedad es endémica en la mayoría de los países europeos, en tres zonas enzoóticas de EUA y también en algunos países asiáticos. En Europa la prevalencia de la infección evaluada con pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA) o inmunofluorescencia (IFA) es de 8 a 27% y en EUA varía de 1 a 10%.

En Suramérica se han reportado casos clínicos sugestivos de la enfermedad, aunque sin confirmación por estudios de laboratorio. (22)

En México se ha identificado el vector *Ixodes* en Baja California, la Península de Yucatán, el Golfo de México y la zona noreste de la República. Algunos casos sugestivos de borreliosis de Lyme fueron descritos a principios de la década de 1990 en los estados de Sinaloa y Nuevo León, sin que se haya logrado la confirmación etiológica. En 1999, en un estudio de seroprevalencia epidemiológica nacional, se encontró positividad por ELISA en 1.1% de las muestras y se confirmó ésta en 0.3% de las mismas mediante inmunotransferencia. Los sujetos seropositivos fueron ubicados en la Zona noreste y centro de la República Mexicana. Considerando la posible existencia de casos clínicos sugestivos de borreliosis de Lyme en nuestro país y la presencia del vector, los reservorios y los casos seropositivos detectados en la encuesta nacional, es oportuno tener una idea acerca de la prevalencia de la infección por la bacteria causante de la enfermedad de Lyme en muestras de suero de habitantes de estas zonas. (33)

En un estudio se determinó la prevalencia de la infección causada por *Borrelia burgdorferi* en una muestra de sueros de habitantes de la Ciudad de México y de la Zona noreste de la República Mexicana. (33)

Ixodes ricinus

La *Ixodes ricinus* es una especie de garrapatas duras indígenas que tienen una amplia distribución geográfica.

Las garrapatas *Ixodes ricinus* cubren una amplia región geográfica del continente europeo desde Portugal hasta Rusia y de África del norte a Escandinavia.

Esta amplia distribución geográfica implica que esta especie de garrapatas puede sobrevivir en diversas condiciones ambientales. (4)

Las *Ixodes ricinus* son sensibles a las condiciones climáticas, requiriendo una humedad relativa de al menos 80% y están restringidos a áreas de moderada o alta precipitación con buena vegetación.

La *Ixodes ricinus* se observa, por tanto, principalmente en Europa en el bosque caducifolio y bosque mixto, pero se puede encontrar en una variedad de hábitats que apoyan sus anfitriones de sangre y un microclima húmedo.

Los géneros de garrapatas duras más importantes encontrados incluyen *Ixodes escapularis*, *Ixodes pascificus*, *haemaphysalis* e *Ixodes ricinus*, siendo esta última la de mayor importancia médica, clínica y veterinaria, y son que tienen mayor prevalencia en algunas partes del mundo. (5)

Las piezas bucales se encuentran en el capitulum y consisten de un hipostomo, dos quelí- ceros y dos pedipalpos, Los pedipalpos tienen una función táctil con los cuales se orientas puesto que *Ixodes ricinus* carece de ojos, es hipostomo tiene unas espinas que ayudan a mantenerse dentro de la piel después de haber perforado el cuerpo de las garrapatas duras se caracteriza por la presencia de un escudo dorsal endurecido (scutum dorsal). El cual abarca todo el cuerpo del macho mientras que en la hembra solo se encuentra en la parte de atrás lo que les ayuda a tener mayor agilidad en el momento de la toma de

sangre, el orificio genital se encuentra por el medio del segundo par de patas y el ano justo atrás de las dos patas del cuarto par también detrás de este par de patas están los estigmas respiratorios. (28)

Las patas tienen 6 componentes: coxa, trocánter, fémur, rodilla, tibia, metatarso y tarso. El primer tarso alberga el órgano sensorial de Haller que ayuda en la detección de los hospedadores, estos son unas estructuras porosas en el primer par de patas en el caso de los machos. (6)

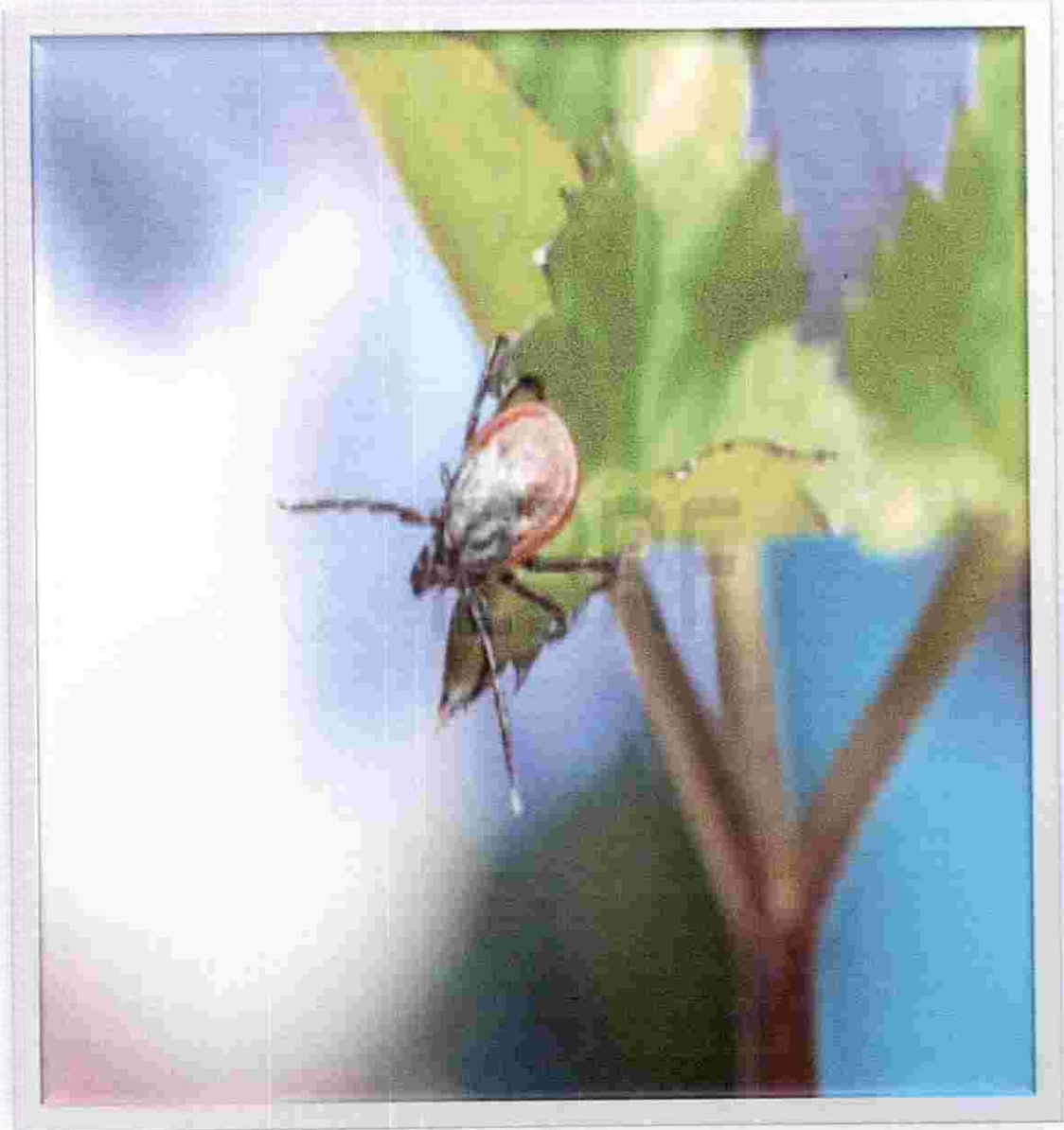
Las hembras tienen órganos sensoriales que son superficies porosas en la parte superior dorsal las cuales sirven para detectar a los machos, también les sirven para detectar a los hospedadores.

En ambos existen estas estructuras puesto que carecen de ojos y estos ayudan a orientarse, a estas estructuras se les conoce como pedipalpos los cuales tienen forma de pinzas.

Tienen un tracto digestivo que consiste en una faringe muscular adaptada para absorber fluido (sangre), tienen glándulas salivales ramificadas las cuales se abren en la faringe, el tracto digestivo y genital de las hembras tienen varios puntos donde se conectan entre sí, lo cual hace el papel de ovario y útero esto hace que transmitan patógenos del tracto digestivo a sus ovarios lo que facilita la transmisión vertical de agentes. (39)

La *Ixodes ricinus* busca huéspedes, usando una técnica de "emboscada" por el que suben a la punta de la vegetación y esperan a que pase cerca un posible huésped. Durante esta espera, la garrapata pierde humedad, por lo que tiene que bajar por la vegetación en la capa de estera para rehidratarse, por lo tanto el periodo desespera está directamente afectado por la temperatura y la humedad. Volviendo a la capa de estera, reduce la probabilidad de entrar en contacto con un huésped y utilizando sus reservas de energía, por lo que es perjudicial para la supervivencia de la garrapata. Figura 1, 2, 3, 4 y 5 (39)

Figura 1: Garrapata en espera de un posible huésped. Los huevos son esféricos muy pequeños y de color marrón oscuro, tienen una longitud de 0.54 mm y 0.39 mm de ancho tamaño de los recién eclosionados, las larvas miden 0.5 – 1 mm.



