

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Patología Animal I
(Sanidad Animal)**



**EPIDEMIOLOGÍA DE “BORRELIA BURGDORFERI S L”
(ENFERMEDAD DE LYME) EN UN ECOSISTEMA DE
PINAR DE MONTAÑA SUPRAMEDITERRÁNEO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elena Caride Villaamil

Bajo la dirección de los doctores

Alfredo Solana Alonso

José Alberto Rodríguez Rodríguez

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2154-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I
(SANIDAD ANIMAL)**



**EPIDEMIOLOGÍA DE *Borrelia burgdorferi* s.l.
(ENFERMEDAD DE LYME) EN UN
ECOSISTEMA DE PINAR DE MONTAÑA
SUPRAMEDITERRANEO**

TESIS DOCTORAL

ELENA CARIDE VILLAAMIL

MADRID, 2002

A mis padres
A mis hermanos
A Javier
A Antonio, desde el cielo

D. Alfredo Solana Alonso, Catedrático de Patología Infecciosa; D. José Alberto Rodríguez Rodríguez, Profesor Titular de Parasitología y Enfermedades Parasitarias; y Dña. Ángeles Sonia Olmeda García, Profesor Asociado T.C. del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal), de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: Que el trabajo de la tesis doctoral titulado “Epidemiología de *Borrelia burgdorferi s.l.* (enfermedad de Lyme) en un ecosistema de pinar de montaña supramediterráneo”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid Doña Elena Caride Villaamil, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como Directores de la mencionada Tesis Doctoral, en Madrid a quince de abril de dos mil dos.

D. Alfredo Solana Alonso D. José Alberto Rodríguez Dña. A. Sonia Olmeda García

Este apartado va dedicado a todas aquellas personas sin cuya ayuda no habría sido posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, debo agradecer a mis directores de Tesis, Drs. Alfredo Solana Alonso y José Alberto Rodríguez Rodríguez, la confianza que depositaron en mí en la realización de este trabajo, y a la Dra. Sonia Olmeda García más amiga que “jefa”, con la que he compartido los momentos de mayor desesperación así como los de mayor alegría, durante todo este periodo.

Quisiera agradecer al Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) el haberme permitido desarrollar el presente trabajo en sus instalaciones.

Asimismo, a todo el personal de Fort Dodge, Veterinaria, especialmente a Virginia Rodríguez y a Eusebio Uruburu a quienes mareé tanto durante mi periodo de beca predoctoral.

A José Luis Leal, Che y Pilar, quienes malgastaron horas de estudio para ayudarme en las pruebas serológicas.

A Félix Valcárcel, Elena Peribáñez y, de nuevo, a mi querida amiga Sonia, por ayudarme con los pequeños roedores en Cercedilla.

A Emilio Castillejo, por haberme proporcionado las sangres del Centro de Salud de Cercedilla.

A mis amigas Aurora Fernández, Carmen Martín Espada y Gloria Santurde, por aguantarme y consolarme en los momentos más amargos del trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, Rosa y Lola, por escuchar todas mis quejas intentando animarme.

Por último, a mi familia, a mis padres y hermanos, que aguantaron mi nerviosismo, a Javier, quien ha colaborado dándome apoyo moral y a Antonio, cuyo ejemplo he intentado seguir y que me guiará ahora que está en el Cielo.

Introducción y Objetivos	2
Revisión Bibliográfica	6
1. Historia	7
2. Agente causal	9
3. Epidemiología	17
3.1. Vectores	17
3.1.1. Definición	17
3.1.2. Características que deben cumplir	17
3.1.3. Las garrapatas como ectoparásitos y vectores de enfermedades	18
3.1.4. Antecedentes históricos	19
3.1.5. Especies de ixódidos reconocidos como vectores	20
3.1.5.1. <i>I. scapularis</i> (sinónimo <i>I. dammini</i>)	21
3.1.5.2. <i>I. pacificus</i>	22
3.1.5.3. <i>I. dentatus</i>	22
3.1.5.4. <i>I. ricinus</i>	23
3.1.5.5. <i>I. persulcatus</i>	25
3.1.5.6. <i>I. ovatus</i>	26
3.1.5.7. <i>I. frontalis</i>	26
3.1.5.8. <i>I. uriae</i>	26
3.1.5.9. <i>I. hexagonus</i>	26
3.1.5.10. <i>I. canisuga</i>	26
3.1.6. Otras especies de artrópodos en las que se ha visto el agente	27
3.1.7. Ciclo biológico del vector del agente de la enfermedad de Lyme	27
3.1.7.1. Descripción del ciclo biológico	27
3.1.7.2. Fases no parásitas del ciclo biológico de <i>Ixodes</i>	30
3.1.7.2.1. Diapausa	30
3.1.7.2.2. Fases de actividad	31
3.1.7.2.3. Fases parásitas del ciclo	32
3.1.8. Transmisión del agente (<i>Borrelia burgdorferi</i>) de la garrapata al hospedador	37
3.2. Reservorios	42
3.3. Hospedadores no reservorios	57
3.3.1. Humana	57
3.3.2. Perros	58
3.3.3. Vacuno	62
4. Patogenia	63
4.1. Infección del hospedador	63
4.2. Diseminación	64
4.3. Respuesta inmune del hospedador	64
5. Síntomas	66
5.1. Sintomatología general	67
5.2. Sintomatología cutánea	67
5.3. Síntomas neurológicos	68
5.4. Síntomas músculo esqueléticos	69
5.5. Otras manifestaciones menos frecuentes	69
6. Diagnóstico	70
6.1. Diagnóstico epidemiológico	70

6.2. Diagnóstico clínico	71
6.3. Diagnóstico laboratorial	73
6.3.1. Cultivo y aislamiento	73
6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73
6.3.3. Diagnóstico serológico	74
6.3.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	75
6.3.3.2. Enzimo-inmuno ensayo (ELISA) indirecto	76
6.3.3.3. Western blot o inmunoblot	76
6.4. Diagnóstico diferencial	83
7. Tratamiento	87
8. Prevención	88
Material y Métodos	92
1. Material de laboratorio	93
1.1. Material fungible	93
1.2. Aparatos	94
2. Reactivos	95
2.1. Preparación del antígeno para las técnicas serológicas	95
2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	95
2.3. ELISA indirecto	96
2.4. Inmunoblot	97
2.5. Diagnóstico diferencial en humana	98
2.6. Aislamiento de <i>Borrelia burgdorferi</i> de garrapatas y de micromamíferos	98
2.7. Inmunofluorescencia directa de garrapatas	99
3. Soluciones de trabajo	99
3.1. Recuperación de borrelias	99
3.2. Técnica de ELISA indirecto	100
3.3. Técnica de inmunoblot	102
3.4. Aislamiento de <i>Borrelia burgdorferi</i> en garrapatas	106
4. Material de trabajo	107
4.1. Estudio serológico de la población animal y humana de la Sierra de Guadarrama	107
4.2. Estudio del hospedador reservorio	108
4.3. Estudio del vector <i>Ixodes ricinus</i>	108
5. Procedimientos	109
5.1. Obtención del antígeno de <i>Borrelia burgdorferi</i>	109
5.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	109
5.2.1. Valoración de la eficacia del conjugado anti-IgG de <i>Mus musculus</i> para ratones de campo	111
5.3. ELISA indirecto	111
5.3.1. Desarrollo de la prueba	112
5.3.1.1. Protocolo seguido en el análisis de los sueros de cánidos y bóvidos	112
5.3.1.2. Protocolo seguido en el análisis de los sueros de humana y roedores	113
5.4. Inmunoblot	114
5.5. Diagnóstico diferencial en humana	116
5.6. Inmunofluorescencia directa de garrapatas	116
5.7. Aislamiento y caracterización de variedades locales de <i>Borrelia</i> spp. de garrapatas y hospedadores	117

Resultados	118
1. Estudio serológico de la población animal y humana de la Sierra de Guadarrama	119
1.1. Población canina	119
1.1.1. Resultados de la inmunofluorescencia indirecta (IFI)	119
1.1.2. Resultados obtenidos por ELISA indirecto	120
1.1.3. Comparación de ambas técnicas	121
1.1.4. Comprobación por inmunoblot	121
1.2. Ganado vacuno	122
1.2.1. Resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta (IFI)	122
1.2.2. Resultados obtenidos por ELISA indirecto	123
1.2.3. Comprobación por inmunoblot	124
1.3. Población humana	125
1.3.1. Resultados de la inmunofluorescencia indirecta (IFI)	126
1.3.2. Resultados obtenidos por ELISA indirecto	126
1.3.3. Comprobación de los resultados anteriores por inmunoblot	127
1.3.4. Diagnóstico diferencial con sífilis y factor reumatoide	128
2. Estudio del hospedador reservorio	128
2.1. Eficacia de los conjugados anti-IgG de <i>Mus musculus</i> para ratones de campo (<i>Apodemus sylvaticus</i>)	129
2.2. Estudio serológico de la población de micromamíferos capturada en la Sierra de Guadarrama	131
2.2.1. Resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta (IFI)	132
2.2.2. Resultados obtenidos por ELISA indirecto	132
2.2.3. Comprobación de los resultados por inmunoblot	132
3. Estudio del vector <i>Ixodes ricinus</i>	133
3.1. Estacionalidad del ciclo biológico de los ixódidos en la Sierra de Guadarrama	133
3.2. Inmunofluorescencia directa de garrapatas	136
4. Aislamiento y caracterización de cepas de <i>B. burgdorferi</i> de micromamíferos y de garrapatas	137
Discusión	138
1. Estudio serológico de la población animal y humana de la Sierra de Guadarrama	139
1.1. Población canina	139
1.2. Ganado vacuno	141
1.3. Población humana	141
2. Estudio del hospedador reservorio	144
3. Estudio del vector potencial	145
3.1. Estacionalidad del ciclo biológico de los ixódidos en la Sierra de Guadarrama	145
3.2. Infección de <i>Ixodes ricinus</i>	149
4. Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Borrelia burgdorferi</i> de micromamíferos y de garrapatas	150
Conclusiones	152
Bibliografía	154

RESUMEN

El riesgo de adquisición de determinadas enfermedades, como aquellas transmitidas por garrapatas, ha aumentado en los últimos años, debido al mayor contacto del hombre con la naturaleza y los animales domésticos y silvestres. Una de estas enfermedades, la borreliosis de Lyme, ha sufrido un considerable incremento en el número de casos diagnosticados en España.

En este trabajo hemos estudiado el posible riesgo de contacto del agente de la enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) con la población humana y animal que frecuenta la Sierra de Guadarrama, hábitat en el que coexisten los vectores y reservorios potenciales de esta espiroqueta. Para ello, realizamos un estudio serológico utilizando distintas técnicas, validando la más específica. Asimismo, quisimos conocer la prevalencia de los vectores potenciales y comprobar la importancia de los micromamíferos como reservorios de la bacteria.

La seroprevalencia encontrada en la población estudiada fue muy superior con técnicas de uso rutinario como son la IFI y el ELISA que la hallada al utilizar métodos más específicos como el inmunoblot, por lo que se concluyó que fueron debidas a reacciones cruzadas, siendo la técnica de elección esta última.

El ciclo estacional de *Ixodes ricinus* dura dos años, siendo el único periodo de riesgo para el hombre el de la actividad de las ninfas, que sería la primavera o, según la humedad, el verano.

Con respecto a los roedores, se vio que, tras la infección experimental, la respuesta humoral es muy intensa, pero en la naturaleza no se encuentra infección en ellos, debido al bajo grado de infestación que presentan, gracias a la abundancia de lagartijas en la zona, que alimentan gran cantidad de estadios inmaduros del vector.

Por lo tanto, podemos concluir que, aunque en la Sierra de Guadarrama concurren todos los elementos para que se mantenga el ciclo enzoótico del agente de la enfermedad de Lyme, la intensidad de transmisión durante el periodo de estudio es lo suficientemente bajo para que no constituya un riesgo en la población que visita la zona.

SUMMARY

Clinical reports of human and animal cases of Lyme disease has dramatically increased during last years in Spain. We wanted to know human and animal risk to acquire *Borrelia burgdorferi* infection in the Guadarrama mountains, where the presence of potential vectors and reservoirs are presented.

ELISA and IFAT are the most widely used serological techniques in the diagnosis of suspected cases in this country. We compared the effectiveness of these techniques with that of the more specific Western blot test. We also wanted to know the prevalence of infection by Lyme disease spirochetes in *I. ricinus* and determine the importance of the small mammals as reservoir host for this agent.

The seroprevalence found in the studied population was higher using ELISA and IFAT, than using Western blot, owing to cross-reactions, so this last test was selected to confirm positive or doubt cases.

The life cycle of *Ixodes ricinus* ticks takes at least two years. Because nymphal ticks are the main vectors of tick-borne diseases to humans, the only risk period is spring or, according to the humidity, in summer.

Country mice were susceptible to be experimentally infected by the agent and presented an intensive humoral response, but the prevalence of infection in nature was negative. The abundance of lizards in the area could protect rodents to be infested by ticks, because these animals are hosts for immature stages of the vector, but incompetent reservoirs for *B. burgdorferi*.

During the period of study, the intensity of transmission of the agent of Lyme disease in the Guadarrama mountains was low. In these conditions the real risk for human and animal populations to acquire the infection is very little.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El contacto del hombre con la naturaleza y con animales domésticos y silvestres ha aumentado, en los últimos años, al incrementarse el número de actividades que se desarrollan al aire libre. Todo esto hace que el riesgo de adquisición de determinadas enfermedades, como aquellas transmitidas por garrapatas, sea mucho mayor (Fishbein y Dennis, 1995). Una de las enfermedades de reciente aparición y que más interés ha despertado en la Salud Pública mundial es la borreliosis de Lyme. En Estados Unidos se ha llegado a considerar la infección más importante de esta última década después del SIDA. En España, el número de casos de enfermedad de Lyme descritos ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, la gran variabilidad clínica, las presentaciones atípicas y la distribución irregular del vector en nuestro país hicieron pensar en su coexistencia con otros patógenos relacionados (Anda y cols., 1993) con los que dieran reacciones cruzadas.

El primer aislamiento del agente, *Borrelia burgdorferi*, en España (llamada ESP-1) se obtuvo de una garrapata, *Ixodes ricinus*, de La Rioja (García Moncó y cols., 1992). Además de esta especie, existen otras dos capaces de mantener el ciclo de transmisión en la naturaleza: *I. uriae*, especie asociada con gaviotas, e *I. hexagonus*, principalmente asociada a carnívoros e insectívoros (Gern, 2000). Es difícil determinar la verdadera prevalencia de la infección, ya que varía dependiendo de la especificidad de la técnica utilizada y de la zona examinada.

El principal vector en España, *I. ricinus*, es una garrapata de amplia distribución en Europa que puede parasitar a un amplio grupo de hospedadores, incluido el hombre. En nuestro país tiene un factor limitante fundamental, la humedad (Macleod, 1935), por lo que es abundante en la zona norte de la Península Ibérica y esporádica en el resto, limitada a hábitats concretos donde se cumplen sus requerimientos. Su ciclo biológico tiene una duración de 2 a 3 años. Las larvas y ninfas se alimentan preferiblemente en micromamíferos. Los principales hospedadores de los estadios adultos son animales de mayor tamaño (ganado ovino, vacuno y equino).

Dependiendo de la distribución del vector, la borreliosis presenta dos patrones diferentes: en el norte, donde *I. ricinus* es común, la enfermedad de Lyme es la más prevalente; mientras que en el sur, zona en la que esta garrapata es rara, la fiebre recurrente parece ser más

frecuente (Anda y cols., 1996). Finalmente, en el centro el vector está presente sólo en áreas muy concretas, fundamentalmente de bosque y parasitando animales silvestres. Podría ser que los casos diagnosticados fueran realmente enfermedad de Lyme adquirida en zonas turísticas donde el ciclo enzoótico de *B. burgdorferi* se mantuviera, o podrían deberse a reacciones cruzadas con otros agentes. A pesar de que se conoce la existencia de otras especies distintas a *B. burgdorferi* desde hace tiempo (*Borrelia hispanica* - de Buen, 1926 -), los recientes aislamientos han hecho reconsiderar la importancia de otros patógenos relacionados, como los productores de la sífilis, la fiebre recurrente o los asociados a trastornos intestinales (Jensen, 1997) y de la complejidad de un correcto diagnóstico basado en datos epidemiológicos, clínicos y serológicos.

La zona de estudio, un ecosistema de pinar de montaña supramediterráneo, situado en el Valle de la Fuenfría (Sierra de Guadarrama) a 57 Km de Madrid, fue seleccionada por constituir uno de los únicos hábitats de la provincia donde coexisten los vectores y reservorios de la enfermedad de Lyme. Es un pinar de alta montaña húmedo y umbrío con una alta densidad de animales silvestres (corzos, jabalíes, roedores, lirones, ...) y domésticos en semi-libertad (ganado equino y vacuno), posibles hospedadores de las distintas especies y estadios de los ixódidos. Es además uno de los principales lugares de recreo y esparcimiento de la Comunidad, lo que favorecería el contacto potencial de la población con el agente.

Dado que la presencia del agente de la borreliosis de Lyme está claramente condicionada a la de sus vectores, nos propusimos conocer cual era el grado de contacto de la población de la zona, tanto humana como animal, supuestamente más expuesta que la del resto de la Comunidad Autónoma, y determinar hasta que grado las reacciones cruzadas con otros agentes próximos interferían en la validez de las técnicas rutinarias de serodiagnóstico como la inmunofluorescencia indirecta o el ELISA, comparándolas con otra más específica, el inmunoblot. Asimismo, quisimos conocer la prevalencia de las garrapatas de la zona, fundamentalmente *I. ricinus*, y su ciclo estacional, lo que nos permitiría posteriormente predecir los períodos de riesgo de adquisición de las enfermedades de las que son vectores para poder establecer precoces medidas de prevención y control y comprobar la importancia de los roedores como reservorios de esta espiroqueta.

Toda la información resultante nos ayudaría a definir las condiciones ambientales que faciliten el conocimiento del riesgo real de la adquisición de esta enfermedad en la zona centro de España.

Tomando todo esto en consideración, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Estudiar la cinética estacional de los vectores potenciales del agente de la enfermedad de Lyme en la zona y detectar la presencia, en su caso, de *Borrelia burgdorferi* en ellos.
- Comprobar la importancia de los roedores de la zona como reservorios de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*.
- Estudiar serológicamente el grado de contacto del agente causal de la enfermedad de Lyme con la población humana y animal del área de estudio.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La borreliosis de Lyme es una enfermedad producida por espiroquetas del complejo *Borrelia burgdorferi sensu lato*. En Europa, este complejo incluye 3 genoespecies patógenas para el hombre, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* y *B. garinii* (Johnson y cols., 1984b; Baranton y cols., 1992; Canica y cols., 1993), y 2 grupos genómicos descritos hace poco y no aparentemente patógenos humanos, grupo VS116 (*B. valaisiana*) y grupo PotiB2 (*B. lusitaniae*) (Péter y Bretz, 1992; Postic y cols., 1994).

Su agente causal se mantiene entre garrapatas y una gran variedad de animales que actúan como hospedadores para estos ectoparásitos. Los humanos no forman parte del ciclo habitual en la naturaleza, ya que entran en contacto con el patógeno sólo accidentalmente siendo hospedadores finales (Gern y Humair, 1998).

La ecoepidemiología de *B. burgdorferi sensu lato* es muy compleja, debido principalmente al gran número de especies de vertebrados a los que puede parasitar su vector, las diferentes especies de *Borrelia* y la presencia de diversas especies de garrapatas que actúan como vectores (Gern, 2000).

En España se tiene constancia de su presencia desde 1977, aunque fue en 1987 cuando se confirmó serológicamente el primer caso (Uría y cols., 1987). Posteriormente han sido abundantes los hallazgos serológicos, tanto de procesos clínicos como de la infección en humanos. En el hombre generalmente presenta un cuadro clínico multisistémico y un espectro de manifestaciones muy amplio (Guerrero y cols., 1993; Guerrero, 1995). Anda y cols. (1993), además de demostrar serológicamente la enfermedad de Lyme en la Península Ibérica, comprobaron que la forma neurológica era la más frecuente, seguida de la cutánea y cardíaca.

El aumento de la incidencia de borreliosis, tanto en humanos como en animales domésticos, colocó a la enfermedad de Lyme al frente de la conciencia pública en la segunda mitad de los años 80 (Niesembaum, 1991).

El creciente número de casos de este proceso en el norte de nuestro país está representando un problema de salud pública (Arteaga y García-Moncó, 1998).

1. HISTORIA.

El origen de esta enfermedad parece ser muy antiguo (Persing y cols., 1990). Estudios antropológicos contemporáneos (Lewis, 1994) evidencian la presencia de manifestaciones esqueléticas de artritis crónica juvenil en una población de indios norteamericanos (indios Tchefuncte, 500 a.C.-300 a.C), oriundos de una región actualmente endémica de borreliosis de Lyme.

Desde comienzos del siglo XX, en Europa se conocía una erupción dérmica patognomónica llamada eritema crónico migratorio (Afzelius, 1910) subsecuente a la picadura de garrapatas y que, con frecuencia, precedía a episodios de artritis. Este indicativo de infección aguda se acompañaba de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgias, fatiga y linfadenopatía. Semanas o meses después, se desarrollaba normalmente una artritis monoarticular. Alternativamente, pero a veces al mismo tiempo, podía aparecer una parálisis facial (incorrectamente denominada parálisis de Bell), meningitis o radiculoneuritis. Un bajo porcentaje de pacientes podía presentar un bloqueo aurículoventricular o pancarditis (Telford y Fikrig, 1995).

En 1975, Allen Steere y colaboradores describieron una epidemia de artritis oligoarticular en poblaciones cercanas a Old Lyme, Conectica, USA (Steere y cols., 1977). En el tiempo en que se produjo esta primera epidemia, se tenía la costumbre de alimentar a los ciervos en los jardines traseros de las casas cercanas a los bosques. La abundancia de comida y la ausencia de depredadores produjeron la proliferación de estos grandes mamíferos que, debido a la falta de cercas, deambulaban libremente. Muchas de las hembras grávidas de garrapata se desprendían mientras los ciervos se alimentaban en los alrededores de las casas y allí hacían la puesta. Con la llegada de la primavera eclosionaban los huevos y las larvas resultantes adquirían la infección al alimentarse sobre los ratones de la zona. Los habitantes de las casas, fundamentalmente niños, se infectaban al ser picados por estos artrópodos al trabajar o jugar en el jardín (Dr. Spielman, comunicación personal).

Aunque no se conocía el agente etiológico, se sospechaba que podría tratarse de una enfermedad infecciosa. Por aquel tiempo se describió una nueva garrapata, *Ixodes dammini* (sinónimo *I. scapularis*), como vector de la "fiebre de Nantucket", o babesiosis humana, en las cercanías de Massachusetts y Long Island (Spielman y cols., 1979), y este artrópodo parecía estar asociado con episodios de artritis de Lyme (Wallis y cols., 1978). Andrew Spielman y Joseph Piesman describieron el ciclo biológico de este ectoparásito, de este modo proporcionaron la base para explicar la epidemiología tanto de la babesiosis como de la enfermedad de Lyme, así como los orígenes de la epidemia (Spielman y cols., 1985).

En 1982, mientras examinaba ejemplares de *I. dammini* para determinar rickettsias, Willy Burgdorfer describió una nueva espiroqueta (Burgdorfer, 1984a), la bacteria causal de la enfermedad de Lyme, y dos años más tarde, Johnson y cols. (1984b) describieron este organismo como una nueva especie del género *Borrelia*, *Borrelia burgdorferi*. Desde entonces, se han aislado cepas tanto de humanos como de animales en diferentes partes del mundo.

En el año 1987 se produce la primera comunicación de enfermedad de Lyme en España, confirmada serológicamente por Uría y cols. (1987). Un año antes, bajo la dirección del Dr. Guerrero, del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, se crea el "Grupo de Estudios para la Enfermedad de Lyme en España" (Guerrero y cols., 1988).

En nuestro país, se constató que una especie de *B. burgdorferi sensu lato* era, en algunas regiones, una causa frecuente de infección (Castiella Herrero y cols., 1992; Anda y cols., 1993): en una primera fase se aislaron espiroquetas del vector principal (*I. ricinus*) (García-Moncó y cols., 1992), más recientemente, se obtuvo el primer aislamiento de *B. garinii* de origen humano, de un paciente con eritema crónico migratorio (Oteo y cols., 1998). Por otro lado, en esta zona son frecuentes otras borreliosis, como causantes de fiebres recurrentes, que presentan alguna similitud clínica con la borreliosis de Lyme. Los vectores de estas especies de *Borrelia* son, en este caso, también garrapatas, pero blandas, del género *Ornithodoros*. Se sugirió que estas espiroquetas podían compartir los mismos animales como reservorios (García-Moncó y cols., 1992), diversificando y multiplicando, de este modo, el número potencial de vertebrados con capacidad para mantener en la Naturaleza bacterias del complejo *B. burgdorferi sensu lato*,

así como la posibilidad de producir infecciones mixtas que enmascararan el diagnóstico, tanto clínico como laboratorial.

2. AGENTE CAUSAL.

Borrelia burgdorferi es una bacteria Gram-negativa, que se ha clasificado, de acuerdo con sus características morfológicas y biológicas, como perteneciente al orden *Spirochaetales* (Wilske y cols., 1991). Estas espiroquetas están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Algunas son de vida libre, otras colonizan una gran variedad de organismos vivos, desde moluscos y termitas hasta el hombre, y sólo algunas son patógenas (Schmid, 1989). Están presentes de forma natural en el tracto gastrointestinal (rumen, ciego, colon) de animales y humanos. Así, la especie *Serpulina - Brachispira* es residente del intestino grueso (Stanton, 1997).

El Orden *Spirochaetales* se divide en 2 familias, *Leptospiraceae* y *Spirochaetaceae*. La familia *Leptospiraceae* comprende 3 géneros: *Leptospira*, *Leptonema* y *Turneria*. La familia *Spirochaetaceae* comprende varios géneros saprofitas (*Spirochaeta* y *Cristispira*); el género *Treponema*, que, a su vez, incluye especies saprofitas y patógenas; el género *Serpulina* separado recientemente del anterior; y el género *Borrelia*.

Orden Spirochaetales

Familia Leptospiraceae

Géneros: *Leptospira*

Leptonema

Turneria

Familia Spirochaetaceae

Géneros: *Spirochaeta*

Cristispira

Treponema

Serpulina

Borrelia

Tabla 1: Encuadre Taxonómico

Originariamente las especies de *Borrelia* se clasificaron de acuerdo con su artrópodo vector, pero actualmente la taxonomía de este género depende de criterios genéticos (EUCALB, 1997).

Todas las enfermedades espiroquetales comparten una marcada similitud en su patogenia y sintomatología. Estas similitudes incluyen la utilización de la piel o mucosas como puerta de entrada, espiroquetemia temprana en el curso de la enfermedad y una amplia distribución por tejidos y fluidos corporales (Schmid, 1989).

Al género *Borrelia* pertenecen microorganismos difíciles de cultivar y de aislar, que no proliferan fuera de hospedadores vertebrados e invertebrados. Para su cultivo necesitan de un medio específico, como el de Barbour-Stoener-Kelly (*B. burgdorferi*) (Schmid, 1985; Anderson y Magnarelli, 1992), o no son cultivables (*B. duttonii*, *B. recurrentis* y *B. hispanica*) (Dr. Postic, comunicación personal).

Dentro de las espiroquetas patógenas del género *Borrelia*, hay que destacar las causantes de las fiebres recurrentes transmitida por garrapatas blandas (*B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri*, *B. mazzottii* y *B. venezuelensis* en América; *B. duttonii* en África; *B. crocidurae* en África y Europa; *B. persica* en Asia y Grecia; *B. hispanica* y *B. iberica* (Escudero y cols., 2000b) en la Península Ibérica y noroeste de África; *B. latyschewii* y *B. caucasica* en Asia y Eurasia (Barbour y Hayes, 1986); aquellas transmitidas por piojos (*Borrelia recurrentis* (EUCALB, 1997)); así como la borreliosis aviar (*B. anserina*) o el agente del aborto epidémico bovino (*B. coriaceae*) (Lane y cols., 1985).

B. burgdorferi es microaerófila y catalasa-negativa. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 34-37°C y su tiempo de generación varía entre 10-12 horas a esa temperatura (Johnson y cols., 1984b). Posee una envoltura externa compuesta por lípidos y proteínas que rodea la membrana y la pared celular, las cuales envuelven al cilindro protoplasmático (García-Moncó y cols., 1992). Su genoma está totalmente secuenciado (Fraser y cols, 1997).

Cuando originariamente se describió este microorganismo, se pensaba que era la única especie responsable de la enfermedad de Lyme. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que su diversidad genética era mayor de lo esperado. El agente responsable de la borreliosis de Lyme (*B. burgdorferi sensu lato*) puede dividirse en, al menos, 8 especies (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, presente en Europa y en USA, pero ausente en Rusia y Asia, *B. garinii*, *B. afzelii* y las genoespecies *B. valaisiana* y *B. lusitaniae* en Eurasia, *B. japonica* sólo en Japón, *B. andersonii* y las genoespecies DN127 (*B. bissettii*) en USA). Además, Wang y cols. (1999) han sugerido que, aparte de las genoespecies establecidas, existe otro grupo genómico de *Borrelia* causante de enfermedad de Lyme humana. También se ha sugerido que las borrelias que filogenéticamente están agrupadas con la fiebre recurrente podrían ser las responsables de enfermedades parecidas al Lyme (EUCALB, 1997).

Las especies *B. japonica* y *B. andersonii* se aislaron de *Ixodes ovatus* e *Ixodes dentatus* en Japón y Norteamérica, respectivamente (Kawabata y cols., 1993; Marconi y cols., 1995). Ambas se consideraron no patógenas para el hombre. *B. lonestari*, aislada de la garrapata dura *Amblyomma americanum*, es considerada el posible agente de un proceso parecido a la borreliosis de Lyme en Estados Unidos, y *B. miyamotoi*, aislada de *Ixodes persulcatus* en Japón, parecen estar relacionadas con borrelias productoras de la fiebre recurrente (Fukunaga y cols., 1995; Barbour y cols., 1996). Además se ha recuperado una nueva especie de *Borrelia* de pacientes con fiebre recurrente y de la garrapata blanda *Ornithodoros erraticus* en España (Anda y cols., 1996).

Otros 5 grupos genómicos se han identificado, como son los grupos VS116 (*B. valaisiana*) y PotiB2 (*B. lusitaniae*), que comprenden aislados europeos; DN127 (*B. bissettii*), que incluye sólo aislados de Norteamérica (Postic y cols., 1994) y los Hk501 y Ya501 restringidos a Japón (Fukunaga y cols., 1996c; Masuzawa y cols., 1996). Estos 2 últimos se han clasificado recientemente como las nuevas especies *Borrelia tanuki* y *B. turdae*, respectivamente (Fukunaga y cols., 1996b).

B. valaisiana no está asociada con una garrapata vectora específica, sino que se ha aislado de *I. ricinus*, *I. persulcatus* (Postic y Baranton, 1994), *I. columnae* en Japón (Fukunaga y cols., 1996a; 1996c). También se ha aislado de aves migratorias que serían reservorios de esta infección (Humair y cols., 1998).

La gran diversidad genética junto con el gran polimorfismo clínico observado en el Viejo Continente, sugieren que este es el lugar de origen del complejo *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Ras y cols., 1997). Aunque hay una teoría que considera que la asociación *Borrelia burgdorferi sensu lato* e *Ixodes* debe ser más antigua que la división de Pangea en los continentes que hoy conocemos. Ello explicaría el alto grado de adaptación entre agente/vector y reservorio, ya que habrían coevolucionado a lo largo de milenios.

Los estudios realizados sobre la distribución geográfica de *Borrelia burgdorferi sensu lato* en Europa revelan que *B. garinii* es la especie más frecuentemente aislada, seguida, por este orden, de *B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu stricto* y *B. valaisiana* (Hubálek y Halouzka, 1997; Saint Girons y cols., 1998).

En España, el primer aislamiento de *B. burgdorferi* (*B. burgdorferi sensu stricto*, denominada ESP-1) se realizó de un *Ixodes ricinus* (García-Moncó y cols., 1992), pero hubo que esperar 6 años más para que se pudiera realizar el primer aislamiento de origen humano (Oteo y cols., 1998), a partir de una lesión de eritema migratorio (*B. garinii*, denominada Rio1).

La variabilidad de especies de *Borrelia* spp. presentes en España es amplia, habiéndose descrito, hasta la fecha, 4 genoespecies del grupo *B. burgdorferi sensu lato* aisladas a partir de *I. ricinus* recogidos del País Vasco, La Rioja y Castilla-León, así como de pacientes con eritema migratorio (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. valaisiana* y *B. lusitaniae*) (Escudero y cols., 2000a), así como 2 especies de borrelia causantes de fiebre recurrente (*B. hispanica* y *B. iberica*) (Escudero y cols., 2000b).

Las primeras estirpes de *B. lusitaniae* designadas como PoTiB₁, PoTiB₂ y PoTiB₃ (Núncio y cols., 1993) se aislaron de *I. ricinus* recogidas de la vegetación de la región de Marateca, Concelho de Palmera, Portugal. Posteriormente, en 1998, se clasificaron como una nueva especie denominada *Borrelia lusitaniae* (Le Fleche y cols., 1997), e inducen patología cuando se inoculan en ratones susceptibles (C3H/HeN).

La división de *B. burgdorferi sensu lato* en genopecies tiene también importancia clínica. Así, *B. burgdorferi sensu stricto* está asociada más frecuentemente con artritis, particularmente en Norteamérica, donde es el único agente conocido de la enfermedad de Lyme, *B. garinii* está asociada con síntomas neurológicos y *B. afzelii* con los procesos crónicos de la piel (acrodermatitis crónica atrófica (ACA)). Todas ellas producen la manifestación típica de este proceso, el eritema crónico migratorio (ECM), aunque en Europa es más frecuente en aquellas infecciones producidas por *B. afzelii*. El grupo de *B. valaisiana* sólo se ha asociado con ECM (EUCALB, 1997).

Muchas cepas de *B. burgdorferi* pueden coinfectar al mismo vector y las infecciones humanas pueden ser debidas a una infección simple o múltiple (Demaerschack y cols., 1995; Eiffert y cols., 1995).

La membrana externa de esta bacteria contiene al menos 3 proteínas de la superficie externa (Osp) A (31-33 KDa), B (34-36 KDa) y C (20-24 KDa) (Barbour y cols., 1983b, 1984; Wilske y cols., 1986; Fuchs y cols., 1992). Estas lipoproteínas están insertas en la membrana exterior fluida de la espiroqueta y están codificadas por plásmidos lineales (Barbour y Garon, 1987; Fuchs y cols., 1992). Las proteínas OspA y OspB son lipoproteínas intramembranas (Brandt y cols., 1990) y presentan una heterogenicidad inmunológica considerable entre las distintas cepas (Wilske y cols., 1992). Las proteínas de superficie externa de *B. burgdorferi* se piensa que tienen un importante papel en las interacciones parásito-hospedador durante el curso de la infección (Hindersson y cols., 1992).

Este microorganismo altera la expresión de los genes en distintos estadios de su ciclo de vida, dando lugar a diferentes proteínas de superficie (De Silva y Fikrig, 1997). Las espiroquetas necesitan adaptarse rápidamente a los diferentes ambientes entre el artrópodo en reposo y durante su alimentación, y el hospedador mamífero. De hecho, las borrelias que pasan de la garrapata hacia el mamífero son refractarias a los efectos de la inmunidad pasiva transferida en el suero, sugiriendo que están preparadas para la evasión inmune justo en el momento de su entrada al hospedador. Hay claras evidencias de que existen un número de productos génicos nuevos de esta bacteria que sólo se expresan en el hospedador mamífero (Barthold, 1998).

Los aislados europeos son más heterogéneos con respecto a sus perfiles antigénicos que los americanos (Barbour y cols., 1985; Wilske y cols., 1988; Rosa y Hogan, 1992; Péter y Bretz, 1992; Wallich y cols., 1992b). En diversos estudios se han encontrado algunas diferencias relativas a la OspA y la OspB en cepas procedentes de Estados Unidos y Europa. Concretamente, la OspB está ausente en algunas cepas o muestra, en ocasiones, diferencias significativas en su motilidad electroforética (Barbour y cols., 1984, 1985; Barbour y Schrumpt, 1986; Wilske y cols., 1986; Wilske y cols., 1988).

B. garinii presenta una OspA con un peso molecular de 32 KDa. Por otro lado, las cepas de *B. afzelii* se caracterizan por tener una OspA y una OspB con un peso molecular de 32 y 35 KDa respectivamente (van Dam y cols., 1993). Del mismo modo, todas las cepas de *B. valaisiana* expresan una proteína dominante en el rango de 32-34 KDa (Nohlmans y cols., 1995; Péter y Bretz, 1992) que correspondería a la OspA.

La OspC (21-24 KDa) es inmunodominante en la respuesta inmune temprana y provoca una vigorosa respuesta de IgM (Coyle y Luft, 1995).

Los organismos cultivados parcialmente inducen la OspC, así como otras proteínas, incluyendo las OspE y OspF, en respuesta al aumento de la temperatura (De Silva y Fikrig, 1997).

Los flagelos están contenidos dentro de la membrana externa de las espiroquetas y, por ello, la flagelina no está expuesta en la superficie del microorganismo. Sin embargo, debido a que se detecta en los primeros estadios de la infección anticuerpos frente a esta proteína de 41 KDa, se piensa que las espiroquetas deben desarrollar mecanismos de defensa frente al hospedador por los que exponen la flagelina, resultando la presencia de anticuerpos específicos (Craft y cols., 1984a; 1986). Esta proteína de 41 KDa está envuelta en el transporte de glucosa y la quimiotaxia/motilidad (Hindersson y cols., 1992).

El peso molecular aparente de las flagelinas de *B. hermsii* y *B. burgdorferi* son 39 KDa y 41 KDa respectivamente (Barbour y cols., 1983b).

La inoculación de la espiroqueta a un vertebrado constituye una dura prueba para el agente, ya que, primero, *B. burgdorferi* se expone a la temperatura excesivamente alta de la sangre, comparada con la de su vector (Krinsky y cols., 1982; Benach y cols., 1984b, 1987; Burgdorfer, 1984b, 1988; Piesman y cols., 1987b; Ribeiro y cols., 1987; Wheeler y cols., 1989; Zung y cols., 1989), y, además, debe superar los focos inflamatorios. Cuando la bacteria se ve sometida a una elevación de la temperatura, a privaciones de oxígeno y nutrientes, a la exposición a radicales de oxígeno, así como a infecciones virales (Young y Elliot, 1989), induce la formación de las denominadas proteínas de “choque térmico”, que, según su peso molecular, se dividen en cuatro grupos de 90, 70, 60 y de 10-30 KDa (Lydyard y van Eden, 1990). Estas proteínas tienen un gran número de funciones fisiológicas, como son el plegamiento, desplegamiento y translocación de polipéptidos, así como el ensamblaje y desensamblaje de complejos multiméricos, cuando una célula se encuentra bajo condiciones estresantes. También se ha identificado que son inmunógenos principales en un gran número de infecciones bacterianas, incluyendo la fiebre Q, tuberculosis y lepra (Britton y cols., 1986a; 1986b).

La proteína extracelular principal de la bacteria tiene un peso molecular de 83 KDa (Dorwald y cols., 1991; 1992). Asimismo, este microorganismo posee una proteína presumiblemente específica con un peso molecular de 39 KDa.

Se ha encontrado, también, una proteína de 80 KDa que se expresa en todos los aislados de *B. burgdorferi*, tanto *in vivo* como *in vitro* (Perng y cols., 1991), pero no en otras especies, como *B. anserina*.

El decorín, proteoglicano que decora las fibras de colágeno, puede mediar la adherencia de la bacteria a las fibras de colágeno en la piel y en otros tejidos. *B. burgdorferi* expresa dos proteínas vinculadas a él con pesos moleculares aparentes de 19 y 20 kDa (Guo y cols., 1995).

Una *Borrelia burgdorferi* fresca aislada de garrapata tiene 9 plásmidos (Schwan y cols., 1988), 7 lineales con un tamaño que oscila entre 49 y 16 kb, y 2 circulares de 27 y 7.6 kb. Por un cultivo continuo de este microorganismo en medio BSK se produce la pérdida del plásmido circular de 7.6 kb y del lineal de 22 kb, lo que conlleva a una pérdida de infectividad en ratones.

Durante el inicio del cultivo *in vitro* ocurren al mismo tiempo varios cambios biológicos en esta bacteria, incluyendo la pérdida de infectividad, una disminución en el número de plásmidos detectables, cambios proteicos en los lisados de células completas y un aparente aumento del peso molecular en el componente parecido al polisacárido (Schwan y cols., 1988).

Se produce la pérdida de la proteína externa de superficie OspB (Schwan y Burgdorfer, 1987) con un peso molecular aparente de 34 KDa (Beck y cols., 1985) entre los pases de cultivo 11 y 15. Durante los 10 primeros pases también se observan cambios en la reactividad de esta proteína con el anticuerpo monoclonal H6831, lo que confirma cambios antigénicos en los primeros pases en la OspB (Schwan y Burgdorfer, 1987). Su pérdida durante el mismo período de cultivo cuando la infectividad se perdió, plantea la posibilidad de que esta proteína tenga algún papel en la infección de esta espiroqueta en sus hospedadores mamíferos (Schwan y cols., 1988).