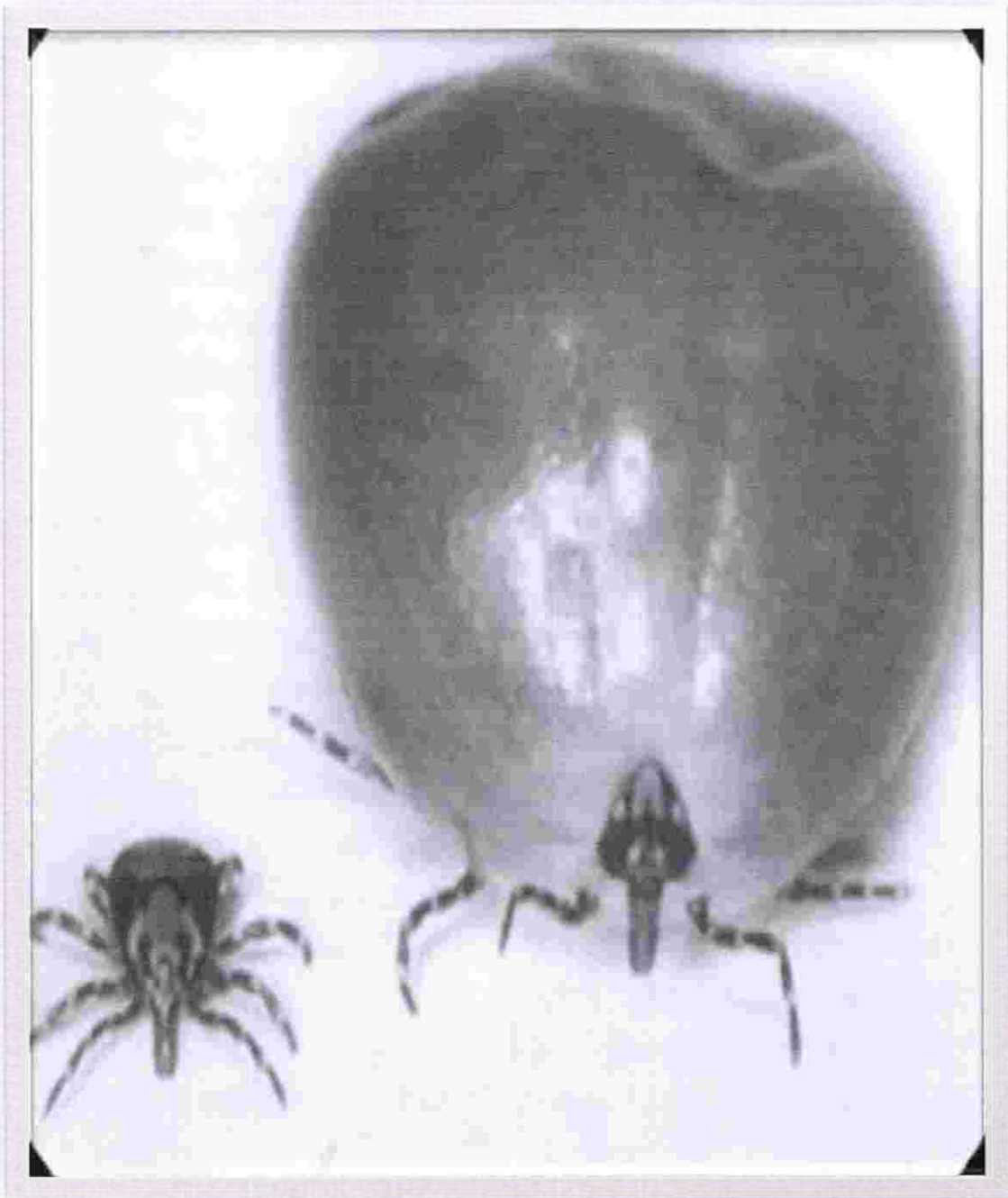
Fuente: 24

Figura 2: Hembra ovopositando. Los adultos miden de 5 – 10 mm de longitud, las hembras pueden llegar hasta los 30 mm y presentan un dimorfismo sexual.



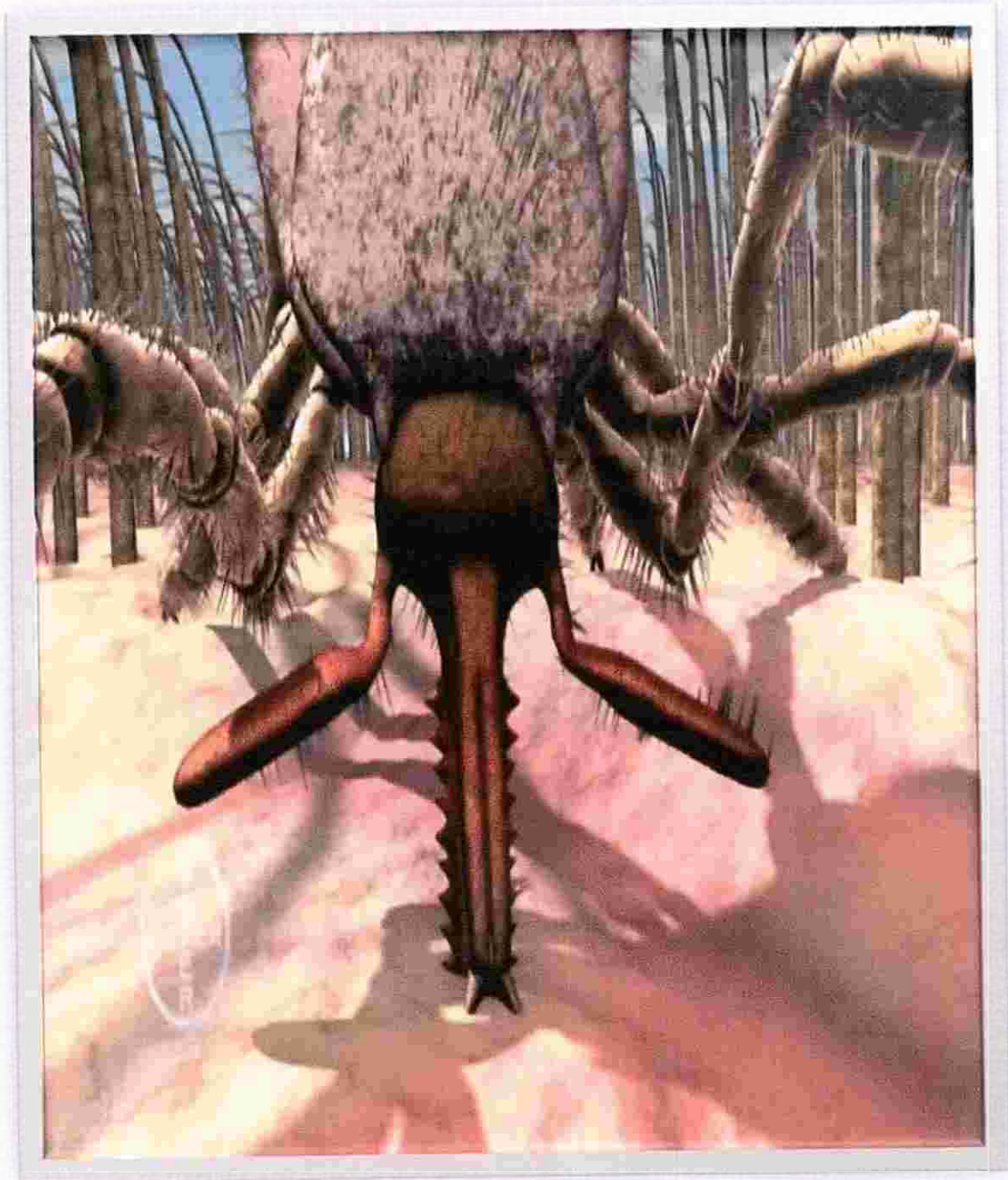
Fuente: 40

Figura 3: Dimorfismo entre macho y hembra



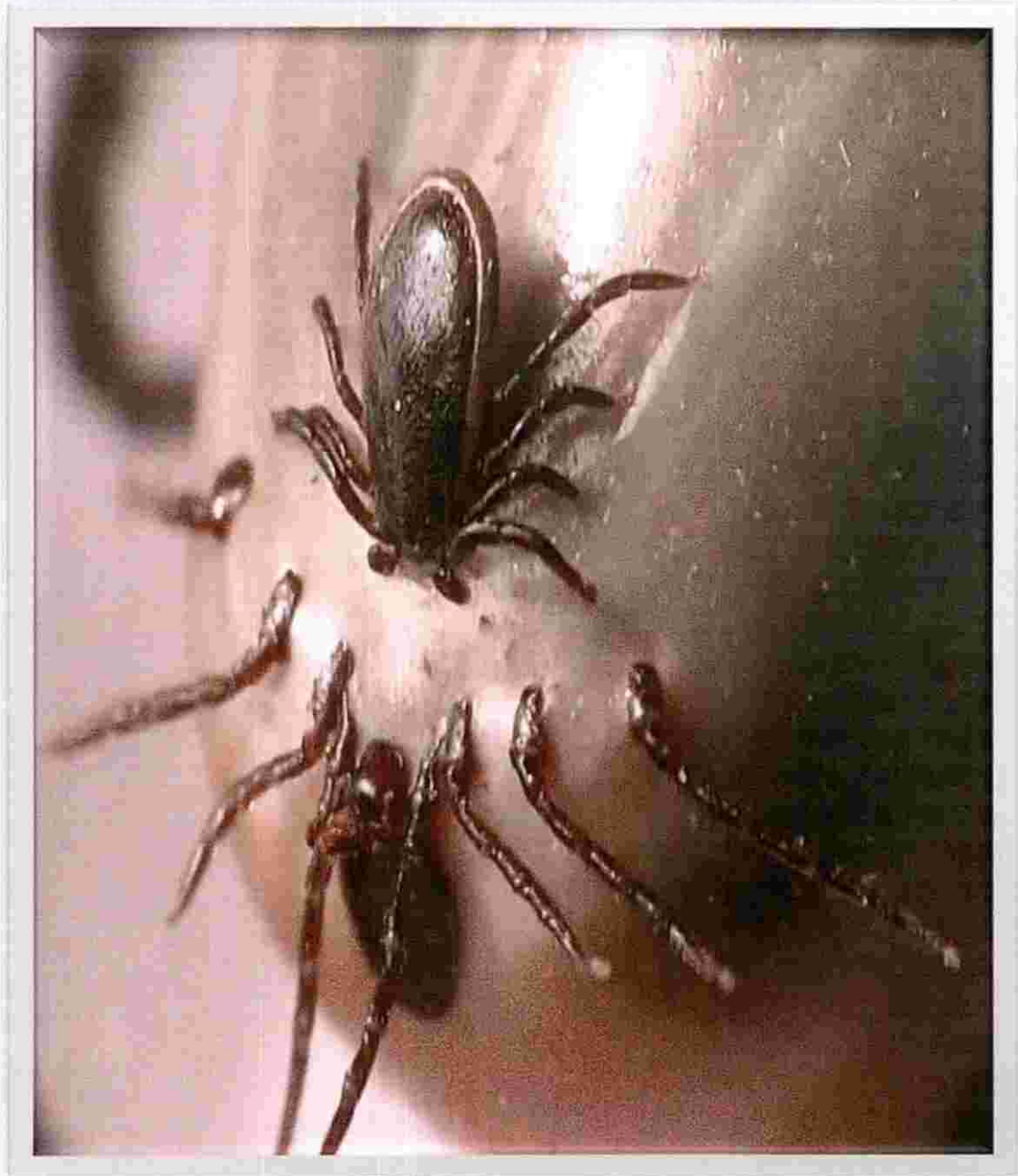
Fuente: 2

Figura 4: Características de la garrapata



Fuente: 17

Figura 5: Garrapatas en cúpula



Fuente: 15

Ciclo de Vida

Ixodes ricinus es una garrapata de tres hospedadores, las larvas, ninfas y adultos. Tienden a alimentarse en animales de distintos tamaños. A menudo se encuentran *Ixodes ricinus* alrededor de la boca, en las orejas y los párpados de ovejas, perros y gatos, y alrededor de la ubre y región axilar del ganado, en los humanos podemos encontrarlo en el vello púbico, en las piernas, axilas etc. Las garrapatas pueden encontrarse en el hospedador por varios días mientras se alimentan, luego caen al suelo para pasar al próximo estadio, ahí pueden durar muchísimo más tiempo puesto que es el lugar predilecto para desarrollarse. (23)

El ciclo de vida de *Ixodes ricinus* por lo general tarda entre dos y cuatro años en completarse. Su alimentación generalmente hace un pico temprano en el verano, con una segunda temporada se activa en el otoño en algunas aéreas. Cuando no está buscando un hospedador, *Ixodes ricinus* puede encontrarse en la zona de la vegetación donde la humedad es relativamente más alta. (28)

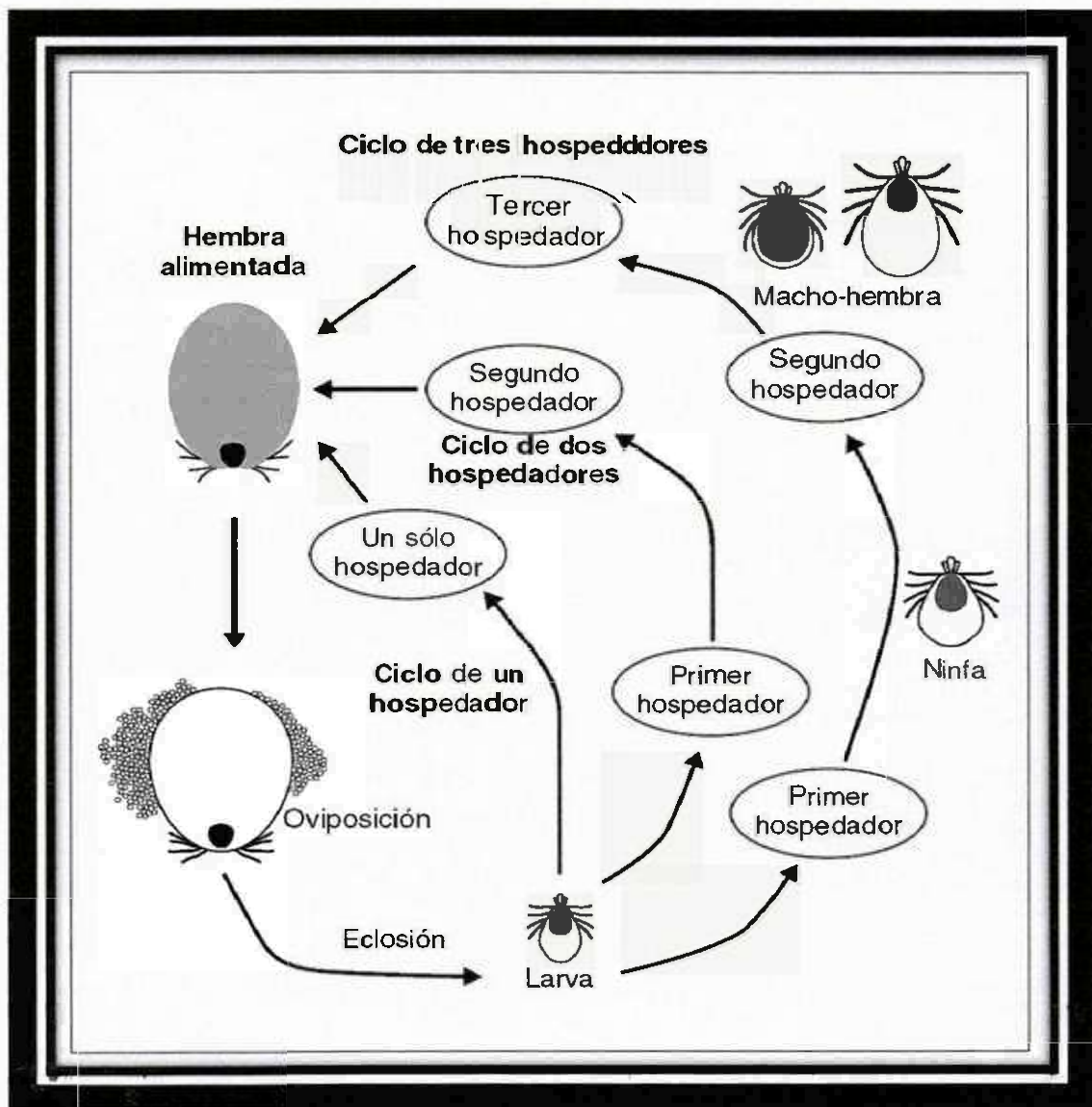
Los ciclos vitales de las garrapatas son el resultado de un proceso de adaptación a las condiciones medioambientales y la disponibilidad de hospedadores adecuados para cada uno de los estadios que aparecen en su ciclo biológico.

El desarrollo del ciclo biológico de una garrapata se encuentra estrechamente relacionado con la presencia efectiva de hospedadores adecuados en su área biológica, así como con la existencia de un micro hábitat en el que se den condiciones microclimáticas favorables. El gran número de combinaciones posibles entre Condiciones ambientales y disponibilidad de hospedadores determina la gran cantidad de tipos evolutivos que aparecen en los *Ixódidos*.

De este modo, se pueden distinguir ciclos en los que intervienen tres, dos y un único hospedador. Figura 6 (13)

En los ciclos trifásicos o trixenos, sin duda los más frecuentes, larva, ninfa y adulto se alimentan sobre hospedadores distintos de la misma o distinta especie, en este tipo de ciclo la búsqueda de un hospedador se produce tres veces, desprendiéndose la garrapata del hospedador correspondiente al final del proceso de alimentación. (25)

Figura 6: Ciclo de vida de *Ixodes ricinus*.



Fuente: 25

Hábitat

Las garrapatas *Ixodes ricinus* prefieren hábitats con vegetación que mantiene una alta humedad, por ejemplo, bosques caducifolios y donde el microclima y composición de acogida son los adecuados para desarrollar las cuatro etapas de la vida. Un microclima favorable puede dar lugar a la proliferación de *Ixodes ricinus* en un número de hábitats proporcionadas especies hospedadoras adecuadas también están presentes. Estos incluyen pastizales, brezales, pastizal áspero, parques urbanos, así como la hoja caduca y bosques de coníferas. (33)

Criterios Ambientales

Las *Ixodes ricinus* son sensibles a las condiciones climáticas, requiriendo una humedad relativa de por lo menos 80% y están restringidos a áreas de moderada a alta precipitación con buena vegetación (es decir, capa de hoja rasca y el suelo permanecen húmedos durante el día).

Las garrapatas pasan el invierno en suelo y la supervivencia puede ser mejorada por la cubierta de nieve que impide que la temperatura del suelo pase por debajo de cero. Los inviernos fríos podrían afectar a la supervivencia de los hospederos pequeños al año siguiente lo que podría significar un menor número de huéspedes de sangre en busca de garrapatas. Sin embargo, la cubierta de nieve también puede ayudar a los pequeños mamíferos que hibernan, pero puede no ser tan bueno para los animales más grandes, como los ciervos que se alimentan de las ramitas. (33)

Distribución Geográfica

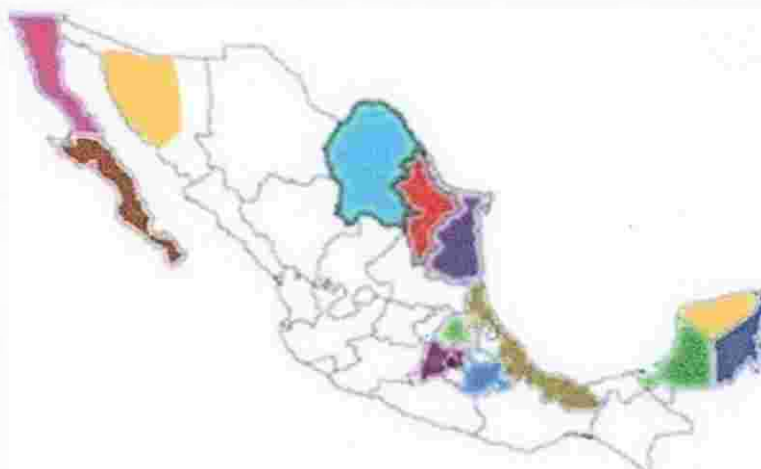
Las *Ixodes ricinus* cubren una amplia región geográfica incluyendo; Escandinavia, islas Británicas, Europa central, Francia, España, Italia, los Balcanes, Europa del este y el norte de África e incluso en América del norte, central y del sur. Figura 7, 8 y 9 (33)

Figura 7: Distribución en Europa de *Ixodes ricinus*.