Así, según lo expuesto, el agente de la enfermedad de Lyme no tiene una única etiología, sino que engloba al menos 10 especies de *Borrelia* pertenecientes al complejo *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Esta compleja etiología lleva consigo una importancia clínica y diagnóstica, debido a la diferente expresión de los distintos antígenos según la genespecie

implicada en el proceso.

3. EPIDEMIOLOGÍA.

3.1. VECTORES.

3.1.1. DEFINICIÓN.

Un vector es todo artrópodo hematófago que asegura la transmisión de un patógeno de forma biológica (con multiplicación y/o evolución del agente en su interior) (Martínez Fernández y Cordero del Campillo, 1999).

Dentro de la multitud de artrópodos vectores, los ácaros constituyen el segundo grupo en importancia después de los dípteros. La distribución cosmopolita de las garrapatas, así como su ciclo biológico, hacen que sean consideradas como vectores potenciales de patógenos (Olmeda García, 1992). Además, han desarrollado magníficos sistemas para su supervivencia:

- a) Capacidad de absorber agua a partir del aire circulante, lo que facilita el mantenimiento de una población.
- b) Diapausa, que implica el cese de las funciones fisiológicas en aquellos periodos de clima desfavorable o en los que no existen hospedadores apropiados.
- c) Detección de hospedadores mediante un complejo sistema sensorial que permite reconocer olores específicos, vibraciones o cambios de temperatura (Estrada Peña, 1994).

3.1.2. CARACTERÍSTICAS QUE DEBEN CUMPLIR.

La capacidad de un artrópodo para ser vector, según Rodhain (1985), depende de que éste permita:

- ser infectado / infestado,
- asegurar el desarrollo del agente en su interior, y
- transmitir el agente a un nuevo hospedador.

Estos fenómenos no dependen exclusivamente del vector. Los vectores competentes para la enfermedad de Lyme son aquellos artrópodos que adquieren y transmiten, de forma eficaz, *Borrelia burgdorferi* a los hospedadores susceptibles. Una especie eficiente de vectores será aquella que posea propiedades fisiológicas y ecológicas que permitan la infección y promuevan la transmisión (Estrada-Peña y cols., 1995).

Algunas características estructurales, fisiológicas, biológicas y de comportamiento de las garrapatas, han permitido a estos ectoparásitos obligados mantener y transmitir una gran variedad de patógenos (Hoogstraal, 1985).

3.1.3. LAS GARRAPATAS COMO ECTOPARÁSITOS Y VECTORES DE ENFERMEDADES.

Con el nombre de garrapatas se definen una serie de artrópodos pertenecientes al orden *Acarina*, que se caracterizan por su régimen de vida estrictamente parásito, y por realizar tres mudas a lo largo de su vida. Se distinguen dos grandes grupos, las llamadas garrapatas blandas y las duras. Las primeras corresponden a la familia *Argasidae* y se caracterizan por poseer una cutícula de tipo coriáceo y por alimentarse rápidamente, permaneciendo en el hospedador sólo el tiempo necesario para hacerlo. Se trata principalmente de parásitos de aves y reptiles, aunque su mayor importancia económica en Europa se debe a que algunas especies transmiten la peste porcina africana.

La otra familia es *Ixodidae*, en la que se incluyen la mayor parte de las especies de interés en medicina humana y animal. Se trata de ácaros que presentan un escudo de cutícula endurecida y que pueden parasitar la mayor parte de vertebrados terrestres (Barral Lahidalga y cols., 1994).

Phylum arthropoda

Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Orden	Parasitiformes
Suborden	Ixodida
Superfamilia	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Géneros	<i>Ixodes, Rhipicephalus, Boophilus, Hyalomma, Amblyomma, Dermacentor, Haemaphysalis, Aponomma, Anocentor, Nosomma, Margaropus, etc.</i>

Tabla 2: Clasificación de las garrapatas de la familia Ixodidae

3.1.4. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

La importancia de las garrapatas ya fue hecha notar por autores como Homero, Plinio y Cato, quienes remarcaron sus hábitos de ingestión de sangre (Estrada Peña, 1994).

Aunque posiblemente la primera referencia de una enfermedad transmitida por garrapatas duras sea la plaga de babesiosis que asoló al ganado vacuno del faraón Ramses II (Éxodo 9:3) (Dammin, 1978), no se incrimina a estos artrópodos como vectores de enfermedades infecciosas hasta 1893. En esta fecha, Smith y Kilbourne demostraron que *Boophilus annulatus* era el transmisor de la fiebre de Texas en el ganado (Gelfand, 1990).

En 1981, la espiroqueta ahora conocida como causante de la enfermedad de Lyme se aisló del intestino medio de garrapatas *Ixodes dammini* (sinónimo *I. scapularis*) recogidas en la Isla de Shelter, Nueva York (Burgdorfer y cols., 1982). Este microorganismo, que se denominó *Borrelia burgdorferi* (Johnson y cols., 1984b), es sólo la segunda especie dentro de las espiroquetas asociadas a garrapatas duras (Burgdorfer y Hayes, 1989). Desde entonces, otros

cinco géneros de ixódidos (*Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*) se han visto naturalmente infectados con *B. burgdorferi*.

3.1.5. ESPECIES DE IXÓDIDOS RECONOCIDOS COMO VECTORES.

Sólo los miembros del género *Ixodes* son los principales vectores de este proceso en Norteamérica, Europa y Asia (Anderson, 1989). Los miembros de este género presentan las siguientes características:

- son garrapatas de 3 hospedadores, es decir, durante su vida se alimentan en 3 hospedadores animales diferentes. El hombre es un hospedador accidental (Anderson, 1989).
- carentes de ojos, posee un rostro largo y un escudo de una única tonalidad. Su rasgo más característico es la presencia de un surco anal que se encuentra bordeando el ano por la parte delantera, de forma que las ramas laterales llegan al borde del escudo o se unen entre sí, dando una forma característica de herradura (Sáez y cols., 1991).
- requieren un alto grado de humedad para su supervivencia; en cambio, no es necesaria su alimentación durante grandes períodos de tiempo (Sáez y cols., 1991).
- es el grupo de garrapatas que más amplio abanico de hospedadores puede parasitar. Algunas especies son parásitos exclusivos de roedores o de aves. Estas garrapatas son especies totalmente endófilas, que no se aventuran fuera del hábitat de sus hospedadores. Prácticamente pueden encontrarse en todas aquellas áreas colonizadas por éstos (Estrada Peña, 1994).

Los principales vectores reconocidos de *B. burgdorferi* son *I. dammini* (sinónimo *I. scapularis*) e *I. pacificus* en USA; *I. ricinus* en Europa e *I. persulcatus* en la Rusia europea y asiática, así como en China y Japón, también se han detectado en otras especies de garrapatas (Piesman y Sinsky, 1988). De todos ellos se va a hablar más pormenorizadamente a continuación.

3.1.5.1. *I. scapularis* (sinónimo *I. dammini*).

Es el principal vector de la enfermedad de Lyme en Norteamérica.

Los estadios subadultos parasitan una gran variedad de especies de mamíferos y aves, mientras que los adultos sólo se han recogido de mamíferos.

Los hospedadores más importantes para los estadios inmaduros son pequeños roedores, como el ratón de patas blancas (*Peromiscus leucopus*). Los adultos tienen predilección por el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Wilson y cols., 1988), aunque también se encuentran frecuentemente en cánidos y otros muchos mamíferos domésticos. Todos los estadios pueden parasitar al hombre.

Esta garrapata tarda 2 años en completar su ciclo biológico (Spielman y cols., 1985). Los adultos son abundantes durante la primavera y otoño, las ninfas en primavera y comienzos del verano y las larvas hacia finales de verano y principios del otoño.

Las espiroquetas se multiplican rápidamente en las larvas de esta especie durante los 6 primeros días después de la replección. Desde el día 6 al 15 se ralentiza esta multiplicación, alcanzando su máximo en el día 15 post-alimentación. Después, la densidad de espiroquetas decrece del día 15 al 24, cuando comienza la muda hasta el estadio ninfal. Durante el período posterior a la muda (días 27-38) los niveles de espiroquetas permanecen bajos, luego aumentan paulatinamente hasta alcanzar un máximo en el día 75 post-alimentación (Piesman y cols., 1990).

El número de borrelias dentro de esta garrapata decrece dramáticamente durante la muda, del orden de 5 veces de larva a ninfa y de 10 veces de ninfa a adulto (Piesman y cols., 1990).

Las ninfas infectadas tienden a agregarse espacialmente en la naturaleza (Telford y cols., 1992).

3.1.5.2. *I. pacificus*.

Se encuentra en el oeste de Estados Unidos, parasitando a 80 especies distintas de animales, incluyendo reptiles, aves y mamíferos. Las larvas y ninfas se alimentan sobre lagartijas, aves, ciervos, roedores y, menos frecuentemente, sobre lagomorfos (Arthur y Snow, 1968; Furman y Loomis, 1984; Westrom y cols., 1985). Los adultos se alimentan en ciervos, cánidos, vacuno y otros mamíferos de tamaño medio o grande (Bishopp y Trembley, 1945; Cooley y Kohls, 1945; Arthur y Snow, 1968; Furman y Loomis, 1984; Lane y Burgdorfer, 1986). Este estadio es el que se alimenta más frecuentemente sobre animales. Los adultos son más abundantes desde noviembre hasta mayo, sobre todo durante el otoño e invierno. Las larvas y ninfas son más frecuentes desde marzo a junio (Arthur y Snow, 1968; Furman y Loomis, 1984; Westrom y cols., 1985). Su ciclo biológico se completa en un año (Arthur y Snow, 1968; Furman y Loomis, 1984). Esta especie puede adquirir la infección de forma natural, pero transmite las espiroquetas mucho menos específicamente (Richter y cols., 1996).

Depende, para su primera o segunda alimentación, del lagarto y otros hospedadores que oponen bastante resistencia a la infección por borrelias. De ahí que el porcentaje de infección de las garrapatas sea mucho menor que en el nordeste. Lo mismo ocurre con especies transmisoras del mal de Lyme en ciertas regiones de Europa y Asia (Kantor, 1994).

3.1.5.3. *I. dentatus*.

Está ampliamente distribuida en la zona este de Estados Unidos. Todos sus estadios se alimentan en conejos de cola de algodón (*Sylvilagus floridanus*) (Smith, 1945). Las larvas y ninfas también se alimentan en aves (Bishopp y Trembley, 1945; Cooler y Kohls, 1945; Clifford y cols., 1961; Sonenshine y Clifford, 1973; Keirans y Clifford, 1978; Carey y cols., 1980; Anderson y Magnarelli, 1984) y, menos frecuentemente, en roedores (Bishopp y Trembley, 1945; Smith, 1945; Tugwell y Lancaster, 1962; Sonenshine y cols., 1966; Sonenshine y Stout, 1970; Koch y Dunn, 1980). Su ciclo biológico es inferior a un año, aunque puede ser más largo (Smith, 1945). Las larvas son abundantes en abril y mayo, y en septiembre y octubre (Smith, 1945; Sonenshine y cols., 1966; Sonenshine y Stout, 1970), las ninfas en marzo y abril, y las

hembras adultas se alimentan desde marzo hasta junio (Smith, 1945; Soneneshine y Stout, 1970).

3.1.5.4. *I. ricinus*.

Es el vector principal de la borreliosis de Lyme en Europa.

La asociación de espiroquetas y el aislamiento de estos microorganismos de *I. ricinus* vivos tuvo lugar en la primavera de 1982, cuando se examinaban ejemplares de estas garrapatas recolectadas en el Bosque de Seewald en la Meseta Suiza (Barbour y cols., 1983a; Burgdorfer y cols., 1983).

Se encuentra en bosques de hoja caduca, en zonas de arbustos y pastizales húmedos y cubiertos por densa y extensa maleza, de Irlanda, Bretaña, y, desde el sur de Eslovaquia hasta España, Portugal, además de en el sur de Europa, Centroeuropa, y, desde la antigua URSS hasta el Mar Caspio y norte de Irán. También se ha hallado en el norte de África, hasta donde se piensa que se ha dispersado por pájaros migratorios (Lane y cols., 1991).

Estas garrapatas sólo pueden sobrevivir en zonas donde haya una buena cubierta de vegetación y una alfombra de hojas caídas, para que en la base de esta vegetación se mantenga una humedad relativa superior al 80% durante los períodos del año más secos, normalmente en verano. Además, en estas áreas deberán estar presentes un número y variedad determinada de hospedadores para cada estadio parásito de la garrapata (EUCALB, 1997).

Se encuentra ampliamente distribuida en la Península Ibérica. Parece que la Cornisa Cantábrica y, en general, el nordeste de España están ampliamente poblados por este artrópodo, debido a su elevada exigencia higrométrica, lo que se corresponde con la distribución de la enfermedad. Se ha detectado en áreas de Asturias, Barcelona, Cáceres, Cádiz, Cantabria, Córdoba, Galicia, Gerona, Huesca, Huelva, Jaen, Lérida, León, Madrid, País Vasco, Salamanca y Zamora (Sánchez Serrano y Vitutia García, 1994). Llama, en cambio, la atención que en la zona del sur (Sevilla), en la que el vector no parece estar muy representado, se diagnostiquen

múltiples casos de neuroborreliosis sin que parezcan (o no se publiquen) casos del proceso dérmico típico, el ECM (Izquierdo y cols., 1992; Oteo y cols., 1992).

Al contrario de lo que ocurre con el vector americano, no es muy específico en cuanto a hospedadores, con las consiguientes implicaciones de la epidemiología de la enfermedad. Es parásito fundamentalmente de rumiantes, y sus estadios inmaduros se encuentran en multitud de micromamíferos y pequeñas aves (Estrada Peña, 1994).

Los adultos sólo se alimentan con éxito en grandes animales como ciervos, ovejas, vacas y perros. Los estadios inmaduros pueden parasitar casi todos los animales de sangre caliente, así como reptiles, pero las larvas se alimentan mejor que las ninfas sobre pequeños mamíferos. En hábitats abiertos como praderas y páramos, la fuente principal de alimentación para todos los estadios es normalmente el ganado ovino y el vacuno (EUCALB, 1997).

Su ciclo biológico dura 2-3 años, aunque en climas nórdicos se alarga hasta 5-6 años (Arthur , 1966; Balashov, 1972; Radda y cols., 1986).

Todos sus estadios aparecen casi simultáneamente a lo largo de la estación de actividad, aunque las ninfas y los adultos empiezan a alimentarse unas 4 semanas antes que las larvas. La infección por espiroquetas, por ello, es adquirida por las larvas que parasitan los roedores que se habían infectado por las ninfas.

En España, se ha encontrado activo durante prácticamente todo el año, con 2 períodos de máxima actividad, uno en primavera-principios de verano y otro a finales de verano-otoño (Sánchez Serrano y Vitutia García, 1994), aunque en ciertas zonas geográficas, y siempre en función del clima reinante, puede aparecer incluso en invierno, o algunos meses de primavera, tras los rigores invernales más severos (Estrada Peña, 1994).

Morfológicamente, se caracteriza por tener un hipostoma largo, puntiagudo, con multitud de dientes; coxa I con dos largas espinas, separadas por una escotadura muy profunda (Estrada Peña, 1994).

En sus estadios inmaduros se fija en la zona cefálica y facial, mientras que los adultos lo hacen en las partes inferiores del cuerpo, área inguinal, cara medial de las extremidades, etc. (Habela y cols., 2000a).

Es transmisora de *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) en humanos, équidos y perros, así como de otros agentes infecciosos y parasitarios como *Babesia divergens* a bovinos; *Ehrlichia phagocytophila* a rumiantes en general; *Ehrlichia equi* a los équidos; virus del Louping-ill a pequeños rumiantes; y *Francisella tularensis* (Tularemia), *Coxiella burnetii* y el virus de la encefalitis vírica a humanos (Habela y cols., 2000a).

Parece ser que existen diferencias en la susceptibilidad entre distintas poblaciones de *I. ricinus* para ser vectores competentes, siendo las poblaciones españolas las más susceptibles. Este estudio se llevó a cabo utilizando una cepa alemana de *B. afzelii* (Estrada-Peña y cols., 1996).

3.1.5.5. *I. persulcatus*.

Se encuentra en zonas más al norte y este que *I. ricinus* y es aparentemente más tolerante de climas extremos. Se encuentra en bosques de hoja pequeña caduca cercanos a bosques de coníferas. Muchos animales domésticos y salvajes son sus hospedadores. Las larvas y ninfas se alimentan, frecuentemente, sobre una gran variedad de mamíferos pequeños del bosque y aves, y los adultos en vacuno, ungulados salvajes, liebres y erizos (Hoogstraal, 1966; Balashov, 1972). Su ciclo biológico dura 2-3 años, pero en latitudes más nórdicas se alarga hasta 5-6 años (Arthur, 1966; Balashov, 1972). En Rusia los adultos se alimentan desde finales de abril hasta finales de julio, con un pico de actividad a finales de mayo y principios de junio. Las larvas y ninfas buscan hospedadores en primavera y verano, principalmente en junio y julio (Balashov, 1972).

En Rusia se ha visto que esta garrapata es más efectiva como vector de *B. burgdorferi* que *I. ricinus* (Korenberg, 1994).

3.1.5.6. *I. ovatus*.

Especie recientemente reconocida como vector del agente de la enfermedad de Lyme en Japón (Masuzawa y cols., 1995).

3.1.5.7. *I. frontalis*.

No es un vector competente para la espiroqueta, pero puede servir como portador facilitando el movimiento de las espiroquetas hacia nuevas regiones, al ser transportado por aves migratorias (Estrada-Peña y cols. 1995).

3.1.5.8. *I. uriae*.

Está asociada a gaviotas y en zonas sin mamíferos, juega un papel importante como parte en el mantenimiento de este patógeno, ya que los mamíferos no son un requisito indispensable para su ciclo de vida (Olsen y cols., 1993).

3.1.5.9. *I. hexagonus*.

Principalmente asociada a carnívoros e insectívoros (Gern, 2000), habiéndose aislado de ella *B. burgdorferi* (Oteo y Estrada Peña, 1991).

Es un vector capaz y competente, como demuestran estudios experimentales, y casi seguro tiene un papel importante en el mantenimiento de la infección en la naturaleza. Aunque puede infestar al hombre, hasta ahora no hay evidencia de que haya estado involucrada en casos de enfermedad de Lyme (EUCALB, 1997).

3.1.5.10. *I. canisuga*.

Parasita principalmente al zorro y se ha visto que vehicula *B. burgdorferi* (Oteo y Estrada Peña, 1991).

I. ricinus, *I. hexagonus* e *I. canisuga* son muy higrófilas, por ello están ausentes de todas las asociaciones vegetales de tipo mediterráneo o de montaña media, siempre y cuando no se asegure un cierto grado de humedad relativa, necesaria para el mantenimiento del ciclo vital. Por este motivo, las tres especies colonizan preferentemente los biotipos de bosque atlántico, donde durante todo el año se mantienen altos valores de saturación atmosférica, acompañados de temperaturas relativamente frescas y prácticamente constantes. En algunos casos raros, *I. canisuga* puede ser capturada en pequeños bosquetes de pinares y monte bajo, en zonas de transición entre la vegetación mediterránea y la atlántica (Estrada Peña, 1994).

3.1.6. OTRAS ESPECIES DE ARTRÓPODOS EN LAS QUE SE HA VISTO EL AGENTE.

Antes de que el agente de la enfermedad de Lyme se detectara en garrapatas del género *Ixodes*, los únicos ixódidos asociados con espiroquetas eran *Rhipicephalus evertsi*, *Boophilus decoloratus*, *Boophilus annulatus*, y *Boophilus microphus*. Son los cuatro vectores conocidos de *Borrelia theileri*, una espiroqueta sanguínea que ocasionalmente produce fiebre, anemia y hemoglobinuria en vacuno de Sudáfrica, Nigeria, Australia, Europa, Méjico y Estados Unidos (Burgdorfer y cols., 1989), y recientemente descrita en España (Habela y cols., 2000c).

En muchos casos, aunque se ha demostrado la presencia del agente en garrapatas como *I. urinae*, *I. trianguliceps*, *I. acuminatus*, *I. frontalis*, *Dermacentor reticulatus* y *Haemaphysalis punctata*, su papel en el mantenimiento del ciclo, o sus repercusiones para la salud pública, son distintos. Así, *I. trianguliceps*, no ataca al hombre, pero podría estar involucrada en el mantenimiento de la espiroqueta en la naturaleza (EUCALB, 1997).

3.1.7. CICLO BIOLÓGICO DEL VECTOR DEL AGENTE DE LA ENFERMEDAD DE LYME.

3.1.7.1. Descripción del ciclo biológico.

En el ciclo vital de las garrapatas se alternan períodos de vida libre con fases parásitas.

Excluyendo el huevo hay tres estadios de desarrollo: larva, ninfa y adultos (macho y hembra). Para pasar de un estadio a otro deben alimentarse y mudar.

La hembra adulta pone los huevos en la vegetación, tras lo cual muere. Cuando las condiciones atmosféricas son buenas, nacen las larvas que miden menos de 1 mm. y poseen tres pares de patas. Las larvas se alimentan durante 3-4 días generalmente en pequeños animales silvestres, y posteriormente caen al suelo donde mudan a la fase de ninfa. Estas son un poco más grandes (2 mm.), con cuatro pares de patas, sin abertura genital entre el segundo par de patas en la porción ventral de su cuerpo y por lo general se alimentan durante varios días en pequeños animales silvestres, animales domésticos o en el hombre. Cuando están repletas caen al suelo y mudan a la fase de adulto (machos o hembras), que vuelve a picar a un hospedador, preferentemente grandes animales o incluso al hombre. Las garrapatas hembras, tras permanecer 5-7 días alimentándose y ser fecundadas por los machos, caen de nuevo a la vegetación y comienzan la puesta de huevos (Barral y cols., 1995).

Casi todos los machos del género *Ixodes* realizan una minúscula ingestión de sangre para poder completar la espermatogénesis (Estrada Peña, 1994).

Tanto los estadios inmaduros (larva y ninfa) como la hembra pueden ingerir grandes cantidades de sangre para la verificación de las mudas o la puesta de huevos, hecho que se acompaña de un significativo incremento en el tamaño corporal a expensas de la producción de nueva cutícula (Estrada Peña, 1994).

Como sólo se alimentan una vez en cada estadio, la infección normalmente la adquiere uno de ellos (por ejemplo la larva), que se alimenta sobre un hospedador reservorio de la espiroqueta y la transmite al próximo (por ejemplo la ninfa). Esto se conoce como transmisión transtadial. En el caso de *I. ricinus*, las ninfas son las responsables de la mayoría de los casos al ser más numerosas que los adultos, más inclinadas a atacar al hombre y son más difíciles de detectar cuando se prenden, debido a su pequeño tamaño. La proporción de ninfas infectadas puede variar de 0-50%, pero lo más frecuente es 10-30%. Las ninfas de *I. persulcatus* no suelen atacar al hombre y son los estadios adultos los que transmiten la enfermedad. La larva de ambas

especies raramente se encuentra infectada, por lo que es evidente que la transmisión transovárica no es común. Sin embargo, este estadio tiene un papel importante al mantener la circulación de la bacteria en la naturaleza al infectar a hospedadores reservorios, como roedores (EUCALB, 1997).

En perros, las formas adultas de estos ectoparásitos son las que suponen un mayor peligro en la transmisión del agente (observación personal).

Las garrapatas duras se clasifican, según su ciclo biológico, en aquellas de un hospedador, en el que todo el ciclo se completa sobre el mismo animal; dos hospedadores, cuando las larvas y las ninfas se alimentan sobre el mismo hospedador y los adultos sobre otro distinto; y garrapatas de tres hospedadores, si cada estadio se alimenta sobre un hospedador distinto de la misma o diferente especie (Olmeda y Caride, 1999). Este último ciclo de tres hospedadores es el menos avanzado evolutivamente hablando (Estrada Peña, 1994).

La adaptación al medio ha originado que las especies de ixodidos hayan adquirido diferentes hábitos de vida. Existen especies endófilas que desarrollan todas sus fases en el interior de madrigueras de pequeños mamíferos, reptiles, etc., se alimentan de ellos y el ciclo completo discurre en los propios hábitats de los hospedadores. Las especies endo-exófilas desarrollan las primeras fases de su vida en madrigueras, pero al llegar al estado adulto salen a la superficie y se comportan como exófilas. Las especies exófilas desarrollan todo su ciclo en la vegetación (Barral y cols., 1994).

Hay estudios que indican que los adultos de garrapatas tienen el doble de posibilidades de estar infectados que las ninfas, una observación que se consolida por la relativa frecuencia de exposición de tales garrapatas a hospedadores reservorios potencialmente infectados. Una garrapata vectora en estado de ninfa habría estado expuesta a la infección sólo una vez, como larva, mientras que un adulto habría estado expuesto 2 veces, una vez como larva y luego como ninfa (Matuschka y cols., 1993).

3.1.7.2. Fases no parásitas del ciclo biológico de *Ixodes*.

Las variaciones de la actividad de los ixódidos en su fase libre, están estrechamente relacionados con el microclima. Para cada especie existe un umbral de temperatura, por debajo del cual hay un retraso en el desarrollo de los huevos, larvas y en la producción de huevos. Además, aunque las temperaturas sean adecuadas, si no se acompañan de la suficiente humedad, las garrapatas se desecan y mueren. Es necesaria una humedad relativa superior al 70% para garantizar el desarrollo y supervivencia de los huevos y de los estadios inmaduros, que son los más exigentes, ya que los adultos, al tener un mayor tamaño y una cubierta quitinosa se defienden mejor de la evaporación (Barral y cols., 1994).

3.1.7.2.1. DIAPAUSA.

La actividad de las garrapatas y, por tanto, la búsqueda de hospedadores, está condicionada por mecanismos de inactividad o diapausa.

Estos mecanismos permiten a las garrapatas evitar fases de búsqueda de hospedadores cuando el tiempo es desfavorable. Esta inactividad ocurre en diferentes momentos de su ciclo estacional y se manifiesta de distintas formas, que se pueden clasificar como diapausa de comportamiento (lleva consigo una forma de quiescencia de las garrapatas sin alimentar) y la diapausa de desarrollo (determina el desarrollo de los estadios alimentados o de los huevos). El factor más importante que estimula esta diapausa parece ser la duración del día, aunque la temperatura puede tener una influencia modificante. La inducción de la diapausa está determinada, en su mayor parte, por el fotoperíodo, y su intensidad por una gran variedad de factores, incluyendo los genéticos de la población local de garrapatas. Esta variabilidad de factores, junto con los que afectan directamente a la actividad (naturaleza del hábitat, disponibilidad de hospedadores apropiados y el clima), son los responsables de las grandes variaciones intraespecíficas en la actividad estacional de estos ectoparásitos en distintas áreas geográficas (EUCALB, 1997).

3.1.7.2.2. FASES DE ACTIVIDAD.

a) MUDA.

Habiendo completado su toma de sangre y caído del hospedador, las larvas o ninfas repletas deben buscar un microhábitat aislado y apropiado para mudar. En las especies no nidícolas, este ambiente puede incluir la arena, el mantillo de hojas o los primeros milímetros del suelo en el bosque o la pradera, donde existe una humedad relativa importante y no llegan directamente los rayos de luz solar. En las especies nidícolas, las garrapatas mudan en las rendijas de la madriguera, entre el material del nido, o cualquier lugar del mismo que les ofrezca un ambiente con unas condiciones climáticas adecuadas (Estrada Peña, 1994).

La muda es un proceso lento y está modulado por la temperatura. Durante la misma, la humedad relativa ambiental, o mejor, el déficit de saturación atmosférica, no interviene de forma directa en la modulación de la velocidad de muda. Sin embargo, sí afecta considerablemente a las garrapatas, por la mortalidad que ocasiona si no se encuentra dentro de unos determinados márgenes óptimos. Tales intervalos, tanto para la temperatura como para la humedad durante la muda, son típicos para cada especie y condicionan su capacidad de colonización de una zona geográfica cualquiera (Estrada Peña, 1994).

La muda es un proceso extremadamente complicado y dinámico durante el cual ocurren muchos cambios hormonales y enzimáticos, así como alteraciones en los contenidos intestinales y textura. Un cambio es la rotura y reforma de su exoesqueleto, cuyo principal componente es la quitina (Cohn, 1987). Quizás el proceso de reforma de la quitina durante la muda de las garrapatas hace que disminuya la cantidad de N-acetilglucosamina disponible para el desarrollo de las espiroquetas (Piesman y cols., 1990).

b) OVIPOSICIÓN.

Después de la cópula y de la alimentación hasta la repleción, las hembras de las garrapatas buscan un microhábitat exactamente igual que en el caso de la muda, para verificar la

oviposición. El período que existe entre el final del engorde y el comienzo de la oviposición se denomina “período de preoviposición”; su duración varía dependiendo de la especie, de la alimentación y, posiblemente, de otros factores (Estrada Peña, 1994).

c) PREALIMENTACIÓN Y BÚSQUEDA DE HOSPEDADORES.

De los tres años de vida que aproximadamente tiene la garrapata *I. ricinus*, sólo pasa 3 semanas sobre los hospedadores. El resto de su vida lo emplea en su desarrollo, quiescencia y búsqueda de hospedadores (Milne, 1950).

Las garrapatas en busca de hospedadores se disponen en las hierbas agarrándose con los dos pares de patas posteriores y exponiendo el órgano de Haller (órgano sensorial situado en el tarso del primer par de patas, que tiene una función fundamental en la búsqueda de hospedadores) al aire, captando variaciones en la temperatura, calor y anhídrido carbónico del aire. Existen otras especies de garrapatas que buscan activamente al hospedador, ya sea a través de la vista, como *Hyalomma*, o percibiendo las vibraciones del paso de los hospedadores, como *Rhipicephalus* (observación personal).

3. 1.7.3. Fases parásitas del ciclo.

a) ESTACIONALIDAD.

La naturaleza estacional de la actividad de búsqueda de hospedadores por parte de las garrapatas determina, en gran parte, la estacionalidad de la borreliosis de Lyme. La mayor parte de los casos humanos se manifiestan a mediados o a finales de verano, debido a la presencia de garrapatas en la vegetación, contacto de la gente con el hábitat y el tiempo de incubación de la enfermedad (EUCALB, 1997).

La temperatura tiene una importancia suprema en todo lo concerniente a la regulación de los ciclos vitales de estos parásitos. Sin embargo, la humedad relativa del ambiente juega un papel primordial, no en la velocidad a la que se producen las diferentes fases

termodependientes, sino en la capacidad de supervivencia de los distintos estadios (Estrada Peña, 1994).

La temperatura es la responsable de la aceleración o frenado de una fase en particular, mientras que la humedad permite que elevados porcentajes de garrapatas sobrevivan bajo condiciones óptimas, debido a la baja pérdida de agua corporal a través de su cutícula. El fotoperíodo, o número de horas-luz / día, “dispara” el inicio de una determinada fase. Es el determinante de que haya garrapatas con ciclos vitales desarrollados preferentemente en invierno o en verano, o que sean activas a primeras o últimas horas del día (Estrada Peña, 1994).

La vegetación es el reflejo de las condiciones climáticas existentes en una zona dada. De esta forma, y mediante el estudio apropiado de la vegetación de un lugar y de su clima, se puede establecer con bastante exactitud las especies que pueden desarrollarse bajo tales circunstancias (Estrada Peña, 1994).

Tanto los estadios inmaduros como los adultos de *I. ricinus* están activos durante los meses más frescos y húmedos, otoño-invierno, para las escasas poblaciones del sur de la Península, y otoño-primavera, para las del norte y zonas con fríos inviernos. Su ciclo puede prolongarse durante algunos años, en caso de condiciones climatológicas adversas (Habela y cols., 2000a).

Su ciclo biológico es largo (2 años) y complejo, con tres hospedadores. Las larvas emergen del huevo y se alimentan al final de la primera primavera, caen al suelo y a principios de la siguiente primavera mudan a ninfas y se alimentan por segunda vez. Finalmente mudan a adultos y se alimentan a últimos de otoño-invierno. Este ciclo condiciona la aparición de brotes de la enfermedad de la primavera al final del otoño, correspondiéndose con los períodos de alimentación de las garrapatas (Caride y cols., 1998).

La dinámica estacional de la infección por *Borrelia burgdorferi*, situó la época de mayor riesgo, en La Rioja, entre abril y junio. Este período se caracteriza por unas condiciones climatológicas que son más propicias para pasar el tiempo libre en la naturaleza (Gil y cols., 2000b).

b) LOCALIZACIONES.

Como en todas las enfermedades transmitidas por artrópodos, la distribución de la enfermedad de Lyme está condicionada a la presencia de su vector.

El hábitat idóneo de las garrapatas son los matorrales, tanto en áreas boscosas (pinares, hayedos, robledales,...), como en zonas descubiertas. La presencia es escasa en pastizales limpios sin arbustos con carencia de microclimas húmedos, y en los que los agentes climatológicos externos inciden directamente sobre las garrapatas (Barral y cols., 1994).

El estudio de la distribución de especies en las distintas asociaciones vegetales es una herramienta interesante para realizar previsiones sobre su presencia en áreas determinadas, y, por lo tanto, cuales podrían ser las enfermedades transmitidas y su epidemiología. Algunos investigadores han utilizado la vegetación como indicador, para obtener una visión de conjunto de las superficies favorables a los vectores (Gilot y cols., 1985; Degeilh, 1992).

La teledetección fue desarrollada originalmente para entender los complejos patrones de distribución de *Ixodes ricinus* en Europa, pero en los últimos años ha sido adaptada para otras especies de interés económico en la Cuenca Mediterránea. Necesita de un flujo continuo de información sobre el hábitat, con datos de temperatura y de humedad relativa a nivel del suelo, que algunos satélites meteorológicos pueden proporcionar. Pero, la presencia de nubes impide la detección de la información a nivel del suelo, además, la existencia de nieve o de hielo distorsiona los datos. Para evitar esto, el sensor del satélite proporciona una información mucho más útil: el estado de la vegetación mediante el llamado índice NDVI, que está directamente correlacionado con el vigor vegetal y con la humedad relativa. En áreas homogéneas, la teledetección puede indicar la existencia de

minúsculas variaciones de temperatura o del estado de la vegetación, mientras que en zonas heterogéneas puede detectar el mosaico de hábitats que conforman el paisaje (Estrada, 2000).

El modelo de teledetección para *I. ricinus* arroja actualmente una especificidad próxima al 95%, mientras que los elaborados para otras especies oscilan entre el 85% y el 90%. Esta técnica proporciona una estimación a largo plazo de la idoneidad del hábitat, no una medida de la actividad ni de la existencia o ausencia de patógenos transmitidos, ya que estos hechos se ven influidos por otras variables no consideradas en el modelo, como el manejo, la existencia o no de hospedadores y el clima a corto plazo. El calentamiento global puede provocar importantes efectos en la distribución y actividad de las garrapatas, que pueden ser adecuadamente planeados mediante este modelo (Estrada, 2000).

Con respecto a la presencia de *B. burgdorferi* en el vector, Gray (1981) encuentra limitaciones para la captura de larvas de *Ixodes* que, debido a sus hábitos de alimentación sobre roedores y micromamíferos, permanecerían en las zonas más bajas de la vegetación, ascendiendo hasta un máximo de 35 cm.

El porcentaje de infección del vector por esta bacteria decrece a medida que aumenta la altitud. Aunque se han encontrado garrapatas infectadas a altitudes de 1250 m, se puede llegar a la hipótesis de que la altitud, por intermediación de las condiciones climáticas, juega un papel en el desarrollo de la espiroqueta en el ectoparásito (Aeschlimann y cols., 1986).

Si se pueden predecir las zonas con mayor riesgo por garrapatas, es posible concentrar en ellas los esfuerzos de control o erradicación o aplicar tratamientos ixodicidas de una manera más racional. De la misma forma, las áreas con riesgo para el hombre según sus actividades diarias pueden ser adecuadamente reveladas, desarrollando programas de protección (Estrada, 2000).

c) MECANISMOS DE ALIMENTACIÓN.

Una vez en el hospedador, las garrapatas ascienden hasta su lugar de predilección e inician un proceso lento e indoloro (por la eliminación de sustancias anestésicas) perforando la piel con los quelíceros y anclando el hipostoma (pieza del rostro con forma mazuda y armada con una serie de dientes dirigidos hacia atrás, cuya función es la de anclarse a la piel del hospedador) (Martín Hernández, 1996). Para fijarse la mayoría de las garrapatas duras segregan una sustancia semejante al cemento y constituida por una lipoproteína con amilopeptidasa, glicoproteína y esterases. Además de como fijación, este cemento tiene otras funciones, ya que evita, en las especies de garrapatas más evolucionadas, que el hipostoma entre en contacto directo con el hospedador, no llegando a atravesar la epidermis. Dentro de sus constituyentes se encuentran sustancias antigénicas que tienen como única función la de “engañar” al hospedador que produce anticuerpos frente a ellas en lugar de actuar sobre la garrapata (Olmeda y Caride, 1999).

Las garrapatas son telmófagas, por lo que no se alimentan directamente sobre un vaso sanguíneo, sino que producen una lesión en la que vierten una serie de sustancias que provocan inflamación y acúmulo de sangre que la garrapata succiona con la bomba faríngea. La succión se alterna a intervalos cortos con regurgitaciones de sangre del hospedador, que tienen una doble función: por una parte eliminan el exceso de líquido para mantener el equilibrio hídrico y por otra inoculan sustancias antigénicas que mantienen “entretenido” al sistema inmune. La alimentación se hace más intensa durante las horas nocturnas y mínima con la salida del sol (Olmeda y Caride, 1999).

Esta alimentación tiene lugar en dos fases: una fase lenta, que en las hembras ocupa aproximadamente los siete primeros días, y una fase de alimentación rápida que sólo dura 12-24 horas (Kaufman, 1989).

Las glándulas salivares son órganos muy activos que modifican su actividad dependiendo de la fase del ciclo y de la alimentación, perdiendo irreversiblemente estas funciones, por lo que las posibilidades de supervivencia de una garrapata parcialmente

alimentada son reducidas. En los ejemplares completamente saciados las glándulas salivares están prácticamente atróficas y han perdido completamente su funcionalidad (Olmeda y Caride, 1999).

Durante el prolongado período de contacto con el hospedador, las garrapatas liberan sustancias tales como enzimas salivares, inhibidores de enzimas, anticoagulantes y agentes con efectos farmacológicos, que facilitan la fijación (Binnington y Kemp, 1980).

Las sustancias que pueden encontrarse en la saliva de estos ácaros se han clasificado según su efecto en la alimentación, en sustancias estimulantes e inhibitoras (Kaufman, 1989). Las primeras se producen para facilitar la alimentación, y las últimas para desprenderse de su hospedador una vez saciados.

El período inmediatamente posterior a la replección de la garrapata es un momento importante para el crecimiento de *B. burgdorferi*. El momento óptimo de multiplicación espiroquetal sería durante la alimentación del ectoparásito y la mayor parte de estas bacterias serían inoculadas al hospedador durante la toma de sangre (Piesman y cols., 1990).

3.1.8. TRANSMISIÓN DEL AGENTE (*Borrelia burgdorferi*) DE LA GARRAPATA AL HOSPEDADOR.

Borrelia burgdorferi permanece en el lumen del intestino medio tanto tiempo como la garrapata está en vida libre, estadio no parásito, que puede durar varios meses. Allí se agrega cerca de las extremidades de las microvellosidades y en los espacios intercelulares del epitelio intestinal (Burgdorfer y cols., 1989). Una vez que encuentra un hospedador, el comienzo de la replección induce a las espiroquetas a que pasen a través del epitelio intestinal hacia la hemolinfa, alveolos de las glándulas salivares y finalmente, cuando el ixódido ha permanecido alimentándose 1.5-2 días, pasan a los conductos salivares (Benach y cols., 1987; Ribeiro y cols., 1987; Zung y cols., 1989; Gern y cols., 1990; Piesman, 1995; De Silva y Fikrig, 1996).

Un pequeño número de espiroquetas que han atravesado la pared intestinal pueden producir infecciones sistémicas (Gern y cols., 1990). Este fenómeno podría estar unido, de alguna manera, con los cambios antigénicos observados en los reaislados de las espiroquetas y que sólo tienen lugar en algunas garrapatas. Un proceso de selección puede ocurrir en el intestino medio. Las modificaciones observadas en la antigenicidad de las OspA y OspB reaisladas pueden jugar un papel en esta selección: sólo las espiroquetas "adaptadas" podrían ser capaces de adherirse a las células epiteliales del intestino medio y atravesar la pared intestinal (Hu y cols., 1992). La adhesión de *B. burgdorferi* a la superficie celular del intestino medio de la garrapata se ha descrito por Benach y cols. en 1987. Se ha sugerido que la OspA y la OspB juegan un papel en la adhesión de las espiroquetas a las células endoteliales (Benach y cols., 1988; Comstock y Thomas, 1989; Thomas y Comstock, 1989) y la adherencia a las células se considera como un paso importante para la invasión bacteriana y en la patogenia (Finlay y Falkow, 1989). Por lo tanto, el cambio antigénico de OspA y OspB y quizás de la proteína de 22 KDa, revelado después de un pase por el intestino medio de la garrapata, podría jugar un importante papel en la patogenicidad e infectividad de *B. burgdorferi* en el hospedador vertebrado (Hu y cols., 1992).

La infección de los ovarios de la garrapata dependería de una oportuna "espiroquetemia" en el vector, y esto explicaría por qué la transmisión transovárica de espiroquetas ocurre en un porcentaje menor al 1% en *I. dammini* (sinónimo *I. scapularis*) (Piesman y cols., 1986b). Quizás algunos factores no relacionados con el hospedador, como una elevada temperatura ambiente, estimulan ocasionalmente la diseminación de espiroquetas en las garrapatas en la naturaleza (Ribeiro y cols., 1987).

La diseminación hacia las glándulas salivares parece que ocurre progresivamente después del ataque de la garrapata. De este modo, una rápida retirada del ectoparásito reduce el riesgo de infección (Ribeiro y cols., 1987), si bien hay casos en los que las borrelias se pueden transmitir al comienzo de la alimentación de las garrapatas, debido a que por una activación anterior (en una alimentación parcial o incluso sin alimentarse) transporten espiroquetas en sus glándulas salivares. Así, se ha demostrado que la transmisión puede ocurrir en menos de 24 horas y algunas especies de garrapatas (especialmente *I. persulcatus*) pueden tener espiroquetas

en sus glándulas salivares aun cuando no se han alimentado (EUCALB, 1997).

El número de espiroquetas presentes en las garrapatas antes de que estas empiecen a alimentarse puede ser insuficiente para infectar al hospedador. Mientras la garrapata se alimenta ocurre una rápida multiplicación de las espiroquetas para producir una dosis suficientemente infectiva de las mismas (Piesman, 1994). Así, cuando una ninfa se alimenta las espiroquetas se multiplican en el intestino para alcanzar una densidad por encima de las 100.000 bacterias por ejemplar (De Silva y Fikrig, 1996).

Las ninfas pueden permanecer varios meses sin alimentarse y las espiroquetas sobrevivir en el vector. Cuando una ninfa se alimenta, las espiroquetas tienen que multiplicarse e invadir el hemocele e infectar las glándulas salivares mientras que, al mismo tiempo, evitan ser digeridas por la garrapata junto con la sangre del hospedador. Una vez en un vertebrado, estas bacterias deben multiplicarse mucho más, evitando ser destruidas por el sistema inmune del hospedador, y estar preparadas para infectar a las larvas que puedan alimentarse sobre dicho hospedador (De Silva y Fikrig, 1997).

El ataque de *Ixodes* origina una cavidad en la dermis por la que se extravasan sangre y, más tarde, fluidos tisulares (Balashov, 1972; Brossard y Fivaz, 1982). Las espiroquetas se acumulan allí durante 2-3 días (Nakayama y Spielman, 1989), y después de ello las garrapatas que se alimentan pueden infectarse (Piesman, 1991).

Las condiciones que soportan las espiroquetas en el vector parecen condicionar su posterior acción patógena. Así, los cambios de temperatura y bioquímicos dentro de las garrapatas que se están alimentando pueden influir en la expresión de los genes de OspA/B y OspC (Shih y cols., 1992). Cuando las ninfas se alimentan, la mayoría de las espiroquetas (60-70%) eliminan las OspA/B de su superficie y, en su lugar, producen OspC (Kimsey y Spielman, 1990; Barthold, 1991). Por lo tanto, muchas espiroquetas que se encuentran dentro de las ninfas que se alimentan cambian sus proteínas superficiales cuando invaden las glándulas salivares e infectan al hospedador (Shih y cols., 1992).

Como las espiroquetas eliminan la OspA de su superficie y expresan la OspC, se vuelven resistentes a los anticuerpos frente a OspA. No todas las espiroquetas que están en el vector necesitan eliminar la OspA de su superficie para infectar a un hospedador en presencia de los anticuerpos. Basta que unas cuantas espiroquetas eliminen OspA para multiplicarse en el vector, invadir sus glándulas salivares e infectar al hospedador (Shih y cols., 1992).

La transmisión por coalimentación, es decir la infección de garrapatas no infectadas que se alimentan al mismo tiempo que otras infectadas, se ha descrito y se sugiere que, en este sentido, las garrapatas que se alimentan en hospedadores reservorios incompetentes se pueden infectar. La importancia de esta coalimentación en la eco-epidemiología de la enfermedad es aún desconocida (EUCALB, 1997).

En la naturaleza, el estadio ninfal de las garrapatas puede estar infectado a la vez por *B. burgdorferi* y el piroplasma *Babesia microti* (Piesman y cols., 1986a), y puede transmitir ambas infecciones simultáneamente (Piesman y cols., 1987a).

Una única picadura de ninfa infectada tanto por *B. burgdorferi* como por *Babesia* es suficiente para infectar a los *Peromyscus leucopus* (Piesman y Spielman, 1982; Donahue y cols., 1987; Mather y cols., 1990). La transmisión de cualquiera de estos agentes infecciosos es más eficiente cuando las garrapatas se alimentan hasta la replección; las espiroquetas raramente se transmiten antes de las 24 horas siguientes al ataque de garrapatas infectadas (Piesman y cols., 1987b), mientras que los esporozoitos de *Babesia* requieren un mínimo de 36-48 horas para completar su desarrollo en las glándulas salivares (Piesman y Spielman, 1980). Ambas infecciones pueden también transmitirse simultáneamente por garrapatas infectadas por ambos microorganismos al mismo tiempo (Piesman y cols., 1987a).

El porcentaje de infección en garrapatas que se alimentan sobre ratones infectados por esta bacteria y por *B. microti* conjuntamente, parecía ser inferior que en aquellas alimentadas sobre ratones infectados con un único agente. La diferencia estadística observada puede deberse a una interacción inhibitoria a nivel del hospedador vertebrado, uno expresado dentro de la garrapata, o ambos, pero todavía ningún mecanismo es evidente para esta interacción. Sin

embargo, debido a que muchos ratones están infectados por ambos agentes a la vez (Anderson y cols., 1986) tal interacción inhibitoria puede servir para disminuir el porcentaje de infección de ambos patógenos en las garrapatas en la naturaleza.

En 1997, a partir de *Ixodes ricinus* obtenidos en la Zona de Salud de Soncillo (Burgos), se caracterizó una cepa perteneciente a *Borrelia garinii*, a la que se asignó una patogenicidad "nivel 1" (inflamación de articulaciones y recuperación de la cepa a partir de menos de 3 órganos) (Álamo Sanz, 2000).

En el País Vasco se recogieron un total de 882 larvas y 8 ninfas de los micromamíferos. Hasta la fecha, de los cultivos realizados de larvas mudadas, no se han aislado espiroquetas. De la vegetación recogieron 2843 garrapatas que han sido, en su mayoría, *Ixodes ricinus*, una hembra de *I. frontalis* y un macho de *Haemaphysalis concinna*. Por el momento, de los 108 cultivos realizados a partir de estas garrapatas, se han conseguido 19 aislamientos (Gil y cols., 2000a).

Durante los años 1991/1992, se capturaron algunos ixodoideos de la vegetación de la región de Águas de Moura (Portugal), resultando el primer aislamiento de una variante de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Núncio y cols., 1993), aparentemente no patógena para el hombre y designada como *B. lusitaniae* sp. nov. en 1997 (Le Fleche y cols., 1997).

Baptista y cols. (2000) aislaron 2 especies genómicas patógenas, *B. garinii* y *B. afzelii*, a partir de *I. ricinus* provenientes de la región de Mafra (Portugal).

Pero también se ha encontrado y aislado *Borrelia burgdorferi* de varias especies de garrapatas en Europa, incluida *I. hexagonus* (Gern y cols., 1991), *I. canisuga* y *H. punctata* (Márquez y Constan, 1990).

Las garrapatas implicadas en la transmisión de la espiroqueta causal de la enfermedad de Lyme se alimentan sobre lagartijas y, en zonas donde abundan estos reptiles, prefieren hacerlo sobre ellas. No se conoce que estos animales infecten a las garrapatas que sobre ellos se

alimentan, por ello, aquellas garrapatas que se alimenten sobre lagartijas se vuelven no infectivas. Las lagartijas van a disminuir el número de garrapatas que se alimentan en ratones y, por ello, el porcentaje de ectoparásitos que lleven la infección (Telford III, S.R., comunicación personal).

La distribución de la borreliosis de Lyme está condicionada a la presencia de su vector principal, que en la Península Ibérica es *Ixodes ricinus*. Dependiendo de las condiciones climáticas, la actividad estacional de estas garrapatas varía cada año. Parece ser que la temperatura es el estímulo para el comienzo de la actividad, mientras que la supervivencia depende de la humedad. Su ciclo biológico es largo (2-3 años) y complejo, con 3 hospedadores. La naturaleza estacional de la actividad de búsqueda de hospedadores determina, en gran parte, la aparición cíclica de este proceso. *Borrelia burgdorferi* se mantiene en todas las fases de desarrollo de las garrapatas transmitiéndose de forma transestádica principalmente.

3.2. RESERVORIOS.

Un hospedador reservorio es aquella especie animal alternativa en el ciclo biológico o epidemiológico. También se llama reservorio al hospedador principal de un ciclo silvestre antroponótico. Es el reservorio del proceso humano (Martínez Fernández y Cordero del Campillo, 1999).

Normalmente son las especies hospedadoras más importantes en la circulación de los agentes patógenos en un hábitat específico. Aunque los vectores también pueden infectarse por hospedadores que actúan como amplificadores durante cortos períodos de tiempo o por transmisión por coalimentación. Un hospedador amplificador es aquel que permite la reproducción del agente y es capaz de transmitir la infección a los vectores, al menos en un corto período de tiempo. Un hospedador de coalimentación no permite la multiplicación del patógeno, pero puede contribuir a aumentar el número de vectores infectados al alimentarse próximamente. Se consideran hospedadores infectivos a los animales que pueden actuar como hospedadores reservorios fisiológicamente, pero su importancia, desde un punto de vista ecológico, es mínimo (serían los animales de laboratorio) (EUCALB, 1997).

Para determinar el estado de reservorio se utilizan distintos criterios. El xenodiagnóstico en larvas es el método más valioso, pero tiene una serie de inconvenientes, como es la dificultad de su utilización en algunas especies y el problema de extrapolar los datos obtenidos con algunos individuos bajo condiciones de laboratorio al medio natural. Estos inconvenientes se pueden solventar recogiendo larvas parcial o totalmente alimentadas de animales silvestres. Tomando como base que la transmisión transovárica no es importante en el hábitat, la detección de infección en larvas alimentadas después de 10 días de incubación o en las ninfas resultantes de éstas daría información del estado de reservorio de esas especies y de la infectividad del individuo en particular. La detección de infección en garrapatas sin alimentar es un método aún más indirecto para investigar el estado de hospedador reservorio, pero da información sobre la contribución que una especie hospedadora ofrece, a largo plazo, en la circulación de las espiroquetas en la naturaleza. Otro método sería la detección de *Borrelia burgdorferi* o de su ADN en los tejidos del hospedador, lo que indicaría la capacidad de supervivencia de la espiroqueta en esa especie hospedadora. Pero esto no sería del todo fiable, ya que, por ejemplo, se sabe que los ciervos no son reservorios, a pesar de que se encuentren espiroquetas en su sangre. Habría que relacionar la presencia de ADN borrelial en estos tejidos animales con la capacidad de que este animal pueda infectar garrapatas. Por último, la presencia de anticuerpos en un animal sólo indica que ha estado expuesto a estas borrelias, y no que sirva para albergar espiroquetas o que sea capaz de infectar garrapatas (EUCALB, 1997).

Para establecer la capacidad de un animal como reservorio en un determinado hábitat debe tenerse en cuenta la infectividad de la especie hospedadora por vectores (incluyendo el período de tiempo que persiste la infectividad después de la infección), la abundancia de los hospedadores en el hábitat, y la proporción de población de vectores alimentados por esa especie animal (Mather y cols., 1989).

La persistencia de *B. burgdorferi* durante grandes períodos de tiempo en hospedadores infectados contribuye a aumentar este papel amplificante, y la gran duración que presenta la infectividad de roedores para las garrapatas *I. ricinus* demuestra que estos ratones son hospedadores reservorios reales para esta espiroqueta y que ellos contribuyen enormemente en el mantenimiento de la bacteria en los focos naturales. Mediante este mecanismo, *Borrelia*

burgdorferi puede persistir en el roedor, en los períodos en los que la garrapata no es activa. En la primavera del año siguiente, la infectividad para los roedores podría aumentarse en respuesta a la infestación por garrapatas (Gern y cols., 1994). Así, se ha comprobado que los roedores capturados en el campo e infectados con *B. burgdorferi* pueden permanecer infectivos durante 7 meses (Donahue y cols., 1987). Una picadura de una ninfa infectada es suficiente para transmitir la infección a ratones (Donahue y cols., 1987). Una vez infectado, el reservorio roedor juega un papel como amplificador al infectar a un gran número de garrapatas y también un papel de mantenimiento, al persistir las espiroquetas en el hospedador por largos períodos de tiempo. El papel de amplificador es estacional y esta estacionalidad está seguramente influenciada por la dinámica de poblaciones de larvas, ninfas y roedores en el foco (Humair y cols., 1993a).

En Europa se han determinado muchas especies de mamíferos como reservorios competentes. La mayoría de ellos son roedores, los más importantes son probablemente los ratones (*Apodemus* spp.) (EUCALB, 1997) que pueden infectar a las garrapatas durante, al menos, 14 meses (Gern y cols., 1994). Esto se debe, en parte, a la no estimulación de la IgG₂ y, por tanto, a la imposibilidad de estos ratones de matar las espiroquetas al no existir los anticuerpos fijadores del complemento. En humanos se necesita la presencia de IgG anti-borrelia para la destrucción de espiroquetas mediada por complemento (Kochi y Johnson, 1988). Los ratones *A. flavicollis* y *A. sylvaticus* capturados en el campo son infectivos para las larvas de *I. ricinus* durante toda su vida, y esta infectividad aumenta en respuesta a la infestación por garrapatas (Genchi y cols., 1994). Otros reservorios roedores son los topillos (*Clethrionomys* spp.), que alimentan muchas ninfas (EUCALB, 1997). Se ha observado una mayor infección por *Borrelia* spp. en *Clethrionomys* spp. que en *Apodemus* spp. Esta diferencia entre *C. glareolus* y *A. sylvaticus* va a contribuir de distinta forma en el proceso de muda de las garrapatas que sobre ellos se alimentan (Humair y cols., 1999). Una vez que se infectan los roedores pequeños, permanecen infectivos para las garrapatas de por vida (Gern y cols., 1994), aunque la infectividad puede variar temporalmente.

Otro roedor muy abundante, el ratón casero *Mus musculus*, puede ser un reservorio competente, y muchas otras especies de pequeños roedores han estado implicadas, particularmente en Europa del Este y en Rusia (Gern y cols., 1998).

Varios insectívoros también están implicados como hospedadores reservorios, como las musarañas (*Sorex*, *Neomys*) (Padgett y cols., 1996; EUCALB, 1997) y erizos (*Erinaceus*). Este último es un reservorio potencialmente importante en una gran variedad de hábitats, incluyendo los suburbanos y los peridomésticos, pero es extremadamente difícil estudiarlo de una manera cuantitativa al ser complicado determinar su densidad en un determinado ambiente (EUCALB, 1997).

Las ardillas grises y rojas pueden desarrollar una infección y transmitir *B. burgdorferi sensu lato* a las garrapatas que se alimentan sobre ellos (Gern, 2000).

Numerosas garrapatas *I. ricinus* se alimentan sobre lirones (*Glis glis*) (Tovornik, 1989). Este animal sirve como hospedador reservorio para la espiroqueta causal de la enfermedad de Lyme más efectivamente que otros roedores (Matuschka y cols., 1994b).

Los lagomorfos se han descrito como reservorios de la enfermedad de Lyme (Telford y Spielman, 1989) y son importantes en hábitats sin roedores. Entre ellos, las liebres (*Lepus*) son reservorios demostrados, pero el papel de los conejos (*Oryctolagus cuniculi*) no se conoce. Estos animales no son buenos hospedadores para las garrapatas vectoras en la naturaleza y las pocas garrapatas que se recogieron de los ejemplares salvajes no estaban infectadas (Aeschlimann y cols., 1986; Hovmark y cols., 1988; Gern y cols., 1991; Matuschka y cols., 1992; Tälleklint & Jaenson, 1993; EUCALB, 1997).

El papel de las especies carnívoras también es limitado, aunque se ha visto que los zorros (*Vulpes vulpes*) tienen anticuerpos frente a *B. burgdorferi sensu lato*, pero no son buenos hospedadores para las formas inmaduras de *I. ricinus* y la proporción de larvas infectadas recogidas es muy baja. En Estados Unidos se ha demostrado experimentalmente que los perros (*Canis familiaris*) son reservorios competentes durante un corto período de tiempo después de la infección, ya que desarrollan rápidamente una inmunidad eficaz. Se desconoce el papel de los felinos (EUCALB, 1997).

Los ungulados (ciervos, ovejas, vacas y cabras) alimentan un gran número de garrapatas en la naturaleza y en ellos se han detectado anticuerpos frente a este patógeno. En áreas locales se han aislado espiroquetas de tejidos de algunas de estas especies y en ovejas se ha demostrado alguna infección por coalimentación, pero por estudios de campo no parece que transmitan la infección. Sin embargo, estas especies están implicadas, de una forma crucial, en la eco-epidemiología de la borreliosis como hospedadores de mantenimiento para las garrapatas (EUCALB, 1997).

Las aves son difíciles de estudiar y sólo recientemente se ha reconocido su papel de reservorios de *B. burgdorferi sensu lato* (EUCALB, 1997). Los mirlos americanos son reservorios de *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* y *B. valaisiana*; los faisanes (*Phasianus colchicus*) de *B. burgdorferi* y *B. garinii*; y los tordos, petirrojos y reyezuelos de *B. burgdorferi sensu lato* (EUCALB, 1997; Gern, 2000).

Algunos *Turdidae* pueden jugar un papel importante como reservorios. Sin embargo, Matuschka y Spielman (1992) encontraron que subadultos de *I. ricinus* alimentados en mirlos europeos (*Turdus merula*) nunca contenían espiroquetas, lo que sugiere que las garrapatas perdían la infección en el curso de su alimentación sobre ellos, y no los infectan (Estrada-Peña y cols., 1995).

El mecanismo por el cual las garrapatas pierden su carga de espiroquetas en el curso de la alimentación en los mirlos europeos permanece desconocida. Una explicación podría ser que ciertas aves aumentan una respuesta inmune frente a la espiroqueta durante exposiciones previas a garrapatas infectadas y estos anticuerpos ingeridos por la garrapata que se está alimentando, de alguna manera destruyen cualquier borrelia residente. Otra alternativa sería la presencia de un factor humoral innato que actúa dentro del intestino de la garrapata que se alimenta. Por último, una tercera hipótesis sería que la elevada temperatura corporal, que en los mirlos europeos es de 43°C, induce la síntesis de proteínas de choque térmico, letales para las espiroquetas, al menos *in vitro* (Matuschka y Spielman, 1992).

Olsen y cols. (1995a) describieron la presencia de *B. garinii* en *I. uriae* en localizaciones diferentes en ambos hemisferios norte y sur. Estos autores demostraron que *I. uriae* y sus hospedadores asociados, las gaviotas, pueden mantener ciclos de transmisión y sugirieron que las espiroquetas pueden ser intercambiadas por estas aves entre ambos hemisferios, pero se desconoce la capacidad de estas cepas para transmitirse a otros hospedadores.

Por último, se han recogido larvas infectadas de varias especies de aves migratorias, lo que implica, en ausencia de transmisión transovárica importante, que podrían ser reservorios (EUCALB, 1997). Además, se sabe que las aves migratorias pueden mantener la enfermedad de Lyme como infección latente durante varios meses, pudiendo reactivarse ésta y pasar a las garrapatas como resultado de la situación de estrés que les supone la migración. Por ello, estas aves serían unos transportadores del patógeno a grandes distancias (Gilfe y cols., 2000).

Como en el caso de los mirlos, se especuló la posibilidad de que las altas temperaturas medias corporales de las aves migratorias (40.6 °C) debían imposibilitar la multiplicación de la espiroqueta, lo que les impediría desarrollar un papel como hospedadores amplificantes. Sin embargo, la temperatura corporal de estas aves no es uniforme, tanto espacial como temporalmente, y determinadas zonas, como la piel y los sacos aéreos, estarían a menor temperatura que los órganos internos (Gilfe y cols., 2000). Además, *B. garinii* y *B. valaisiana*, que no causa enfermedad en el hombre, son las especies más frecuentemente encontradas en las aves, lo que sugiere que están bien adaptadas a las altas temperaturas corporales (Humair y cols., 1998; Kurtenbach y cols., 1998a).

Debido a que tanto los tordos como otras aves frecuentemente viajan a grandes distancias durante su migración, esto revelaría un nuevo mecanismo para facilitar la diseminación de la enfermedad de Lyme a grandes distancias (Gilfe y cols., 2000).

Hasta el momento, las especies hospedadoras europeas que son reservorios competentes para una o más genoespecies de *B. burgdorferi sensu lato* en Europa son las que aparecen en el siguiente cuadro:

	Especie Animal	Autores
Pequeños Mamíferos	<i>Apodemus sylvaticus</i> (ratón de campo)	Aeschlimann y cols., 1986
	<i>Apodemus flavicollis</i> (ratón de campo de cuello amarillo)	Aeschlimann y cols., 1986
	<i>Apodemus agrarius</i> (ratón de raya negra)	Matuschka y cols., 1992
	<i>Clethrionomys glareolus</i> (topillo negro)	Aeschlimann y cols., 1986
	<i>Glis glis</i> (lirón comestible)	Matuschka y cols., 1994b
	<i>Microtus agrestis</i> (topillo de prado)	Tälleklint y Jaenson, 1994
	<i>Neomys fodiens</i> (musaraña de agua)	Tälleklint y Jaenson, 1994
	<i>Sorex minutus</i> (musaraña pigmeo)	Tälleklint y Jaenson, 1994
	<i>Sorex araneus</i> (musaraña común)	Tälleklint y Jaenson, 1994
Mamíferos de tamaño medio	<i>Erinaceus europaeus</i> (erizo)	Gray y cols., 1994
	<i>Lepus timidus</i> (liebre variante)	Tälleklint y Jaenson, 1993
	<i>Lepus europaeus</i> (liebre marrón)	Tälleklint y Jaenson, 1994
	<i>Rattus norvegicus</i> (rata marrón)	Matuschka y cols., 1997
	<i>Rattus rattus</i> (rata negra)	Matuschka y cols., 1997
	<i>Sciurus carolinensis</i> (ardilla gris)	Craine y cols., 1995
	<i>Sciurus vulgaris</i> (ardilla roja)	Humair y Gern, 1998

Aves	<i>Aca torda</i> (pico de navaja)	Olsen y cols., 1995a
	<i>Anthus trivialis</i> (bisbita arbóreo)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Coccothraustes coccothraustes</i> (picogordo)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Erithacus rebecula</i> (petirrojo)	Olsen y cols., 1995b; Humair y cols., 1993b
	<i>Fringilla coelebs</i> (pinzón vulgar)	Olsen y cols., 1995b; Humair y cols., 1993b
	<i>Luscinia luscinia</i> (ruiseñor tordo)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Luscinia svecica</i> (garganta azul)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Parus major</i> (gran herrerillo común)	Humair y cols., 1993b
	<i>Phasianus colchicus</i> (faisán)	Kurtenbach y cols., 1998a
	<i>Phoenicurus phoenicurus</i> (estrella roja)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Phylloscopus collybita</i> (mosquitero común)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Sylvia atricapilla</i> (capuchón negro)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Sylvia communis</i> (garganta blanca)	Olsen y cols., 1995b; Humair y cols., 1993b
	<i>Troglodytes troglodytes</i> (reyzuelo)	Olsen y cols., 1995b
	<i>Turdus merula</i> (mirlo)	Olsen y cols., 1995b; Humair y cols., 1993b; 1998
<i>Turdus philomelos</i> (tordo cantor)	Olsen y cols., 1995b; Humair y cols., 1993b	

Tabla 3: Hospedadores reservorios competentes en Europa (EUCALB, 1997)

En la ecología de la borreliosis de Lyme, los reservorios vertebrados actúan como filtros biológicos al seleccionar las especies de *Borrelia* compatibles con el medio ambiente fisiológico del hospedador y luego transmiten estas genoespecies a las siguientes garrapatas que se alimenten sobre ellos (Humair y Gern, 1998). Así, se han observado asociaciones específicas entre hospedadores, garrapatas y *Borrelia* spp.: *B. afzelii* y pequeños roedores en Suiza (Humair y cols., 1995; Hu y cols., 1997), *B. burgdorferi sensu stricto* y pequeños roedores en Gran Bretaña (Kurtenbach y cols., 1998a), *B. garinii* y *B. valaisiana* y aves (Humair y cols., 1998; Kurtenbach y cols., 1998a), *B. afzelii* y ardillas grises en Gran Bretaña (Craine y cols., 1997), y *B. burgdorferi sensu stricto* y *B. afzelii* y ardillas rojas en Suiza (Humair y Gern, 1998).

Así, Kurtenbach y cols. (2002) dividen las cepas de *B. burgdorferi* s.l. en, al menos, tres grupos ecológicos:

1. Las adaptadas a pequeños mamíferos (*B. garinii* ribotipo NT29 serotipo 4 de OspA; *B. afzelii*; *B. bissettii*; y *B. japonica*),
2. Las adaptadas a aves (*B. garinii* ribotipo 20047 serotipos 3,5,6 y 7 de OspA; *B. valaisiana* y *B. turdi*), y
3. Las que no están especializadas (*B. burgdorferi sensu stricto*).

Los ciclos enzoóticos cerrados juegan un papel en el mantenimiento de patógenos en la naturaleza, pero la zoonosis sólo se presenta si actúa un vector puente, como *I. ricinus*. Si la garrapata no es antropofílica, no constituye un riesgo para la población humana. El único ejemplo de esto en Europa es la circulación de espiroquetas entre el erizo europeo (*Erinaceus europaeus*) y su garrapata, *I. hexagonus* (EUCALB, 1997).

En Europa, el primer aislamiento de *Borrelia* de roedores se obtuvo por Hovmark y cols. (1988) en Suecia y se caracterizó como *B. afzelii*. En Rusia y en Austria, Gorelova y cols. (1995) y Khanakha y cols. (1994) han demostrado que se pueden aislar distintas genoespecies o detectarlas por PCR de la vejiga de la orina, corazón y bazo de pequeños mamíferos. Sin embargo, sólo *B. afzelii* pudo aislarse de biopsias de oreja tomadas de pequeños mamíferos capturados en diferentes áreas endémicas de Suiza (Humair y cols., 1995). Más tarde, Hu y cols.

(1997) demostraron que los roedores transmitían exclusivamente *B. afzelii* a las garrapatas que sobre ellos se alimentaban. Estos resultados sugerían la existencia de una asociación específica entre el tipo de cepa *B. afzelii*, pequeños roedores e *I. ricinus* (Gern y Humair, 1998).

Tales asociaciones estrictas entre hospedadores y especies de *Borrelia* no siempre se observan: en Japón, por ejemplo, se han encontrado en pequeños mamíferos *B. garinii*, *B. afzelii* y especies no identificadas de *Borrelia* (Nakao y Miyamoto, 1995; Ishiguro y cols., 1996; Sato y cols., 1996). Esta ausencia de asociación específica en Asia, se podría relacionar con varios factores ecológicos como diferentes subtipos de *B. garinii*, distintas especies de garrapatas vectoras, así como distintas especies de roedores asiáticos (Gern y Humair, 1998).

Con respecto a la respuesta inmune en los roedores hospedadores reservorios, se ha visto que reaccionan frente a antígenos presentes de forma natural en la espiroqueta. Casi todos ellos reconocen los antígeno p20, p35.5, p39 y p58, a pesar de la intensidad de transmisión. Los sueros de los ratones infectados crónicamente reconocen simultáneamente tanto los antígenos p35.5 como p37 (Brunet y cols., 1995).

Brunet y cols. (1995) indicaron la ausencia general de la inmunorreactividad de los ratones de patas blancas frente a los antígenos espiroquetales flagelina, OspA, OspB y OspC. Esto podría relacionarse con la competencia reservoria excepcional de estos ratones en la naturaleza. Por el contrario, observaron una reactividad importante frente a tres antígenos peor caracterizados (p35.5, p36 y p58). El principal reservorio enzoótico presentaba una respuesta humoral rápida, intensa y duradera a la mayor parte de los antígenos espiroquetales. La ausencia de respuesta frente a las principales proteínas de la superficie externa de la borrelia podría representar una coevaluación a una interacción aparentemente benigna entre la espiroqueta de la enfermedad de Lyme y su reservorio. Otros autores mostraron que 3 proteínas de bajo peso molecular de *B. burgdorferi* (OspA, OspB y pC) causaban una respuesta inmune temprana intensa en ratones (Wilske y cols., 1989).

Kurtenbach y cols. (1994) observaron que tras la inoculación experimental con espiroquetas inactivadas o viables, todos los roedores desarrollaban anticuerpos IgG frente a OspA, OspB, flagelina y, además, frente a varias proteínas de peso molecular entre 18-26 KDa y de 70 KDa. En algunos sueros se detectaron anticuerpos frente a proteínas con pesos moleculares aproximados de 39 KDa, de 60-70 KDa y de 80-110 KDa. Por el contrario, los roedores infectados por garrapatas no desarrollaron anticuerpos frente a OspA y OspB, pero sí frente a proteínas de 24, 26, 39-41 y 70 KDa.

Los ratones *Apodemus* no adquieren una resistencia a las garrapatas, pero desarrollan una respuesta inmune más fuerte a la infección por *Borrelia* (Kurtenbach y cols., 1994; Dizij y Kurtenbach, 1995). A través de su sistema inmune, *Apodemus* mantiene la infección borrelial a un bajo nivel, raramente detectable por cultivo de piel, pero suficiente para infectar a las garrapatas de una forma eficiente. Por el contrario, los topillos *Clethrionomys* desarrollan una respuesta inmune primariamente a las garrapatas, mientras que permiten que las borrelias se multipliquen en su piel. Las espiroquetas se detectan fácilmente en *Clethrionomys* y se transmiten a las garrapatas que se alimentan en estos animales, sin embargo, no engordan o mudan bien, debido a la resistencia adquirida a estos ectoparásitos (Dizij y Kurtenbach, 1995; Humair y cols., 1999). Esto indica que la competencia reservoria de un hospedador se modula por su respuesta inmune hacia el patógeno y hacia el vector. Igualmente, el sistema inmune del hospedador probablemente reaccione de forma distinta a las diferentes genoespecies de *Borrelia* y esto explicaría las asociaciones ya observadas de hospedador-*Borrelia* (Kurtenbach y cols., 1998b).

Algunas evidencias experimentales y epidemiológicas (Lane, 1990; Manweiler y cols., 1992) sugieren que las lagartijas no son reservorios competentes para *B. burgdorferi*, sin embargo, algunos datos indican que se pueden infectar y transmitir la espiroqueta a las garrapatas (Levin y cols., 1993). Así, según las primeras evidencias, el riesgo resultante de la exposición a la enfermedad de Lyme se disminuiría por la presencia de hospedadores no competentes, como las lagartijas (Spielman y Kimsey, 1991), al actuar como hospedadores barrera (aquel resistente a la infección que, además, elimina la infección de las garrapatas que se alimentan sobre él (EUCALB, 1997).

La distribución de garrapatas sobre lagartijas está relacionada con el tamaño (edad) del hospedador y género. Así se encuentran las siguientes asociaciones: *I. ricinus* -*Lacerta agilis* L. / *Lacerta vivipara* Jacquin (Bauwens y cols., 1983).

Las lagartijas adultas y especialmente los machos, normalmente están más infestados que los ejemplares jóvenes y las hembras (Lane y Loye, 1989).

Se ha sospechado que otros hospedadores vertebrados tiene un efecto zooprofiláctico en las garrapatas infectadas que se alimentan sobre ellos destruyendo las espiroquetas presentes en el intestino medio de la garrapata. Uno de ellos es, como ya se ha indicado, la lagartija *Sceloporus occidentalis*, cuya sangre contiene un factor termolábil, probablemente una proteína, que destruye las espiroquetas en el divertículo del intestino medio de las ninfas de *I. pacificus* (Lane y Quistad, 1998). Así, en los Estados de las costas del Pacífico, la alimentación de *I. pacificus* sobre lagartijas y otros reptiles representa la muerte para las espiroquetas y, por ello, a través del proceso de zooprofilaxis, el porcentaje de infección de *I. pacificus* se anula (Lane y Loye, 1989). Consecuentemente, *S. occidentalis* disminuye el riesgo de transmisión de estas espiroquetas al desviar a la garrapata vectora de alimentarse en otros hospedadores reservorios competentes, como la rata de campo *Neotoma fuscipes* o la rata canguro de California *Dipodomys californicus* (Lane y Loye, 1989; Lane y Brown, 1991; Brown y Lane, 1992, 1996; Manweiler y cols., 1992).

Además de las lagartijas *S. occidentalis* (Lane, 1990), *L. agilis* (Matuschka y cols., 1992) y *P. dugesii* (Matuschka y cols., 1994a), otras especies de reptiles parecen ser también hospedadores incompetentes de borrelias. En la antigua U.R.S.S., una encuesta de 1144 (17 especies) y 556 (8 especies) reptiles, incluyendo lagartijas, para estudiar la presencia de borrelias causantes de fiebre recurrente en el centro asiático, fue improductivo (Mishchenko, 1960; Bairamova, 1963). Sin embargo, los reptiles, al igual que las aves y mamíferos, varían en su competencia reservoria a *B. burgdorferi* (Lane y Quistad, 1998).

Wright y cols. (1998) no han podido aislar espiroquetas de sangre de lagartijas o de garrapatas que se habían alimentado sobre ellas. Estos datos sugieren que la lagartija *Elgaria multicarinata* no es un reservorio competente para esta borrelia, aunque es un importante hospedador para los estadios inmaduros de *I. pacificus*.

Sin embargo, Levin y cols. (1996) indican que las especies de lagartijas *Eumeces inexpectatus* y *Anolis carolinensis* juegan un papel en el mantenimiento de la transmisión de espiroquetas al padecer una infección por *Borrelia* e infectar a las garrapatas alimentadas sobre ellas.

Otros hospedadores barrera son algunos ungulados. Sus inmunoglobulinas pueden servir para destruir las espiroquetas presentes en los intestinos de las garrapatas que se alimentan sobre ellos (Kochi y Johnson, 1988). Estos animales no juegan un importante papel como hospedadores reservorios, aunque la transmisión por coalimentación puede permitir alguna infección de garrapatas (Gern y cols., 1998).

El suero de ejemplares sero-reactivos de ciervos asiáticos silvestres (*Cervus nippon yezoensis*) destruían las espiroquetas *Borrelia garinii*. Además, la actividad bactericida del suero de ciervo fue proporcional al nivel de anticuerpos presentes frente a *B. garinii*, y esta actividad podría haber sido mediada por el complemento. Esta fue la primera demostración del mecanismo de un factor borrelícida en un hospedador vertebrado natural de las espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme (Isogai y cols., 1994).

Sin embargo, este punto es también controvertido, ya que recientes estudios muestran que estos hospedadores pueden ser capaces de sufrir infecciones localizadas y transmitir *Borrelia* a las garrapatas sin desarrollar una infección diseminada. Estos hospedadores incluyen al ciervo sika en Japón (Kimura y cols., 1995) y a la oveja en Inglaterra (Ogden y cols., 1997). Así, el hospedador puede transmitir *B. burgdorferi* a las garrapatas, incluso en ausencia de infección generalizada (Gern y Humair, 1998).

En Alemania, las larvas de *I. ricinus* no adquieren espiroquetas mientras se alimentan sobre la lagartija *Lacerta agilis* (Matuschka y cols., 1992) y esta garrapata pierde su infección espiroquetal mientras se alimenta en el mirlo europeo (*Turdus merula*) (Matuschka y Spielman, 1992). Otra lagartija, *Podarcis dugesii*, así como canarios y ungulados domésticos, son reservorios incompetentes de *B. burgdorferi* en la Isla de Madeira, Portugal (Matuschka y cols., 1994a). De forma similar, al menos 6 especies de ungulados europeos y norteamericanos, como el corzo (*Capreolus capreolus*) y el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) son aparentemente incapaces de infectar de forma eficiente a las garrapatas subadultas de *Ixodes* spp. con *B. burgdorferi sensu lato*, y las garrapatas infectadas con espiroquetas pueden perder sus infecciones como resultado del contacto con estos hospedadores (Telford y cols., 1988; Jaenson y Tälleklint, 1992; Lacombe y cols., 1993; Matuschka y cols., 1993; Lane y cols., 1994).

Se han ofrecido varias hipótesis para explicar la pérdida de espiroquetas en el divertículo del intestino medio de las garrapatas vectoras por su alimentación sobre hospedadores reservorios incompetentes. Estas incluyen la ingestión de inmunoglobulinas del hospedador o cualquier otro factor borrelícida y los efectos potenciales letales que la alta temperatura del cuerpo de las aves (mayor a 41°C) y las lagartijas pueden tener sobre *B. burgdorferi sensu lato* (Matuschka y Spielman, 1992; Lacombe y cols., 1993; Matuschka y cols., 1993; Isogai y cols., 1994; Clover y Lane, 1995; Levin y cols., 1996). A pesar del mecanismo operativo en diferentes vertebrados, la importancia en salud pública es similar, es decir, la eliminación de las infecciones espiroquetales de las garrapatas vectoras disminuye el riesgo de transmisión a los humanos y a otros animales.

El término de hospedador de reproducción o de mantenimiento se aplica a aquellos animales sobre los que se alimentan garrapatas adultas y son esenciales para la reproducción o el mantenimiento de la población de estos vectores. Un ejemplo serían los ciervos (EUCALB, 1997), ya que, como se ha indicado, en general se acepta que no son reservorios competentes (Jaenson & Tälleklint, 1992; Matuschka y cols., 1993).

En Inglaterra, Kurtenbach y cols. (1998a) observaron que *B. afzelii* puede estar completamente ausente en algunas áreas y que pequeños mamíferos transmiten *B. burgdorferi sensu stricto* a garrapatas por xenodiagnóstico, pero sólo en un porcentaje extremadamente pequeño. La ausencia de *B. afzelii* en estos focos podría estar relacionado con una población amplia y densa de faisanes, que reducen sustancialmente el número básico de multiplicación de *B. afzelii*. Esta genespecie es eliminada del ecosistema por faisanes que actúan como hospedadores zooprofilácticos.

En conclusión, el papel de reservorio describe la contribución relativa de una especie animal a la circulación de *Borrelia burgdorferi* en un hábitat determinado, y está en función de la infectividad del reservorio, abundancia de hospedadores y papel en la alimentación de garrapatas (EUCALB, 1997). En ellos, las espiroquetas se diseminan en las 2 semanas siguientes, de manera que otra garrapata vectora puede ingerirlos en el curso de su alimentación en otra parte de la superficie del hospedador (Levine y cols., 1985; Donahue y cols., 1987).

Para determinar el riesgo potencial de infección en un hábitat es muy importante identificar los hospedadores que son responsables de la infección de los vectores (Gern y Humair, 1998).

En Europa se han demostrado muchas especies de mamíferos como reservorios competentes. La mayoría de ellas son roedores, los más importantes son probablemente los ratones (*Apodemus* spp.) y los topillos (*Clethrionomys* spp.) al ser hospedadores habituales de ninfas. Varios insectívoros también están implicados, como las musarañas (*Sorex*, *Neomys*) y erizos (*Erinaceus*). Los ungulados (ciervos, vacas, ovejas y cabras) alimentan un gran número de garrapatas en la naturaleza. Con respecto a las aves, los faisanes (*Phasianus colchicus*) y los mirlos (*Turdus merula*) son reservorios competentes y son importantes al infectar garrapatas con *B. garinii* y, en el caso de los mirlos, también con espiroquetas del grupo *B. valaisiana* (EUCALB, 1997).

Algunas evidencias experimentales y epidemiológicas (Lane, 1990; Manweiler y cols., 1992) sugieren que las lagartijas no son reservorios competentes para *B. burgdorferi*. Por otro lado, los mamíferos de mayor tamaño –alce americano y ciervo- aparentemente son incompetentes como reservorios (Gray y cols., 1992, 1995; Jaenson y Tälleklint, 1992; Tälleklint y Jaenson, 1994).

En España, el mayor hospedador para los inmaduros de *Ixodes ricinus* es el ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, sin olvidar a distintos géneros de aves Passeriformes, como *Erithacus*, *Turdus* y *Fringilla*. Sin embargo, en las aves tiene lugar un fenómeno de competencia entre distintas especies de garrapatas, aproximadamente en la misma época del año. Así, pueden aparecer sobre una misma ave los inmaduros de *I. frontalis*, *I. ricinus* y *H. punctata*. Es común encontrar siempre grandes cantidades de *I. frontalis* y *H. punctata*, en perjuicio de un menor número de especímenes de *I. ricinus*. Tal circunstancia de competencia puede incidir en el hecho de que sea menor la capacidad de las aves como reservorios activos de *B. burgdorferi* (Estrada Peña, 1994).

3.3. HOSPEDADORES NO RESERVORIOS.

Son aquellos animales que sufren la infección por *Borrelia burgdorferi*, una vez que esta bacteria es inoculada por los distintos estadios de las garrapatas durante su alimentación.

En este apartado se va a hablar de aquellas especies animales hospedadoras en las que se ha realizado el estudio objeto de esta tesis doctoral.