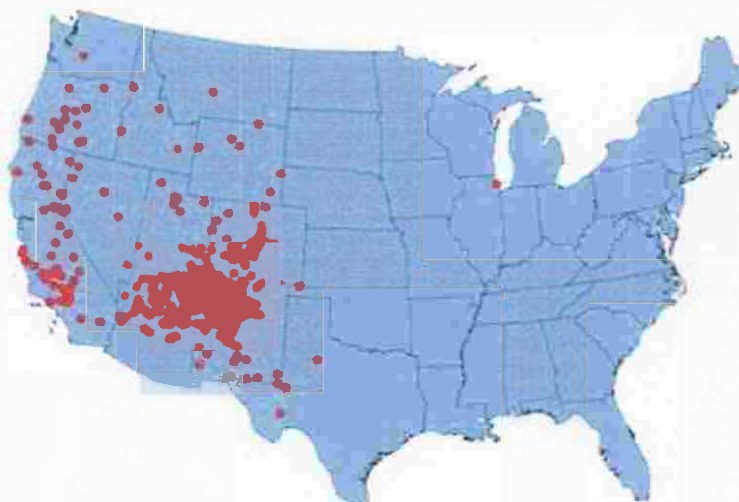
Fuente: 40

Figura 8: Prevalencia de infección de *Borrelia burgdorferi* en la ciudad de México y Zona Noroeste de la Republica Mexicana.



Fuente: 38

Figura 9: Reporte de casos en Estados Unidos de *Ixodes ricinus*.



Fuente: 26

La distribución ha cambiado en varios países en los últimos años, encontramos *Ixodes ricinus* a mayor altitud en Bosnia y Herzegovina y la República Checa. Estos cambios en la distribución se han sugerido que sean el resultado de una combinación de factores como el cambio climático, los cambios en el uso del suelo, los cambios en las poblaciones de ciervos y los cambios en las poblaciones de jabalíes. (33)

Modelización de los datos sugiere que *Ixodes ricinus* se convertirá distribuyéndose por toda Noruega, Finlandia y Suecia por 2071-2100 y también que el bosque caducifolio se pueden extender hacia el norte en Finlandia y Noruega que contribuirá a una mayor propagación de *Ixodes ricinus*. (33)

BORRELIA BURGENDORFERI

Borrelia burgdorferi sensu lato es el agente etiológico de la enfermedad de Lyme. (28)

Esta constituye un complejo de espiroquetas que causa la enfermedad antes mencionada, la cual es una zoonosis emergente desde finales del Siglo XX por las graves secuelas que produce a la salud humana y por las dificultades para su diagnóstico, control y prevención. (28)

Agente Etiológico, Características y Ciclo de Vida

En el complejo *Borrelia burgdorferi* sensu lato se reconocen actualmente 19 genomaespecies, *B.burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmani*, *B. bissetti*, *B. bavariensis*, *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. tarukii*, *B. turdi*, *B. sínica*, *B. californiensis*, *B. yangtze*, *B. caroliensis*, *B. americana*, *B. kurtenbachii* y *B. finlandiensis*. Las primeras ocho son consideradas patógenas para el hombre. (3)

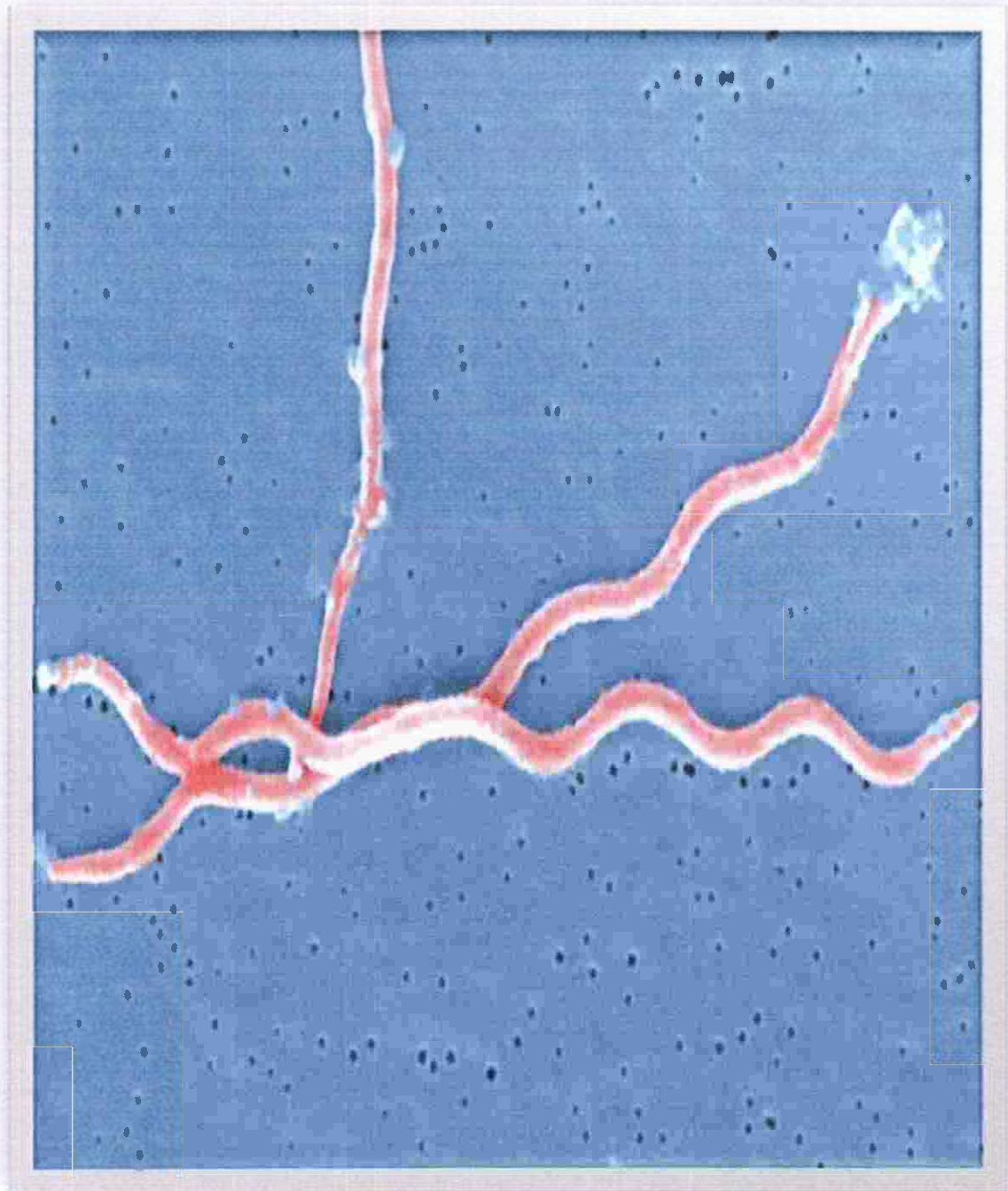
Las Borrelias son microorganismos unicelulares helicoidales y muy flexibles. Presentan una pared celular no rígida y flagelos periplásmicos, estos últimos responsables de su activa y característica movilidad de rotación en contra de las manecillas del reloj. (9)

El genoma *Borrelia burgdorferi* sensu lato es relativamente pequeño, lo que refleja su modo de vida como parásito obligado. Ellas carecen de la maquinaria reconocida convencionalmente para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos y cofactores enzimáticos, los que tienen que obtener del hospedero.

Su genoma, descrito como inusual, está constituido por cromosoma lineal de aproximadamente 1Mb y numerosos plásmidos circulares y lineales.

Borrelia burgdorferi sensu lato tiene un ciclo de vida complejo por que circula entre vectores artrópodos y hospederos vertebrados. Las Borrelias tienen que ser capaces de adherirse y sobrevivir en el intestino de la garrapata, pasar del epitelio de este a la hemolinfa y transportarse a través de las glándulas salivares al flujo sanguíneo del hospedero, evitar la reacción inmune y diseminarse a los órganos diana. En todo este proceso tienen un papel importante varias proteínas de membrana externa y proteínas adhesivas. Cuando las condiciones no son favorables para la multiplicación de *Borrelia burgdorferi* sensu lato como pueden ser la presencia de antibióticos (sobre todo betalactámicos), el LCR o medios con déficit de nutrientes, esta cambia su morfología espiroquetal característica y móvil a esferoplastos o formas L o quistes no móviles (también conocidas como formas císticas). A ello se le atribuye la supervivencia por largos periodos en el sistema nervioso central y periférico, y en las articulaciones, así como la desaparición de los anticuerpos dependientes de la pared celular. Una vez que las condiciones son normales, nuevamente ellas revierten a su forma espiroquetal. Fig.10 (11).

Figura 10: *Borrelia burgdorferi*



Fuente 20

Tabla1: Especies del complejo *Borrelia burgdorferi*.

Especie	Distribución geográfica
<i>B. burgdorferi sensu</i>	EE.UU. Europa Occidental
<i>Stricto</i>	
<i>B. garinii</i>	Europa, partes de Asia
<i>B. afzelii</i>	Europa, partes de Asia
<i>B. japónica</i>	Japón
<i>B. andersonii</i>	Norteamérica
<i>B. tanukii</i>	Japón
<i>B. turdi</i>	Japón
<i>B. valaisiana</i>	Europa, partes de Asia
<i>B. lusitaniae</i>	Europa Central y Mediterránea
<i>B. sinica</i>	China
<i>B. bissettii</i>	EE.UU.
<i>B. californiensis</i>	EE.UU. (Oeste)
<i>B. carolinensis</i>	EE.UU. (Sureste)
<i>B. spielmanii</i>	Europa
<i>B. yangtze</i>	China
<i>B. amaericana</i>	Norteamérica
<i>B. bavariensis</i>	Europa
<i>B. kurtenbachii</i>	Norteamérica

Fuente: 30

ENFERMEDAD DE LYME

La enfermedad de Lyme es una enfermedad transmitida por la garrapata causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Técnicamente esta definición es la correcta, pero clínicamente la enfermedad es a menudo mucho más que solo eso, especialmente en sus etapas diseminada y crónica etapas dos y tres. (20)

En términos más generales la enfermedad de Lyme es una enfermedad que resulta después de la picadura de una garrapata infectada. Esto incluye la infección causada no sólo por *Borrelia burgdorferi* sino también las diversas co-infecciones que además puedan resultar después de adquirir la Borreliosis de Lyme puesto que debilita mucho al sistema inmunológico en la barrera de las llamadas Natural Killer Cells. De hecho en la forma crónica de la enfermedad, otros factores pueden asumir un papel todavía más significativo la disfunción inmunológica, infecciones oportunistas, co-infecciones, toxinas biológicas, desequilibrios metabólicos y hormonales, de condicionamiento, etc. (42)

La Enfermedad de Lyme tiene una distribución mundial, aunque se describe prácticamente solo en el hemisferio norte y constituye la enfermedad transmitida por vectores más común en Estados Unidos y regiones de Euroasia.