3.3.1. HUMANA.

El hombre, al igual que los animales domésticos y silvestres, puede servir de hospedador para *Borrelia burgdorferi*. La enfermedad de Lyme en él se caracteriza por una afección dermatológica que aparece al principio, seguida de manifestaciones neurológicas y/o cardiovasculares, quedando, finalmente, secuelas de tipo articular, gracias a las cuales, este proceso se reconoció, por primera vez, en 1975 en la ciudad de Old Lyme (Conéctica) de

Estados Unidos (Steere y cols., 1977). El primer caso de humana en España, perfectamente documentado, se describe en Asturias en 1987 (Uría y cols., 1987). Desde entonces, han sido numerosos los casos identificados, aunque los registrados en el Boletín Epidemiológico son muy inferiores al número real, debido a que en nuestro país no es una enfermedad de declaración obligatoria, a diferencia de en Portugal, que lo es desde 1999 (Núncio, 2000).

3.3.2. PERROS.

Los perros están frecuentemente infestados por garrapatas y, por ello, son vulnerables a la infección por *Borrelia burgdorferi* (Speck y cols., 2001).

En el perro la enfermedad de Lyme es conocida desde 1984 (Lissman y cols., 1984) y se asocia con un cuadro clínico de artritis (cojeras y dificultad de movimientos), deformación de articulaciones, carditis, nefritis y fiebre (Stevens, 1989; Levy y Dreesen, 1992), entre otros síntomas (Azuma, 1994). En España fue diagnosticada por Font y cols. en 1992. A partir de allí se han iniciado diversos estudios en las diferentes regiones españolas para determinar la seroprevalencia de esta enfermedad en cánidos, con cifras próximas al 17% en la provincia de Soria (Serrano y cols., 1994). Estos datos de seroprevalencia deben ser considerados con precaución, ya que en perros con infección natural los títulos de anticuerpos pueden persistir durante años (Magnarelli y cols., 1984a), y concretamente las IgM al menos 9 meses (Bosler y cols., 1988). Se desconoce si esto es debido a la persistencia del microorganismo dentro del hospedador o a nuevas exposiciones al mismo, ya que es posible que un perro seropositivo sea todavía susceptible a la infección por este patógeno. Lo que sí está demostrado es que a pesar de la resolución de los signos clínicos después del tratamiento antibiótico en perros, los títulos generalmente se mantienen durante meses o años (Jacobson y cols., 1996).

El diagnóstico es complejo y debe basarse en la clínica, análisis serológicos, respuesta al tratamiento y en la exclusión de otros procesos, incluyendo enfermedad articular degenerativa, osteocondritis disecante, proceso de dislocación del ancóneo, panosteitis o enfermedad inmunomediada (Levy y cols., 1996). Otras enfermedades sistémicas como la ehrlichiosis, rickettsiosis o la leishmaniosis pueden dar un cuadro clínico parecido. Por otro lado no es raro

encontrarse perros con infecciones mixtas. Enfermedades neuromusculares o neurológicas deben de considerarse, en especial los casos que se presentan con dolor en las regiones vertebrales (Font, 1994).

Tanto el Lupus Eritematoso Sistémico como la Artritis Reumatoide pueden presentarse con poliartritis, edema de las articulaciones y fiebre. Las radiografías junto con las pruebas de anticuerpos antinucleares (AAN), factor reumatoideo (FR) y preparaciones para lupus eritematoso (LE) pueden ayudar a descartar estas enfermedades (Niesembaum, 1991).

El serodiagnóstico de la enfermedad de Lyme en esta especie animal se caracteriza por una baja especificidad de los ensayos normales con antígeno de *B. burgdorferi* y su incapacidad para diferenciar entre una infección natural y el estado vacunal (Gauthier y Mansfield, 1996).

Las variaciones entre los laboratorios resultante de una falta de estandarización, causa problemas en las pruebas serológicas (Greene y cols., 1991).

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y enzimo-inmunoensayo (ELISA) detectan IgG frente a *Borrelia* en el suero, pero no distinguen si se trata de anticuerpos naturalmente inducidos o vacunales (Gauthier y Mansfield, 1996), aunque algunos autores establecen que los métodos estandarizados de IFI en perros son altamente sensibles, y su uso no produce reacciones cruzadas con leptospiros (Lissman y cols., 1984; Magnarelli y cols., 1984a, 1985; Kornblatt y cols., 1985).

El serodiagnóstico se ve dificultado por el hecho de que los anticuerpos inducidos por otros organismos, espiroquetas o no, como *Leptospira interrogans* o *Escherichia coli*, pueden originar reacciones cruzadas con los antígenos de *Borrelia burgdorferi* (Fawcett y cols., 1989; Schillhorn van Veen y cols., 1993; Shin y cols, 1993). Los perros están normalmente vacunados frente a leptospirosis y, consecuentemente desarrollan grandes cantidades de anticuerpos específicos frente a leptospiros, que pueden persistir al menos 80 días (Hellmann y Aschenbrenner; 1987; Gitton y cols, 1994). Se puede suponer que en perros los anticuerpos leptospirales producen una reacción positiva en un IFI o ELISA convencionales a anticuerpos de

B. burgdorferi, dando lugar a un sobrediagnóstico de infecciones caninas por esta espiroqueta (Magnarelli y cols., 1987b; Raoult y cols., 1989; Käsbohrer y cols., 1994).

En contraposición a esto, el inmunoblot se considera un método útil para confirmar los resultados positivos obtenidos por un ensayo serológico estándar (Greene y cols., 1988b; 1991).

Con respecto al establecimiento de la barrera de positividad y negatividad por la IFI, existe una gran disparidad entre los diferentes autores a la hora de fijar el título de anticuerpos. Hay investigadores que esta línea la establecen a una dilución 1/256 (Russell y cols., 1984; Weber y cols., 1991), otros que lo hacen a una dilución de 1/128 (Cohen y cols., 1990) y, otros terceros a la dilución de 1/64 (Magnarelli y cols., 1984b; Greene, 1991; Serrano y cols., 1994).

Fuera de España, hay autores que consideran positivos los sueros caninos con título superior a 64 (Magnarelli y cols., 1984b, 1985, 1987b; Levy y Dreesen, 1992). Otros no lo hacen hasta ver la reactividad a una dilución de 1/128 (Burgess, 1986; Doby y cols., 1988; Cohen y cols., 1990), o de 1/320 (Schillhorn van Veen y cols., 1993). Kärbohrer y cols. (1994) consideran por IFI un suero positivo cuando presenta un título mayor o igual a 1/256, dudosos entre 1/64 y 1/128, y negativos los menores o iguales a 1/32.

Un título de anticuerpos IgG por IFI superior a 64 se considera normalmente positivo, aunque no es raro observar títulos para IgG del orden de 8192 en perros de zonas endémicas (Kornblatt y cols., 1985). Se considera que a la dilución de 1/64 no existe reacción cruzada con otras espiroquetas que pudieran estar presentes en los perros (Kornblatt y cols., 1985; Burgess y cols., 1993).

En una misma Comunidad Autónoma se pueden encontrar prevalencias diferentes para esta enfermedad en perros, así, por ejemplo, en Castilla y León distintos autores encontraron prevalencias de 2.1% (Rojo Vázquez, 1997), 16.4% (Serrano y cols., 1994) y 21% (Delgado y Cármenes, 1995).

Es importante señalar que el suero de perros con anticuerpos frente a leptospiras puede también tener patrones positivos por inmunoblot con antígenos borreliares, demostrando diferentes reacciones cruzadas en 3 ó más regiones (Shin y cols., 1993).

Para la interpretación de patrones de inmunoblot de sueros caninos debe tenerse en cuenta que los perros con otras infecciones espiroquetales o condiciones clínicas sin relación con *B. burgdorferi* pueden también dar patrones por inmunoblot que pueden interpretarse como positivos. Con respecto al serodignóstico de las infecciones por *B. burgdorferi* en perros, sólo hay un ligero conocimiento sobre el nivel normal de anticuerpos de fondo que, de forma natural, dan reacciones cruzadas (Wittenbrink y cols., 1996).

Según Barthold y cols. (1995) los perros con infecciones naturales presentan, por inmunoblot, anticuerpos frente a p41, p39, 22kDa y no frente a OspA. En los vacunados aparecen, por esta técnica, anticuerpos frente a p39, OspA y OspB.

Wittenbrink y cols. (1996) consideran un perro positivo por inmunoblot cuando presenta anticuerpos frente a los antígenos de 93-96, 73, 66, 60, 41, 34 (OspB) a veces, 31 (OspA) y 22-28 (no siempre) kDa, y según Magnarelli y cols. (1997) si presenta anticuerpos frente a OspF y p41-G.

Tras la infección, los perros experimentan una amplia respuesta a numerosas proteínas de *B. burgdorferi* de 15 a 100 KDa, que pueden detectarse por el método de inmunoblot (Bosler y cols., 1988; Greene y cols., 1988b; Appel y cols., 1993). Los principales antígeno frente a los cuales los perros muestran una respuesta son OspC (22 KDa), p39 (39 KDa), flagelina (41 KDa) y varias proteínas por estrés del calor de 55 a 90 KDa, entre otras (Dressler y cols., 1993). Las proteínas OspA (31 KDa) y OspB (34 KDa) específicas de *B. burgdorferi* frecuentemente no se reconocen por los anticuerpos en perros naturalmente infectados (Bosler y cols., 1988; Greene y cols., 1988b, 1991) así como en perros de laboratorio tras la infección por garrapatas (Appel y cols., 1993; Gauthier y Mansfield, 1996).

La p39 tiene un alto potencial como marca diagnóstica de *B. burgdorferi* en perros expuestos, y puede ser particularmente útil para discriminar la respuesta serológica de los perros vacunados de las respuestas de los perros naturalmente expuestos (Barthold y cols., 1995).

Normalmente, la respuesta al tratamiento se puede observar dentro de las 72 horas siguientes a la administración del antibiótico, y en caso de no existir respuesta deberá reconsiderarse el diagnóstico (Levy y cols., 1993).

Existe una gran asociación entre la distribución de garrapatas *Ixodes*, humanos con enfermedad de Lyme y perros con anticuerpos frente a esta espiroqueta (Magnarelli y cols., 1987b).

No se ha demostrado que los perros sean reservorios de la infección, pero se han utilizado en áreas endémicas para actuar como centinelas, ya que la prevalencia es siempre superior en perros que en humanos.

Hasta la fecha no se habían aislado con éxito cepas de *B. burgdorferi sensu lato* de perros que permitieran investigar el papel patogénico de las genoespecies europeas de las espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme en estos hospedadores, pero Speck y cols. (2001) consiguieron aislar, por primera vez, *B. afzelii* de un perro naturalmente infectado.

La borreliosis de Lyme del perro no debe ser considerada como un problema de Salud Pública (André-Fontaine y cols., 1994), ya que no hay evidencia de que los perros y gatos domésticos supongan un riesgo para los humanos, excepto a través de la posibilidad de introducir las garrapatas en la casa (Levy y cols., 1996).

3.3.3.VACUNO.

En vacuno se han descrito infecciones por espiroquetas como *Borrelia theileri*, *B. burgdorferi* y *B. coriaceae* (Rogers y cols., 1999).

Las tres especies comparten epítomos de los antígenos de 39 y 41 KDa. Esto deberá ser tenido en cuenta a la hora de presentarse reacciones cruzadas en el diagnóstico. De hecho, se ha visto que el suero de vacuno infectado con *B. theileri* presenta reacciones cruzadas con células completas de *B. burgdorferi* y *B. coriaceae* (Ji y cols., 1994). Esto sugiere que los estudios seroepidemiológicos del agente causal de la enfermedad de Lyme, o de *B. coriaceae*, utilizando las técnicas de inmunofluorescencia con antígenos homólogos, puede ser complicado en áreas donde existe infección por *B. theileri* (Rogers y cols., 1999).

B. theileri, recientemente citada en nuestro país (Habela y cols., 2000c), puede que sea frecuente en las zonas donde abunde el vector, *Boophilus* spp. Aunque causa una leve enfermedad en el vacuno, debe ser tomada en cuenta en el diagnóstico diferencial con *B. burgdorferi* y con el agente causal del aborto enzoótico bovino, *B. coriaceae* (Callow y Hoyte, 1961; Burgess y cols., 1987; Wells y cols., 1993).

Se han descrito casos de vacas con anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (indicando una previa infección), pero sin mostrar signos clínicos de enfermedad (Lembke, 1989), aunque se sospecha que pueda provocar laminitis en el vacuno de leche (Burgess y cols., 1987; Burgess, 1988; Post y cols., 1988; Rothwell y cols., 1989; Wells y cols., 1993).

4. PATOGENIA.

Los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan los síntomas de la infección por *Borrelia burgdorferi* son bastantes complejos. Se piensa que es la propia respuesta inflamatoria que el organismo provoca ante los microorganismos que han colonizado los lugares diana la que los origina.

4.1. INFECCIÓN DEL HOSPEDADOR.

La acción antiinflamatoria e inmunosupresora de la saliva de las garrapatas (Ribeiro y cols, 1985) hacen que esta secreción, al contener varios agentes farmacológicamente activos, suprima la respuesta inmune local del hospedador (Ribeiro, 1987) y facilita que las espiroquetas

inoculadas produzcan una infección en la piel, al intensificar su localización intradérmica (Ribeiro y cols., 1987).

4.2. DISEMINACIÓN.

Una vez que *B. burgdorferi* es inoculada por la garrapata, se disemina por el tejido subcutáneo originando el eritema migratorio (EM). A esto le sigue una diseminación hematógena responsable de los síntomas sistémicos de diseminación precoz de la enfermedad de Lyme, así como de las manifestaciones más tardías.

Las borrelias se mueven de forma centrífuga en el interior de la piel, alejándose de la localización de la picadura de la garrapata, a la vez que el eritema va aumentando de tamaño.

Esta lesión dérmica es una reacción de hipersensibilidad mediada por basófilos que aparece en el hombre y en un gran número de otras especies de mamíferos, pero no en ratones (Greene y cols., 1984), aunque se presenta con más frecuencia en Estados Unidos, por las genoespecies allí implicadas.

Una vez que la infección se ha diseminado por vía sanguínea o linfática, se afectan el sistema nervioso central, el corazón y las articulaciones (Piesman y cols., 1987b).

4.3. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.

Ante la invasión orgánica de *Borrelia burgdorferi*, el organismo actúa mediante una respuesta de tipo inmunitario, en la que están implicados todos los componentes del sistema: humoral, celular y fagocítico (Rodríguez Rodríguez y Martín Espada, 1994).

Los macrófagos, neutrófilos polinucleares y monocitos fagocitan y destruyen las espiroquetas mediante su opsonización (Mainil, 1994).

Un lipopolisacárido procedente de la pared celular de *B. burgdorferi* es el responsable de que distintos tipos de células, como monocitos, sinoviocitos, queratocitos y células endoteliales (Benach y cols., 1984a, 1988; Beck y Habicht, 1988; Lipsky y cols., 1989), liberen interleuquina-1 y esta, a su vez, es la responsable del daño tisular que origina las manifestaciones clínicas (Beck y cols., 1986). Al actuar sobre el hipotálamo es responsable de la fiebre, y sobre los leucocitos, determina el desarrollo del eritema cutáneo. Su acción sobre células sinoviales y condrocitos provoca la destrucción articular, por la activación de proteasas y la reabsorción del hueso, y el dolor, por la activación de prostaglandinas. Por último, al actuar sobre los linfocitos B y T produce, por una parte, la destrucción articular, al favorecer la liberación de prostaglandina y colagenasa (André-Fontaine y cols., 1994), y por otra el aumento de la síntesis de anticuerpos.

Con respecto a la respuesta humoral, como en otras enfermedades infecciosas se ha demostrado que primero aparece una respuesta específica de inmunoglobulinas (Ig) M al microorganismo, seguida de IgG específicas (Craft y cols., 1984b, 1986; Stiernstedt y cols., 1986). Las IgM específicas se pueden detectar normalmente 3-4 semanas después del comienzo de la infección, alcanzan un pico a las 6-8 semanas y después disminuyen gradualmente. En esta etapa de la enfermedad, la aparición de IgM está dirigida, principalmente, al antígeno asociado a la flagelina de 41 KDa. También se ha demostrado que IgM específicas pueden desarrollarse frente al antígeno OspB de 34 KDa un poco más tarde en el curso de la infección (Craft y cols., 1986).

Las inmunoglobulinas (Ig) G específicas e inmunoglobulinas (Ig) A van apareciendo gradualmente durante el segundo y tercer mes de la infección y, una vez establecidas, pueden permanecer detectables durante años. Sin embargo, como en la sífilis, un tratamiento antimicrobiano temprano puede impedir el desarrollo de una respuesta humoral madura (Stiernstedt y cols., 1986; Dattwyler y cols., 1988). Por eso, aquellos pacientes tratados antes de desarrollar una respuesta madura frecuentemente carecen de niveles de anticuerpos específicos frente a *Borrelia* detectables en el diagnóstico. Sin embargo, individuos que ya han desarrollado una respuesta antiborrelia por IgG frecuentemente permanecen seropositivos después de una terapia antibiótica exitosa. Con el tiempo en estos pacientes se observa una disminución en los

niveles de anticuerpos específicos, pero los niveles absolutos de anticuerpos pueden permanecer por encima de los normales. Consecuentemente, la presencia o ausencia de anticuerpos circulantes frente a *Borrelia* después de una terapia antibiótica no es un indicador fidedigno de cura.

La infección primaria con *B. burgdorferi* estimula la formación de inmunocomplejos y su depósito. Los signos clínicos se relacionan con la persistencia del microorganismo y la aparición de dichos complejos inmunes. Sin embargo no se sabe si las manifestaciones tanto precoces como tardías, requieren la presencia de microorganismos viables de *B. burgdorferi* o bien si la autoperpetuación de la respuesta inmune desarrollada frente a una infección previa puede continuar originando enfermedad clínica.

5. SÍNTOMAS.

La borreliosis de Lyme se caracteriza por presentar un cuadro clínico multisistémico con un espectro de manifestaciones muy amplio (Guerrero y cols., 1993; Guerrero, 1995). Pueden afectarse la piel, el corazón y los sistemas nervioso y músculo esquelético (Burgdorfer y cols., 1982; Steere, 1989; García-Moncó y Benach, 1995).

La variabilidad clínica de esta enfermedad no sólo afecta a cada paciente de forma individual, sino que presenta un cierto componente geográfico, existiendo importantes diferencias entre las manifestaciones clínicas de los casos diagnosticados en Estados Unidos y los identificados en Europa (Saz y cols., 1995a).

La enfermedad de Lyme parece progresar, más frecuentemente en Europa, hacia manifestaciones neurológicas y dermatológicas (acrodermatitis crónica atrófica), mientras que la artritis es la manifestación tardía más común en Estados Unidos (Ackermann y cols., 1988; Åsbrink y Hovmark, 1988; Halperin y cols., 1988; Stiernstedt y cols., 1988; Steere, 1989).

En España, la forma neurológica es la más frecuente, seguida de la cutánea y de la cardíaca (Anda y cols., 1993).

En general, la sintomatología varía según la especie hospedadora afectada, el momento de la infección y las características genéticas del agente causal implicado. Así, *B. burgdorferi sensu stricto* está asociada más frecuentemente con artritis, *B. garinii* con síntomas neurológicos, y *B. afzelii* con los procesos crónicos de la piel (acrodermatitis crónica atrófica (ACA)). Todas ellas producen la manifestación típica de este proceso, el eritema crónico migratorio (ECM), aunque en Europa es más frecuente en aquellas infecciones producidas por *B. afzelii* (EUCALB, 1997).

5.1. SINTOMATOLOGÍA GENERAL.

En todas las especies afectadas se producen una serie de síntomas inespecíficos, comunes a otras patologías, como son fiebre, anorexia, letargo, linfadenopatía, pérdida de peso y, en el caso de vacuno lechero, se evidencia una pérdida o disminución de la producción láctea. Asimismo, aparece dolor articular y muscular generalizado, dolor de cabeza o rigidez de cuello.

5.2. SINTOMATOLOGÍA CUTÁNEA.

El eritema migratorio (EM) es la manifestación precoz y más típica de la enfermedad de Lyme. Se trata de una erupción cutánea característica que se va diseminando desde el sitio de la picadura de la garrapata y va aumentando de tamaño, como consecuencia de la migración de las espiroquetas inoculadas a través de la piel. Aparece entre el segundo y el trigésimo día tras el ataque del ectoparásito (EUCALB, 1997).

También se aprecian diferencias en las manifestaciones cutáneas a nivel geográfico. Así, el EM es muy característico en Estados Unidos, debido a las genoespecies allí presentes, mientras que en Europa son más frecuentes los procesos crónicos de la piel, como la acrodermatitis crónica atrófica (ACA) (Åsbrink y cols., 1984). Se caracteriza por una decoloración de la piel seguida de una atrofia gradual de la epidermis, desarrollándose una

apariencia fina y brillante en la piel, semejando a “papel de cebolla”.

Otra afección cutánea que se puede presentar es el linfocitoma borrelial, especialmente visible en el lóbulo de la oreja (principalmente en niños), pezón o escroto. Se trata de un infiltrado linfocitario que se traduce en un aumento de la superficie cutánea en forma de nódulo, tumor o placa y suele aparecer en las fases tempranas de la enfermedad, aunque, en general, es poco frecuente (EUCALB, 1997).

Otras patologías dérmicas menos usuales son la esclerodermia localizada y las lesiones evanescentes en diana (García-Márquez y cols., 1991; Oteo y cols., 1991).

Todas estas lesiones cutáneas son más fácilmente apreciables en humanos, sobre todo en aquellos individuos de piel clara.

Lesiones cutáneas parecidas al eritema migratorio se han descrito en conejillos de Indias inoculados experimentalmente (Krinsky y cols., 1982) y en conejos (Benach y cols., 1984b; Kornblatt y cols., 1984) y se han visto en las ubres de vacas de leche infectadas de forma natural (Post y cols., 1988).

5.3. SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS.

Una de las características de las borrelias, en general, es su neurotropismo, que desemboca en la aparición de alteraciones nerviosas.

En una afección temprana, pueden aparecer parálisis facial, parálisis de otros nervios craneales, meningitis aséptica, encefalitis leve y neuritis periférica.

En estadios tardíos de la enfermedad, se aprecian síndromes neurológicos crónicos que dan lugar a pérdidas de memoria, depresión, polineuropatías sensoriales, síndrome de fatiga crónica o fibromialgias, todo ello característico de la encefalopatía de Lyme, aunque esta última es muy poco frecuente (EUCALB, 1997).

5.4. SÍNTOMAS MÚSCULO ESQUELÉTICOS.

En la especie humana, las afecciones músculo esqueléticas son raras en Europa y más frecuentes en Norteamérica. La rodilla es la articulación más afectada y aparece cojera (EUCALB, 1997).

En el resto de especies animales la cojera es el síntoma característico que hace sospechar al veterinario de la posible infección por *B. burgdorferi*. En perros, hay artritis recurrente, intermitente y no erosiva, afectándose dos o más articulaciones y el carpo (Kornblatt y cols., 1985; Magnarelli y cols., 1985; Burgess, 1986b). En equino y vacuno, se presentan cojeras esporádicas, laminitis y artritis.

5.5. OTRAS MANIFESTACIONES MENOS FRECUENTES.

Se han descrito alteraciones cardíacas en distintas especies animales, principalmente en perro (Levy y Duray, 1988) y hombre (Artigao y cols., 1991), apareciendo un bloqueo aurículo-ventricular. Aparte de ello, en la literatura se citan también la aparición de uveítis anterior y posterior, panoftalmitis, hepatitis, miositis y orquitis (EUCALB, 1997).

En resumen, la infección por *B. burgdorferi* puede ser subclínica o presentar un amplio rango de alteraciones clínicas, dependiendo del período de tiempo transcurrido desde la infección y del órgano o sistema afectado. Si no se instauro un tratamiento adecuado, la mayoría de los pacientes progresan de un estadio temprano a uno tardío de la enfermedad. Al principio aparecen síntomas inespecíficos generales, así como determinadas lesiones cutáneas como el EM o el linfocitoma borrelial.

Como consecuencia de la diseminación precoz de la espiroqueta, se presentan síntomas tempranos de neuroborreliosis y alteraciones parecidas a las que se producen en un estado gripal, mialgias, artralgias, radiculopatías, artritis recurrente y carditis con defectos en la conducción.

En estadios crónicos de la borreliosis de Lyme se observa artritis, ACA y síndromes neurológicos crónicos.

Toda esta variedad de síntomas se presentan dependiendo de la especie hospedadora afectada, de la genoespecie implicada en la infección, así como del estado inmunitario del individuo.

6. DIAGNÓSTICO.

Para establecer el diagnóstico de este proceso es importante tener en cuenta 4 criterios esenciales:

- historia de exposición a *Ixodes* en una zona endémica.
- signos clínicos típicos.
- una serología positiva usando un método adecuadamente validado, y
- una respuesta aparente a una terapia antibiótica, cuando la enfermedad se debe a una infección. Una excepción a este 4º punto es cuando no ocurre una respuesta a los antibióticos en individuos vacunados recientemente con la vacuna de Lyme, debido a que la vacunación puede causar, también, un síndrome parecido a Lyme en algunos de ellos (Appel y Jacobson, 1995).

En este aspecto se puede hablar de distintos tipos de diagnóstico, que se detallan a continuación:

6.1. DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO.

Como en todas las enfermedades transmitidas por artrópodos, la distribución de este proceso está condicionada a la presencia de su vector. Por ello, en la anamnesis se debe tener en cuenta si el paciente vive en zonas endémicas o ha viajado recientemente a ellas, y que presenta antecedentes de picadura de garrapatas aproximadamente un mes antes de la aparición de la sintomatología.

En este sentido, hay que tener en cuenta que otras enfermedades que utilizan garrapatas como vectores (ehrlichiosis y babesiosis) pueden ser “cotransmitidas” con la enfermedad de Lyme (Spielman, 1994; Dumler y Bakken, 1995; Fishbein y Dennis, 1995), con lo que habrá que descartar estas patologías en el diagnóstico diferencial.

6.2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.

El diagnóstico de cualquier enfermedad depende del reconocimiento clínico y la confirmación laboratorial por técnicas serológicas o cultivo (Russell y cols., 1984). Los síntomas varían en función de la especie animal afectada:

- a) En perros, la enfermedad puede manifestarse de forma aguda o crónica. En la infección aguda aparece fiebre, anorexia, letargo, linfadenopatía y ataques agudos de rigidez, cojera o dolor (Lissman y cols., 1984; Kornblatt y cols., 1985; Grauer y cols., 1988; Appel, 1990). Los perros presentan las articulaciones inflamadas y resulta difícil localizar el origen del dolor. La cojera puede ser intermitente y errática. Aparece una inflamación de los nódulos linfáticos (con más frecuencia poplíteos y preescapulares).

En la infección crónica, la primera manifestación es la artritis recurrente, intermitente, no erosiva. La mayoría de los perros infectados tienen dos o más articulaciones afectadas y el carpo (Kornblatt y cols., 1985; Magnarelli y cols., 1985; Burgess, 1986).

- b) En caballos, se manifiesta con pérdida crónica de peso, cojeras esporádicas, laminitis, fiebre, artritis y uveitis. También se presentan síntomas neurológicos, tales como depresión, cambios de comportamiento, disfagia, encefalitis e hipersensibilidad cutánea (Burgess y cols., 1986b; Cohen y cols., 1988).

- c) El ganado vacuno seropositivo frecuentemente es asintomático. En el curso clínico agudo hay fiebre, cojera y descenso de la producción láctea. También son atribuibles a borreliosis la pérdida de peso, laminitis y aborto (Burgess, 1988; Post y cols., 1988; Rothwell y cols., 1989).

- d) En cuanto a los síntomas en humana, clásicamente se ha dividido el período sintomático de la infección en tres estadios, uno inicial de afección dermatológica, uno segundo caracterizado por manifestaciones neurológicas y/o cardiovasculares, y el tercero con sintomatología articular.

La mayoría de los pacientes presentan una sintomatología inespecífica con el inicio de su enfermedad, siendo relativamente frecuente en este período la presencia de fiebre, escalofríos, cefaleas, astenia o mialgias.

Aunque el eritema crónico migratorio (ECM) es la manifestación dermatológica más característica, existen otras menos frecuentes como la acrodermatitis crónica atrófica (ACA), que también puede presentarse. Se han encontrado otras patologías dérmicas menos usuales como el linfocitoma cutáneo (Gómez-Díaz y cols., 1993) y la esclerodermia localizada o lesiones evanescentes en diana (García-Márquez y cols., 1991).

La infección diseminada precoz (estadio II) se caracteriza por síntomas similares a los de la gripe o meningitis, junto con alteraciones cardíacas y neurológicas agudas. La alteración cardíaca más frecuente es el bloqueo aurículo-ventricular de carácter autolimitado y fluctuante (de primer a tercer grado). Las alteraciones neurológicas que pueden aparecer son meningoencefalitis, neuritis craneal y radiculoneuritis (Pachner y Steere, 1985).

En la infección tardía persistente (estadio III) aparece la artritis.

La presencia de unos u otros síntomas en todos estos pacientes depende del genotipo de *Borrelia burgdorferi* que haya producido la infección, así como del propio estado de salud del individuo. Por ello, y debido a que no hay ningún síntoma o lesión que sea estrictamente patognomónico (el ECM no siempre aparece), debe realizarse una confirmación laboratorial o serológica.

6.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.

Los métodos de detección del agente de esta enfermedad no están, en general, estandarizados, y los laboratorios usan distintos reactivos, protocolos y sus propios criterios de validación (Jacobson y cols., 1996). En el laboratorio se realizan, a su vez, distintas pruebas para detectar al agente o la respuesta que ha ocasionado su presencia en el hospedador:

6.3.1. CULTIVO Y AISLAMIENTO.

El medio utilizado es el desarrollado por Barbour (1984) y modificado posteriormente por Stoenner y Kelly, y que en la actualidad se puede adquirir de forma comercial. A este medio, denominado BSK-H, se le añaden distintas mezclas de antibióticos para evitar el crecimiento de la flora contaminante.

Debido al bajo número de espiroquetas viables presentes en las biopsias de los pacientes infectados y la dificultad en el aislamiento, un resultado negativo en el cultivo no siempre excluye una infección activa. Las borrelias son más frecuentemente aisladas de cultivos de biopsias de piel de pacientes con ECM o con ACA, o bien de sangre de individuos con infección temprana o de fluido sinovial de individuos con artritis (EUCALB, 1997).

6.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Esta técnica surgió en los años 80 (Mullis y cols., 1986) y se ha usado, desde entonces, para la detección e identificación de un amplio rango de patógenos complicados.

Mediante este método, lo que se detectan son los ácidos nucleicos del patógeno y se ha usado en piel y fluidos corporales (Bradley y cols., 1994; Moter y cols., 1994).

Con ella, se puede establecer si una infección por esta espiroqueta está aún activa y, por tanto, es una herramienta valiosa tanto para el diagnóstico como para la administración clínica de pacientes, especialmente aquellos con síntomas crónicos no específicos de la enfermedad de Lyme, como artritis y encefalomiелitis (EUCALB, 1997).

Se ha usado este método para detectar e identificar distintas genoespecies de *B. burgdorferi sensu lato*: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto* y el grupo de *B. valaisiana* (EUCALB, 1997).

Es una técnica más sensible que el cultivo para la detección de este patógeno (Lebech y cols., 1991).

6.3.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

En este caso, lo que se detecta en suero son los anticuerpos que el paciente ha producido frente al agente infeccioso.

Los análisis serológicos son válidos para detectar cambios significativos de IgG específica en pacientes expuestos a picadura de garrapatas y que padezcan síntomas como acrodermatitis crónica atrófica, neuroborreliosis crónica, artritis o carditis. Actualmente, ninguna de las técnicas serológicas es eficaz en el aislamiento (Anónimo, 1995), principalmente en Europa, donde hay, al menos, cuatro agentes distintos productores de la borreliosis de Lyme (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*).

La respuesta inmunológica al patógeno se ha evaluado por técnicas como ELISA, IFI e inmunoblot.

Las técnicas de IFI y el ELISA se han considerado sensibles en etapas crónicas de la enfermedad, pero relativamente insensibles para la enfermedad temprana, y ambas han mostrado reacciones cruzadas con otros agentes espiroquetales productores de enfermedades (Russell y cols., 1984).

Cuando el individuo presenta un linfocitoma borrelial se detecta la presencia de IgM específicas. Con ACA hay altos niveles de IgG específicos en suero. En la neuroborreliosis temprana hay IgG específicas en suero y, a veces, en líquido cefalorraquídeo. En la neuroborreliosis crónica las IgG específicas se detectan tanto en suero como en el líquido cefalorraquídeo. En la artritis de Lyme, aparecen altos niveles de IgG específicas en suero. Por último, en la carditis de Lyme las IgG presentan niveles que varían en función de la progresión de la infección o del tratamiento (se recomienda analizar el suero de estos pacientes 3 meses después para detectar una disminución en los niveles de IgG) (EUCALB, 1997).

Se han utilizado distintas técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*, entre los que cabe citar:

6.3.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Esta técnica se viene empleando para el diagnóstico de la infección por *Borrelia burgdorferi* desde hace mucho tiempo. Presenta la ventaja de ser una prueba de fácil realización, aunque limitada por la baja sensibilidad (sobre todo en las fases tempranas de la enfermedad), interpretación y punto de corte de la misma, además de ser bastante subjetiva y no poderse automatizar. Es una técnica más accesible para las clínicas veterinarias, al ser más barata y poder utilizarse como prueba de rutina. Su principal ventaja es la facilidad en la preparación del antígeno para tapizar los portaobjetos y como infraestructura necesita de la existencia de un microscopio que presente una fuente de luz fluorescente que, al contacto con la fluoresceína unida a los anticuerpos antiespecie, permita visualizar los complejos antígeno-anticuerpo.

6.3.3.2. Enzimo-inmuno ensayo (ELISA) indirecto.

Es una técnica inmunoenzimática, debido a que los anticuerpos antiespecie se marcan con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar los anticuerpos marcados con la enzima e insolubilizados sobre un soporte, el complejo antígeno-anticuerpo quedará inmovilizado y, por tanto, podrá fácilmente ser revelado mediante la adición de un sustrato específico que, al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

El ELISA presenta un gran número de ventajas sobre la IFI y puede usarse sólo o en combinación con el inmunoblot. Está especialmente indicado para el análisis de un gran número de muestras y carece de interpretación subjetiva. La utilidad de esta técnica depende de la elección de los valores de corte que deben ser confirmados en la población de estudio (EUCALB, 1997).

Cuando se utiliza un extracto de microorganismo completo como antígeno; este contiene muchas proteínas de reacción cruzada (proteínas de choque térmico) comunes con otras bacterias, y proteínas como la flagelina común a bacterias relacionadas con *B. burgdorferi* (Levy y cols., 1993). Los ELISA que usan OspC recombinante son más sensibles que el Western-blot o ELISA que usan como antígeno el microorganismo completo sonificado en pacientes con enfermedad de Lyme temprana (Fung y cols., 1994; Padula y cols., 1994; Gerber y cols., 1995).

6.3.3.3. Western blot o inmunoblot.

Se trata de una inmunoelectroforesis que identifica la producción de anticuerpos específicos como respuesta a *B. burgdorferi*. Se puede usar para verificar que los anticuerpos detectados por ELISA o IFI son específicamente producidos frente a esta bacteria y no reaccionan, de forma cruzada, con antígenos de otros organismos (Levy y Dreesen, 1992). Normalmente se usa para confirmar aquellas muestras reactivas por ELISA o IFI. Para ello, mediante una electroforesis se separan los diferentes antígenos de la espiroqueta en función de sus pesos moleculares.

Por el análisis del gel de electroforesis (SDS-PAGE) de células enteras lisadas de *B. burgdorferi*, se han identificado al menos 29 componentes, 11 ó 12 de los cuales se reconocen por Western blot, al usar sueros de pacientes con borreliosis de Lyme (Grodzicki y Steere, 1988; Zoller y cols., 1991). Entre estos polipéptidos se encuentran las proteínas externas de superficie de 31 y 34 KDa (OspA y OspB, respectivamente) (Barbour y cols., 1984; 1985), la proteína flagelar de 41 KDa (Barbour y cols., 1986), la proteína extracelular mayoritaria de 83 KDa (Dorward y cols., 1991), la proteína cilíndrica protoplasmática de 21/22 KDa (Barbour y cols., 1985; Wilske y cols., 1986; Simpson y cols., 1991), el antígeno común de 60 KDa (Hansen y cols., 1988) y las proteínas de choque térmico de 60-72 KDa (Carreiro y cols., 1990).

Los anticuerpos específicos IgG o IgM en las muestras de sueros de pacientes con borreliosis de Lyme, no siempre generaban patrones de bandas idénticos (Ma y cols., 1992).

Hasta 1997 no hay un consenso en Europa sobre los criterios de seropositividad para inmunoblot. Esto se debe al uso de metodologías diferentes, variaciones geográficas y de las cepas, diferentes interpretaciones de la importancia de las bandas (del total de bandas y bandas específicas) y de su subjetividad (bandas débiles y fuertes) (EUCALB, 1997).

Las propuestas oscilan en la combinación entre 3 y 5 bandas cualquiera (Wittenbrink y cols., 1996). Se han observado algunas diferencias significativas en la composición antigénica entre la cepa española y las americanas estudiadas, fundamentalmente en la composición de la OspB. Ciertos estudios comparativos previos entre cepas europeas y norteamericanas ya habían notado una heterogeneidad respecto a la OspA y la OspB (Barbour y Schrumphf, 1986; Wilske y cols., 1988). En general se encontraron diferencias en el peso molecular de ambas proteínas así como una ausencia en muchas cepas europeas de OspB y, con menor frecuencia, de OspA. También se encontraron algunas diferencias entre las cepas aisladas de garrapatas frente a las de pacientes. Esta heterogeneidad indica la importancia de utilizar una cepa propia a la hora de realizar la serología diagnóstica (García-Moncó y cols., 1992).

Por ejemplo, se han encontrado 9 patrones proteicos distintos en 14 aislados de *I. ricinus* y 9 de humanos en Alemania (Wilske y cols., 1986). Sólo 4 de las cepas tenían una proteína OspA de 31 KDa, como se encontró en la mayor parte de los aislados de Estados Unidos, mientras que 17 tenían una OspA de 32 KDa. Como en Europa, en el nordeste de Estados Unidos aparecen diferentes variantes antigénicas en lo que se podría considerar como posibles agentes de la enfermedad de Lyme. Algunas de estas espiroquetas tienen sus orígenes en diferentes mamíferos salvajes y aves. Existe la posibilidad de que estas variantes sean no infectivas para el hombre y animales domésticos y que estén asociadas a síndromes diferentes a la borreliosis de Lyme. La clasificación de estos microorganismos se ve dificultada por las diferencias en las propiedades antigénicas que existen entre las cepas cultivadas y el aislamiento original (Barbour y cols., 1984; Wilske y cols., 1986; Schwan y Burgdorfer, 1987).

En la región que corresponde aproximadamente a los 60 kDa falta una banda en ESP-1 que contienen las cepas americanas B31 (Burgdorfer y cols., 1982) y BEP4 (Coleman y Benach, 1989). La banda que corresponde al antígeno flagelar de 41 kDa es menos acentuada, como expresión de la menor cantidad de subunidades flagelares en la cepa española. En la región correspondiente a 25 KDa, aproximadamente, ESP-1 contiene una proteína de la que carecen las otras dos (García-Moncó y cols., 1992).

En cuanto a OspB, la cepa española contiene la molécula pero aparentemente contiene epítomos o determinantes antigénicos distintos a las cepas americanas (García-Moncó y cols., 1992).

La cantidad de flagelina parece menor en la cepa española por cuanto menor es la reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a esta molécula. Esto puede deberse a un menor número de flagelos, al tamaño más pequeño de ESP-1 o al hecho de que los organismos se alarguen después de algún tiempo en cultivo. Los anticuerpos monoclonales contra el antígeno de 20 kDa sugieren también heterogeneidad en esta proteína, cuyo epítomo está presente en ESP-1 y BEP-4, pero no existe en B31. La reactividad frente a los componentes de 72 y 22 kDa fue idéntica (García-Moncó y cols., 1992).

B. burgdorferi es genéticamente más heterogéneo (Postic y cols., 1990; Adam y cols., 1991) de lo que se creía previamente (Johnson y cols., 1984b). Varios estudios han demostrado la heterogenicidad tanto fenotípica como genotípica con respecto a sus proteínas superficiales de membrana (Osp) A, B y C (Wallich y cols., 1992b; Wilske y cols., 1993a; 1993b). *B. burgdorferi sensu stricto* expresa una proteína superficial de membrana (Osp) A de 31 KDa y una OspB de 34 KDa, *B. garinii* tiene una OspA de 32-33 KDa y *B. afzelii* expresa una OspA de 32 KDa y una OspB de 35 KDa (Baranton y cols., 1992; Canina y cols., 1993). La expresión de OspC, con un peso molecular aproximado de 22 KDa, es más variable que la expresión de OspA y OspB por las distintas cepas de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Wilske y cols., 1993b).

Para una específica identificación de la infección, especialmente durante la fase temprana, se puede usar la detección de 2 antígenos: uno de un peso molecular de 39 KDa (Schwan y Simpson, 1991), que puede servir como un buen candidato para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, al ser un marcador fiable de exposición a espiroquetas vivas y virulentas (Golde y cols., 1994), y fragmentos de flagelina que contienen epítomos específicos de la borrelia (Berland y cols., 1991). Durante la infección temprana, ambos antígenos producen la respuesta de anticuerpos específicos frente a *B. burgdorferi* (Levy y cols., 1993). Adicionalmente, en muchos pacientes europeos, aparecen anticuerpos frente a una proteína de un rango de 20 KDa, denominada pC (Wilske y cols, 1986; 1989). Ciertas proteínas inmunodominantes de un rango de 100 KDa se han descrito por varios autores (LeFebvre y cols., 1990; Wilske y cols, 1990; Volkman y cols., 1991) que parecen ser antígenos muy específicos para el serodiagnóstico de la borreliosis de Lyme. Posteriormente, en la fase crónica de la enfermedad y de forma menos regular, aparecen anticuerpos frente a OspA y OspB, así como a otros antígenos celulares (García-Moncó, 1991), como a una proteína de 94 KDa, que se consideró como una buena marca por Western blot en el diagnóstico del estado III de la enfermedad de Lyme (Zoller y cols., 1991), y a las proteínas de choque térmico de 60-72 KDa.

Debido a las diferencias existentes entre los aislados europeos y americanos, es necesario realizar una correcta selección del antígeno o antígenos para el serodiagnóstico de la enfermedad (Hu y cols., 1994).

Según los autores, se usan distintos criterios de valoración de un positivo por inmunoblot. Basándose en los criterios de Grodzicki y Steere (1988) y Zoller y cols. (1991), consideran un suero positivo por inmunoblot:

a) en estadios tempranos de la enfermedad, cuando presentan una banda clara frente al antígeno de 41 KDa y al menos 2 bandas adicionales con peso molecular de 21, 30, 60 ó 87 KDa.

b) en estadios tardíos de la enfermedad, cuando presentan 5 ó más anticuerpos frente a *B. burgdorferi* con unas bandas marcadas de 18, 21, 23, 30, 41, 75 ó 87 KDa.

Según Ma y cols. (1992) un suero positivo humano debe presentar, por inmunoblot, reactividad frente a las siguientes bandas: 94, 83, 75, 66, 60, 55, 46, 41, 39, 34, 31, 29, 22 y 17 KDa.

Anda y cols. (1993) consideran un suero positivo cuando tiene bandas de 4 polipéptidos que incluyan, al menos, el de 41 KDa y uno de bajo peso molecular, cuando usan, como antígeno, la cepa B-31 de *B. burgdorferi*.

Sigal y cols. (1998) consideran un suero positivo para IgG si contiene anticuerpos, en cualquier momento tras la aparición de síntomas, que reaccionan al menos frente a 5 de las siguientes 10 bandas: 21, 25 (23), 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66 y 83 (correspondiendo a la banda de 93) KDa.

Para Dunand y cols. (1998), el criterio de positividad por inmunoblot para un suero humano es de, al menos, 5 bandas, incluyendo anticuerpos frente a flagelina y 2 de las siguientes proteínas: OspC, OspA, p39 y 93 KDa (p100).

Nilsson y von Rosen (1996) consideraron un suero positivo cuando presenta, al menos, anticuerpos frente a 4 de los siguientes polipéptidos específicos de *Borrelia*: OspC, OspA, OspB, p39, p41 (flagelina), p83, p94 y 110 KDa.

Hauser y cols. (1997,1998,1999) indicaron que, para un Western blot de IgG, la mejor combinación, de entre todas las bandas, era, para *B. burgdorferi sensu stricto* (pk_{a2}), al menos una banda de p83/100, p58, p56, p39, p30, OspC, p21 y p17a; para *B. afzelii* (pk₀), al menos dos bandas de p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17 y p14; y para *B. garinii* (pB₁), al menos una banda de p83/100, p58, p39, p30, OspC, p21 y p17b. Al menos 2 bandas reactivas se requirieren para considerar así un suero como positivo.

Para estandarizar la nomenclatura en Norteamérica, el grupo CDC recomendó que la OspC, según Dressler y cols. (1993), de 21 KDa, y que distintos autores han considerado que tiene un peso molecular entre 21 y 25 KDa, dependiendo de la cepa de *B. burgdorferi* y del sistema de electroforesis usado, tendría un peso molecular aproximado de 23 KDa. El antígeno de 18 KDa de Dressler y cols. (1993), sería el equivalente al de 21 ó 20 KDa, marcado como significativo por otros autores.

La mayor parte de las proteínas antigénicas producidas en el curso de la infección por *B. burgdorferi* son poco específicas, con excepción de las proteínas OspC, OspA, OspB, p39 y p94/83 (Núncio, 2000).

El hecho de que el fenotipo de una población de *B. burgdorferi* cambie durante su estancia en la garrapata sugiere que las garrapatas no sólo transmiten el microorganismo, sino que proporcionan el medio ambiente que conduce a la variación de uno u otro epítipo de los antígenos de *B. burgdorferi* (Hu y cols., 1992). La habilidad de *B. burgdorferi* de alterar la expresión de sus proteínas de superficie tiene importantes implicaciones en el desarrollo de reactivos para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Diferentes antígenos pueden ser mejores para detectar las espiroquetas durante distintos estadios de la enfermedad en vertebrados (De Silva y Fikrig, 1997).

Se ha visto que la técnica de inmunoblot (western blot) es más específica y sensible que el ELISA para la detección de la enfermedad de Lyme temprana (Grodzicki y Steere, 1988) y puede ser la técnica corriente que se use para comprobarla con las técnicas de ELISA e IFI.

El grupo de trabajo CDC, recomienda que todos los sueros que han resultado dudosos o positivos por ELISA o IFI, sean analizados por inmunoblot. Cualquier positivo o dudoso por ELISA o IFI que haya resultado positivo por inmunoblot debería darse como positivo. Cualquier positivo por ELISA o IFI que haya resultado negativo por inmunoblot, debería considerarse como negativo (Anónimo, 1995).

En todos estos métodos serológicos es siempre más importante un alto grado de especificidad (un limitado número de falsos positivos) que una alta sensibilidad, siempre que una pérdida de sensibilidad pueda ser compensada por un alto número de anticuerpos en muestras posteriores (EUCALB, 1997).

Las técnicas serológicas que utilizan preparaciones del antígeno completo no son suficientemente sensibles para detectar un aumento temprano de anticuerpos por encima de los anticuerpos de fondo debidos a reacciones cruzadas. Por ello, el empleo de técnicas como ELISA e IFI para el serodiagnóstico en las primeras semanas de infección no es útil y puede haber una gran proporción de resultados falsos (Craft y cols., 1986). El inmunoblot puede detectar anticuerpos frente a *B. burgdorferi*, pero su especificidad es un problema (Grodzicki y Steere, 1988).

El análisis serológico de la borreliosis de Lyme es difícil debido a los niveles bajos de anticuerpos específicos asociados con la infección temprana (aumenta el número de resultados negativos falsos) y la relativamente alta prevalencia de anticuerpos que producen reacciones cruzadas en la población sana (aumenta el número de resultados positivos falsos). Además, cualquier resultado positivo debe interpretarse en un contexto clínico debido a la prevalencia de anticuerpos específicos, por ejemplo, individuos asintomáticos que son verdaderos seropositivos, especialmente en áreas altamente endémicas (EUCALB, 1997).

Las limitaciones en el uso de las técnicas serológicas vienen dadas, en cuanto a la sensibilidad, por una respuesta débil o ausente en los estadios tempranos de la enfermedad, especialmente en el eritema crónico migratorio, y por la ausencia de la respuesta en suero, pero no en el líquido cefalorraquídeo en casos de neuroborreliosis temprana. Con respecto a la

especificidad, los problemas que se pueden dar son:

- valores de corte demasiado bajos,
- reacciones cruzadas con anticuerpos frente a sífilis, ...,
- IgM positiva falsa debido al factor reumatoide en ensayos indirectos,
- reacciones de positivos falsos, predominantemente en IgM y principalmente usando antígeno sonicado en el ELISA, causadas por alguna enfermedad autoinmune o enfermedades de origen desconocido, o
- problemas causados por una prevalencia alta de anticuerpos en la población general (EUCALB, 1997).

6.4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Un aspecto pocas veces valorado es la existencia de otras enfermedades con manifestaciones clínicas similares y que comparten el mismo entorno epidemiológico, como es el caso de la brucelosis, endémica en nuestro país. En muchas áreas de España, la población general presenta títulos positivos frente a *Brucella* spp.; un paciente con manifestaciones articulares puede ser erróneamente diagnosticado de brucelosis si no se descarta simultáneamente una posible infección por *Borrelia burgdorferi*. Esta posibilidad se ve confirmada por la existencia de pacientes con serología positiva frente a ambas bacterias (*B. burgdorferi* y *Brucella*) (Tamayo y cols., 1990; Saz y cols., 1994). Es probable que en algunas áreas este hecho, además de distorsionar el espectro clínico de la enfermedad, determine un menor número de diagnósticos de borreliosis de Lyme, pero tampoco se debe olvidar que, dadas las numerosas reacciones cruzadas de esta espiroqueta, algunas como las del VHI recientemente descritas en nuestro país (Guerrero y cols., 1991; Oteo y cols., 1993a), existe también el riesgo de un "sobrediagnóstico" de enfermedad de Lyme.

Enfermedades sistémicas como ehrlichiosis, rickettsiosis o leishmaniosis, que pueden dar cuadros clínicos parecidos, deben ser tenidas en cuenta siempre. Por otro lado, no es raro encontrar individuos con infecciones mixtas (Font, 1994). También deben considerarse enfermedades neuromusculares o neurológicas, especialmente en paciente con dolor en las

regiones vertebrales.

Los anticuerpos frente a *B. burgdorferi* HSP-70 pueden presentar reacciones cruzadas con las proteínas de choque térmico de *Ehrlichia*. Esta positividad debe ser considerada a la hora de interpretar los resultados de los análisis serológicos de la ehrlichiosis granulocítica humana (HGE) y la enfermedad de Lyme (Ijdo y cols., 1998).

Debe realizarse diagnóstico diferencial con artritis reumatoide, infecciosa o inmunomediada, osteopatías, enfermedades degenerativas de articulaciones u otras enfermedades infecciosas como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas y endocarditis bacteriana (Jacobson y cols., 1996).

Borrelia burgdorferi comparte un gran número de antígenos con otras espiroquetas y otras bacterias (Craft y cols., 1986; Grodzicki y Steere, 1988; Hansen y cols., 1988). La proteína de 72 KDa tiene reacciones cruzadas con miembros bien caracterizados de la familia de las proteínas de choque térmico de 70 KDa de *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis* (Carriero y cols., 1990). Las proteínas de 66 y 60 KDa están relacionadas con la familia de las de choque térmico de 60 KDa, incluyendo la de 65 KDa de *M. tuberculosis*, dando también reacciones cruzadas (Carriero y cols., 1990). Esta proteína sería similar, si no idéntica, al antígeno común de 60 KDa relacionado con *Pseudomonas aeruginosa*, *T. pallidum* y *Legionella micdadei* (Hansen y cols., 1988).

La fiebre recurrente se ha notificado de forma esporádica en España a lo largo de este siglo (Aznar, 1926; De Buen y De la Cámara, 1931; Felsenfeld, 1965; León de Lope y cols., 1985; López-Cortés y cols., 1989; Sánchez Porto y cols., 1991), y se ha asociado con *B. hispanica* (Aznar, 1926; De Buen y De la Cámara, 1931). Está causada por varias especies del género *Borrelia* que se transmiten por garrapatas blandas (familia Argasidae). En Europa y África la fiebre recurrente transmitida por garrapatas está causada por *B. crocidurae*, *B. hispanica* y *B. duttoni*; mientras que en Norteamérica está originada por *B. hermsii*, *B. parkeri* y *B. turicatae* (Felsenfeld, 1965; Barbour y Hayes, 1986). Se ha renovado el interés en las formas variadas de borreliosis debido al aumento en el número de casos y a la cambiante distribución

mundial de este proceso. Además muchas especies patógenas de *Borrelia* se han ido descubriendo y caracterizando (Burgdorfer y cols., 1982; Fukunaga y cols., 1995; Barbour y cols., 1996). El descubrimiento de una especie de *Borrelia* asociada con la fiebre recurrente en garrapatas duras ha cambiado la hipótesis de que estos organismos estén únicamente asociados a las garrapatas blandas (Fukunaga y cols., 1995; Barbour y cols., 1996). El incremento en el espectro de enfermedades humanas y animales asociadas con borrelias requiere que estos organismos sean considerados como parte de los nuevos patógenos emergentes que se han identificado en la década de los 80 (Anda y cols., 1996).

En el sur de España se ha aislado de 3 pacientes humanos y de garrapatas *Ornithodoros erraticus* una nueva especie de *Borrelia* filogenéticamente distinta, muy relacionada con otras especies de *Borrelia* transmitidas por garrapatas en Europa y África y que produce unos signos claramente definidos de fiebre recurrente (Anda y cols., 1996).

La enfermedad de Lyme y la fiebre recurrente, borreliosis sistémicas transmitidas por garrapatas, comparten muchas similitudes etiopatogénicas. En un estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Lyme (Anda y cols., 1993) se describió una diferente presentación clínica, relacionada con la localización geográfica. La mayoría de los pacientes del norte cursaron con un espectro clínico sugestivo de enfermedad de Lyme. En el sur lo más frecuente fue un proceso febril con afectación neurológica. Esto, junto con la distribución de los vectores de ambas enfermedades (Cordero del Campillo y cols., 1994) condujeron a la hipótesis de que otra especie de *Borrelia*, podría ser el agente etiológico de algunos de los casos de neuroborreliosis procedentes del sur de España.

La fiebre recurrente se presenta de forma esporádica o en pequeños brotes, con predominio en zonas rurales y en el período estival (Colebunders y cols., 1993). Las borrelias son transmitidas al ser humano a través de la picadura de las garrapatas. Pasan al torrente circulatorio y permanecen en la sangre durante los períodos febriles de la enfermedad, desapareciendo durante los períodos afebriles, y quedando secuestradas en diversos órganos. Cada vez que reaparecen las borrelias en la sangre han variado antigénicamente. Estos cambios en su estructura antigénica, seguidos de la producción de anticuerpos específicos, son los

responsables de la recurrencia de la enfermedad (Colebunders y cols., 1993; Steere, 1995).

Anda y cols. (1996) descubren una nueva borrelia patógena muy relacionada con otros agentes transmitidos por garrapatas de la fiebre recurrente en Europa y África. Este agente causa una enfermedad sistémica recurrente con similitudes serológicas con la borreliosis de Lyme.

Otras espiroquetas saprofitas comparten epítomos de células T con OspA de *B. burgdorferi*. Se ha detectado una reactividad cruzada entre *B. burgdorferi* y *Treponema denticola*, bacteria saprofita de la mucosa oral humana que se encuentra frecuentemente en casos de periodontitis (Cooke y cols., 1990; Magnarelli y cols., 1990).

Los anticuerpos frente a la proteína de 72 KDa de *Borrelia burgdorferi* también reaccionan con *B. hermsii*, *T. phagadenis* biotipo Reiter y *E. coli* por inmunoblot y ELISA. Sin embargo, los anticuerpos frente a este mismo antígeno son reactivos frente a *B. fragilis* y *Salmonella typhimurium* sólo por ELISA (Coleman y Benach, 1992).

La presencia de polipéptidos inmunogénicos que dan reacciones cruzadas con determinantes antigénicos de otras espiroquetas y bacterias Gram-negativas explicaría la presencia de reacciones cruzadas en las técnicas serológicas corrientemente usadas para el diagnóstico. Conociendo qué antígenos pueden presentar reacciones cruzadas, se podrían realizar pruebas serológicas más específicas (Coleman y Benach, 1992).

En respuesta a estos problemas, un gran número de trabajos se han dirigido a identificar los antígenos inmunogénicos y especie-específicos (Lefebvre y cols., 1990; Simpson y cols., 1990; Volkman y cols., 1991) para ofrecer una mayor especificidad en las pruebas diagnósticas.

Como conclusión, se debe tener en cuenta que el diagnóstico de la enfermedad de Lyme no debe basarse exclusivamente en la serología, sino que los resultados deben ser valorados junto con la sintomatología y la respuesta al tratamiento, ya que un suero positivo sólo indica que el individuo ha estado en contacto con la bacteria, pero no diferencia entre la infección activa y la

mera exposición a la espiroqueta. Además, las pruebas serológicas pueden dar falsos negativos (baja sensibilidad), en las fases iniciales de la enfermedad, y falsos positivos (baja especificidad).

7. TRATAMIENTO.

La evaluación de la eficacia del tratamiento antibiótico en esta enfermedad resulta difícil por la complejidad del cultivo del microorganismo, y el hecho de que muchos síntomas están más relacionados con procesos inmunológicos, sin que ello implique necesariamente la persistencia de microorganismos vivos (Philipson, 1991).

En un principio, el tratamiento se realizó con penicilina (Steere, 1989; Nadelman y cols., 1992). Posteriormente, las tetraciclinas resultaron superiores a la penicilina V y a la eritromicina en el tratamiento de la fase inicial de la enfermedad de Lyme (Steere, 1989). La penicilina también resultaba útil en el tratamiento de las manifestaciones neurológicas, pero no siempre en la fase de artritis (Steere, 1989; Nadelman y cols., 1992). La ampicilina, la ceftriaxona y el imipenem son altamente activos contra dicho microorganismo (Steere, 1989).

La doxiciclina y la amoxicilina son también medicamentos de elección en el tratamiento de la enfermedad de Lyme temprana y sin complicaciones (Fishbein y Dennis, 1995).

En el caso de los perros, donde la vacunación puede ser frecuente, si la infección por el agente de la enfermedad de Lyme no está presente y sólo se detectan anticuerpos vacunales, está indicado el uso de medicamentos antiinflamatorios. Esto no sería apropiado si el perro tiene una infección por esta espiroqueta, revelada por inmunoblot; estos perros deberían tratarse con antibióticos (Jacobson y cols., 1996).

La evolución de los niveles de anticuerpos en un individuo en tratamiento es muy variable y su interpretación debe realizarse con mucha precaución, de manera que puede no existir una correlación entre los niveles de inmunoglobulinas y el éxito o fracaso del tratamiento (Kazmierczak y Sorhage, 1993). Durante la antibioterapia, el aumento de los niveles de

anticuerpos puede ser indicativo de un nuevo contacto con garrapatas o de un fallo en la respuesta a los antibióticos. Si el cuadro mejora los niveles de anticuerpos pueden disminuir, aumentar o desaparecer. En términos generales, la desaparición de los signos clínicos acompañada de un mantenimiento o ligero aumento del título de anticuerpos indica que se está controlando la enfermedad, es decir, que se están destruyendo las borrelias, que al morir producen la liberación de antígenos y, consecuentemente, el aumento de anticuerpos. Si los niveles de anticuerpos aumentan y el cuadro clínico no mejora significa que no se está controlando el proceso. En caso de que el cuadro clínico no mejore y los anticuerpos desaparezcan, se deberán considerar otras enfermedades (Font, 1995).

8. PREVENCIÓN.

Hay que considerar a la enfermedad de Lyme como un importante problema de salud, lo que plantea la necesidad de establecer una mejor vigilancia epidemiológica, e incluir esta enfermedad en los diagnósticos rutinarios de los laboratorios de microbiología, así como fomentar la educación sanitaria en la población (Arteaga y García-Moncó, 1998; 1999), especialmente en las zonas rurales, en cuanto a las garrapatas y sus consecuencias (Serrano y cols., 1994).

Además de retirar lo antes posible las garrapatas prendidas (Piesman y cols., 1987b; 1991) y la presunta administración de una terapia antibiótica sistémica, un tratamiento local del lugar de la picadura del vector puede ayudar a prevenir la enfermedad de Lyme (Shih y cols., 1992).

La mejor forma de controlar este proceso es reducir la exposición a garrapatas (Niesembaum, 1991).

En los lugares de mayor riesgo (arbolado, bosques, etc), durante los meses de mayo a octubre, se debe revisar la piel al final del día en aquellos que hayan estado al aire libre. Se debe procurar llevar pantalón largo y los calcetines cubriendo la pernera. El uso de pesticidas para el control de las garrapatas no suele resultar práctico dada la dificultad de penetración en la

vegetación (García-Moncó, 1994).

La mejor manera de quitar una garrapata es sujetarla con una pinza lo más cerca posible de la piel y tirar de ella de forma constante hacia fuera en el mismo sentido en el que se encuentra, intentando sacarla entera, es decir, sin dejar dentro las partes bucales (hipostoma) que es lo que introducen en la piel. La práctica popular de quitar garrapatas rociándolas con alcoholes, aceites, gasolina o cualquier otra sustancia, así como quemarlas con cigarrillo, no es recomendable, ya que, como respuesta, la garrapata puede regurgitar el contenido de su intestino, lugar donde se encuentran estas bacterias, favoreciendo la transmisión de la enfermedad (Barral y cols., 1995).

Para disminuir las poblaciones de garrapatas se han utilizado diferentes métodos, como el control químico mediante compuestos inorgánicos derivados del azufre y polisulfuros de cal, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, carbamatos, piretrinas y piretroides, avermectinas y sinergias entre los distintos compuestos; lucha biológica mediante la esterilización de grandes cantidades de machos de garrapatas y su posterior liberación en la zona en la que se pretende realizar el control; ciertas leguminosas del género *Stylosanthes*, con acciones ixodicidas (tales plantas producen unas secreciones químicas que paralizan y matan a las garrapatas cuando éstas ascienden por sus tallos a la búsqueda de un hospedador); ciertos insectos himenópteros, que utilizan las garrapatas de manera selectiva para las puestas de sus huevos; nematodos entomófagos, que viven en grandes números y de forma natural en los primeros milímetros del suelo; hongos entomopatógenos que, viviendo en el suelo, son capaces de atacar y matar a las garrapatas de forma activa; y mediante un control hormonal por precocenos y juvenoides, que ejercen un control absoluto sobre los mecanismos de reproducción y muda de estos ectoparásitos (Estrada Peña, 1994).

El empleo de las vacunas para la prevención de la enfermedad de Lyme, sólo debe ser considerado en áreas donde está determinada la epidemiología de la enfermedad (Font, 1995).

Johnson y cols. (1984a) fueron los primeros en demostrar que la inmunización pasiva y la inmunización activa podían proteger a hamsters de experimentación frente a la infección con *B. burgdorferi*. Varias proteínas de este patógeno, incluyendo la OspA (Simon y cols., 1991; Callister y cols., 1993), OspB (Fikrig y cols., 1992), OspC (Preac-Mursic y cols., 1992) y la proteína de 39 kDa (Scriba y cols., 1993) inducen una respuesta protectora que ha conducido a investigar alguna de estas proteínas como componentes de una vacuna para la enfermedad de Lyme (Lovrich y cols., 1994).

Basado en esta investigación, el modelo canino para la enfermedad de Lyme se utilizó en 1987 para desarrollar una vacuna canina que fue autorizada de forma condicional en 1990 y autorizada definitivamente en 1992. La vacuna es una bacterina consistente en *B. burgdorferi* inactivada químicamente en un adyuvante basado en polímeros. Un grupo de investigación de la Universidad de Yale demostró que la vacunación con proteína de superficie externa A (derivada de *Escherichia coli* recombinante) por sí sola podía proporcionar una protección de larga duración frente a la infección por *B. burgdorferi* y la subsiguiente enfermedad clínica en ratones. Más adelante, este grupo demostró que la protección de la vacuna vista por la inyección directa de espiroquetas también ocurría durante la exposición natural cuando garrapatas infectadas se alimentaban en ratones. Sin embargo, no está claro que otras proteínas de la espiroqueta puedan estar involucradas en la inducción de una inmunidad protectora; la presencia de antígenos adicionales de *B. burgdorferi* en la vacuna canina puede mejorar la protección frente a cepas múltiples de la espiroqueta (Levy y cols., 1996). En la actualidad hay 2 vacunas de Lyme para perros, una fabricada por Solvay (Mendota Heights, MN) y otra por Ft. Dodge (Fort Dodge, I.A.).

Debido a la heterogenicidad antigénica de la OspA (Johnson y cols., 1992; Wallich y cols., 1992a; Wilske y cols., 1993a) existente en los aislados norteamericanos y europeos. Esto es de gran importancia, ya que una vacuna monovalente no daría una protección completa frente a todos los aislados de *B. burgdorferi* (Lovrich y cols., 1994).

Una vacuna que contenga múltiples proteínas tendría una mayor oportunidad de protección frente a cepas divergentes debido a que sería raro que se produjeran cambios en cada antígeno protector (Levy y cols., 1996).

Las estrategias de vacunación deberían dirigirse a aquellas cepas más perjudiciales. En una vacuna europea efectiva debería incluirse una protección frente a todas las cepas de *B. garinii* (van Dam y cols., 1993).

La aplicación de esta vacuna junto con el tratamiento antibiótico en animales seropositivos hace que se desarrollen anticuerpos neutralizantes que apoyen el efecto del tratamiento con antibióticos (Levy y cols., 1996).

En conclusión, para realizar una prevención efectiva de la enfermedad de Lyme, se debe actuar, por una parte, contra los reservorios naturales y, por otra, contra los vectores que transmiten el agente patógeno. Asimismo, se debe realizar un estudio epidemiológico de la enfermedad en aquellos individuos con riesgo a padecerla y, así, poder aplicar o no pautas de vacunación en esa población de riesgo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL DE LABORATORIO.

1.1. MATERIAL FUNGIBLE.

- Alfileres entomológicos del nº3 (Imperial Karlsbad^R).
- Bisturí.
- Botes de centrifuga de polipropileno con tapón a rosca de 250 ml de capacidad.
- Criotubos de 1.2 ml de capacidad (Nalgene^R).
- Crotalador.
- Cubeta de cristal de histología.
- Cubetas de espectrofotometría.
- Cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- Cubreobjetos de 24 x 60 mm.
- Embudos de vidrio.
- Espaciadores en forma de "U" de 10 cm x 10 cm x 1.0 mm (PageMate^R).
- Filtros de 0.45 µm de diámetro de poro (Millipore^R).
- Filtros estériles de 0.2 µm de diámetro de poro (Gelman Sciences Inc.^R).
- Frascos de vidrio de 500 y 1000 ml de capacidad con tapón a rosca.
- Gasas estériles.
- Hojas de bisturí estériles.
- Jeringas de plástico.
- Matraces aforados.
- Matraces de vidrio de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml de capacidad.
- Mechero de alcohol.
- Membrana para diálisis (5-24/32") (Medicell International LTD^R).
- Micropipeta multicanal (modelo 8-Channel) de 50-250 µl.
- Micropipetas de 5-50 µl, 50-200 µl y 200-1000 µl.
- Minicrotales metálicos.
- Papel de filtro de 150 mm de diámetro de poro (Whatman^R).
- Papel de filtro de 18 x 34 cm y de 42 x 52 cm.
- Papel de nitrocelulosa de 0.2 µm de grosor (BioRad^R).

- Pinzas de iridectomía (Medicon^R).
- Pipetas graduadas de plástico estériles de 1, 5 y 10 ml de capacidad.
- Pipetas Pasteur de 230 y 250 mm de longitud.
- Pipeteador neumático.
- Placas de Petri.
- Placas para Enzimo-inmuno ensayo tipo F ELISA (Dynatech^R).
- Portaobjetos.
- Portas de vidrio para inmunofluorescencia con 30 pocillos de 4 mm de diámetro.
- Probetas.
- Puntas de plástico para micropipetas de 1-200 µl y de 100-1000 µl de capacidad.
- Tela de terciopelo blanco de 1 x 1.5 m.
- Trampas de animales vivos (Sherman^R).
- Tubos de plástico estériles con tapón a presión de 10 ml de capacidad.
- Tubos de plástico con tapón a rosca y con fondo en pico de 15 y 50 ml de capacidad.
- Tubos Micro Test de 0.5 y de 2 ml de capacidad (Eppendorf^R).
- Vasos de precipitado.

1.2. APARATOS.

- Agitador-incubador (Agimatic P Selecta^R).
- Agitatubos (tipo Reax 2000) (Heidolph^R).
- Autoclave (modelo 437-G) (Selecta Autoester^R).
- Balanza de precisión (modelo AJ 150) (Mettler^R).
- Balanza (modelo PE 2000) (Mettler^R).
- Baño termostático (Kowell^R).
- Campana de flujo laminar (modelo AV 10) (Telstar^R).
- Cassette para inmunoblot (Immunitics^R).
- Centrífuga refrigerada de supervelocidad (modelo RC-5B) (Sorvall^R).
- Congelador de -80°C (modelo ULT 1686 UOB) (Revco^R).
- Congelador de -20°C (Liebherr^R).
- Cubeta de electroforesis (Enprotech^R).

- Cubeta de electrotransferencia (Hoefel^R).
- Espectrofotómetro (Hitachi 150-20 Spectrophotometer^R).
- Estereomicroscopio (Nikon SMZ1^R).
- Estufa de +33°C (modelo C2-I) (Kowell^R).
- Fuente de alimentación (Hoefel Scientific Instruments^R).
- Iluminador para el estereomicroscopio (Intralux 4000^R).
- Lector para Enzimo-inmuno-ensayo (modelo EAR 400) (Easy Reader^R).
- Microscopio de campo oscuro (modelo Jenamed-2.B) (Zeiss Jena^R).
- Microscopio de fluorescencia (modelo Axioskop 20) (Zeiss^R).
- PH-metro (modelo MicropH 2000) (Crison^R).
- Portafiltros Sterifil (Millipore^R).
- Sonicador (modelo 450) (Branson Sonifier II Ultrasonic Cell Disruptor^R).

2. REACTIVOS.

2.1. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA LAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS.

- Azida sódica (NaN_3) (Merck^R).
- Cloruro magnésico ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck^R).
- Cloruro sódico (NaCl) (Panreac^R).
- Fosfato sódico dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (Panreac^R).
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (Panreac^R).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac^R).
- Medio BSK-H estéril (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Suero estéril de conejo (Sigma-Aldrich, Inc.^R).

2.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

- Acetona ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$) (Panreac^R).
- Adyuvante incompleto de Freud (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Gel de sílice (Panreac^R).

- Glicerol ($C_3H_8O_3$) (Panreac^R).
- Inmunoglobulina G anti-bovino producida en conejo y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G (cadena γ específica) anti-humana producida en cabra y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G anti-perro producida en conejo y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G (cadena γ específica) anti-ratón producida en cabra y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc.^R).

2.3. ELISA INDIRECTO.

- Ácido clorhídrico al 35% (HCl) (Panreac^R).
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Panreac^R).
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck^R).
- Dietanolamina (DEA) ($C_4H_{11}NO_2$) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Fosfato disódico hidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (Probus^R).
- Inmunoglobulina G anti-bovino producida en conejo y conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G (cadena γ específica) anti-humana producida en cabra y conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G anti-perro producida en conejo y conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G (cadena γ específica) anti-ratón producida en cabra y conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- O-fenilendiamina (O.P.D.) ($C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- P-nitrofenil fosfato disódico (pNPP) ($C_6H_4NO_6PNa_2$) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Peróxido de hidrógeno al 30% (H_2O_2) (Panreac^R).
- Reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Seroalbúmina bovina fracción V (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Suero de caballo estéril (Bio-Whittaker^R).

- Sulfato de dextrano (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Tween-20 (Merck^R).

2.4. INMUNOBLLOT.

- Ácido acético glacial (CH₃COOH) (Panreac^R).
- Ácido tricloroacético (CCl₃COOH) (Panreac^R).
- Acrilamida (Merck^R).
- Azul de bromofenol, sal sódica (C₂₇H₂₇Br₂O₅SNa) (BioRad^R).
- Azul R-250 brillante de Coomassie (C₄₅H₄₄N₃O₇S₂Na) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Glicina (H₂NCH₂COOH) (Panreac^R).
- Inmunoglobulina G anti-bovina producida en conejo y conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G (cadena γ específica) anti-humana producida en cabra y conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G anti-perro producida en conejo y conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Inmunoglobulina G (cadena γ específica) anti-ratón producida en cabra y conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Leche en polvo desnatada (BioRad^R).
- Marcador de pesos moleculares para SDS-Page (BioRad^R) con las siguientes proteínas:
 - Miosina (200 KDa).
 - β -galactosidasa (116.25 KDa).
 - Fosforilasa b (97.4 KDa).
 - Albúmina sérica (66.2 KDa).
 - Ovoalbúmina (45 KDa).
 - Anhidrasa carbónica (31 KDa).
 - Inhibidor de la tripsina (21.5 KDa).
 - Lisozima (14.4 KDa).
 - Aprotinina (6.5 KDa).
- 2-Mercaptoetanol (HSCH₂CH₂OH) (Merck^R).

- Metanol (CH₃OH) (Merck^R).
- Negro amido (C₂₂H₁₄N₆Na₂O₉S₂) (Merck^R).
- N,N'-Dialiltartardiamida (DATD) (C₁₀H₁₆N₂O₄) (BioRad^R).
- N,N'-Metilene-bis-acrilamida (C₇H₁₀N₂O₂) (BioRad^R).
- N,N,N',N'-Tetrametiletenamina (TEMED) (BioRad^R).
- Persulfato amónico (APS) (BioRad^R).
- Ponceau S (ácido 3 -hidroxi- 4 - [2 -sulfo-4- (4 -sulfo- fenilazo) fenilazo] -2,7 naftalenedisulfónico (C₂₂H₁₂N₄O₁₃S₄Na₄) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Sistema de sustrato líquido 5-bromo-4-cloro-3 indolilfosfato / nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Sodium Dodecil Sulfato (SDS) (BioRad^R).
- Trizma base (Tris-hidroximetil aminometano) (C₄H₁₁NO₃) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).

2.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN HUMANA.

- RPR Slide-Test (bioMérieux^R).
- Waaler Rose-Kit (bioMérieux^R).

2.6. AISLAMIENTO DE *Borrelia burgdorferi* DE GARRAPATAS Y DE MICROMAMÍFEROS.

- Acetona ((CH₃)₂CO) (Panreac^R).
- Anfotericina B (C₄₇H₇₃NO₁₇) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) [(CH₃)₂SO] (Probus^R).
- DL-ditiotreitol (C₄H₁₀O₂S₂) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Etanol al 75% (CH₃CH₂OH) (Panreac^R).
- Fosfomicina (C₃H₅O₄PCa) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Gelatina (Gibco Laboratories^R).
- L-cisteina (C₃H₇NO₂S) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Medio BSK-H estéril (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Rifampicina (C₄₃H₅₈N₄O₁₂) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).

- Seakem LE agarosa (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Seroalbúmina bovina (fracción V) (BSA) (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Suero estéril de conejo (Sigma-Aldrich, Inc.^R).
- Superóxido dismutasa (Boehringer Mannheim^R).
- Tween-20 (Merck^R).

2.7. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA DE GARRAPATAS.

- Acetona ((CH₃)₂CO) (Panreac^R).
- Glicerol (C₃H₈O₃) (Panreac^R).
- Inmunoglobulina G anti-conejo producida en cabra y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc.^R).

3. SOLUCIONES DE TRABAJO.

3.1. RECUPERACIÓN DE BORRELIAS.

SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA (PBS 0.01M), pH 7.2

Cloruro sódico -----	7.65 g.
Fosfato sódico dibásico anhidro -----	0.724 g.
Fosfato monopotásico -----	0.21 g.
Agua destilada -----	1000 ml.

PBS - AZIDA SÓDICA 0.02%, pH 7.2

PBS 0.01M -----	1000 ml.
Azida sódica al 10% -----	2 ml.

PBS - CLORURO MAGNÉSICO 5mM - AZIDA SÓDICA 0.02%, pH 7.2

PBS 0.01M ----- 1000 ml.

Cloruro magnésico ----- 1.02 g.

Azida sódica al 10% ----- 2 ml.

3.2. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO.

SOLUCIÓN AL 0.02% DE AZIDA SÓDICA EN CLORURO SÓDICO 1M

Cloruro sódico ----- 116.88 g.

Agua destilada ----- 1000 ml.

Azida sódica al 10% ----- 2 ml.

SOLUCIÓN DE LAVADO (SOLUCIÓN AL 0.05% DE PBS-TWEEN 20), pH 7.2

PBS 0.01M ----- 1000 ml.

Tween 20 ----- 0.5 ml.

DILUYENTE DE ELISA I (PBS - 0.05% TWEEN 20 - 0.1% BSA)

Seroalbúmina bovina (BSA) -----1 g.

Solución de lavado (PBS-TWEEN 20) ----- 1000 ml.

TAMPÓN CITRATO-FOSFATO, pH 5.0

A- SOLUCIÓN CITRATO 0.1M.

Acido cítrico ----- 21 g.

Agua destilada ----- 1000 ml.

B- SOLUCIÓN FOSFATO 0.2M.

Fosfato disódico hidratado ----- 35.6 g.
Agua destilada ----- 1000 ml.

TAMPÓN CITRATO-FOSFATO.

Solución Citrato 0.1M ----- 100 ml.
Solución Fosfato 0.2M ----- 100 ml.
Agua destilada ----- 400 ml.

SUSTRATO CROMÓGENO I (O.P.D. AL 0.04% Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO 0.04% EN TAMPÓN CITRATO-FOSFATO).

O-fenilenodiamina (O.P.D.) ----- 0.004 g.
Tampón citrato-fosfato ----- 10 ml.
Peróxido de hidrógeno al 30% ----- 4.3 µl.

REACTIVO DE FRENADO I (ACIDO SULFÚRICO 3N).

Ácido sulfúrico (d=1.84) ----- 80 ml.
Agua destilada ----- 500 ml.

DILUYENTE DE ELISA II (SOLUCIÓN AL 0.05% DE PBS-TWEEN 20 CON UN 5% DE SUERO DE CABALLO Y UN 0.001% DE SULFATO DE DEXTRANO).

Solución de lavado (PBS-Tween 20) ----- 95 ml.
Suero de caballo ----- 5 ml.
Sulfato de dextrano ----- 0.001 g.

SUSTRATO CROMÓGENO II (1 mg/ml DE p-NITROFENILFOSFATO EN 0.1M DEA BUFFER).

p-Nitrofenilfosfato ----- 5 µg.
DEA buffer ----- 10 ml.

DEA BUFFER 0.1M, pH 9.8

Dietanolamina ----- 9.7 ml.
Cloruro magnésico ----- 0.01 g.
Azida sódica ----- 0.02 g.
Agua destilada ----- 80 ml.

REACTIVO DE FRENADO II (HIDRÓXIDO DE SODIO 3N).

Hidróxido de sodio 97% ----- 12 g.
Agua destilada ----- 100 ml.

3.3. TÉCNICA DE INMUNOBLOT.

ACRILAMIDA 28% - DATD.

Acilamida ----- 28 g.
DATD ----- 0.735 g.
Agua destilada ultrapura ----- hasta 100 ml.

Filtrar por 0.45 µm.

3M TRIS-HCl, pH 8.5

Trizma base ----- 36,33 g.
Agua destilada ultrapura ----- hasta 100 ml.

Filtrar por 0.45 m.

30% ACRILAMIDA - 0.8% METILENE-BISACRILAMIDA

Acrilamida ----- 150 g.
Bis-acrilamida ----- 4 g.
Agua destilada ultrapura ----- hasta 500 ml.

Filtrar por 0.45 μ m.

0.5M TRIS-HCl, pH 6.8

Trizma base ----- 6.05 g.
Agua destilada ultrapura ----- hasta 100 ml.

Filtrar por 0.45 μ m.

GEL SEPARADOR AL 20% DE ACRILAMIDA

Acrilamida 28%-DATD ----- 5.02 ml.
3M Tris-HCl, pH 8.5 ----- 1.19 ml.
Agua destilada ultrapura ----- 0.7 ml.
10% SDS ----- 95 μ l.
10% APS ----- 42 μ l.
TEMED ----- 7 μ l.

GEL EMPAQUETADOR AL 3.6% DE ACRILAMIDA

30% Acrilamida - 0.8% Metilene-bisacrilamida -----	0.24 ml.
0.5M Tris-HCl, pH 6.8 -----	0.5 ml.
10% SDS -----	20 µl.
Agua destilada ultrapura -----	1.2 ml.
TEMED -----	2 µl.
10% APS -----	10 µl.

TAMPÓN DE MUESTRA

0.5M Tris-HCl, pH 6.8 -----	1 ml.
Glicerol -----	0.8 ml.
10% SDS -----	1.6 ml.
0.5% Azul de bromofenol -----	0.8 ml.
Agua destilada ultrapura -----	4 ml.

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS (SDS-PAGE BUFFER), pH 8.8

Trizma base -----	3 g.
Glicina -----	14.4 g.
SDS -----	1 g.
Agua destilada -----	hasta 1000 ml.

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA (10X WB BUFFER), pH 8.3

Trizma base -----	30.27 g.
Glicina -----	144.13 g.
SDS -----	1 g.
Agua destilada -----	hasta 1000 ml.

1X WB BUFFER (SOLUCIÓN DE TRABAJO), pH 8.3

10X WB buffer -----	100 ml.
Metanol -----	150 ml.
Agua destilada -----	750 ml.

SOLUCIÓN DE TEÑIDO DE GELES

Azul de Coomassie brillante -----	1.5 g.
Metanol -----	200 ml.
Ácido acético glacial -----	75 ml.
Agua destilada -----	725 ml.

SOLUCIÓN DE DESTENIDO DE GELES

Metanol -----	200 ml.
Ácido acético glacial -----	75 ml.
Agua destilada -----	725 ml.