La distribución geográfica de *Borrelia burgdorferi* sensu lato patógenas al hombre varía de un continente al otro. En Estados Unidos solo se reporta *B. burgdorferi* sensu stricto; en Europa, se encuentra con mayor frecuencia *B. garinii*, *B. garinii*, *B. afzelii* y *B. burgdorferi sensu stricto*, mientras que en Asia se reportan *B. garinii* y *B. afzelii*. (42)

En América latina y el Caribe existen hallazgos clínicos y de laboratorio sobre la infección por *Borrelia burgdorferi* sensu lato en diversos países como Argentina, Bolivia, Chile, Colombia y Venezuela. En estos se han llevado estudios de seroprevalencia y de búsqueda de la infección en humanos y animales, con

intentos de aislamiento y detección molecular de las Borrelias, que han permitido demostrar evidencias serológicas de la infección, pero que en la mayoría de los países no se han confirmado. (1)

Brasil, México y Cuba constituyen la excepción, puesto que en Brasil los estudios clínicos, serológicos y moleculares han permitido describir un síndrome similar o imitador de la enfermedad de Lyme, en México prácticamente se ha reportado la enfermedad de Lyme, porque se ha encontrado recientemente ADN de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto en garrapatas, además de las evidencias serológicas específicas constatadas con anterioridad en pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas de la enfermedad. En Cuba existen evidencias serológicas específicas que sugieren la infección en diferentes regiones del país (Pinar del río, Artemisa y la Habana) a partir de la confirmación serológica de la infección por pruebas específicas en muestras de sueros de individuos con sospechas clínicas y epidemiológicas, así como por la detección de anticuerpos específicos contra *Borrelia burgdorferi* sensu lato en individuos de una comunidad donde históricamente ha existido infestación por garrapatas. (1)

La enfermedad se presenta en individuos de cualquier edad, es más frecuente en los hombres, en los que se ha comprobado un marcado incremento de las tasa anuales en relación con las mujeres el principal factor de riesgo para adquirir la infección es la permanencia en zonas boscosas o en las que predomine la vegetación, por lo que se considera a la enfermedad de Lyme como una enfermedad profesional para los guarda bosques, leñadores, agricultores y ganaderos. Se debe tener cuidado también en áreas residenciales, especialmente al remover las hojas secas que se crean en los jardines porque estas albergan con frecuencia garrapatas. (7)

El tiempo necesario para la transmisión de las Borrelias por las garrapatas, una vez que comienzan alimentarse sobre el hospedero, varía según el genoma

especie; *B. afzelii* se transmite durante las primeras 24 hrs. Mientras que la *Borrelia burgdorferi* sensu stricto requiere más de 48 hrs. La saliva de las garrapatas contiene numerosas sustancias, entre las que se encuentran anticoagulantes y otras que modulan la respuesta inmune del hospedero y actúan como anestésicos que hacen indolora la mordedura, porque solo 50 a 70% de los pacientes las recuerdan. Las garrapatas constituyen los únicos vectores reportados hasta el momento capaces de transmitir las Borrelias y causar la enfermedad en humanos y animales. Entre las garrapatas, las del genero *Ixodes* son las implicadas mayormente en el ciclo zoonótico de esta espiroqueta. (10)

Existen otros vectores en los que se ha demostrado la presencia de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en sus intestinos, pero no se ha constatado la transmisión a humanos o animales. Entre estos se encuentran mosquitos del género *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*, y las moscas del caballo y del venado. (8)

Etapas de la Enfermedad de Lyme

En general, se sabe que la enfermedad tiene tres categorías: aguda, temprana, diseminada y crónica. Cuanto antes se comience el tratamiento al principio de la infección, mayores serán las probabilidades de éxito. Esto muchas veces resulta contraproducente porque tratar la enfermedad temprana es lo más adecuado pero los síntomas pueden confundirnos con otra enfermedad, entonces estaríamos haciendo las cosas mal porque estaríamos atacando una enfermedad que no es, entonces los síntomas podrían desaparecer pero reaparecerían después con una mayor fuerza y entonces sería más difícil diagnosticarla y el tratamiento sería muchísimo más costoso. (28)

La primera etapa de la enfermedad se caracteriza por un salpullido rojo que se desarrolla alrededor de la picadura de la garrapata el cual tiene por nombre eritema migrans, esta etapa puede ser muy confusa para su diagnóstico porque es muy parecida a la gripe común en cuanto a sus síntomas, esto con frecuencia es la etapa temprana de la enfermedad. (16)

Para asegurarse de que se trata de esta enfermedad se pueden aislar las Borrelias de las orillas principales del salpullido. Pero esto también podría causarnos confusión ya que no en todos los casos aparece salpullido o podría aparecer pero no tratarse de esta enfermedad. También que no todos los salpullidos que aparecen después de la picadura de una garrapata significan aparición de enfermedad de Lyme, este salpullido puede ser debido a una reacción alérgica a la saliva de la garrapata y ocasionar su aparición aun en ausencia de las Borrelias ya que hay muchas personas muy susceptibles a las picaduras de algunos insectos, ácaros etc. lo cual hace que tengan una reacción alérgica.

Los síntomas de la primera etapa pueden ser: Escalofríos, Dolor de cabeza, insomnio y dolores musculares. (5)

La segunda etapa o etapa de diseminación se presenta después de semanas e incluso meses después de la picadura de la garrapata y de los primeros síntomas, las manifestaciones más comunes en los pacientes infectados ya en esta etapa son las neurológicas, cardíacas o artríticas. Las cuales pueden variar entre meningoencefalitis, neuropatía craneal, neuropatía periférica y carditis. (5)

En esta etapa es común ver en los pacientes pérdida de la razón temporal, dolores muy fuertes de cabeza, desmayos, convulsiones, en otros de los síntomas sus manos principalmente los dedos empiezan desfigurarse estas son las características artríticas de la enfermedad, en los síntomas cardíacos destacan más las taquicardias e incluso infartos al corazón. (41)

La tercera etapa se conoce como infección crónica o tardía en la cual los síntomas y señales pueden no aparecer sino hasta semanas, meses o años después de la picadura de una garrapata o exposición a la enfermedad.

La artritis crónica es la principal manifestación de esta etapa en donde la rodilla es la más afectada. Pueden presentarse erupciones conocidas como acrodermitis que se puede manifestar como una decoloración de la piel incluso con un color rojo-azulosa esta erupción es muy difícil de curar y puede estar presente en la piel durante años aun si se trata.

Las manifestaciones del sistema nervioso pueden incluir, entumecimiento, dolor, parálisis de los músculos faciales (generalmente en un lado), meningitis y un dolor intenso de cabeza.

Otra de las muchas manifestaciones es la ocular, esta se puede presentar en cualquier parte del ojo o cualquiera de los dos y esta varía según la etapa de avance de la enfermedad, En la fase 1 de la enfermedad solo podemos observar conjuntivitis y fotofobia estas son leves y duran muy poco algunas veces solo horas la conjuntivitis es la más común esta se presenta en el 11% de los casos. (10)

Durante la fase 2 las más comunes son las manifestaciones neuro-oftalmológicas, principalmente la parálisis de Bell. Algunos pacientes presentan la triada de Lyme la cual se refiere a una parálisis del nervio craneal, meningitis y radiculopatía.

En la fase 3 es cuando se ve la mayoría de las manifestaciones oculares las cuales ya son muy severas las cuales incluyen: espiescleritis, simblefaron, queratitis, iritis, pars planitis, uveítis, coriorretinitis, desprendimiento de retina y oclusión de rama de la arteria central de la retina. (12)

DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO CLÍNICO

Las pruebas de laboratorio clínico comúnmente usadas no revelan información útil para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, puesto que los resultados de hemoglobina, hematocrito, creatinina y de orina son usualmente normales y el conteo de leucocitos puede ser indistintamente normal o elevado. Si existe afectación neurológica, en muestras de LCR puede observarse una pleocitosis linfocítica moderada, concentraciones de proteínas elevadas y de glucosa, de normal a ligeramente baja.

El diagnóstico de esta enfermedad requiere de ensayos microbiológicos, excepto en casos con manifestaciones patognómicas con los eritemas migratorios. Entre ellos se encuentran los métodos de detección directa y los de detección de anticuerpos.

La detección microscópica directa del *Borrelia burgdorferi* sensu lato en campo oscuro y los métodos de detección de antígenos, tienen una aplicación limitada debido al número de casos de microorganismos presentes en las muestras clínicas. (14)

Medios de Cultivo

Para el cultivo de *Borrelia burgdorferi* sensu lato se utilizan medios de cultivo líquidos derivados del medio original de Kelly. Entre las versiones actuales se encuentran los medios BSK II, BSK-H y el medio de Kelly-Pettenkofer modificado (MKP: modified Kelly-pettenkonfer).

Los cultivos se incuban usualmente de 30 a 34°C en condiciones de microaerofilia, durante 12 semanas o más, debido al tiempo de generación prolongado de estas espiroquetas (7 a 20 hrs). También se ha reportado la propagación de líneas celulares obtenidas de garrapatas y mamíferos.