SOLUCIÓN DE TEÑIDO REVERSIBLE (ROJO PONCEAU 1%)

Ponceau S -----	1 g.
Ácido acético glacial -----	10 ml.
Agua destilada -----	90 ml.

SOLUCIÓN DE TEÑIDO PERMANENTE DE LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Negro amido -----	0.1 g.
Solución de destañido de geles -----	100 ml.

10X TBS-TWEEN, pH 7.4

Trizma base ----- 12.11 g.
Cloruro sódico ----- 87.66 g.
Agua destilada ----- hasta 1000 ml.

1X TBS-TWEEN (SOLUCIÓN DE TRABAJO), pH 7.4

10X TBS-Tween ----- 200 ml.
Tween-20 ----- 5 ml.
Agua destilada ----- 1500 ml.

0.1M TRIS-HCl, CLORURO SÓDICO 100mM Y CLORURO MAGNÉSICO 5mM

Trizma base ----- 6.055 g.
Solución 3M de cloruro sódico ----- 16.6 ml.
Solución 100 mM de cloruro magnésico ----- 25 ml.
Agua destilada ultrapura ----- hasta 500 ml.

Filtrar por 0.45 μ m.

3.4. AISLAMIENTO DE *Borrelia burgdorferi* EN GARRAPATAS.

PBS - BSA 0.05%, pH 7.2

PBS 0.01M ----- 1000 ml.
Seroalbúmina bovina (fracción V) ----- 0.5 g.

Filtrar por 0.22 μ m.

AGUA DESTILADA - 0.05% TWEEN-20

Agua destilada ultrapura ----- 1000 ml.

Tween-20 ----- 0.5 ml.

4. MATERIAL DE TRABAJO.

4.1. ESTUDIO SEROLÓGICO DE LA POBLACIÓN ANIMAL Y HUMANA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA.

Se ha realizado un estudio serológico de la población animal y humana de la zona de la Sierra de Guadarrama para conocer la prevalencia de infección por *B. burgdorferi*. Los sueros caninos fueron suministrados por diferentes clínicas veterinarias de la zona de estudio, resultando un total de 204 muestras recogidas al azar de entre los pacientes de la consulta médica, entre los meses de agosto de 1995 y junio de 1996.

La mayor parte de los sueros de vacuno (369) se obtuvieron por una campaña de saneamiento realizada durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 1995 en distintas poblaciones de la Sierra de Guadarrama. El resto (6 muestras) provenían de animales con sintomatología compatible con la borreliosis de Lyme y nos fueron remitidas en octubre de 1997.

Los sueros de personas se recogieron de forma aleatoria de los pacientes que acudían al Centro de Salud de Cercedilla (Área VI de Atención Primaria) desde septiembre de 1994 hasta octubre de 1995. Desde mayo de 1996 hasta agosto de 1999 se analizaron aquellos sueros de pacientes con sintomatología compatible con la enfermedad de Lyme, o que habían sido picados por garrapatas.

Todas estas muestras recogidas de humanos y de animales se analizaron por las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por enzimo-inmunoensayo (ELISA) indirecto. Aquellas que resultaron positivas o dudosas se confirmaron por inmunoblot.

4.2. ESTUDIO DEL HOSPEDADOR RESERVORIO.

La captura de micromamíferos, posibles reservorios de la infección (Donahue y cols., 1987), se llevó a cabo en dos zonas del Valle de la Fuenfría (Sierra de Guadarrama). Una de ellas, Roble Gordo, fue elegida por la abundancia de hospedadores de los adultos de *Ixodes ricinus* (corzos, jabalíes, caballos y vacuno), en tanto que la segunda zona, el Embalse de las Berceas, constituía un hábitat ideal para los roedores. Quincenalmente en 1995 y mensualmente en 1996 y 1997, entre los meses de marzo y octubre, se colocaron 25 trampas para captura de animales vivos en cada zona, con chorizo y algodón como cebo, y a una distancia de 10 pasos. Al amanecer se revisaron las trampas y los animales capturados se llevaron al laboratorio. Una vez allí, los ejemplares fueron identificados específicamente, se tomaron muestras de sangre y ectoparásitos, se marcaron y liberaron en el mismo lugar de captura.

4.3. ESTUDIO DEL VECTOR *Ixodes ricinus*.

Las garrapatas fueron obtenidas tanto de la vegetación como sobre los distintos hospedadores (micromamíferos y lagartijas).

La recogida de estos ectoparásitos del suelo se realizó mensualmente de Marzo de 1995 a Septiembre de 1997. A primera hora de la mañana se pasó, durante al menos 30 minutos, dos banderas de terciopelo blanco de 1 x 1.5 m siguiendo un recorrido establecido.

Los ejemplares obtenidos se identificaron específicamente, anotándose su número y estadio de desarrollo (Gil Collado y cols., 1979; Nuttal y Warburton, 1991).

5. PROCEDIMIENTOS.

5.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE *Borrelia burgdorferi*.

El cultivo de *B. burgdorferi* se realizó siguiendo la metodología descrita por Barbour en 1984. Se utilizó la cepa española (ESP-1) de esta bacteria (García-Moncó y cols., 1992).

Los viales mantenidos a -80°C con la cepa se dejaron descongelar y su contenido se echó en los frascos con medio BSK-H. Posteriormente se adicionó un 6% de suero estéril de conejo y se llevaron a incubar a 33°C hasta comprobar que se encontraban en fase de crecimiento logarítmico. En ese momento, el examen directo a 40X aumentos del cultivo bajo microscopía de campo oscuro reveló un mínimo de 50 microorganismos activos por campo.

Para recuperar los microorganismos se vertió el medio crecido en botes de centrífuga previamente autoclavados y se centrifugó a 11.500 rpm durante 30 minutos en una centrífuga refrigerada de supervelocidad utilizando un rotor GSA. Se tiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en PBS 0.01M estéril, centrifugando de nuevo en las mismas condiciones. Esta operación se repitió un total de tres veces.

Tras el último centrifugado, el sedimento quedó resuspendido en el mínimo volumen posible de PBS-Azida sódica al 0.02%, cuando se utilizó para IFI, o de PBS-Cloruro magnésico 5mM-Azida sódica 0.02%, para ELISA o inmunoblot, y se congeló a -80°C.

5.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

En cada pocillo de los portas especiales para inmunofluorescencia se depositaron 10 µl de una dilución 1/400 de *B. burgdorferi* en PBS-Azida sódica 0.02% y se incubaron a 37°C unas 2-4 horas. Se fijaron posteriormente con acetona durante 20 minutos y se almacenaron en cajas para preparaciones a 4°C con gel de sílice para preservarlos de la humedad.

En el momento de su utilización, los portas con el antígeno fijado se dejaron atemperar. Se diluyeron los sueros problema en PBS, para los sueros de humana y ratones, o en agua destilada ultrapura, para las muestras de perros y vacuno, y se depositaron 10 μ l de cada dilución por pocillo, dejando dos de ellos para el control positivo, titulado previamente, y el control negativo.

Los portas se incubaron durante 30-45 minutos, según especie, a 37°C en cámara húmeda. Después se lavaron en PBS 10 minutos en agitación y se dejaron secar al aire.

Cada uno de los pocillos se cubrió con 10 μ l de inmunoglobulina antiespecie conjugada con isotiocianato de fluoresceína diluida en PBS o en agua destilada ultrapura a la dilución de trabajo previamente establecida.

Se realizó otra nueva incubación en cámara húmeda y a 37°C durante 30-45 minutos en oscuridad.

Finalmente se procedió a un nuevo lavado en PBS y en agitación durante un mínimo de 10 minutos, pero en este caso en oscuridad. Los portas se secaron al aire y se montaron los cubreobjetos usando glicerina diluida al 1/9 en PBS. A continuación se llevaron a leer en un microscopio de fluorescencia a 40X aumentos.

El título que se consideró como punto de corte dependió de la especie analizada y de la calidad del conjugado utilizado.

Nosotros elegimos el título de anticuerpos de 64 como positivo al ser este el usado por otros autores españoles a la hora de hacer estudios serológicos en distintas regiones de España (Serrano y cols., 1994; Caride, 1995; Rojo Vázquez, 1997) y también al ser nuestra metodología muy parecida a la empleada por Magnarelli y cols. (1984b), quienes adoptaron este título como positivo para sueros humanos, de ratón suizo y de perro.

5.2.1. VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL CONJUGADO ANTI-IgG DE *Mus musculus* PARA RATONES DE CAMPO.

La ausencia de conjugado comercial anti-*Apodemus*, que nos permitiera analizar de una forma fiable las muestras, nos obligó a realizar una experiencia previa para valorar la eficacia del conjugado anti-IgG de *Mus musculus*. Para ello se inocularon intraperitonealmente 10^6 espiroquetas *B. burgdorferi* (ESP-1) en adyuvante incompleto de Freud durante 3 días alternativos a 5 *A. sylvaticus* de la colonia que se mantiene en el Departamento y a 4 controles (*Mus musculus* C3H). Los animales fueron sangrados los días 15, 60, 90 y 120 post-inoculación y los sueros se analizaron mediante Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA, utilizando los conjugados comerciales marcados con isotiocianato de fluoresceína y fosfatasa alcalina respectivamente.

5.3. ELISA INDIRECTO.

Una vez resuspendido el sedimento en PBS-Cloruro magnésico 5mM-Azida sódica 0.02%, se sonicó al 60% de la potencia máxima en ciclos de 15 segundos de duración.

El sonicado se centrifugó a 11.500 rpm durante 30 minutos y a 4°C. El sobrenadante se recogió en un tubo y el sedimento se resuspendió en una solución al 0.02% de azida sódica en cloruro sódico 1M y se centrifugó igualmente. Se recogió el sobrenadante y, junto con el anterior, se dializó en membranas tubulares contra dos cambios de agua destilada y uno de PBS a 4°C (Harris y Angal, 1989).

Para la determinación de la concentración proteica del antígeno así elaborado se utilizó la técnica descrita por Bradford en 1976.

El antígeno sonicado y dializado se diluyó en agua destilada ultrapura hasta una concentración de 10 µg/ml, y se tapizaron placas de 96 pocillos depositando 50-100 µl/pocillo de esta dilución y se dejaron secar a 37°C durante la noche.

5.3.1. DESARROLLO DE LA PRUEBA.

A lo largo de esta tesis se usaron dos protocolos de ELISA. El primero de ellos, puesto a punto en los trabajos previos (Caride, 1995), se utilizó para la valoración de los sueros de cánidos y bóvidos. Posteriormente, al entrar en contacto con el equipo de trabajo del Dr. Spielman y el Dr. Telford del Departamento de Salud Pública Tropical de la Universidad de Harvard (Estados Unidos), se cambió el protocolo utilizando el ELISA por ellos validado, al presentar considerables ventajas, como el ahorro de antígeno y de reactivos y la durabilidad de la reacción.

5.3.1.1. Protocolo seguido en el análisis de los sueros de cánidos y bóvidos.

Las placas se postapizaron por adición de 250 μ l/pocillo del diluyente de ELISA I, incubándose una hora a 37°C.

Tras un lavado, se dispensaron 100 μ l de la dilución 1/100 de cada suero en el diluyente de ELISA I a razón de 3 pocillos por muestra y se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Después de lavar las placas 5-6 veces, se añadieron 100 μ l/pocillo de la solución de trabajo de la inmunoglobulina G antiespecie marcada con peroxidasa en el diluyente de ELISA I y se llevaron a incubar una hora a 37°C.

Lavadas las placas de nuevo, como se indicó anteriormente, se echó en cada pocillo 100 μ l del sustrato cromógeno I, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta que los tres controles negativos incluidos en cada placa comenzaron a desarrollar color, momento en el que se frenó la reacción añadiendo 50 μ l/pocillo del reactivo de frenado I.

La lectura se realizó en un lector para Enzimo-inmuno ensayo a una longitud de onda de 492 nm y las densidades ópticas de cada pocillo se imprimieron.

5.3.1.2. Protocolo seguido en el análisis de los sueros de humana y roedores.

En este caso las placas se postapizaron añadiendo 200 μl /pocillo del diluyente de ELISA II y se incubaron una hora a 37°C.

Se lavaron las placas una vez y se añadieron los sueros por triplicado (en 3 pocillos cada uno de ellos) a una dilución 1/100 en el diluyente de ELISA II, depositando 50 μl / pocillo de la misma y se incubó una hora a 37°C. Pasado este tiempo, las placas se lavaron 5 veces a intervalos de 3 minutos.

Se añadieron 50 μl /pocillo de la inmunoglobulina G antiespecie conjugada con fosfatasa alcalina a la solución de trabajo, usando como diluyente el mismo que en el caso de los sueros, y se incubó durante otra hora a 37°C.

Tras lavar 5 veces, como se indicó anteriormente, se dispensaron 50 μl /pocillo del sustrato cromógeno II. Media hora después, o cuando apareció suficiente coloración en los controles negativos, se detuvo la reacción añadiendo 50 μl /pocillo del reactivo de frenado II.

La lectura se realizó, en este caso, a una longitud de onda de 405 nm y las densidades ópticas de cada pocillo se imprimieron.

Para cualquiera de los protocolos seguidos, consideramos como resultados positivos a aquellos sueros que a la dilución 1/100 presentaban, a la longitud de onda utilizada, una densidad óptica superior a la suma de tres veces la desviación estándar y la media de la absorbancia de los controles negativos incluidos en la placa. Se consideraron dudosos los sueros que a esa dilución tenían unos valores de densidad óptica entre la suma de dos veces la desviación estándar y la media y el anterior, también con respecto a los controles negativos (Magnarelli y cols., 1984b; Caride, 1995).

5.4. INMUNOBLOT.

Los sueros que resultaron positivos o dudosos por cualquiera de las dos técnicas anteriores se comprobaron por inmunoblot (Laemmli, 1970; Towbin y cols., 1979; Towbin y Gordon, 1984).

Se utilizó un gel separador al 20% y un gel empaquetador al 3.6%. Tanto nuestro antígeno como el marcador de pesos moleculares se disolvieron en el tampón de muestra, al que se le adicionó un 5% de 2-mercaptoetanol, y se hirvieron durante 5 minutos. En el gel se cargaron 21 μ l del marcador de pesos moleculares en un pocillo (20 μ l de tampón de muestra y 1 μ l del marcador) y 200 μ l del antígeno en el resto (100 μ l de tampón de muestra y 100 μ l de antígeno a una concentración de 463.2 μ g/ml).

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 110 V durante la primera media hora y luego a 190 V en tampón de electroforesis.

Las proteínas así resueltas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 mm de tamaño de poro a una intensidad de corriente de 150 mA durante 3 horas en el tampón de transferencia.

Las bandas antigénicas de la membrana se revelaron mediante una solución de tinte reversible al 1/40 en agua destilada, y el marcador de pesos moleculares y parte del antígeno se tiñeron de forma permanente.

Tras bloquearla toda la noche a 4°C por adición de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-Tween, la membrana se lavó con TBS-Tween y se colocó en el cassette para inmunoblot, se cargó la dilución de 1/100, para los sueros de humana y perros, o de 1/50, para los de vacuno y ratones, y se incubó a 37°C durante 30-60 minutos.

Después de lavarla haciendo pasar 300 ml de TBS-Tween por los canalitos del cassette conectando una bomba de vacío al accesorio, ésta se depositó en una cubeta de histología y allí se realizaron 4 lavados de 1-2 minutos también con TBS-Tween.

A continuación se añadió la inmunoglobulina G antiespecie conjugada con fosfatasa alcalina diluida en leche desnatada en polvo al 1% en TBS-Tween y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Se lavó 4 veces con TBS-Tween y otras cuatro más con agua destilada durante 1-2 minutos/lavado y se añadió el sustrato (4 ml de BCIP/NBP y 16 ml de 0.1M Tris-HCl, pH 9.5). Cuando las bandas desarrollaron suficiente color se frenó la reacción añadiendo ácido tricloroacético al 3%.

Para los inmunoblot frente a *B. burgdorferi* en perros, se consideraron positivos los sueros que detectaban la flagelina de 41 KDa, la p39 y, al menos, dos de los siguientes antígenos: 96-93, 73, 66, 34, 31 y 28-22 KDa (Barthold y cols., 1995; Wittenbrink y cols., 1996; Wieler y cols., 1999).

En el ganado vacuno, y siguiendo las recomendaciones del CDC / grupo de trabajo ASTPHLD para la estandarización del inmunoblot en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme (Dressler y cols., 1993 modificado), se tomaron como positivos los sueros con reactividad frente a las siguientes bandas: 41, 39, 34 y 31 KDa.

En el caso de humana, se consideraron positivos aquellos sueros que presentaban reactividad frente al menos 5 de las siguientes 10 bandas: 18 KDa, 21 KDa (OspC), 28 KDa, 30 KDa, 39 KDa (Bmp A), 41 KDa (Fla), 45 KDa, 58 KDa, 66 KDa y 93 KDa (Ma y cols., 1992; Anda y cols., 1993; Dressler y cols., 1993; Anónimo, 1995; Coyle y Luft, 1995; Rodríguez y cols, 1995; Telford III y Fikrig, 1995; Nuncio, 2000).

En micromamíferos se consideró positivo un suero reactivo con, al menos, tres de los antígenos específicos de espiroquetas (p18-20; p29; p35.5; p37; p39; p41; p45; p58; p66; p88 y p93-100; 31 KDa OspA; 34 KDa OspB y 23 KDa ospC) (Brunet y cols., 1995).

5.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN HUMANA.

En todos los sueros de humana que reaccionaron frente a *Borrelia burgdorferi*, independientemente de la técnica utilizada, se descartó la reacción cruzada con sífilis y factor reumatoide con un kit comercial.

5.6. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA DE GARRAPATAS.

La muestra de intestino medio extraída de cada garrapata se preparó para ser analizada por inmunofluorescencia directa (Piesman y cols., 1990), se extendió en un portaobjetos y se dejó secar para posteriormente fijarla con acetona a -20°C durante 10 minutos.

Sobre el portaobjetos se depositaron 25 µl de una dilución 1/100 de suero de conejo hiperinmunizado (Caride, 1995) en PBS 0.01M. Se incubaron durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después se lavaron en PBS unos 10 minutos en agitación y se dejaron secar al aire.

Se añadió a cada portaobjetos 25 µl de inmunoglobulina G anticonejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína diluida en PBS a la dilución de trabajo.

Se realizó otra nueva incubación en cámara húmeda y a 37°C durante 45 minutos en oscuridad.

Finalmente se procedió a un nuevo lavado en PBS y en agitación durante un mínimo de 10 minutos, pero en este caso en oscuridad. Los portaobjetos se secaron al aire y se montaron los cubreobjetos usando glicerina diluida al 1/9 en PBS. A continuación se

5.7. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES LOCALES DE *Borrelia* spp. DE GARRAPATAS Y HOSPEDADORES.

El medio de aislamiento (BSK-AM) se realizó según el protocolo descrito por Anderson y Magnarelli (1992) y modificado por el Dr. Telford, adicionando a un medio de cultivo BSK distintos antibióticos, como anfotericina B, fosfomicina y rifampicina.

Las garrapatas capturadas sobre la vegetación o sobre micromamíferos y lagartijas, así como las biopsias de oreja de los micromamíferos capturados se desinfectaron mediante 3 lavados consecutivos: el primero con agua destilada con 0.05% de Tween-20, el segundo con agua destilada estéril y el tercero con etanol al 75%.

Tras secar las garrapatas, se disecaron en un estereomicroscopio por el método descrito por Olmeda García (1992) modificado. Parte del intestino medio se utilizó para hacer inmunofluorescencia directa y el resto se depositó en el medio de aislamiento y se incubó a 33°C.

La caracterización se llevó a cabo por la técnica de inmunoblot.

RESULTADOS

1. ESTUDIO SEROLÓGICO DE LA POBLACIÓN ANIMAL Y HUMANA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA.

1.1. POBLACIÓN CANINA.

Las clínicas veterinarias de la Sierra de Guadarrama nos suministraron un total de 204 sueros entre agosto de 1995 y junio de 1996 de las siguientes procedencias: 73 de Alpedrete, 47 de Cercedilla, 81 de Guadarrama y 3 de Villalba.

1.1.1. RESULTADOS DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

El 35.8% de las muestras analizadas por esta técnica presentaron un título para inmunoglobulina G mayor o igual a 64, en tanto que el 15.2% fueron consideradas como dudosas al presentar fluorescencia a la dilución 1/32.

PROCEDENCIA	SUEROS ANALIZADOS	PREVALENCIA	
		Positivos	Dudosos
Alpedrete	73	21 (28.8%)	7 (9.6%)
Cercedilla	47	20 (42.5%)	7 (14.9%)
Guadarrama	81	30 (37%)	16 (19.7%)
Villalba	3	2 (66.7%)	1 (33.3%)
TOTAL	204	73 (35.8%)	31 (15.2%)

Como se observa en el cuadro, la seroprevalencia osciló entre un 28.8% encontrado en la población de Alpedrete y un 42.5% hallado en Cercedilla. La seroprevalencia en Villalba (66.7%) debe ser evaluada con precaución, debido al bajo número de sueros analizados en esta población.

1.1.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA INDIRECTO.

La seroprevalencia que se encontró al analizar los sueros caninos por esta técnica fue muy parecida a la encontrada por IFI .

PROCEDENCIA	SUEROS ANALIZADOS	PREVALENCIA	
		Positivos	Dudosos
Alpedrete	73	11 (15%)	27 (37%)
Cercedilla	47	25 (53.2%)	11 (23.4%)
Guadarrama	81	39 (48.1%)	22 (27.2%)
Villalba	3	0	1 (33.3%)
TOTAL	204	75 (36.8%)	61 (30%)

A diferencia de lo que ocurrió con la inmunofluorescencia indirecta, por esta técnica ninguno de los sueros de Villalba analizados fue positivo, sin embargo se encontró una prevalencia algo mayor por esta última metodología en Guadarrama (48.1%) y en Cercedilla (53.2%). En Alpedrete se obtuvieron más resultados positivos por IFI (28.8%) que por ELISA (15%).

1.1.3. COMPARACIÓN DE AMBAS TÉCNICAS.

Del total de los sueros analizados, 26 (12.7%) resultaron positivos tanto por ELISA como por IFI, correspondiendo 2 a Alpedrete, 10 a Cercedilla y 14 a Guadarrama. Un 35.3% (72 sueros) fueron negativos por las dos técnicas: 43 de Alpedrete, 12 de Cercedilla, 26 de Guadarrama y 1 de Villalba.

También hubo un alto porcentaje de sueros que fueron sólo reactivos por una técnica. Así, un 23% (47 sueros) dieron positividad por IFI, pero se consideraron negativos por ELISA: 19 de Alpedrete, 10 de Cercedilla, 16 de Guadarrama y 2 de Villalba. Un porcentaje parecido, 23.5% (48 sueros), no fueron reactivos por IFI, pero sí por ELISA: 9 de Alpedrete, 14 de Cercedilla y 25 de Guadarrama.

1.1.4. COMPROBACIÓN POR INMUNOBLOT.

Por esta técnica se analizaron un total de 170 sueros (43 de Alpedrete, 51 de Cercedilla, 73 de Guadarrama y los 3 de Villalba), que habían resultado positivos o dudosas por IFI y/o ELISA.

Teniendo en cuenta las directrices que siguen los diferentes autores, consideramos que de esos 170 sueros, sólo 2 eran realmente positivos, uno de Alpedrete y otro de Cercedilla. Ambos presentaban una banda de alto peso molecular de 96-93 KDa, y otras de 73, 66, 41 y 39 KDa. El perro de Cercedilla reaccionó frente a 2 bandas de bajo peso molecular de 28-22 KDa y el de Alpedrete frente al antígeno OspB (34 KDa) y el OspA (31 KDa). Con esto, la prevalencia encontrada por esta técnica fue de 0,98%.

Asimismo, consideramos 3 sueros como dudosos, 2 de Cercedilla y uno de Villalba, al poseer una de las bandas que establecimos como obligatorias, de 41 y de 39 KDa, y, al menos, dos del resto. Así, uno de los sueros de Cercedilla reaccionó frente a

bandas de 66, 39 y una de 28-22 KDa, el otro frente a una de 96-93, 73, 60, 41 y dos de 28-22 KDa. El último dudoso, el de Villalba, presentó reactividad frente a dos bandas de 96-93, 73, 39, 31 y una de 28-22 KDa.

El perro positivo de Cercedilla era un pequinés macho de 5 años que había resultado positivo por IFI, con un título de 256, y dudoso por ELISA. El suero positivo de Alpedrete pertenecía a un macho, cruce de samoyedo y boxer, de 6 años, que había resultado negativo por IFI y positivo por ELISA.

De los tres sueros dudosos, el primero fue sólo dudoso por ELISA, el segundo positivo por esa misma técnica y el tercero fue dudoso tanto por IFI como por ELISA.

1.2. GANADO VACUNO.

Se analizaron un total de 369 sueros de ganado vacuno en extensivo que procedían de la campaña de saneamiento de la Sierra de Guadarrama y 6 sueros de vacuno de Valsaín con sintomatología compatible con borreliosis de Lyme (articulaciones inflamadas) y sobre el que se habían encontrado garrapatas del género *Ixodes*.

Dentro de la Sierra de Guadarrama se recogieron muestras de las poblaciones de Becerril de la Sierra (35), Cerceda (12), El Boalo (187), Mataelpino (32), Moralarzal (62) y Navacerrada (41).

1.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

El 23% de los sueros recogidos durante la campaña de saneamiento presentaron un título para inmunoglobulina G igual o superior a 64, mientras que un 17.9% se consideraron dudosos al presentar a fluorescencia a la dilución 1/32.

SANEAMIENTO	SUEROS ANALIZADOS	PREVALENCIA	
		Positivos	Dudosos
Becerril de la Sierra	35	23 (65.7%)	11 (31.4%)
Cerceda	12	3 (25%)	0
El Boalo	187	22 (11.8%)	18 (9.6%)
Mataelpino	32	5 (15.6%)	4 (12.5%)
Moralzarzal	62	18 (29%)	23 (37.1%)
Navacerrada	41	14 (34.1%)	10 (24.4%)
TOTAL	369	85 (23%)	66 (17.9%)

En este caso, el dato más significativo es el de la zona de El Boalo, donde 22 de las 187 muestras analizadas se consideraron positivas por esta técnica. La prevalencia observada en Becerril de la Sierra fue muy alta (65.7%), pero no se tomó mucho en cuenta debido a la escasa cantidad de animales muestreados.

Con respecto a las 6 vacas de Valsaín que presentaban articulaciones inflamadas, ninguna de ellas se consideró positiva por IFI.

1.2.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA INDIRECTO.

Cuando se analizaron los sueros obtenidos del saneamiento, resultó una seroprevalencia del 11.9%.

SANEAMIENTO	SUEROS ANALIZADOS	PREVALENCIA	
		Positivos	Dudosos
Becerril de la Sierra	35	2 (5.7%)	0
Cerceda	12	2 (16.7%)	1 (8.3%)
El Boalo	187	17 (9.1%)	12 (6.4%)
Mataelpino	32	5 (15.6%)	3 (9.4%)
Moralzarzal	62	12 (19.3%)	2 (3.2%)
Navacerrada	41	5 (12.2%)	1 (2.4%)
TOTAL	369	44 (11.9%)	19 (5.1%)

Con respecto a la población de Becerril de la Sierra, se observó una menor prevalencia cuando se utilizó esta técnica (5.7%), que cuando se empleó la fluorescencia. En general se obtuvo una menor prevalencia cuando se usó el ELISA indirecto en todas las zonas muestreadas, excepto en Mataelpino, que fue exactamente la misma por ambos métodos (15.6%).

En el caso de las vacas sospechosas de enfermedad de Lyme, sólo una se consideró positiva, resultando una prevalencia del 16.7% por esta técnica.

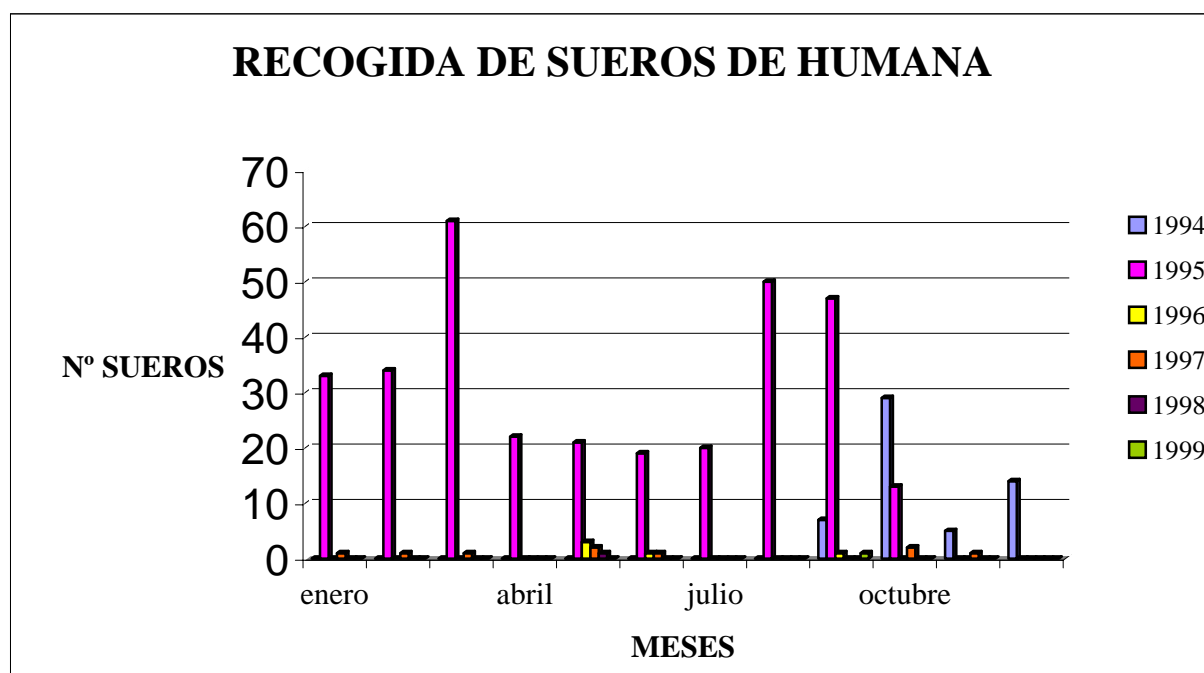
1.2.3. COMPROBACIÓN POR INMUNOBLOT.

Al analizar los sueros que habían resultado positivos o dudosos por una de las dos técnicas anteriores o por las dos, un total de 185 sueros (184 de los cogidos durante la campaña de saneamiento y sólo 1 de los de Valsaín), observamos que ninguno de ellos se podía considerar como positivo, según el criterio que seguimos para inmunoblot, aunque 12 de ellos se consideraron dudosos, todos ellos provenientes de la campaña de saneamiento, al

tener 2 de ellos tres bandas importantes (de 41, 39 y 34 KDa), otro presentaba reactividad frente a antígenos de 41, 39 y 31 KDa. El resto de los 12 sueros dudosos, sólo presentaban 2 bandas significativas: tres frente a 41 y 34 KDa.; uno frente a 39 y 31 KDa.; uno frente a 39 y 34 KDa.; dos frente a 41 y 39 KDa.; y dos frente a 41 y 31 KDa.

1.3. POBLACIÓN HUMANA.

Se recogieron un total de 391 sueros de personas (241 mujeres y 150 hombres) en el Centro de Salud de Cercedilla (Área VI de Atención Primaria) y se analizaron por las técnicas de IFI, ELISA indirecto e inmunoblot. 375 sueros (233 de mujeres y 142 de hombres) se recogieron al azar durante los dos primeros años del estudio y el resto (16 sueros, 8 de mujeres y 8 de hombres) nos fueron remitidos del mismo centro al pertenecer a pacientes que habían sido picados por garrapatas o que presentaban sintomatología compatible con la enfermedad de Lyme.



En todos aquellos sueros que reaccionaron frente a *Borrelia burgdorferi*, independientemente de la técnica utilizada, se descartó la reacción cruzada con sífilis y con factor reumatoide.

1.3.1. RESULTADOS DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

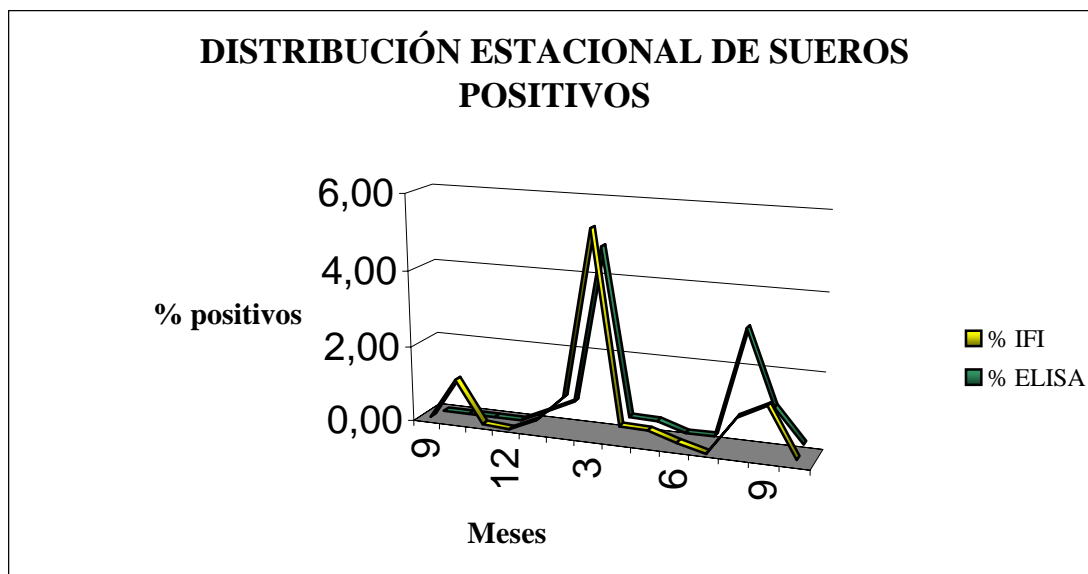
Cuando el límite de positividad para IgG lo imponíamos en la dilución 1/64, los sueros que reaccionaron fueron 36 (9.2%), 32 de los recogidos al azar (8.5% de prevalencia), 3 con sintomatología compatible y 1 picado por garrapatas (25% de prevalencia). Sin embargo, cuando el punto de corte era el título 128, el porcentaje de positividad disminuyó al 4.3% (17 sueros reactivos, 16 de los recogidos al azar y 1 de persona con sintomatología compatible). La seroprevalencia observada fue mayor en hombres (25) (16.7%) que en mujeres (11) (4.6%), encontrándose los títulos más altos (256) en los primeros.

1.3.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA INDIRECTO.

Por esta técnica sólo se analizaron los 375 sueros recogidos al azar durante los dos primeros años del estudio (1994-1995).

En este caso la seroprevalencia observada fue del 8.3% (31 sueros). También en este caso la prevalencia encontrada fue superior en hombres (12.7%) que en mujeres (5.6%).

Por ambas técnicas (IFI y ELISA indirecto) la distribución estacional de los positivos presentó dos máximos, uno en Julio-Septiembre y otro en Marzo.



1.3.3. COMPROBACIÓN DE LOS RESULTADOS ANTERIORES POR INMUNOBLOT.

Sólo uno de los 160 sueros que se analizaron por esta técnica se consideró positivo, dando una prevalencia total del 0.26%. En este suero se apreciaron además de bandas específicas (94 KDa, 71-60 KDa, 41 KDa, 39 KDa, 34 KDa, 31 KDa y 29 KDa) una doble banda de 84 KDa. Esta doble banda también estaba presente en un 36% de los sueros negativos. Un 46% desarrolló reactividad frente a un grupo de 4-5 bandas de entre 30-44 KDa.

Este suero pertenecía a una mujer que había resultado positiva por IFI, con un título de 128, y dudosa por ELISA. Era uno de los 375 sueros recogidos al azar.

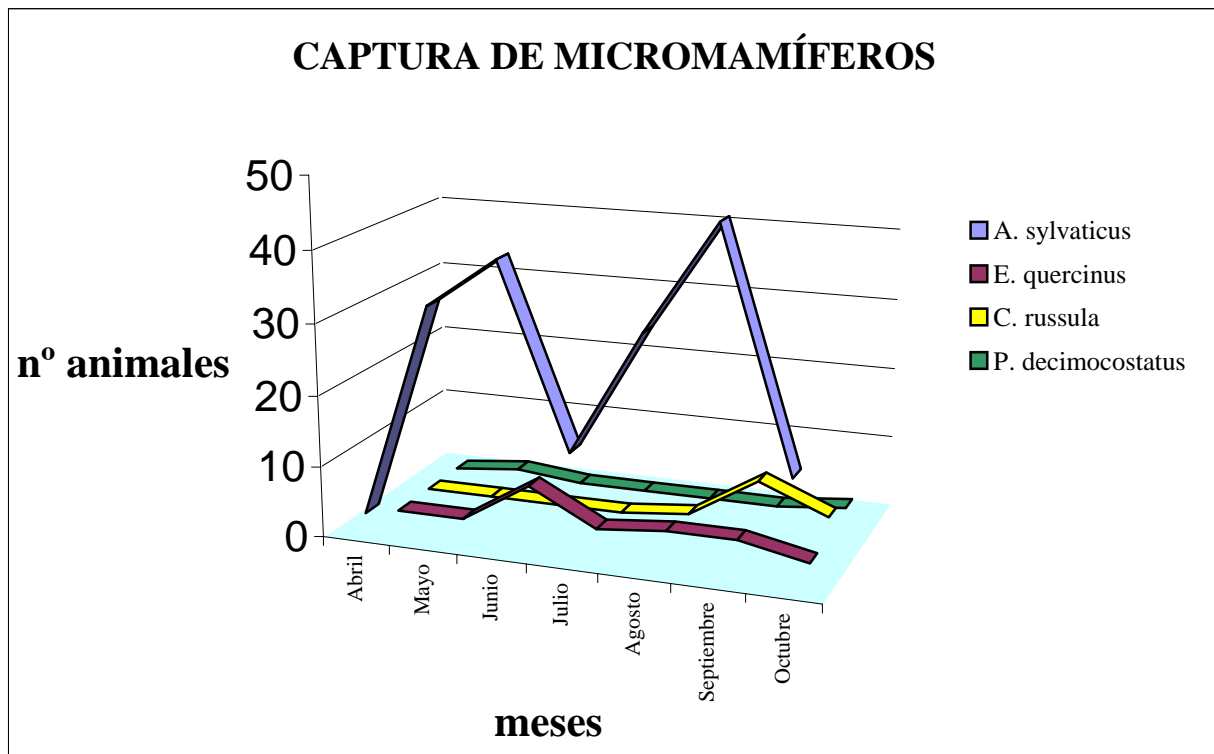
1.3.4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON SÍFILIS Y FACTOR REUMATOIDE.

Todos los sueros que fueron reactivos por IFI y/o ELISA fueron negativos a estas dos enfermedades producidas por otras espiroquetas.

2. ESTUDIO DEL HOSPEDADOR RESERVORIO.

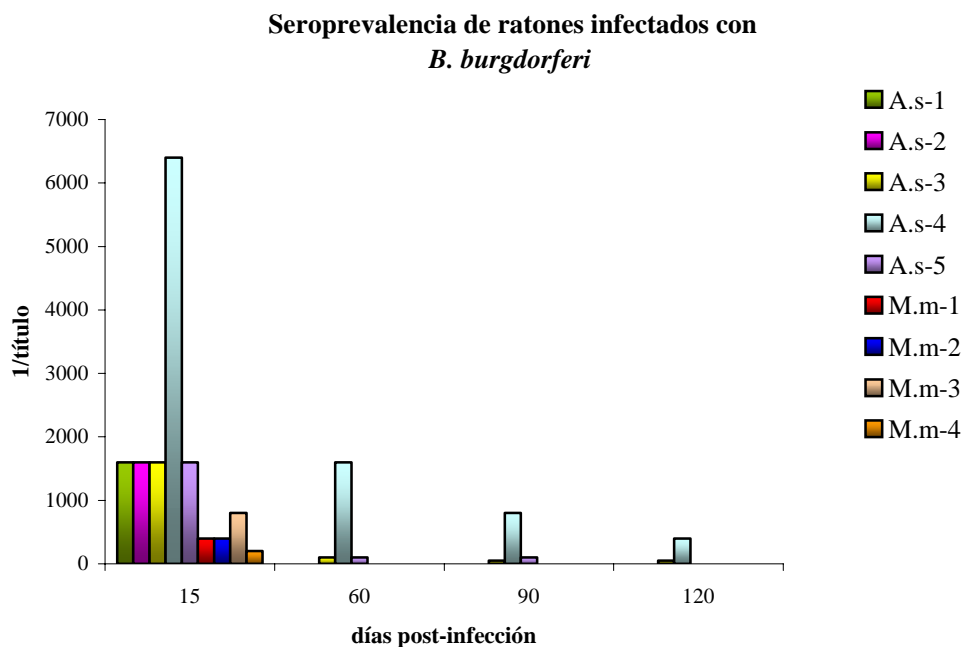
Durante 1995 se capturaron un total de 209 animales: 88.5% (185) ratones de campo, *Apodemus sylvaticus*; 5.3% (11) lirones careto, *Eliomys quercinus*; 5.3% (11) musarañas, *Crocidura russula* y 0.9% (2) topillos, *Pitymys decimocostatus*. En 1996 y 1997 todos los pequeños mamíferos que se capturaron fueron ratones de campo (46 y 11, respectivamente).

	1995	1996	1997	TOTAL
Ratones de campo	185	46	11	242
Lirones caretos	11	0	0	11
Musarañas	11	0	0	11
Topillos	2	0	0	2
TOTAL	209	46	11	266



2.1. EFICACIA DE LOS CONJUGADOS ANTI-IG G DE *MUS MUSCULUS* PARA RATONES DE CAMPO (*Apodemus sylvaticus*).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando el conjugado comercial anti-Ig G de *Mus musculus* marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc.) resultó eficaz para detectar los anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en *A. sylvaticus*. El día 15 post-inoculación todos los ratones fueron positivos, si bien el título de los ratones de campo (de 1600 a 6400) fue superior al de *Mus musculus* C3H usados de control (de 400 a 800).

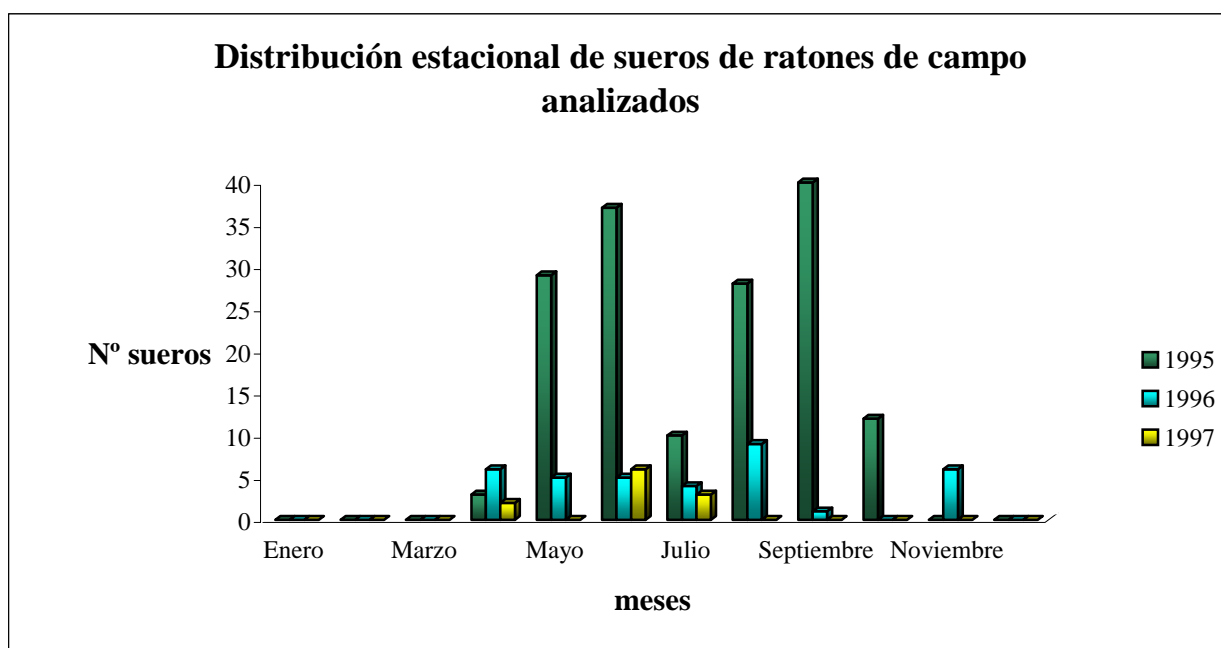


Dos meses después de la inoculación ninguno de los ratones control presentaron anticuerpos frente a la espiroqueta, en tanto que 3 de los 5 ratones de campo continuaron siendo positivos hasta 3 meses después. El día 120 post-inoculación, 2 *Apodemus sylvaticus* seguían manteniendo título.

Para comprobar si el conjugado comercial anti-Ig G de *Mus musculus* marcado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, Inc.) era igualmente efectivo, los sueros fueron también analizados por ELISA indirecto comprobándose, de este modo, la validez de la técnica.

2.2. ESTUDIO SEROLÓGICO DE LA POBLACIÓN DE MICROMAMÍFEROS CAPTURADA EN LA SIERRA DE GUADARRAMA.

Una vez demostrada la eficacia del conjugado comercial, analizamos un total de 206 sueros de ratones de campo. De ellos, 159 se recogieron en 1995, 36 en 1996 y 11 en 1997, mostrando la siguiente distribución por meses:



En 1995 y 1996 se recapturaron 22 y 8 *Apodemus sylvaticus* respectivamente. Estos 30 animales recapturados no se sangraron, al haberse obtenido suero el día anterior, en su primera captura.

2.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

Se consideraron positivos los sueros que presentaban un título igual o superior a 64 para Inmunoglobulina G.

Ninguno de los sueros analizados de los ratones de campo (*A. sylvaticus*) capturados fue positivo.

2.2.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA INDIRECTO.

De los 159 sueros analizados en 1995, sólo 2 ratones, uno capturado en el mes de Junio y otro en Julio, presentaron una moderada reactividad, resultando una seroprevalencia del 1.2%.

En 1996 se estudiaron 36 sueros, resultando una seroprevalencia del 30.5% (4 ratones positivos en el mes de Abril, 2 en Mayo, 2 en Junio y 3 en Agosto).

En 1997 se analizaron 11 sueros, siendo todos ellos negativos.

La seroprevalencia total fue del 6.3%.

2.2.3. COMPROBACIÓN DE LOS RESULTADOS POR INMUNOBLOT.

Se consideraron aquellos sueros de ratones positivos cuando reconocían al menos 3 proteínas específicas de *Borrelia burgdorferi*, o cuando una de ellas era la P39 (respuesta

temprana a la infección activa por *B. burgdorferi*, como ocurre para el reservorio de esta infección en Norteamérica, *Peromiscus leucopus*.

Ninguno de los sueros que habían resultado positivos o dudosos por ELISA o IFI mostraron bandas específicas a *Borrelia burgdorferi* cuando se analizaron por inmunoblot.

3. ESTUDIO DEL VECTOR *Ixodes ricinus*.

3.1. ESTACIONALIDAD DEL CICLO BIOLÓGICO DE LOS IXÓDIDOS EN LA SIERRA DE GUADARRAMA.

Las garrapatas identificadas en la zona de estudio fueron:

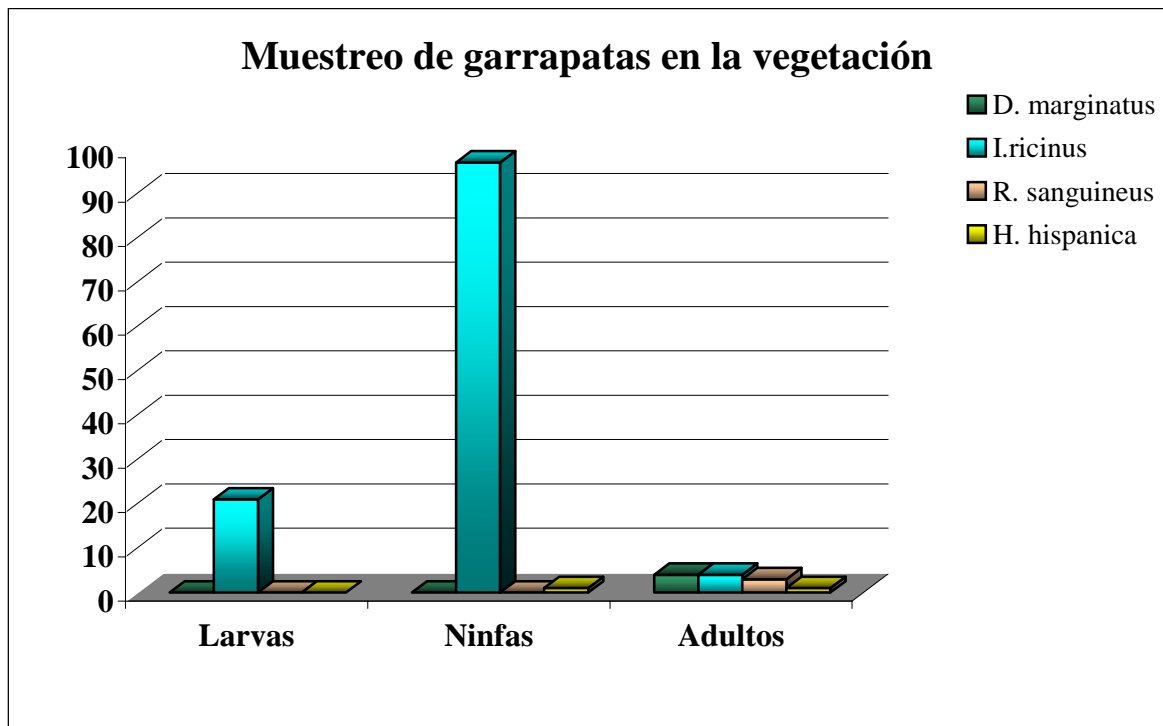
- *Dermacentor marginatus* (59.2%)

- *Ixodes ricinus* (39.1%)

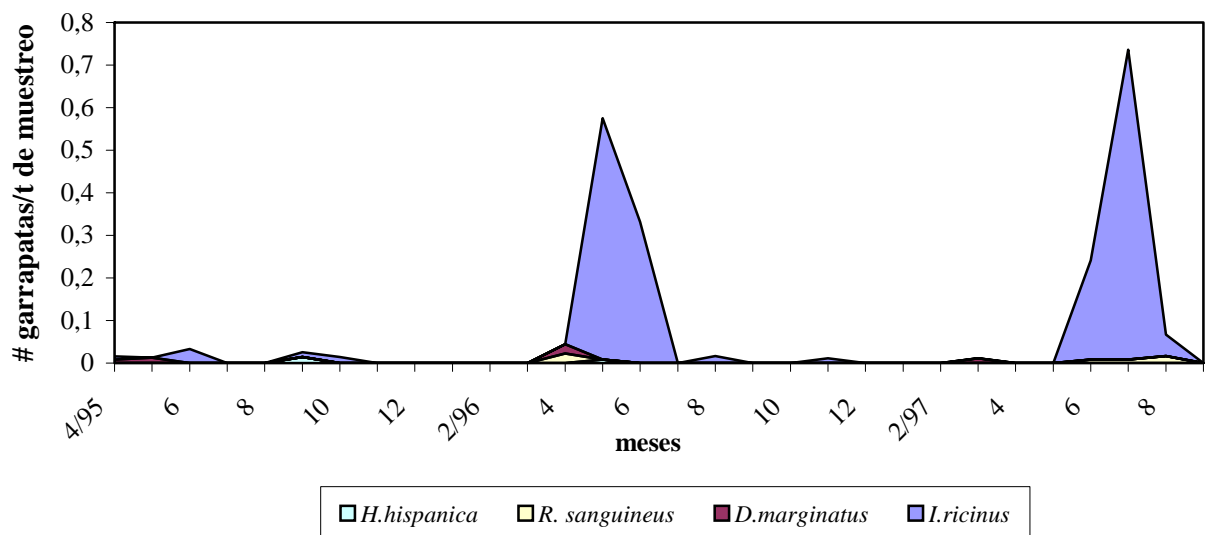
- *Rhipicephalus sanguineus* (1.1%)

- *Haemaphysalis hispanica* (0.6%)

En el muestreo de garrapatas de la vegetación, la especie más numerosa fue *I. ricinus* (92.2%), observándose sólo ocasionalmente *D. marginatus* (3.1%), *R. sanguineus* (3.1%) y *H. hispanica* (1.6%). Las larvas de *I. ricinus* se recogieron de mayo a julio, las ninfas de abril a septiembre y los adultos, aunque en bajo número, de junio a noviembre. Sólo se recogieron adultos de *D. marginatus* de marzo a mayo, de *R. sanguineus* en abril y de junio a agosto, y de *H. hispanica* una ninfa en septiembre y una hembra en mayo.

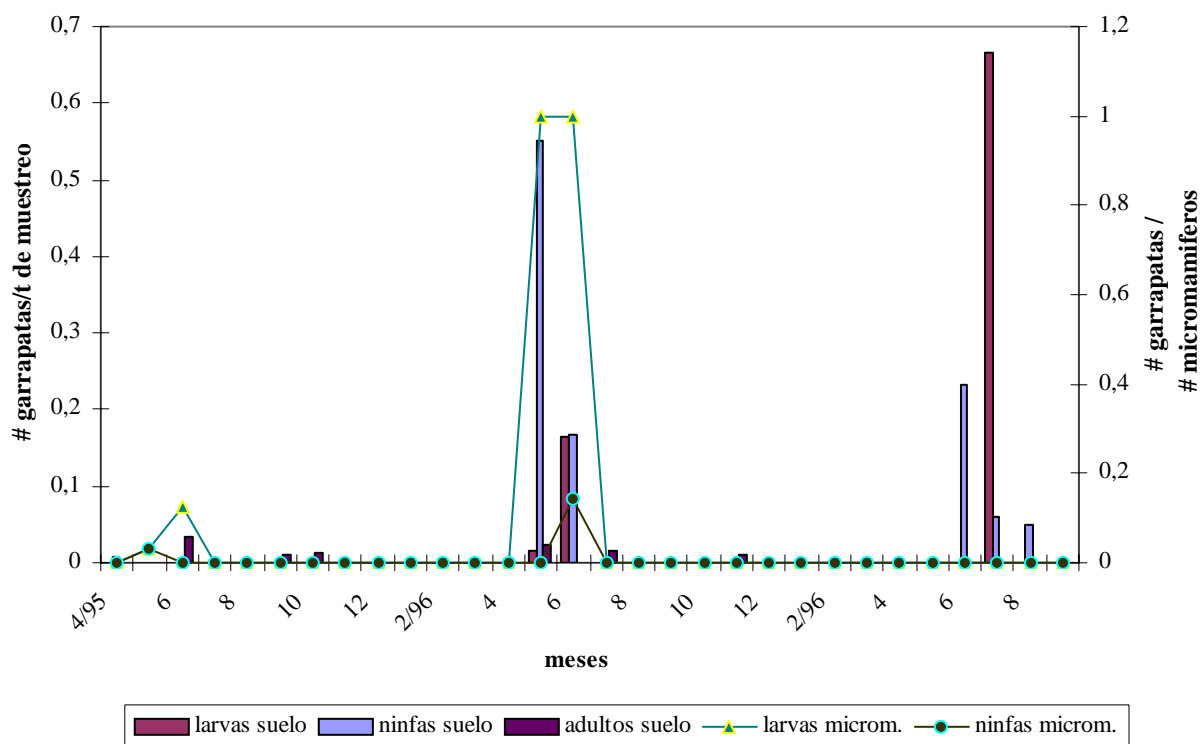


Distribución estacional de los ixódidos recogidos de la vegetación en la Sierra del Guadarrama



En el muestreo de garrapatas sobre micromamíferos (*Apodemus sylvaticus* y *Elyomys quercinus*), sólo se recogieron estadios inmaduros de *D. marginatus* (90.8%) e *I. ricinus* (9.2%). El índice de parasitación de estos animales fue del 16.2%, siendo del 10.3% en los ratones de campo y del 50% en los lirones careto. Tanto las larvas como las ninfas de *I. ricinus* se presentaron sobre estos hospedadores en los meses de mayo y junio, las larvas de *D. marginatus* de junio a agosto y las ninfas de junio a septiembre.

Distribución de *I. ricinus* en la Sierra del Guadarrama



Se capturaron, durante el mes de mayo, 30 lagartijas colilargas (*Psemmodromus algirus*), de las que 13 presentaban garrapatas.

Todas las garrapatas que de ellas se desprendieron eran estadios inmaduros de *I. ricinus*, siendo su proporción de 81% ninfas (17) y 19% larvas (4). Sólo los machos de estas lagartijas eran los que estaban infestados.

3.2. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA DE GARRAPATAS.

Los ejemplares vivos de garrapatas se analizaron para detectar agentes en su interior. La infección por espiroquetas se detectó mediante inmunofluorescencia directa en 105 garrapatas, 67 alimentadas en pequeños mamíferos, 17 alimentadas sobre lagartijas y 21 recogidas de la vegetación.

	LARVAS	NINFAS	ADULTOS
<i>I. ricinus</i>	14	27	5
<i>D. marginatus</i>	45	8	5
<i>R. sanguineus</i>	-	-	1

Al observar las preparaciones al microscopio de campo oscuro se vieron espiroquetas en el intestino medio de 2 machos de *I. ricinus* recogidos de la vegetación y de 2 ninfas también de *I. ricinus* alimentadas sobre lagartijas. La prevalencia por esta técnica fue de 3.8% del total de garrapatas analizadas y de 8.7%, considerando sólo *I. ricinus*.

4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *B. burgdorferi* DE MICROMAMÍFEROS Y DE GARRAPATAS.

Del total de 266 micromamíferos capturados, se tomaron 115 biopsias de oreja, correspondiendo un 94.8% a *Apodemus sylvaticus* y un 5.2% a *Eliomys quercinus*. Al cultivarlos, todos ellos fueron negativos, por lo que no se pudo caracterizar ninguna cepa de *B. burgdorferi*.

Del mismo modo, todos los cultivos que se hicieron del intestino medio de las 105 garrapatas analizadas por inmunofluorescencia directa fueron negativos, no pudiéndose caracterizar, tampoco en este caso, ninguna cepa de esta espiroqueta.

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO SEROLÓGICO DE LA POBLACIÓN ANIMAL Y HUMANA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA.

1.1. POBLACIÓN CANINA.

Los resultados de seroprevalencia canina frente a *Borrelia burgdorferi* por la técnica de IFI (35.8%) han presentado valores mayores a los de otros estudios similares realizados también en la Comunidad de Madrid, que citan prevalencias que van desde el 11.5% (Tesouro y cols., 1995) hasta el 30% (Caride y cols., 1996). Pero, contrariamente a lo que podría suponerse, son también más altos que los obtenidos en las provincias de Soria (Saz y cols., 1995b) o de León (Rojo Vázquez, 1997), con un 16.4% y un 2.1% respectivamente.

Estos hechos podrían deberse, como sugirieron Anda y cols. (1996), a la presencia, en la zona centro y sur de la Península Ibérica, de otras espiroquetas que reaccionarían cruzadamente con los microorganismos del género *Borrelia* (Magnarelli y cols., 1987a; Magnarelli, 1988).

La elevada seroprevalencia de este estudio obtenida utilizando la técnica de IFI, fue confirmada también por la técnica de ELISA (36.8%). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por el equipo empleando idéntico protocolo en distinta población canina (35%) (Caride y cols., 1996). Sin embargo, utilizando técnicas comerciales (CITE^R (IDDEX) de Fort Dodge Veterinaria, S.A.), la seroprevalencia descendió hasta el 1% (Olmeda y cols., 1991). La alta sensibilidad y menor especificidad del ELISA utilizado en este estudio podría justificar esa elevada seroprevalencia.

Al comparar los resultados de ambas técnicas, sólo un 12.7% (26 sueros) fueron positivos a ambas, y sólo un 35.3% (72 sueros) coincidieron en su negatividad, lo que corrobora nuestra hipótesis de que existieron reacciones cruzadas a otros agentes muy cercanos antigénicamente, y que forman parte de su microflora intestinal, como *Serpulina hyodysenteriae* y *E. coli*, u otros patógenos importantes como *L. interrogans* (Pindak y cols., 1965; Meier y cols., 1982; Gitton y cols., 1994). Es posible que también pudieran deberse a reacciones post-

vacunales a leptospirosis, si bien este punto no pudo confirmarse por falta de datos.

Cuando los sueros se analizaron por inmunoblot, se confirmó que la mayoría de los que habían resultado positivos a una de los dos técnicas anteriormente citadas, se debían a reacciones cruzadas. Estos resultados están en perfecta concordancia con los obtenidos por Wittenbrink y cols. (1996), ya que tan sólo dos mostraron bandas específicas frente a *B. burgdorferi*. Así, además de reaccionar frente a la flagelina y frente a un antígeno de alto peso molecular de 96-93 KDa, presentaron una banda de 73 KDa, que podría corresponderse con la citada por Gauthier y Mansfield (1996), y otra de 66 KDa, descrita por Greene y cols. (1988a). De igual modo, respondieron frente a la proteína p39, considerada de un alto potencial diagnóstico (Barthold y cols., 1995), si bien frente a esta misma proteína de 39 KDa, también reaccionaron otros dos sueros cuyo patrón no se ajustaba exactamente a la referencia de positividad.

Uno de los sueros reaccionó frente a los antígenos OspB (34 KDa) y OspA (31 KDa), lo que sugiere que el animal podría haber sido inmunizado frente a esta bacteria, a la vez de haber estado expuesto, de forma natural, a la infección (Appel y cols., 1993; Gauthier y Mansfield, 1996).

En alguno de los sueros negativos observamos, al igual que otros autores (Wittenbrink y cols., 1996), una ligera reacción con bandas proteicas únicas en las regiones de 60 y 41 KDa. Esta última podría deberse a flagelinas de *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium* (Wallich y cols., 1990). Otros sueros lo hacían en las regiones de 94, 66 y 22-20 KDa, como reacción a otros microorganismos.

Concluyendo, diremos que, aunque la población canina esté expuesta al agente de la borreliosis de Lyme, no es, a la vista de nuestros resultados, un proceso de elevado riesgo en la zona de estudio.

1.2. GANADO VACUNO.

La seroprevalencia obtenida al analizar los sueros de esta población animal por IFI (23%) presentó valores intermedios al compararla con la publicada por otros autores en la provincia de Huesca (30.6%) (Ferrero y cols., 1995) y en Andalucía (10.1%) (Caride y cols., 2000), en tanto que por ELISA (11.9%) fue superior a la detectada en esta última región (Caride y cols., 2000).

Sin embargo, ninguno de los sueros resultó reactivo mediante la técnica de inmunoblot, al aplicar los criterios de positividad de Ji y cols. (1994), ya que aunque diez sueros reaccionaron frente a la proteína de 41 KDa, no especie-específica (Ji y cols., 1994) al estar también presente en otras especies de *Borrelia*, como son *B. theileri*, recientemente descrita en Extremadura (Habela y cols., 2000c), y *B. coriaceae*, agente causal de aborto enzoótico bovino (Callow y Hoyte, 1961; Burgess y cols., 1987; Wells y cols., 1993).

Por otra parte, los resultados negativos de infestación por ixódidos en la población vacuna, deben ser analizados con precaución, ya que si bien el período de recogida de los mismos (septiembre-noviembre) coincidiría con la época de actividad de los adultos de *I. ricinus* (Habela y cols., 2000a), el año en que se realizó el muestreo, 1995, fue el último de un gran período de sequía que habría mermado la población del vector en la zona de estudio.

Por lo tanto, podemos concluir que tanto la infección con *B. burgdorferi*, como el vector estuvieron ausentes en la zona y período de estudio.

1.3. POBLACIÓN HUMANA.

Al analizar el grado de contacto de la población de la zona de estudio con el agente de la enfermedad de Lyme por IFI, los resultados se mantuvieron dentro de los límites presentados por otros autores en diferentes regiones del país (López Prieto y Borobio, 1989; Oteo y cols., 1992; Gegúndez y cols., 1995; Jiménez y cols., 1995; Ranilla y cols., 1995; Saz y cols., 1995b; Rojo Vázquez, 1997; Gironés y cols., 1998; Lledó y cols., 1998), pero, como es lógico suponer,

ascendieron al 25% en las muestras remitidas por padecer sintomatología compatible o por picadura de garrapata.

Al poner el punto de corte en el título 128 (Oteo y cols., 1992; Barranquero y cols., 1994; Rojo Vázquez, 1997), la seroprevalencia disminuyó a un 4.3%, resultando que está dentro de los rangos observados por otros autores en La Rioja (5.8% -Oteo y cols., 1992-) y León (4.08% - Rojo Vázquez, 1997-).

En un estudio realizado en la provincia de Soria, se encontró una prevalencia de infección del 18.9% usando como antígeno la cepa B-31 de *B. burgdorferi* (Merino y cols., 1993), y considerando una muestra como positiva cuando presentaba reactividad a una dilución igual o superior a 1/256 (Russell y cols., 1984; Merino y cols., 1993; Saz y cols., 1994; 1995b; Gegúndez y cols., 1995; Jiménez y cols., 1995; Ranilla y cols., 1995; Gironés y cols., 1998; Lledó y cols., 1998; Núncio, 2000). En nuestro caso, sólo 3 sueros recogidos en 1995 presentaban un título superior al mencionado, lo que correspondería a una seroprevalencia total de 0.8%, más baja a la encontrada por los autores citados que utilizan este punto de corte.

Al contrario de lo observado por otros autores (Merino y cols., 1993) la mayor seroprevalencia correspondió, en nuestro estudio, a la población masculina, lo que fue atribuido a la actividad laboral fuera de casa y más concretamente en el bosque, ya que, como otros autores han indicado (Arteaga y García-Moncó, 1999), el máximo riesgo corresponde a profesiones como pastor o apicultor.

El análisis de los resultados de los sueros evaluados mediante ELISA (8.5%) arrojó datos muy similares a los obtenidos por IFI con un punto de corte en la dilución 1/64, aunque fue inferior a la obtenida por otros autores españoles en Granada, cercana al 13% (Núñez y cols., 1995).

La distribución estacional de seropositivos por ELISA e IFI, con picos en julio-septiembre y marzo, nos hizo pensar en su relación con una hipotética actividad de las garrapatas. En verano, este aumento podría deberse a la picadura de ninfas infectadas, mientras que a comienzos de la primavera podría corresponder a la alimentación de los adultos.

Sin embargo, y aunque la disparidad en el rango de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* encontrados en distintas regiones geográficas podría ser debida a diferencias en las técnicas serológicas empleadas, consideramos que la existencia de reacciones cruzadas con otras espiroquetas y microorganismos, patógenos o no, podría haber afectado estos resultados, de tal manera que deberían ser analizados con cautela (Rojo Vázquez, 1997). Así, de acuerdo con otros autores (Grodzicki y Steere, 1988; Telford y Fikrig, 1995), todos los sueros positivos o dudosos por una o ambas técnicas fueron analizados por inmunoblot.

Según nuestros resultados, sólo una de las muestras sospechosas se confirmó subsecuentemente como positiva por inmunoblot. Estos datos son inferiores a los encontrados por Gutiérrez y cols. (1995), al comparar sus resultados de ELISA e inmunoblot. Estos autores hallan una prevalencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* por ELISA del 16.4%, de los cuales, el 8.2% fueron positivos por inmunoblot. Sin embargo, esta diferencia es fácilmente justificable, ya que los sueros provenían de pacientes con clínica compatible.

Entre las bandas observadas en el único suero que consideramos positivo destacan, por su marcada especificidad, la de 39 KDa y la presencia conjunta de las 31-34 KDa. La visualización de estas dos bandas así como la de 94 KDa (Zoller y cols., 1991) y la ausencia de las de menor peso molecular (20-22 KDa) (Wilske y cols., 1986), confirmaron el carácter crónico del proceso (Ma y cols., 1992). Por otra parte, las bandas no específicas observadas en un elevado número de sueros podrían ser responsables de las reacciones cruzadas detectadas mediante ELISA e IFI.

De hecho, el patrón de bandas entre 44 y 30 KDa que aparece en un 46% de los sueros estudiados, podría corresponderse con polipéptidos flagelares de distintas espiroquetas intestinales, como *Serpulina* spp. (Sellwood y Bland, 1997) o a infecciones orales por *Treponema* spp. (Ma y cols., 1992). La ausencia de bandas características del género *Borrelia* hizo innecesario el análisis de los sueros frente a otras cepas distintas de *B. burgdorferi sensu lato*.

Aunque *B. burgdorferi* está presente en la población humana de Cercedilla (0.26%), parece que hay otro agente fuertemente relacionado mucho más seroprevalente (8.5% por IFI y 8.3% por ELISA). Al contrario de lo que ocurre en Estados Unidos, donde técnicas como IFI y ELISA tienen cierto valor diagnóstico, en nuestra zona de estudio su utilidad es muy limitada, y los sueros reactivos deben ser analizados por técnicas más específicas.

2. ESTUDIO DEL HOSPEDADOR RESERVORIO.

En nuestra zona de estudio, el micromamífero más abundante resultó ser el ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, seguido a mucha distancia por lirones caretos, *Eliomys quercinus*, musarañas, *Crocidura russula*, y topillos, *Pitymis decimocostatus*. Por otra parte, no se capturaron individuos de los géneros *Microtus*, *Rattus* y *Sorex*, identificados por otros autores en el País Vasco (Gil y cols., 2000a).

En otros lugares de Europa donde se ha estudiado el ciclo enzoótico de *Borrelia burgdorferi*, como en los Países Bajos, la composición de su fauna en relación a los pequeños mamíferos es ligeramente distinta a la nuestra, estando dominada por 3 especies: el ratón de campo, *A. sylvaticus*, el topillo de la rivera, *Clethrionomys glareolus*, y las musarañas, *Sorex araneus* y *S. coronatus* (De Boer y cols., 1993).

Una vez que se confirmó la eficacia de las técnicas serológicas para la detección de anticuerpos en ratones de campo durante 120 días post-infección, se comprobó que ninguno de los animales capturados en la zona de estudio resultó positivo. Esto difiere de los resultados

obtenidos por Ruiz y cols. (1998) en la provincia de Toledo, que obtienen una seroprevalencia por IFI del 25.4%, aunque el punto de corte utilizado por estos autores fue inferior al nuestro.

Sin embargo, por ELISA la seroprevalencia fue del 6.3%, pero en ninguno de los dos casos la reacción resultó específica al ser analizada por inmunoblot.

La ausencia de infección en los ratones de campo, reservorios del agente, puede ser debida a la baja intensidad de transmisión de la espiroqueta o a la presencia, en la zona, de otros hospedadores de las garrapatas, ya que aunque *I. ricinus* estuvo presente en los ratones, no fue la especie más abundante. Por el contrario, las lagartijas muy abundantes en todo el área de estudio, presentaron elevadas infestaciones por los estadios inmaduros de *I. ricinus*. Estos reptiles no pueden infectarse, pero al servir de hospedadores de la garrapata, evitan que los ratones se infecten, rompiendo el ciclo de mantenimiento del agente en el medio (Lane, 1990). Por lo tanto, a la vista de los resultados, parece que la abundancia de lagartijas en la zona protege, de forma indirecta, a la población animal y humana de la enfermedad de Lyme, al inhibir la transmisión (Matuschka y cols., 1991).

3. ESTUDIO DEL VECTOR POTENCIAL.

3.1. ESTACIONALIDAD DEL CICLO BIOLÓGICO DE LOS IXÓDIDOS EN LA SIERRA DE GUADARRAMA.

Como era de esperar, *I. ricinus* fue la especie de garrapata más frecuente en la vegetación, aunque la intensidad no alcanzó los valores de otras provincias españolas (Gil y cols., 2000a). Esto es debido a que, aunque el hábitat de la zona se ajuste a los requerimientos de la especie (Barral y cols., 1994) y aunque las zonas boscosas proporcionen protección (Gray, 1981), la humedad relativa durante el período de estudio fue muy variable, no alcanzando, en ocasiones, los valores mínimos necesarios. Asimismo, hay que tener en cuenta que la vegetación existente, con abundancia de helechos, zarzamoras y majuelos, dificultaba la recogida con la técnica de la bandera, que debía limitarse a los claros del bosque, donde la acción directa del sol y la

deseccación limitarían su actividad (Barral y cols., 1994).

A pesar de ello, y aunque la población fue residual en las épocas climáticamente más duras, se recogieron ejemplares durante todo el año, salvo en los meses de invierno, cuando la nieve cubría el terreno. En zonas de clima más suave, como el Parque Nacional de Doñana, es en los meses de otoño e invierno cuando *I. ricinus* presenta mayor actividad (Habela y cols., 2000b).

Los estadios inmaduros presentaron una actividad muy estacional circunscrita a los meses de primavera y principios de verano, con pequeñas variaciones dependiendo de las condiciones climáticas del año de estudio.

Así, Barral y cols. (1994) encontraron que los 3 estadios de *I. ricinus* estuvieron activos en la vegetación durante todo el año, alcanzando las ninfas un máximo en mayo, y las larvas 2 máximos, en mayo y julio. Este resultado es muy significativo, ya que incluso con métodos de muestreo más intensivos, en otras localidades europeas la actividad ha estado restringida, como en nuestro caso, a unos meses determinados (Gray, 1984; Pérez-Eid, 1989).

La misma supeditación a las variables climáticas de cada año se ha observado en otros países de Europa, de ahí la dificultad de generalizar la actividad de *I. ricinus*, lo que establece la necesidad de realizar estudios en cada área concreta.

Las siguientes especies, en abundancia, que encontramos en la vegetación fueron *D. marginatus* y *R. sanguineus*, ambas con un 3.1% de proporción, y hallándose únicamente adultos, de *Dermacentor* de marzo a mayo y de *Rhipicephalus* en abril y de junio a agosto. También Barral y cols. (1994) recogieron sólo adultos de estas dos especies, observándose claras diferencias estacionales en cuanto a la época de presentación de ambos géneros. *Rhipicephalus* hizo su aparición durante los meses de primavera y verano, *Dermacentor* en invierno y otoño, pues según Sonenshine (1978) están más activos en los días de corta duración. Mientras que *R. sanguineus* restringió su presencia a los meses de primavera, *R. bursa* se

detectó desde el mes de abril hasta julio. *Dermacentor marginatus* se encontró únicamente los meses de enero y febrero y *D. reticulatus* entre los meses de septiembre y noviembre, y marzo (Barral y cols., 1994).

Por su parte, *Rhipicephalus sanguineus*, aunque puede parasitar a otras especies, suele encontrarse infestando perros y está adaptada a ciclos periurbanos, por lo que es lógica su limitada distribución en la zona de estudio.

Por último, *Haemaphysalis hispanica* fue la especie más escasa que recogimos utilizando la técnica de la bandera, representando un 1.6% de las capturas, con una ninfa en septiembre y un adulto en mayo. Dadas las características de esta especie como endófila estricta, que lleva a que todo su ciclo se desarrolle en el interior de madrigueras, el dato tiene cierto valor. En el País Vasco, *H. hispanica* sólo estuvo presente en primavera y en agosto (Barral y cols., 1994).

La gran variabilidad climática del período de estudio en el área de la Sierra de Guadarrama hace más interesante el análisis de los datos de forma anual. 1995 fue el último año de la sequía que afectó a la Península durante una década. En estas condiciones las ninfas de *I. ricinus* sólo pudieron observarse a principios de primavera (abril-mayo) y en bajo número, y las larvas en mayo y junio. El calor y la baja humedad favorecieron ese año la presencia de *D. marginatus*, cuyos estadios inmaduros parasitaron de forma masiva a los micromamíferos de mayo a septiembre. En el segundo año, que podría considerarse como húmedo, los estadios inmaduros de *Ixodes* spp. fueron mucho más numerosos durante los meses de mayo y junio. Con respecto al año anterior las ninfas retrasaron su aparición un mes siendo aún 15 días más precoces que las larvas. Finalmente, las condiciones climáticas de 1997, cálido y relativamente seco en invierno y frío y húmedo en verano, motivaron el retraso en la aparición de ninfas de *Ixodes* hasta junio-agosto y de las larvas hasta julio.

Mientras en nuestra zona la baja humedad fue limitante de *I. ricinus*, como ya se describiera por otros autores (Soulsby, 1982; Urhquart y cols., 1987; Gray, 1991), en el País Vasco es el exceso de lluvia lo que provoca una disminución de actividad.

Contrariamente a lo que a priori era de suponer la especie más abundante sobre roedores fue *D. marginatus* (90.8%), con una actividad verano-otoñal. *I. ricinus* sólo se presentó en un 9.2% de los animales en los meses de mayo y junio, coincidiendo con el primer pico de actividad de larvas en Suiza (Humair y cols., 1993a).

El aumento más pronunciado de larvas detectado por estos autores se produce dos meses después del hallado por nosotros debido, seguramente, a la climatología más fría de ese país. Lo mismo ocurre con la actividad de las ninfas.

Los resultados del muestreo de *I. ricinus* en la vegetación y sobre micromamíferos confirma que su ciclo de vida dura 2 años. La conclusión del análisis de datos confirma que la temperatura es el estímulo para el comienzo de la actividad, mientras que la supervivencia depende de la humedad. En nuestra área de estudio, las ninfas sólo son activas durante 1-2 meses en primavera-verano y las larvas 15 días-1 mes más tarde. Como el estadio ninfal es el principal vector de enfermedades transmitidas por garrapatas al hombre, el único período de riesgo de contraer estas enfermedades en la Sierra de Guadarrama sería la primavera o, según la humedad, el verano. En zonas más húmedas y templadas de España (País Vasco), por el contrario las ninfas están activas durante todo el año (Barral y cols., 1994). En esta Comunidad Autónoma la presencia máxima de ixódidos se detectó en primavera y verano, con elevaciones más importantes en mayo y agosto.

Durante 1995, último año de sequía, el número de *Ixodes* fue muy bajo incrementándose paulatinamente en años sucesivos, aunque no se pudo valorar la verdadera intensidad de este aumento, debido a la larga duración de su ciclo biológico (2 años). No se sabe el efecto que los cambios climáticos que se están experimentando, pueden tener en la zona. Quizás la llegada de períodos lluviosos provoque el aumento de los ixódidos por encima de niveles tolerables, siendo

de especial interés aquellos trabajos que determinen las variaciones de la población.

3.2. INFECCIÓN DE *Ixodes ricinus*.

En nuestro caso, y por inmunofluorescencia directa (una de las técnicas que recomienda EUCALB (1997) para el diagnóstico en garrapatas), la prevalencia fue inferior a 8.7% de las garrapatas *I. ricinus* analizadas, lo que corresponde al 40% de adultos y al 7.4% de ninfas investigadas, resultado que contrasta con el descrito en el País Vasco (1.5% para adultos y 0.4% para ninfas) (Barral y cols., 1997). En otro estudio posterior realizado también en esa región geográfica, se encontraron unos porcentajes de infección en *I. ricinus*, por PCR, del 10.5% en los adultos y del 2.6% en ninfas para la enfermedad de Lyme (Gil y cols., 2000b). Los datos obtenidos por estos autores en el País Vasco tienen mucho mayor valor epidemiológico, al haber analizado un elevado número de muestras.

Nuestros resultados de prevalencia están muy próximos a los encontrados en otros lugares de Europa por Hubálek y cols., 1990, aunque estos autores hallan prevalencias superiores en hembras, dato que contrasta con el nuestro, puesto que sólo observamos espiroquetas en dos machos.

De todas las garrapatas analizadas que se encontraron sobre pequeños mamíferos, no se halló ninguna que albergara *Borrelia* spp. en su intestino medio. Esto contrasta con los resultados que obtienen otros autores, que encuentran prevalencias del 14% en larvas y del 50% en ninfas en Suiza (Humair y cols., 1993a).

Aunque en la Sierra de Guadarrama concurren todos los elementos para que se mantenga el ciclo enzoótico del agente de la enfermedad de Lyme, la intensidad de transmisión durante el período de tiempo estudiado (1994-1999) es lo suficientemente baja para que no constituya un riesgo en la población que visita la zona. No obstante, cualquier cambio, ya sea climático o producido directamente por el hombre, puede romper este precario equilibrio.

4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Borrelia burgdorferi* DE MICROMAMÍFEROS Y DE GARRAPATAS.

Como era de esperar, y a la vista de los resultados serológicos, no se aisló ninguna espiroqueta de micromamíferos ni de garrapatas, lo que confirma los resultados anteriores.

La ausencia de aislamientos conseguidos, tanto en reservorios como en garrapatas, nos lleva a pensar que, en la Sierra de Guadarrama puedan existir otras especies silvestres, en las que las genoespecies existentes se encuentran mejor adaptadas y que estén desempeñando el papel de reservorio de *B. burgdorferi* (Humair y cols., 1998). Para la comprobación de esta hipótesis sería necesaria la captura de un número mayor de micromamíferos en estas zonas así como de otras especies silvestres como, por ejemplo, aves. Por otro lado, la baja parasitación de ninfas encontrada en los micromamíferos, tal como describen otros autores (Gray y cols., 1999), puede suponer un freno en la amplificación de la enfermedad en estos animales.