Los aislamientos de Borrelias se han logrado fundamentalmente a partir de tejidos y fluidos corporales, que incluyen biopsias de las lesiones en piel, el LCR y sangre completa (suero y plasma). También se han recuperado aunque con menor frecuencia, de líquido sinovial, tejido cardíaco e iris. (16)

La sensibilidad de cultivo para muestras clínicas no está definida, pero se conoce que es relativamente baja. No se recomienda para la práctica clínica de rutina, pues la variabilidad en la calidad de los lotes de medios de cultivo repercute de manera negativa en la promoción del crecimiento de las espiroquetas. Además, es un método laborioso, caro y lento, para el que disminuye la sensibilidad cuando los pacientes han recibido tratamiento con antibiótico. A pesar de ello, representa el método de referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. (15)

ELISA

Los ELISA constituyen el formato más empleado para detectar los anticuerpos. Se recomienda el empleo de, al menos, pruebas de segunda generación o en las que se utilizan antígenos purificados (componentes flagelares), o pruebas de tercera generación con antígenos recombinantes o péptidos sintéticos para evitar las reacciones cruzadas.

Una opción para el diagnóstico serológico de la neuroborreliosis (enfermedad de Lyme), es la detección de anticuerpos intratecales, para los que se analizan paralelamente muestras de sueros y LCR, porque se considera que hay producción de anticuerpos intratecales cuando el título de anticuerpos en LCR excede el título en suero, o sea, el índice restante o relación entre ellos es mayor que 1. (32)

Entre las limitaciones de los ELISA se encuentra la falta de estandarización, fundamentalmente por las variaciones antigénicas que se pueden presentar entre diferentes estuches comerciales e incluso entre los lotes de un mismo estuche. Las preparaciones de antígenos a partir de células completas disminuye la especificidad por la ocurrencia de reacciones cruzadas. Los ELISA tienen ventajas sobre los otros inmunoensayos, porque son fáciles de realizar, generan de forma objetiva un valor numérico que se correlaciona con la cantidad de anticuerpo presentes en la muestra y pueden ser automatizados.

Las muestras que resultan positivas, dudosas o equivocadas deben ser analizadas con Western Blots. De esta forma se cumple con el algoritmo recomendado por el centers for disease control (CDC), que plantea el empleo de una prueba de pesquisa (IFI o ELISA) con alta sensibilidad, seguida de un Western Blots con alta especificidad, o la realización de ambas simultáneamente. (34)

Western Blots

El uso de Western Blots ha permitido conocer los antígenos *Borrelia burgdorferi* sensu lato inmunodominantes en cada etapa clínica de la enfermedad. Los pacientes con manifestaciones tempranas de neuroborreliosis tienen una respuesta inmune restringida a unas pocas proteínas, mientras que los que manifiestan enfermedad tardía tienen anticuerpos IgG contra un amplio espectro de antígenos.

De forma general, los Western Blots y los ELISA tienen sensibilidades similares, excepto en la detección de anti cuerpos en la fase aguda de la enfermedad temprana, donde el Western Blots es más sensible. En cambio, la especificidad del Western Blots es mayor que la del ELISA (aunque menor que 100%) por que la interpretación se basa en bandas de proteínas específicas inmunoreactivas. (34)

Las principales limitaciones del Western Blots incluyen la lectura visual e interpretación subjetiva de la intensidad de las bandas, la variabilidad de respuestas de anticuerpos en pacientes con iguales manifestaciones clínicas y el costo. En consecuencia, se han desarrollado sistemas comerciales para los que la lectura es automatizada, lo cual reduce la subjetividad y el tiempo requerido para la prueba; sin embargo estas no se utilizan ampliamente.

En 6% de los pacientes con otras enfermedades como artritis reumatoidea, mononucleosis infecciosa y lupus eritematoso sistémico, se reportan resultados falsos positivos a la IgM. La reactividad a esta inmunoglobulina puede persistir por periodos prolongados después del tratamiento de la enfermedad de Lyme temprana. (35)

Dado que los hallazgos serológicos varían de manera considerable y los anticuerpos pueden persistir en individuos tratados con éxito, el seguimiento serológico no es útil para el control de la terapia. Recientemente se recomienda

por autores norteamericanos el empleo del péptido C6 (péptido sintético de 26 aminoácidos que reproduce la secuencia de la sexta región invariable dentro del dominio central de la proteína VIsE) como antígeno para estos fines e incluso se piensa que un futuro el ELISA-C6 pueda ser empleado como una prueba, sin necesidad de confirmación por Western Blots. (35)

PCR

Dada la complejidad del diagnóstico serológico, la disponibilidad de datos objetivos adicionales es muy recomendable. Las técnicas de amplificación del genoma son de especial eficacia, pero tienen el problema de que una constante en esta enfermedad es el bajo número de organismos infectantes. La carga de espiroquetas transmitidas por el vector en el momento de la infección puede oscilar de unos cientos hasta 5.000 y el número de genomas en líquidos corporales puede ser menor de 50/ ml. En estas circunstancias es necesario, en primer lugar, disponer de técnicas de extracción y purificación de ADN que eviten al máximo la pérdida de material durante el procesamiento de la muestra. Para este objetivo, se han descrito una gran variedad de métodos dependiendo de la muestra a tratar. Los métodos tradicionales incluyen una disrupción de las células, inactivación de RNasas y/o DNasas con sales caotrópicas, degradación de proteínas con proteinasa K, extracción del ADN con fenol-cloroformo y precipitación con alcoholes (etanol o isopropanol). Dado el bajo número de copias de genoma en las muestras, se han ensayado métodos alternativos que aumentan la sensibilidad. Entre ellos, la extracción con tiocianato de guanidina permite la extracción y precipitación sin cambiar de tubo, evitando la pérdida de material en los trasvases que se realizan en los métodos tradicionales. Otros métodos más simples aplicables a muestras líquidas realizan una centrifugación y posterior tratamiento por ebullición del sedimento, sin extracción posterior. En cualquier caso se recomienda la adición de "carriers" (glicógeno, ADN de leptospiras, etc.) que ayudan a precipitar pequeñas cantidades de ADN. También existen en el mercado procedimientos basados en matrices de resina que captan el ADN que será eluido a través de columnas desechables. Estos métodos que evitan el uso de disolventes pueden dar lugar a problemas de sensibilidad con *Borrelia*. (37)

La técnica de amplificación también es vital a la hora de obtener una buena sensibilidad. Un test de PCR anidado, ("nested" o "semi-nested"), donde se realizan dos amplificaciones consecutivas mediante el uso del producto de la primera amplificación como diana para la segunda, proporciona un gran rendimiento. El procedimiento de detección de los amplificados también ayuda a mejorar la sensibilidad. Un método de detección ampliamente utilizado, con una gran sensibilidad y especificidad comprobadas por diferentes grupos, es el llamado "Reverse Line Blotting", donde los productos de amplificación, marcados con biotina (mediante el uso de uno de los iniciadores marcados) se hibridan sobre una membrana de nylon en la que se han aplicado sondas específicas de diferentes genoespecies. De esta manera, se obtiene un resultado positivo/negativo además de la genoespecie del organismo causal. La variabilidad en los genes elegidos para su amplificación es uno de los factores que introducen problemas de estandarización en este tipo de tests. La elección tiene que pasar obligatoriamente, por el empleo de regiones del genoma con poco grado de variabilidad. Se han descrito casi tantos métodos como genes específicos tiene el microorganismo. Los más utilizados son los que amplifican diversas regiones de ospA (en su zona menos variable), regiones de fla (flagelina), p93 (gen cromosómico con poca variabilidad) y los espacios intergénicos entre las unidades 5S y 23S del ADN ribosómico. En cualquier caso, ospA es, con diferencia, el gen más empleado y el que permite obtener resultados con una mayor sensibilidad. (34)

Como resumen, una PCR que incluya una extracción con tiocianato de guanidina en un único tubo con glicógeno como "carrier", amplificación de ospA de forma anidada y una detección de los amplicones mediante hibridación debe tener unos valores de sensibilidad muy buenos. Este tipo de técnicas, al alcance de cualquier laboratorio que disponga de las instalaciones para la realización de PCR, sin ninguna dificultad de interpretación serán el futuro para el diagnóstico de esta enfermedad y facilitarán, además, datos sobre las

distintas genoespecies causantes de enfermedad humana ayudando a la producción de tests serológicos con mejores parámetros de sensibilidad y especificidad aunque será ya difícil disponer de técnicas serológicas que mejores significativamente el diagnóstico.

Estas pruebas están disponibles en la actualidad para diagnosticar esta enfermedad pero su sensibilidad aún es muy pobre. Esto es porque *Borrelia burgdorferi* causa una infección del tejido profundo y se encuentra sólo transitoriamente en los fluidos corporales y sería muy difícil diagnosticar esta enfermedad mediante esta técnica solamente en su etapa temprana la cual es muy confusa y no específica de Lyme, pero si desde la etapa temprana o etapa uno solo con los síntomas se supiera que se trata de la enfermedad de Lyme sería esta la herramienta primordial. (36)

Pero aún permanece pobre, posiblemente menos de un 30%. Por lo tanto, así como en los cultivos de sangre rutinarios, deben recogerse múltiples especímenes para aumentar el margen, un resultado negativo no descarta la infección, pero uno positivo es significativo. Puedes examinar la sangre entera, de la capa de leucocitos, el suero, la orina, el fluido espinal y otros fluidos corporales y biopsias de tejidos.

Se pueden hacer varias PCR en sangre o se puede realizar PCR en sangre entera, suero y orina simultáneamente en un momento con síntomas activos. El paciente debe estar libre de antibióticos al menos durante 6 semanas antes del examen para así obtener el margen más alto. (36)

La Captura de Antígenos

Está cada vez más ampliamente disponible, y se puede hacer en orina, LCR y líquido sinovial. La sensibilidad todavía es baja alrededor del 30%, pero su especificidad es alta más de un 90%. Es específico más no sensible así que también es pobre en cuanto a los resultados. (4)

El organismo tarda cierto tiempo en producir los anticuerpos frente a *B. burgdorferi*. Los anticuerpos frente a *B. burgdorferi* de tipo IgM (inmunoglobulina M) suelen ser detectables en sangre a las dos o tres semanas de la exposición; su concentración aumenta y alcanza un máximo a las seis semanas y posteriormente empieza a declinar. Los anticuerpos de tipo IgG (inmunoglobulina G) se detectan varias semanas más tarde de la exposición, alcanzan un nivel máximo al cabo de unos seis meses y pueden mantenerse elevados durante muchos años.

La presencia de los complejos (*Ag Borrelia, IgG anti-Borrelia burgdorferi, conjugado anti-IgG*) que se forman eventualmente es revelada mediante la adición de una solución enzimática de revelado en cada pocillo. (4)

Las Punciones Lumbares

No se recomiendan rutinariamente, ya que una punción lumbar negativa no descarta el Lyme. Los anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* se encuentran principalmente en la meningitis de Lyme, y se observan rara vez en infecciones no meningíticas del SNC, incluyendo encefalopatía avanzada. Incluso en casos de meningitis, los anticuerpos se detectan en el LCR en menos del 13% de los pacientes con Lyme tardío. Por lo tanto, las punciones lumbares se practican solamente en pacientes con manifestaciones neurológicas muy fuertes en los que el diagnóstico es incierto, si son seronegativos, o siguen aún sintomáticos después de completar el tratamiento. Cuando sea realizada, el objetivo es el de descartar otras condiciones, y determinar si están presentes antígenos y ácidos nucleicos de *Borrelia burgdorferi*. Es especialmente importante observar si las proteínas y glóbulos blancos están elevados, lo que daría la necesidad de una terapia más agresiva, así como también la presión de apertura, que puede ser más fuerte y contribuir a los dolores de cabeza, especialmente en los niños. (17)

La prueba LCR no está indicada en los siguientes estados de la enfermedad en relación con neuroborreliosis de Lyme, porque no son de esperar resultados patológicos:

- Encefalopatía crónica en la borreliosis de Lyme.
- Polineuropatía crónica en la etapa tardía.

Pleocitosis (recuento de células en $5/\mu\text{L}$), el nivel de elevación de la proteína y la evidencia de la síntesis intratecal de anticuerpos específicos de *Borrelia* (LCR / suero ratio) son indicios de neuroborreliosis aguda.

Sin embargo, si la neuroborreliosis se produce muy poco tiempo después de la infección por *Borrelia* y con manifestaciones tardías, los anticuerpos de *Borrelia* específicos estarán ausentes tanto en suero como en LCR o aparecerán más pronto en el LCR que en el suero, y viceversa. (18)

La detección de *Borrelia* formadas por vía intratecal de anticuerpos específicos en el LCR es sólo muy rara vez es posible en los casos de la borreliosis de Lyme, con afectación neurológica.

Sería mejor hacer biopsias en todas aquellas lesiones o sarpullidos de la piel inexplicables y realizar PCR y cuidadosa histología. Para alertar al patólogo en cuanto a la observación de espiroquetas. (42)

Prueba CD57

Medir los recuentos de CD57 representa un gran avance en el diagnóstico y tratamiento de la Borreliosis de Lyme.

Las Infecciones crónicas de Borrelia se sabe que suprimen el sistema inmune y pueden disminuir la cantidad del subconjunto CD57 de las células Natural Killer. Así como en la infección del VIH, se usan rutinariamente los recuentos de células T anormalmente bajos como marcadores para saber qué actividad tiene la infección, en la Borrelia podemos usar el grado de la disminución en el recuento del CD57 para indicar la actividad de la infección de Lyme y si, después del fin del tratamiento, es probable que ocurra una recaída. Incluso puede utilizarse como una prueba de cribado sencilla de bajo costo, porque en este momento, creemos que sólo Borrelia es capaz de deprimir los CD57. Así, un paciente enfermo con las CD57 altas, está probablemente enfermo de algo distinto del Lyme, tal como una co-infección. (33)

El recuento normal para personas sanas es encontrarse por encima de 200. Generalmente hay un grado de fluctuación en el recuento a través del tiempo, y el número no aumenta progresivamente a medida que avanza el tratamiento. Sino, que permanece bajo hasta que la Borreliosis de Lyme esté controlada, y luego subirá de golpe. Si el recuento de CD-57 no está en el rango normal cuando se concluya un curso de antibióticos, entonces es casi seguro que tendrá lugar una recaída. (39)

La prueba del recuento de CD57 está disponible en la Sanidad Pública pero según los protocolos médicos dicen que no pueden realizarla. Así que una vez más nos vemos obligados a enviar las muestras de sangre a Europa o E.E.U.U.

El laboratorio Infectolab de Alemania realiza dicha prueba y también los laboratorios IGENEX de E.E.U.U. (32)

Esta prueba nos sirve para medir las células CD57 y representa un gran avance en el diagnóstico y tratamiento de la Borreliosis de Lyme.

Estudios de investigación clínica y estudios de casos han mostrado que las infecciones crónicas de Lyme suelen ir acompañados de cambios en la defensa inmune celular. La evidencia de esto es una disminución del número de las llamadas Natural Killer-Cells (NK; CD3-CD56 +), pero sobre todo un número absoluto disminuido y partes de las células NK activadas (CD3-CD56 + CD57 +). Mientras que las infecciones agudas de Lyme y otras enfermedades muestran CD57-parámetros normales, pacientes de Lyme crónica a menudo tienen parámetro de 100 CD57-cells/ μ l en la sangre o menos. (35)

Esto hace a esta prueba la prueba más veraz y más eficaz para el diagnóstico de esta enfermedad solo con una desventaja la cual sería el alto costo, fuera de ahí esta prueba sería la indicada para diagnosticar Borreliosis de Lyme y es una de las más empleadas en los países primer mundistas donde existen casos de esta enfermedad. Virginia Yáñez (2008) número absoluto disminuido y partes de las células NK activadas (CD3-CD56 + CD57 +). Mientras que las infecciones agudas de Lyme y otras enfermedades muestran CD57-parámetros normales, pacientes de Lyme crónica a menudo tienen parámetro de 100 CD57-cells/ μ l en la sangre o menos. (35)

Tabla 2: Métodos de inmunodiagnostico y moleculares para detección de *Borrelia burgdorferi* en muestras clínicas de pacientes con sospecha de enfermedad de Lyme adquirida en México.

Manifestación clínica	N	WB (+) (%)	PCR fla (+) (%)	Southern – blot fla (+)
Cutáneos	40	6	4/6 (67%)	5/6 (83%)
EM	3	1	1/1	1/1
Linfocitoma cutáneo	3	3	1/3	2/3
ACA	3	1	1/1	1/1
Mórfea	31	1	1/1	1/1
Neurológicos	19	11	3/7 (42%)	3/7 (42%)
N craneal	7	4	1/1	1/1
Poli radiculopatía	12	7	3/6	3/6
Artritis	9	3	1/1	1/1
Total	72	20 (28%)	8/14 (57%)	9/14 (64%)

Fuente: 27

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La enfermedad de Lyme es muy agresiva y presenta ciertas dificultades para poder llegar a su diagnóstico. Por los signos y síntomas que manifiesta una persona, se puede confundir con otro padecimiento. Si se lleva a cabo un tratamiento de fármacos inadecuados, el padecimiento continuara avanzando.

Respecto a la ayuda diagnostica que en el laboratorio clínico se pueda realizar, en las pruebas actuales no se cuenta, de manera rutinaria con una que tenga las características requeridas de sensibilidad, especificidad y tiempo de detección, para confirmar la presencia o no de la bacteria causante de tal enfermedad en el paciente en estudio.

Por lo tanto se recomiendan se desarrollen estudios donde se investigue la presencia de la garrapata, así como de las bacterias que son causantes de la enfermedad de Lyme. Así mismo, que las personas expuestas a las anteriores tomen las medidas pertinentes para evitar el contagio de la mencionada enfermedad.

Por lo anterior, es necesario protegerse uno mismo de las picaduras de las garrapatas, retirando maderas amontonadas, paredes de piedra, comederos de pájaros, ya que estos atraen a pequeños animales portadores de garrapatas y puede aumentar el riesgo de adquirir Lyme.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Álvarez, M. & Molina I. (2016). Enfermedades Infecciosas y Metodología Clínica. Elsevier. 34 (2), Recuperado Enero, 12, 2016 de <http://www.elsevier.es/ct-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28>
- 2.- Aylin, B. (2013). Naturaleza sorprendente. (Fotografía). Recuperado marzo, 10, 2016 desde la web: <http://www.chismesmundo.com/naturaleza-sorprendente-seres-vivos/>
- 3.- Barbour, A. G., Jasinskas, A., Kayala, M. A., Davies, D.H., Steere, A. C., Baldi, P. & Felgner, P. L. (2008). A genome-wide proteome array reveals a limited set of immunogens in natural 4. Infections of humans and white-footed mice with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* [Abstract], 76 (11), 37-88. Retrieved April, 1, 2012, from University of California. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474646>
4. - Battisti, J. M., Bono, J. L., Rosa, P. A., Schrupf, M. E., Schwan, T. G. & Policastro, P. F. (2008). Outer Surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in The tick vector. *Infect Immun.* [Abstract], 76 (11), 87-128. Retrieved April, 1, 2012, from University USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779341>
5. - Berrada, Z.L., Telford, S.R. (2009) Third. Burden of tick-borne infections on American companion animals. [Abstract], 24 (4), 81-175. Retrieved April, 1, 2012, from Laboratory New England. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945085>
6. - Beugnet, F., Kolasinski, M., Michelangeli, P.A., Vienne, J. & Loukos, H. (2011). Mathematical modelling of the impact of climatic conditions in France on *Rhipicephalus sanguineus* tick activity and density since 1960. [Abstract] 5(2), 63-

255. Retrieved April, 1, 2011, from Geospat Health.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590676>
7. - Bowen, M. D. (1984). Lyme Disease in New Jersey, 1978-1982. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. [Abstract], 57(17), 661-668. Retrieved May, 26, 2012 from source.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2590043/pdf/yjbm00100-0207.pdf>
8. - Burrascano, Jj. (2008). *Advance topics in lyme disease*, (16 ed.) New York, USA: ronald press.
9. - Brunner, J. L., Logiudice, K., & Ostfeld, R.S. (2011). Estimating reservoir competence of *Borrelia Burgdorferi* hosts: prevalence and infectivity, sensitivity and specificity. [Abstract], 45(1), 47-139. Retrieved Jan 1, 2008, from *Entomologica Medicine*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283955>
- 10.- Cameron, D. J., Johnson, L.B. & Maloney, E. L. (2014). Evidence assessments and guideline recommendations in lyme disease: the clinical management of known tick bites, erythema migrans rashes and persistent disease [abstract] *anti-infect* 12(9), 1103-1135. Retrieved august, 26, 2015 from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4196523/>
11. - Contreras, F., Rodríguez, J.J. & Muniain, M.A. (2005). Ticks (Acarina: Ixodida) as vectors and reservoirs of pathogen microorganism in Spain. [Abstract], *Ticks vectors Borrelia*, 23(2), 1307-1613. Retrieved January, 12, 2012, from web: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-las-garrapatas-acarina-ixodida-como-13071613>
- 12.- Dantas, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. [Abstract], 3(26), 1186-1756. Retrieved May, 9, 2009, from *Biomed Central the USA*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857863/#>

13. - Farkas R.(2010). Ticks and Tick borne diseases of companion animals in Central Europe. Distance learning course. Retrieved July, 21, 2012 from http://www.google.com.mx/url?url=http://eurekabymerial.es/descargar_bibliotek.php%3Felid%3D59&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwi2jMiw_PzKAhXluoMKHZ86AylQFggTMAA&usg=AFQjCNEBOxfRYk-GRPQoeJ5T_9bWCcy0oQ
- 14.- Fernandez, S. (2008). M.E. Lyme disease: Laboratory issues. *Infect Disciplic N. AM.* [Abstract]. 22(3), 301-313. Retrieved May 12 (2010), from the web: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1889543316000190>
- 15.- Frame, P. (2001). The footage colletion run by filmmakers. (photograph). Retrieved march, 10, 2016 from the web: <http://footage.framepool.com/ja/shot/596346709-wood-tick-struggle-pedal-mouth-tools-mating>
- 16.- Garcia, M. E., Skinner, T., Salas, J.C. & Ocampo, J. (2014). Enfermedad del lyme [abstract], 56(4),84-95. Recuperado marzo, 10, 2016 from the web: http://www.anmm.org.mx/gmm/2014/n1/gmm_150_2014_1_084-095.pdf
- 17.- Gómez, J. (2015). Características de las garrapatas (fotografía). Recuperado enero, 18, 2016 desde la web: <http://www.canonistas.com/foros/macro/169000-macros-macros-55.html>
- 18.- Gordillo, P. G., Torres J.,* Solórzano, S., Fortino.,* De Martino, S., Dan L., † & Velazquez, E. (2007). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe.[abstract], 13(10), 1556-1558. Retrieved august, 24, 2012, from *emerg infect dis.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2851501>
- 19.- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada, A., Kahl, O. & Lindgren, E. (2009). *Interdiscip perfect infect* (photograph). Retrieved august, 24, 2012 from

published on line web:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2648658/figure/fig5/>

20. - Haney, C. J. (2015). *Borrelia Burgdorferi*. (Fotografía). Recuperado enero, 18, 2016 desde la web:
<http://www.bacteriainphotos.com/borrelia%20burgdorferi%20electron%20microscopy.html>

21. - Herrera, L., Infante, J., Ramírez, C. & Lavastida, H. (2011). Enfermedad de Lyme: historia, microbiología, epizootiología y epidemiología. *Revista cubana de higiene y epidemiología*, 50(2), 231-244. Recuperado octubre, 23, 2015, desde web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubhigepi/chi-2012/chi122l.pdf>

22.- Idro, R., Chandy C. J., & Charles, R.J. (2010). Cerebral malaria; mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive outcome cerebral malaria. [abstract], 68(4), 433-441. Retrieved april, 18, 2012, from funder europe. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3056312/>

23.- Karis, E. (2005). The Castor vean ticks. (Photograph). Retrieved March, 10, 2016. from web: http://www.123rf.com/photo_39818690_the-castor-bean-tick-ixodes-ricinus.html

24.- Killiela, M. (2008). *Ixodes pacificus* (photograph). Retrieved august, 22, 2014 from the web: http://wikidoc.org:8000/index.php/ixodes_pacificus

25. - - Márquez, J.F., Pontiveros, A., Contreras, F., Rodriguez, J.J. & Muniain, M.A. (2005). Ciclo de vida de *Ixodes Ricinus* (Fotografía). Recuperado Enero 13 de 2015, from the web: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-las-garrapatas-acarina-ixodida-como-13071613>

26.- Mazusagua, T. (2013). Reporte de casos en Estados Unidos de Ixodes Ricinus.(Fotografía). Recuperado en Agosto 24 de 2014. Recuperado de la web: <http://propark.wordpress.com/tag/enfermedadestransmitidas-por-plagas/>

27.- Michelangeli, J. (2013). Métodos de inmunodiagnostico y moleculares para detección de Borrelia Burgdorferi en nuestras clínicas de pacientes con sospecha de enfermedad de Lyme adquirida en México. (Fotografía). Recuperado en Abril 23 de 2014, de la fuente web: <http://scielo.org.mx/pdf/bmim/v67n2a10.pdf>

28.- Milutinovic, M., Masuzawa, t., & Tomanovic, S.(2008) Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma phagocytophilum, Francisella tularensis and their co-infections in host-seeking Ixodes ricinus ticks collected in Serbia. [Abstract], 62 (4), 171-183. Retrieved April, 12, 2014, from the Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000400015

29.- Molina, J., Álvarez, M. & Molina, I. (2016). Medical care for refugees: A question of ethics and public health. Enfermedades Infecciosas y Metodología Clínica. 34 (2), Recuperado Enero, 12, 2016 from the web: <http://www.elsevier.es/ct-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28>

30.- Mlogiudice, K. (2015). Especies del complejo Borrelia Burgdorferi. (Fotografía). Recuperado en Septiembre 13 de 2015. Fuente web: http://www.anmm.otg.mx/GMM/2014/N1/GMM_150_2014_1_084-095.pdf.

31.- Musser, G. & Carleton. M. (2015). Superfamily muroidea. In mammal species of the world: a taxonomic and geographic. [abstract,] 22(1), 894-1531. Retrieved september, 12, 2015, from the web:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0327-93832015000100018

32. - Perez, J.M. (2015). Control de plagas en sanidad (fotografía) recuperado enero, 15, 2016 desde la web: <http://controldeplagassanidadambiental.blogspot.mx/2015/01/ixodes-ricinus.html>

33.- Pérez, M., Guzmán, C., Montiel, G., Paredes, R. & Rivas, G. (2010). Revista Mexicana Biodiversidad, 81(10), 289-298. Recuperado Enero, 22, 2015 desde <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v85sene/v85senea48.pdf>

34.- Pontiveros, A.(2005). Ticks (Acarina: Ixodida) as vectors and reservoirs of pathogen microorganism in Spain. Revista Elsevier, 23(2), 38-45. Retrieved Enero, 23, 2014 from the web: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-las-garrapatas-acarina-ixodida-como-13071613>

35.- Radulovic, M., Milutinovic, S., Tomanivic A. & Mulenga, M. (2010). Detection of Borrelia _ Specific 16S r RNA sequence in total RNA extracted from , Ixodes ricinus ticks. [Abstract], 62 (4), 862-867. Retrieved April, 1, 2012, from university USA. <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v62n4/15.pdf>

36.- Rodríguez, I. C. (2013) actualización acerca de borrelia burgdorferi sensu lato y enfermedad de Lyme. Revista cubana de medicina tropical, 65(2), 33-50. Recuperado agosto, 27, 2015, desde http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0375-07602013000200002&script=sci_arttext

37.- Rodríguez, R., Fernández, M. & Fuentes, O. (2011). Enfermedades del Lyme en Cuba. Revista Cubana Med Trop. 55(1), 41-43. Recuperado el Octubre, 23, 2014, desde http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-30032012000200012&script=sci_arttext

- 38.- Rosas, P. (2014). Prevalencia de infección *Borrelia Burgdorferi* en la ciudad de México y Zona Noroeste de la Republica Mexicana.(Fotografía)
Recuperado 12 Mayo de 2015, de la web:
<http://laenfermedadde Lyme24.blogspot.mx/p/reporte-de-algunos-estudios.html>
- 39.-Salked, D. J., Nieto, N. C., Carbajales, P., Carbajales, M., Cinkovich, S. S., & Lambin, E.F. (2015). Disease Risk & Landscape Attributes of Tick-Borne *Borrelia* Pathogens in the San Francisco Bay Area- California.[Abstract] *Plos One* 10(8), 535-40. Retrieved August, 25, 2015 from
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134812>
- 40.- Schmed, G.(2015). Control de plagas de garrapatas y mosquitos. (Fotografía). Recuperado en Enero 15 2016, de la fuente web:
<http://www.higieneambiental.com/control-de-plagas/mapas-actualizados-de-la-distribucion-de-vectores-en-europa-mosquitos-garrapatas-y-flebotomos>
- 41.- Wall, R. & Shearer, D. (1997). *Veterinary entomology*. (ed.2da). London, England. Retrieved enero, 12, 2016, from the web:
<http://www.springer.com/in/book/9780412615108>
- 42.-Yañez, V. (2008). Claves y guías para el tratamiento de la Enfermedad del Lyme. [Abstract], 16(2), 118-221. Retrieved jan, 05, 2014, from the web:
http://researchednutritional.com/FactSheets/Burrascano's%20Spanish%20Advanced%20Topics%20in%20Lyme%20Disease%20_12_17_08.pdf