CONCLUSIONES

1. Debido a su baja especificidad, las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de enzimo-inmunoensayo indirecto tienen una escasa aplicación en estudios epidemiológicos de la enfermedad de Lyme en la zona de estudio.
2. *Ixodes ricinus*, el vector de *Borrelia burgdorferi*, mantiene su ciclo biológico en la zona de estudio con una duración media de 2 años. El comienzo de la actividad de los distintos estadios depende de la temperatura, mientras que la humedad es la responsable de la viabilidad. Las ninfas están activas durante dos meses en primavera-verano, las larvas de 15 a 30 días más tarde. El riesgo de la adquisición de una infección transmitida por garrapatas en esta zona en el hombre se reduce al periodo de actividad de las ninfas, desde abril a agosto.
3. Aunque los ratones de campo, *Apodemus sylvaticus*, son susceptibles de ser infectados experimentalmente con *Borrelia burgdorferi*, siendo su respuesta humoral muy intensa y duradera, no hay infección en los ejemplares capturados debido a la abundancia de lagartijas en la zona, que alimentan los estadios inmaduros de *Ixodes ricinus*.
4. Durante el periodo de estudio, el grado de contacto de la población humana, canina y bovina con la espiroqueta causal de la borreliosis de Lyme ha sido muy baja.
5. Aunque en la Sierra de Guadarrama concurren todos los elementos para que se mantenga el ciclo enzoótico del agente de la enfermedad de Lyme, si no se alteran las condiciones ambientales del período de estudio, la intensidad de transmisión es lo suficientemente baja para que no constituya un riesgo en la población humana y animal que frecuentan la zona.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, R.; Rehse-Kupper, B.; Gollmer, E.; Schmidt, R. (1988). Chronic neurologic manifestations of erythema migrans borreliosis. En: J.L. Benach & E.M. Bosler (ed.). Lyme Disease and Related Disorders. New York Academy of Science, New York. pp 16-23.
- Adam, T.; Gassmann, G.S.; Rasiyah, C.; Göbel, U.B. (1991). Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect Immun*, **59**: 2579-2585.
- Aeschlimann, A.; Chamot, E.; Gigon, F.; Jaenneret, J.-P.; Kessler, D.; Walther, C. (1986). *B. burgdorferi* in Switzerland. *Zbl Bakt Hyg A*, **263**: 450-458.
- Afzelius, A. (1910). Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm 1909. *Arch Dermatol Syphil*, **101**: 405-406.
- Álamo Sanz, R. (2000). Infección por *Borrelia burgdorferi* en las garrapatas que se fijan a personas en Castilla y León. V *Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Anda, P.; Rodríguez, I.; de la Loma, A. (1993). A serological survey and review of clinical Lyme borreliosis in Spain. *Clin Infect Dis*, **16**: 310-319.
- Anda, P.; Sánchez-Yebra, W.; Vitutia, M.M.; Pérez Pastrana, E.; Rodríguez, I.; Miller, N.S.; Backenson, P.B.; Benach, J.L. (1996). A new *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever in Spain. *Lancet*, **348**: 162-165.
- Anderson, J.F. (1989). Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. En: Lyme Disease and Other Spirochetal Diseases. *Reviews of Infectious Diseases*, **11** (6): 1451-1459.
- Anderson, J.F.; Johnson, R.C.; Magnarelli, L.A.; Hyde, F.W.; Myers, J.E. (1986). *Peromyscus leucopus* and *Microtus pennsylvanicus* simultaneously infected with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*. *J Clin Microbiol*, **23**: 135-137.
- Anderson, J.F.; Magnarelli, L.A. (1984). Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. *Yale J Biol Med*, **57**: 627-641.
- Anderson, J.F.; Magnarelli, L.A. (1992). Epizootiology of Lyme disease and methods of cultivating *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci*, **653**: 52-63.
- André-Fontaine, G.; Ruvoen-Clouet, N.; Ganière, J.P. (1994). La Borréliose de Lyme. *Rec Méd Vét*, **170** (10/11): 669-673.
- Anónimo. (1995). Recommendations for test performance and interpretation from Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme disease. *M M R W.- Morbidity and Mortality Weekly Report*, **44**: 590-591.
- Appel, M.J.G. (1990). Lyme disease in dogs and cats. *Comp Cont Educ Pract*, **12**: 617-627.

- Appel, M.J.G.; Allan, S.; Jacobson, R.H.; Lauderdale, T.L.; Chang, Y.F.; Shin, S.J.; Thomford, J.W.; Todhunter, R.J.; Summers, B.A. (1993). Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis*, **167**: 651-664.
- Appel, M.J.G.; Jacobson, R.H. (1995). CVT update: canine Lyme disease. En: J.D. Bonagura (ed.). *Kirk's Current Veterinary Therapy* (ed. XII). Philadelphia, P.A., Saunders. pp 303-309.
- Arteaga, F.; García-Moncó, J.C. (1998). Asociación de la enfermedad de Lyme con el trabajo y las actividades de ocio. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, **16** (6): 265-268.
- Arteaga, F.; García-Moncó, J.C. (1999). Factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*. *Rev Clin Esp*, **199** (3): 136-141.
- Arthur, D.R. (1966). The ecology of ticks with reference to the transmission of protozoa. En: Soulsby, E.J.L. (ed.). *Biology of Parasites*. New York. Academic Press. pp 61-84.
- Arthur, D.R.; Snow, K. (1968). *Ixodes pacificus* (Cooley and Kohls, 1943): its life history and occurrence. *Parasitology*, **58**: 893-906.
- Artigao, R.; Torres, G.; Guerrero, A.; Jiménez-Mena, M.; Bayas Paredes, M. (1991). Irreversible complete heart block in Lyme disease. *Am J Med*, **90** (4): 531-533.
- Åsbrink, E.; Hovmark, A. (1988). Early and late cutaneous manifestations in *Ixodes*-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). En: J.L. Benach & E.M. Bosler (ed.). *Lyme Disease and Related Disorders*. New York Academy of Science, New York. pp 4-15.
- Åsbrink, E.; Hovmark, A.; Hederstedt, B. (1984). The spirochetal etiology of acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer. *Acta Derm Venereol (Stockholm)*, **65**: 506-512.
- Aznar, P. (1926). Algunas investigaciones clínicas y experimentales sobre la fiebre recurrente española. *Arch Inst Nac Hig Alfonso XIII*, **4**: 121-127.
- Azuma, Y. (1994). Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *Vet Rec*, **134** (15): 369-372.
- Bairamova, R.A. (1963). Investigation of reptiles in the nidi of tick-borne spirochetosis in the Azerbaijan SSR. *Zool Zh*, **42**: 628-629.
- Balashov, Y.S. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoides) – vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, **8**: 161-376.
- Baptista, S.; Vieira, M.L.; Manso, R.; Domingos, S.; Santos-Reis, M.; Sewell, H-S.; De Michelis, S.; Kurtenbach, K.; Collares-Pereira, M. (2000). Contributo para a definição da borreliose de Lyme em Portugal: I. primeiro isolamento de agentes patogénicos. *V Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.

- Baranton, G.; Postic, D.; Saint Girons, I.; Boerlin, P., Piffaretti, J.-C.; Assous, M.; Grimont, P.A.D. (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*, **42**: 378-383.
- Barbour, A.G. (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, **57**: 521-525.
- Barbour, A.G. ; Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Péter, O.; Aeschlimann, A. (1983a). Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol*, **8**: 123-126.
- Barbour, A.G.; Garon, C.F. (1987). Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science*, **237**: 409-411.
- Barbour, A.G.; Hayes, S.F. (1986). Biology of *Borrelia* Species. *Microbiol Rev*, **50** (4): 381-400.
- Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Heiland, R.A.; Schrupf, M.E.; Tessier, S.L. (1986). A *Borrelia* genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun*, **52**: 549-554.
- Barbour, A.G.; Heiland, R.A.; Tessier, H.R. (1985). Heterogeneity of major proteins in Lyme disease *borreliae*: a molecular analysis of North American and European isolates. *J Infect Dis*, **152**: 478-484.
- Barbour, A.G.; Maupin, G.O.; Teltow, G.J.; Carter, C.J.; Piesman, J. (1996). Identification of an incultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. *J Infect Dis*, **173**: 403-409.
- Barbour, A.G.; Schrupf, M.F. (1986). Polymorphisms of major surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Zbl Bakt Hyg*, **263**: 83-91.
- Barbour, A.G.; Tessier, S.L.; Hayes, S.F. (1984). Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun*, **45**: 94-100.
- Barbour, A.G.; Tessier, S.L.; Todd, W.J. (1983b). Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infect Immun*, **41**: 795-804.
- Barral Lahidalga, M.; García Pérez, A.; Juste Jordán, R.; Fernández de Luco Martínez, D.; Dehesa Ganuza, V. (1994). Distribución y actividad de los ixódidos presentes en la vegetación de la Comunidad Autónoma Vasca. Informes técnicos nº 54, Dpto. de Agricultura y Pesca, Dpto. de Sanidad. Gobierno Vasco. 65 pp.
- Barral, M.; García-Pérez, A.; García-Moncó, J.C.; Anda, P. (1995). La enfermedad de Lyme: una infección transmitida por garrapatas. *Sustrai*, **39**: 64-67.

- Barral, M.; Mandaluniz, N.; Indigoras, I.; Juste, R.A.; Anda, P.; García Pérez, A.L. (1997). Prevalencia de la infección por *Ehrlichia phagocytophyla*, *Borrelia burgdorferi* y Flavivirus en *Ixodes ricinus*. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **4** (1/2): 54.
- Barranquero, A.; Borobio, M.V.; Sifontes, O.; Martínez Manzanares, C.; Izquierdo, G. (1994). Serología positiva a *Borrelia burgdorferi* en pacientes con sintomatología compatible con la enfermedad de Lyme. *Anales de Medicina Interna*, **11** (5): 212-216.
- Barthold, S.W. (1991). Infectivity of *Borrelia burgdorferi* relative to route of inoculation and genotype in laboratory mice. *J Infect Dis*, **163**: 419-420.
- Barthold, S.W. (1998). Spirochetes, ticks and DNA. *Parasitol Today*, **14** (11): 444.
- Barthold, S.W.; Levy, S.A.; Fikrig, E.; Bockenstedt, L.K.; Smith, A.L. (1995). Serologic responses of dogs naturally exposed to or vaccinated against *Borrelia burgdorferi* infection. *J A V M A*, **207** (11): 1435-1440.
- Bauwens, D.; Strijbosch, H.; Stumpel, A.H.P. (1983). The lizards *Lacerta agilis* and *L. vivipara* as hosts to larvae and nymphs of the ticks *Ixodes ricinus*. *Holarct Ecol*, **6**: 32-40.
- Beck, G.; Habicht, G. (1988). Isolation and biological activity of *Borrelia burgdorferi* peptidoglycan. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 365-366.
- Beck, G.; Habicht, G.; Benach, J.L. (1986). A role for interleukin-1 in the pathogenesis of Lyme disease. *Zbl Bakt-Int J Med M*, **263**: 133-136.
- Beck, G.; Habicht, G.S.; Benach, J.L.; Coleman, J.L. (1985). Chemical and biologic characterization of lipopolysaccharide extracted from the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *J Infect Dis*, **152**: 108-117.
- Benach, J.L.; Coleman, J.L.; García-Moncó, J.C.; Deponte, P.C. (1988). Biological activity of *Borrelia burgdorferi* antigens. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 115-125.
- Benach, J.L.; Coleman, J.L.; Skinner, R.A.; Bosler, E.M. (1987). Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis*, **155**: 1300-1306.
- Benach, J.L.; Fleit, H.B.; Habicht, G.S.; Coleman, J.L.; Bosler, E.M.; Lane, B.P. (1984a). Interaction of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. *J Infect Dis*, **150** : 497-507.
- Benach, J.L.; Habicht, G.S.; Coleman, J.L. (1984b). Experimental transmission of the Lyme disease spirochete to rabbits. *J Infect Dis*, **150**: 786-790.

- Berland, R.; Fikrig, E.; Rahn, D. (1991). Molecular characterization of the human response to the 41-kilodalton flagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Infect Immun*, **59**: 3531-3535.
- Binnington, K.C.; Kemp, D.H. (1980). Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv Parasitol*, **18**: 315-339.
- Bishopp, F.C.; Trembley, H.L. (1945). Distribution and hosts of certain North American ticks. *J Parasitol*, **31**: 1-54.
- Bosler, E.M.; Cohen, D.P.; Schulze, T.L.; Olsen, C.; Bernard, W.; Lissman, B. (1988). Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 221-234.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**, 248-253.
- Bradley, J.F.; Johnson, R.C.; Goodman, J.L. (1994). The persistence of spirochete nucleic acids in active Lyme arthritis. *Ann Intern Med*, **120**: 487-489.
- Brandt, M.E.; Riley, B.S.; Radolf, J.D.; Norgard, M.V. (1990). Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun*, **58**: 983-991.
- Britton, W.S.; Hellqvist, L.; Basten, A.; Inglis, A.S. (1986a). Immunoreactivity of a 70 kD protein purified from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin by monoclonal antibody affinity chromatography. *J Exp Med*, **164**: 695-708.
- Britton, W.S.; Hellqvist, L.; Ivanyi, J.; Basten, A. (1986b). Immunopurification of radiolabeled antigens of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* (bacillus Calmette-Guerin) with monoclonal antibodies. *Scand J Immunol*, **26**: 149-159.
- Brossard, M. ; Fivaz, V. (1982). *Ixodes ricinus* L: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infected or re-infected rabbits. *Parasitology*, **85**: 583-592.
- Brown, R.N.; Lane, R.S. (1992). Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Science*, **256**: 1439-1442.
- Brown, R.N.; Lane, R.S. (1996). Reservoir competence of four chaparral-dwelling rodents for *Borrelia burgdorferi* in California. *Am J Trop Med Hyg*, **54**: 84-91.
- Brunet, L.R. ; Sellitto, C. ; Spielman, A. ; Telford III, S.R. (1995). Antibody response of the mouse reservoir of *Borrelia burgdorferi* in nature. *Infect Immun*, **63** (8): 3030-3036.
- Burgdorfer, W. (1984a). Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med*, **57**: 515-520.

- Burgdorfer, W. (1984b). The New Zealand white rabbit: an experimental host for infecting ticks with Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, **57**: 609-612.
- Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Benach, J.L.; Grundwaldt, E.; Davis, J.P. (1982). Lyme disease- a tick-borne spirochetosis? *Science*, **216**: 1317-1319.
- Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Péter, O.; Aeschlimann, A. (1983). Erythema chronicum migrans – a tick-borne spirochetosis. *Acta Trop*, **40**: 79-83.
- Burgdorfer, W.; Hayes, S.F. (1989). Vector / spirochete relationships in louse-borne and tick-borne borrelioses with emphasis on Lyme disease. En: *Advances in Disease Vector Research*. Springer-Verlag, New York. Vol. 6. pp 127-150.
- Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Benach, J.L. (1988). Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodid* tick vectors. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 172-180.
- Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Corwin, D. (1989). Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodid ticks. En: *Lyme Disease and Other Spirochetal Diseases. Reviews of Infectious Diseases*, **11** (6): 1442-1450.
- Burgess, E.C. (1986). Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*. *Zbl Bakt Microbiol Hyg*, **263**: 49-54.
- Burgess, E.C. (1988). *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 235-243.
- Burgess, E.C.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Wright, W.O. (1987). Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow. *J Am Vet Med Assoc*, **191**: 1468-1470.
- Burgess, E.C.; Gillete, D.; Pickett, J.P. (1986b). Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *J A V M A*, **189**: 1340-1342.
- Burgess, E.C.; Wachal, M.D.; Cleven, T.D. (1993). *Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents and birds from four Wisconsin dairy farms. *Vet Microbiol*, **35**: 61-77.
- Callister, S.M.; Schell, R.F.; Case, K.L.; Lovrich, S.D.; Day, S.P. (1993). Characterization of the borreliacid antibody response to *Borrelia burgdorferi* in humans: a serodiagnostic test. *J Infect Dis*, **167**: 158-164.
- Callow, L.L.; Hoyte, H.M.D. (1961). Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the cattle tick *Boophilus microphus*. *Aust Vet J*, **37**: 381-390.
- Canica, M.M.; Nato, F.; du Merle, L.; Mazie, J.C.; Baranton, G.; Postic, D. (1993). Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelli* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis*, **25**: 441-448.

- Carey, A.B.; Krinsky, W.L.; Main, A.J. (1980). *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) and associated ixodid ticks in south-central Connecticut, USA. *J Med Entomol*, **17**: 89-99.
- Caride, E.; Olmeda, A.S.; Rodríguez Rodríguez, J.A. (1998). Borreliosis canina de Lyme. *Pequeños Animales*, **15**: 13-24.
- Caride, E.; Olmeda, A.S.; Rodríguez Rodríguez, J.A.; Viseras, J.; García Fernández, P. (2000). Estudio seroepidemiológico de infección por *Borrelia burgdorferi* en ganado vacuno de Andalucía. V *Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Caride, E.; Rodríguez Rodríguez, J.A.; Martín Espada, M.A.; Olmeda, A.S.; Solana, A. (1995). Prevalencia de la borreliosis canina en Madrid. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Caride, E.; Rodríguez-Rodríguez, J.A.; Martín Espada, M.C.; Olmeda, A.S.; Solana, A. (1996). Aspectos epidemiológicos de la borreliosis canina en Madrid. *Med Vet*, **13** (1): 25-32.
- Carreiro, M.M.; Laux, D.C.; Nelson, D.R. (1990). Characterization of the heat shock response and identification of heat shock protein antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, **58**: 2186-2191.
- Castiella Herrero, J.; Zabala López, S.; Hortells Aznar, J.L.; Martínez Tabernero, R.; Cebollero Rivas, M.P.; Guillén Martínez, G. (1992). Enfermedad de Lyme: cuatro casos descritos en la Comunidad Autónoma de Aragón. *Rev Clín Esp*, **191**: 86-89.
- Clifford, C.M.; Anastos, G.; Elbl, A. (1961). The larval ixodid ticks of the eastern United States (Acarina – Ixodidae). *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, **2**: 215-237.
- Clover, J.R.; Lane, R.S. (1995). Evidence implicating nymphal *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg*, **53**: 237-240.
- Cohen, D.; Bosler, E.M.; Bernard, W.; Meirs, D.; Eisner, R.; Schulze, T. (1988). Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 244-257.
- Cohen, N.D.; Carter, C.N.; Thomas, M.A.Jr.; Angulo, A.B.; Engster, A.K. (1990). Clinical and epizootologic characteristics of dogs seropositive for *Borrelia burgdorferi* in Texas: 110 cases (1988). *JA VMA*, **197** (7): 893-898.
- Cohn, E. (1987). Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Ann Rev Entomol*, **32**: 71-93.
- Colebunders, R.; De Serrano, P.; Van Gompel, A.; Wyrants, H.; Blot, K.; Van den Ende, E. (1993). Imported relapsing fever in European tourist. *Scan J Infect Dis*, **25**: 533-536.

- Coleman, J.L.; Benach, J.L. (1989). Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Invest*, **84**: 322-331.
- Coleman, J.L.; Benach, J.L. (1992). Characterization of antigenic determinants of *Borrelia burgdorferi* shared by other bacteria. *J Infect Dis*, **165**: 658-666.
- Comstock, L.E.; Thomas, D.D. (1989). Penetration and endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, **57**: 1626.
- Cooke, W.; Luft, B.J.; McNamara, T.F.; Golightly, M.; Gorevic, P.D.; Dattwyler, R.J. (1990). Antibodies to *Borrelia burgdorferi* recognize epitopes on *Treponema denticola*. *Arthritis Rheum*, **33**: 84.
- Cooley, R.A.; Kohls, G.M. (1945). The genus *Ixodes* in North America. *National Institutes of Health Bulletin*, **184**: 1-246.
- Cordero del Campillo, M.; Castañón Ordóñez, L.; Reguera Feo, A. (1994). Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones (ed.). pp 329-386.
- Coyle, P.K.; Luft, B.J. (1995). Management of Lyme disease. *Curr Opin Infect Dis*, **8**: 444-449.
- Craft, J.E.; Fischer, D.K.; Hardin, J.A.; Garcia-Blanco, M.; Steere, A.C. (1984a). Spirochetal antigens in Lyme disease. *Arthritis Rheum*, **27** (Suppl.): 64.
- Craft, J.E.; Fischer, D.K.; Shimamoto, G.T.; Steere, A.C. (1986). Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease: appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of immunoglobulin G response late in the illness. *J Clin Invest*, **78**: 934-939.
- Craft, J.E.; Grodzicki, R.L.; Steere, A.C. (1984b). Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic test. *J Infect Dis*, **149**: 789-795.
- Craine, N.; Randolph, S.E.; Nuttall, P.A. (1995). Seasonal variations in the role of grey squirrels as hosts of *Ixodes ricinus*, the tick vector of the Lyme disease spirochaete, in a British woodland. *Folia Parasitol*, **42**: 73-80.
- Craine, N.G.; Nuttall, P.A.; Marriott, A.C.; Randolph, S.E. (1997). Role of red squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochete, in the U.K. *Folia Parasitol*, **44**: 155-160.
- Dammin, G.P. (1978). Babesiosis. En: L., Weinstein & B., Fields (ed.). Seminars in Infectious Disease. Stratton, New York. pp 169-199.
- Dattwyler, R.J.; Volkman, D.J., Halperin, J.J.; Luft, B.J.; Thomas, J.; Golightly, M.G. (1988). T and B cell immune responses in *Borrelia burgdorferi* infection. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 93-102.

- De Boer, R.; Hovius, K.E.; Nohlmans, M.K.E.; Gray, S. (1993). The woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) as a reservoir of tick-transmitted spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in the Netherlands. *Zbl Bakt*, **279**: 404--416.
- De Buen, E.; De la Cámara, P. (1931). Notas sobre 59 casos de fiebre recurrente española. *Bol Tecn Dir San*, **6**: 193-207.
- De Buen, S. (1926). Note préliminaire sur l'épidémiologie de la fièvre récurrente espagnole. *Ann Parasitol*, **IV** (2): 185-192.
- De Silva, A.; Fikrig, E. (1996). Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*, **53**: 397-404.
- De Silva, A.M., Fikrig, E. (1997). *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. *Parasitol Today*, **13** (7): 267-270.
- Degeilh, B. (1992). *Ixodes ricinus* (Linné, 1758) dans le massif Armoricain: indicateur végétal et cartographie de ses populations, approche du polymorphisme de l'espèce dans une optique vectorielle. *Rapport de Stage. Université Rennes I*.
- Delgado, S.; Cármenes, P. (1995). Seroepidemiological survey for *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs from northwestern of Spain. *Eur J Epidemiol*, **11**: 321-324.
- Demaerschalck, I.; Ben Messaoud, A.; Dekesel, M.; Hoyois, B.; Lobet, Y.; Hoet, P.; Bigaignon, G.; Bollen, A.; Godfroid, E. (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol*, **33**: 602-608.
- Dizij, A.; Kurtenbach, K. (1995). *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol*, **17**: 177-183.
- Doby, J.M.; Chevrier, S.; Couatarmanac'h, A. (1988). La spirochétose a tiques par *Borrelia burgdorferi* chez les chiens dans l'ouest de la France. *Recl Med Vet*, **164** (5) : 367-374.
- Donahue, J.G.; Piesman, J.; Spielman, A. (1987). Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg*, **36**: 92-96.
- Dorward, D.W.; Huguenel, E.D.; Davis, G.; Garon, C.F. (1992). Interactions between extracellular *Borrelia burgdorferi* proteins and non-*Borrelia*-directed immunoglobulin M antibodies. *Infect Immun*, **60**: 838-844.
- Dorward, D.W.; Schwan, T.G.; Garon, C.F. (1991). Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *J Clin Microbiol*, **29**: 1162-1170.

- Dressler, F.; Whalen, J.A.; Reinhardt, B.N.; Steere, A.C. (1993). Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis*, **167**: 392-400.
- Dumler, J.S.; Bakken, J.S. (1995). Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. *Clin Infect Dis*, **20**: 1102-1110.
- Dunand, V.A.; Bretz, A.G.; Suard, A.; Praz, G.; Dayer, E.; Peter, O. (1998). Acrodermatitis chronica atrophicans and serologic confirmation of infection due to *Borrelia afzelii* and/or *Borrelia garinii* by immunoblot. *Clinical Microbiology and Infection*, **4** (3): 159-163.
- Eiffert, H.; Ohlenbusch, A.; Christen, H.J.; Thomssen, R.; Spielman, A.; Matuschka, F.R. (1995). Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from tick vectors and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*, **171**: 476-479.
- Escudero, R.; Barral, M.; Pérez, A.; Vitutia, M.M.; García-Pérez, A.L.; Jiménez, S.; Sellek, R.E.; Anda, P. (2000a). Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol*, **38** (11): 4026-4033.
- Escudero, R.; Sellek, R.; Chaparro, E., Rodríguez, I.; García-Pérez, A.L.; Anda, P. (2000b). relaciones filogenéticas entre especies de borrelia aisladas en España. V *Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Estrada Peña, A. (1994). Las garrapatas en España: introducción. En: Junta de Castilla y León (ed.). 86 pp.
- Estrada, A. (2000). Predicción de la presencia y abundancia de las garrapatas mediante teledetección. V *Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Estrada-Peña, A.; Gray, J.S.; Kahl, O. (1996). Variability in cuticular hydrocarbons and phenotypic discrimination of *Ixodes ricinus* populations (Acarina: Ixodidae) from Europe. *Exp App Acar*, **20**: 457-467.
- Estrada-Peña, A.; Oteo, J.A.; Estrada-Peña, R.; Gortázar, C.; Osácar, J.J.; Moreno, J.A.; Castellá, J. (1995). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari:Ixodidae) from two different foci in Spain. *Exp Appl Acarol*, **19**: 173-180.
- EUCALB (European Union Concerted Action On Lyme Borreliosis). (1997). <http://www.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/>
- Fawcett, P.T.; O'Brien, A.E.; Doughty, R.A. (1989). An absorption procedure in increase the specificity of enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme disease without decreasing sensitivity. *Arthritis Rheum*, **32**: 1041-1044.
- Felsenfeld, O. (1965). Borrelia, human relapsing fever, and parasite – vector – host relationship. *Bacteriol Rev*, **29**: 46-74.

- Ferrero, M.; Luis, A.; González, C. (1995). Seroprevalencia de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en vacas y ovejas de la provincia de Huesca. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Fikrig, E.; Barthold, S.W.; Marcantoni, N.; Deponte, K.; Kantor, F.S.; Flavell, R.A. (1992). Role of OspA, OspB, and flagellin in protective immunity of Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Infect Immun*, **60**: 657-661.
- Finlay, B.B.; Falkow, F.S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology Review*, **53**: 210.
- Fishbein, D.B.; Dennis, D.T. (1995). Tickborne diseases – a growing risk. *New Engl J Med*, **17**: 452-453.
- Font, A. (1994). Enfermedad de Lyme. *29º Congreso Nacional de AVEPA*. Barcelona.
- Font, A. (1995). Enfermedad de Lyme en el perro. *Veterinaria*, **32**: 42-45.
- Font, A.; Closa, J.M.; Mascort, J. (1992). Lyme disease in dogs in Spain. *Vet Rec*, **130** (11): 227-228.
- Fraser, C.M.; Casjens, S.; Huang, W.M.; Sutton, G.G.; Clayton, R.; Lathigra, R.; White, O.; Ketchum, K.A.; Dodson, R. y cols. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**: 580-586.
- Fuchs, R.; Jauris, S.; Lottspeich, F.; Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Soutschek, E. (1992). Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Molec Microbiol*, **6**: 503-509.
- Fukunaga, Hamase, A.; Okada, K.; Inoue, H.; Tsuruta, Y.; Miyamoto, K.; Nakao, M. (1996a). Characterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Appl Environ Microbiol*, **62**: 2338-2344.
- Fukunaga, M.; Hamase, A.; Okada, K.; Nakao, M. (1996b). *Borrelia tanuki* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from *Ixodes* ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol*, **40**: 877-881.
- Fukunaga, M.; Okada, K.; Nakao, M.; Konoshi, T.; Sato, Y. (1996c). Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *Int J Syst Bacteriol*, **46**: 898-905.
- Fukunaga, M.; Takahashi, Y.; Tsuruta, Y.; Matsushita, O.; Ralph, D.; McClelland, M.; Nakao, M. (1995). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyatomoi* sp. nov., isolated from the *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol*, **45**: 804-810.

- Fung, B.P.; McHugh, G.L.; Leong, J.M.; Steere, A.C. (1994). Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect Immun*, **62**: 3213-3221.
- Furman, D.P.; Loomis, E.C. (1984). The ticks of California (Acari: Ixodida). *Bulletin of the California Insect Survey*, **25**: 1-239.
- García-Márquez, P.; Martínez-Garrido, J.P.; Gómez-Gómez, A.; Espárrago-Rodilla, M. (1991). Enfermedad de Lyme: a propósito de un caso. *An Esp Pediatr*, **34** (4): 315-318.
- García-Moncó, J.C. (1991). El diagnóstico de la enfermedad de Lyme. *Med Clín*, **96**: 544-548.
- García-Moncó, J.C. (1994). Enfermedad de Lyme. En: Seminario sobre Enfermedades Transmitidas por Garrapatas al Hombre y los Animales: Situación en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Informe Técnico nº 58, Dpto. de Sanidad, Dpto. de Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. pp 9-17.
- García-Moncó, J.C.; Benach, J.L. (1995). Lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol*, **37** : 691-702.
- García-Moncó, J.L.; Benach, J.L.; Coleman, J.L.; Galbe, J.L.; Szczepanski, A.; Fernández-Villar, B.; Norton Hughes, C.A.; Johnson, R.C. (1992). Caracterización de una cepa española de *Borrelia burgdorferi*. *Med Clín*, **98** (3): 89-93.
- Gauthier, D.T.; Mansfield, L.S. (1996). Western blot analysis for distinguishing vaccine and infection status with *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs. *Am Ass Vet Lab Diagn*, pp 95.
- Gecheva, G.G.; Georgieva, G.P.; Manev, H.; Machaldjiski, I. (1994). Species and seasonal activity of ixodic ticks infected with *Borrelia burgdorferi*. *Mediterranean Journal of Infectious and Parasitic Diseases*, **9** (3): 197-200.
- Gegúndez, M.I.; Saz, J.V.; Ranilla, F.; Merino, F.J.; Gómez, A.; Pozo, M.; Beltrán, M. (1995). Seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en el norte de Castilla-León. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Gelfand, J.A. (1990). Babesia. En: G.L., Mandel; R.G.; Douglas & J.E.; Bennet (ed.). Principles and Practice of Infectious Diseases (3^{er} ed.). Churchill Livingstone, New York. pp 2119-2122.
- Genchi, C.; Rizzoli, A.P. ; Fabbi, M. ; Sambri, V. ; Manfredi, M.T.; Magnino, S.; Moroni, A.; Massaria, F.; Cevenini, R. (1994). Ecology of *Borrelia burgdorferi* in some areas of Northern Italy. En: Advances in Lyme Borreliosis Research. Proceeding of VI International Conference on Lyme Borreliosis. Bologne, Italy. June, 19-22.
- Gerber, M.A.; Shapiro, E.D.; Bell, G.L.; Sampieri, A.; Padula, S.I. (1995). Recombinant outer surface protein C ELISA for the diagnosis of early Lyme disease. *J Infect Dis*, **171**: 724-727.

- Gern, L. (2000). The eco-epidemiology of *Borrelia burgdorferi* “sensu lato” in Europe. V *Symposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Gern, L.; Zhu, Z.; Aeschlimann, A. (1990). Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Ann Parasitol Hum Comp*, **65**: 89-93.
- Gern, L.; Estrada-Peña, A.; Frandsen, F.; Gray, J.S.; Jaenson, T.G.T.; Jongejan, F.; Kahl, O.; Korenberg, E.; Mehl, R.; Nuttall, P.A.; Stanek, G. (1998). European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zbl Bakt*, **287**: 196-204.
- Gern, L.; Humair, P.-F. (1998). Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wien Klin Wochenschr*, **110** (24): 856-858.
- Gern, L.; Siegenthaler, M.; Hu, C.M.; Leuba-Garcia, S.; Humair, P.F.; Moret, J. (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur J Epidemiol*, **10**: 75-80.
- Gern, L.; Toutoungi, L.N.; Hu, C.M.; Aeschlimann, A. (1991). *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med Vet Entomol*, **5**: 431-435.
- Gil Collado, J.; Guillén Llera, J.L.; Zapatero Ramos, L.M. (1979). Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). *Rev Ibérica Parasitol*, **39**: 107-118.
- Gil, H.; Barral, M.; Juste, R.A.; Anda, P.; García-Pérez, A.L. (2000a). Estudio de los micromamíferos presentes en áreas endémicas de enfermedad de Lyme en el País Vasco. Resultados preliminares. V *Symposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Gil, M.; Barral, M.; Povedano, I.; Pérez, A.; Jiménez, S.; Oteo, J.A.; Juste, R.A.; García-Pérez, A.L. (2000b). Prevalencia de *B. burgdorferi* y del grupo *E. phagocytophila* en garrapatas capturadas en la vegetación de La Rioja. V *Symposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Gilfe, Å.; Bergström, S.; Lundström, J.; Olsen, B. (2000). Reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature*, **403**: 724-725.
- Gilot, B.; Pautou, G. (1983). Répartition et écologie de *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) (Ixodoidea) dans les Alpes Françaises et leur avant-pays. *Acarologia*, **XXIV** (3) : 261-273.
- Gilot, B.; Rogers, P.; Lachet, B. (1985). Données biologiques et écologiques sur les tiques de lagomorphs (et plus spécialement celles du lapin de garennes, *Oryctolagus cuniculus* L.) dans les Alpes françaises et leur avant-pays. *Acarologia*, **26** (4) : 335-354.

- Gironés, O.; Gegúndez, M.I.; Simón, M.C.; Saz, J.V.; Ortega, C. (1998). Seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en los estudiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. *IV Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Setúbal (Portugal), 24-26 Sept.
- Gitton, X.; Buggin Daubie, M.; Anfre, F.; Ganiere, J.P.; André-Fontaine, G. (1994). Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs. *Vet Microbiol*, **41**: 87-97.
- Golde, W.T.; Kappel, K.J.; Dequesne, G.; Feron, C.; Plainchamp, D.; Capiiau, C.; Lobet, Y. (1994). Tick transmission of *Borrelia burgdorferi* to inbred strains of mice induces an antibody response to P39 but not to outer surface protein A. *Infect Immun*, **62**: 2625-2627.
- Gómez-Díez, S.; Asensi-Álvarez, J.M.; Soler, T.; Fernández-Pérez, J.C. (1993). ¿Linfocitoma cutáneo por *Borrelia*?. *Med Clínica*, **100** (2): 78.
- Gorelova, N.B.; Korenberg, E.I.; Kovalevskii, Y.V.; Shcherbakov, S.V. (1995). Small mammals as reservoir hosts for *Borrelia* in Russia. *Zbl Bakt*, **282**: 315-322.
- Grauer, G.F.; Burgess, E.C.; Cooley, A.J.; Hagel, J.H. (1988). Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J A V M A*, **193**: 237-239.
- Gray, J.S. (1981). The fecundity of *Ixodes ricinus* (L.) (Acarina: Ixodidae) and the mortality of its developmental stages under field conditions. *Bull Ent Res*, **71**: 533-542.
- Gray, J.S. (1984). Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Acarologia*, **XXV** (2): 167-178.
- Gray, J.S. (1991). The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology*, **79** (6): 323-333.
- Gray, J.S.; Kahl, O.; Janetzki, C.; Stein, J. (1992). Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. *J Med Entomol*, **29**: 915-920.
- Gray, J.S.; Kahl, O.; Janetzki, C.; Stein, J.; Guy, E. (1994). Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Exp Appl Acarol*, **18**: 485-491.
- Gray, J.S.; Kahl, O.; Janetzki, C.; Stein, J.; Guy, E. (1995). The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi* – infected *Ixodes ricinus* in the Connerama region of Co. Galway, Ireland. *Experim App Acarol*, **18**: 485-491.
- Gray, J.S.; Kirstein, F.; Robertson, J.N.; Stein, J.; Kahl, O. (1999). *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol*, **23**: 717-729.

- Greene, M.I.; Schatten, S.; Bromberg, J.S. (1984). Delayed hypersensitivity. En: W.E. Paul (ed.). *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York. pp 685-696.
- Greene, R.T. (1991). Canine Lyme borreliosis. *Vet Clin N Am – Small*, **1** (2): 51-64.
- Greene, R.T.; Hirsch, D.A.; Rottmann, P.L.; Gerig, T.M. (1991). Interlaboratory comparison of titers of antibody to *Borrelia burgdorferi* and evaluation of commercial assay using canine sera. *J Clin Microbiol*, **29**: 16-20.
- Greene, R.T.; Walker, R.L.; Burgess, E.C.; Levine, J.F. (1988a). Heterogeneity in immunoblot patterns obtained by using four strains of *Borrelia burgdorferi* and sera from naturally exposed dogs. *J Clin Microbiol*, **26** (11): 2287-2291.
- Greene, R.T.; Walker, R.L.; Nicholson, W.; Heidner, H.W.; Levine, J.F.; Burgess, E.C.; Wyand, M.; Breitschwerdt, E.B.; Berkhoff, H.A. (1988b). Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimentally and naturally exposed dogs. *J Clin Microbiol*, **26**: 648.
- Grodzicki, R.L.; Steere, A.C. (1988). Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J Infect Dis*, **157**: 790-797.
- Guerrero, A. (1995). Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lyme. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Guerrero, A.; Quereda, C.; Escudero, R.; Cobo, J.; Morcillo, R.; Martí-Belda, P. (1991). Diagnóstico serológico de la enfermedad de Lyme. Un problema pendiente. *Enf Inf Microbiol Clín*, **9**: 335-338.
- Guerrero, A.; Quereda, C.; Martí-Belda, P.; Escudero, R. (1993). Borreliosis de Lyme. ¿Cómo se manifiesta en España?. *Med Clín*, **101**: 5-7.
- Guerrero, A.; Serrano, M.J.; García-Moncó, J.C.; Grupo de estudio para la enfermedad de Lyme en España. (1988). Borreliosis de Lyme en España. *Med Clín*, **90**: 434.
- Guo, B.P.; Norris, S.J.; Rosenberg, L.C.; Höök, M. (1995). Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan Decorin. *Infect Immun*, **63** (9): 3467-3472.
- Gutiérrez, J.; Maroto, M.C.; De la Higuera, A.; Guerrero, M.; Padilla, E.; Piedrola, G. (1995). Three-years study of antibody to *Borrelia burgdorferi* in southern Spain. *Eur J Clin Microbiol*, **14** (6): 542-546.
- Habela, M.; Peña, J.; Corchero, E.; Sevilla, R.G. (2000a). Garrapatas y hemoparásitos transmitidos de interés veterinario en España. Manual práctico para su identificación. Facultad de Cáceres, U.E.X. y Schering-Plough Animal Health (ed.). 55 pp.

- Habela, M.; Peña, J.; Corchero, E.; Sevilla, R.G.; Sánchez, C. (2000b). Nuevas aportaciones al conocimiento de la ixodidofauna en el parque nacional de Doñana (SO, España). *V Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Habela, M.; Sevilla, R.G.; Corchero, E.; Peña, J. (2000c). Epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas de los bovinos de Extremadura. *V Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Halperin, J.J.; Pass, H.L.; Anand, A.K.; Luft, B.J.; Volkman, D.J.; Dattwyler, R.J. (1988). Nervous system abnormalities in Lyme disease. En: J.L. Benach & E.M. Bosler (ed.). *Lyme Disease and Related Disorders*. New York Academy of Science, New York. pp 24-34.
- Hansen, K.; Bangsbo, J.M.; Fjordvang, H.; Pedersen, N.S.; Hindersson, P. (1988). Immunochemical characterization of and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria. *Infect Immun*, **56**: 2047-2053.
- Harris, E.L.V.; Angal, S. (1989) Concentration of the extract. En: *Protein Purification Methods*. Oxford University Press (ed.). New York. 317 pp.
- Hauser, U.; Lehnert, G.; Lobentanzer, R.; Wilske, B. (1997). Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J Clin Microbiol*, **35** (6): 1433-1444.
- Hauser, U.; Lehnert, G.; Wilske, B. (1998). Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Clin Diagn Lab Immunol*, **5** (4): 456-462.
- Hauser, U.; Lehnert, G.; Wilske, B. (1999). Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol*, **37** (7): 2241-2247.
- Hellmann, E.; Aschenbrenner, E. (1987). Untersuchungen über die Eignung des ELISA für den Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren beim Hund. *Tierärztl Umschau*, **42**: 634-638.
- Hindersson, P.; Thomas, D.; Stamm, L.; Penn, C.; Norris, S.; Joens, L.A. (1992). Interaction of spirochetes with the host. *Res Microbiol*, **143**: 629-639.
- Hoogstraal, H. (1966). Ticks in relation to human diseases caused by viruses. *Annu Rev Entomol*, **11**: 261-308.
- Hoogstraal, H. (1985). Ticks. En: S.M., Gaafar; W.E., Howard & R.E., Marsh (ed.). *Parasites, Pest and Predators*. Elsevier. Oxford & New York. 575 pp.

- Hovmark, A.; Jaenson, T.G.T.; Åsbrink, E.; Forsman, A.; Jansson, E. (1988). First isolations of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in Northern Europe. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, **96**: 917-920.
- Hu, C.M.; Gern, L.; Aeschlimann, A. (1992). Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks. *Parasite Immunol*, **14**: 415-427.
- Hu, C.M.; Humair, P.F.; Wallich, R.; Gern, L. (1997). *Apodemus* sp. rodents, reservoir hosts for *Borrelia afzelii* in an endemic area in Switzerland. *Zbl Bakt*, **285**: 558-564.
- Hu, C.M.; Leuba-García, S.; Kramer, M.D.; Aeschlimann, A.; Gern, L. (1994). Comparison in the immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolates from *Ixodes ricinus* derived from three endemic areas in Switzerland. *Epidemiol Infect*, **112**: 533-542.
- Hubálek, K.; Halouzka, J. (1997). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol*, **13**: 951-957.
- Hubálek, Z.; Korenberg, E.I.; Juřicová, Z.; Kovalevski, Yu.V.; Halouzka, J.; Shcherbakov, S.V. (1990). Prevalence of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Moravia, Czechoslovakia. *Folia Parasitol*, **37**: 359-362.
- Humair, P.F.; Gern, L. (1998). Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Tropica*, **69** (3): 213-227.
- Humair, P.F.; Péter, O.; Wallich, R.; Gern, L. (1995). Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *J Med Entomol*, **32**: 433-438.
- Humair, P.F.; Postic, D.; Wallich, R.; Gern, L. (1998). An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme disease spirochetes. *Zbl Bakt*, **287**: 521-538.
- Humair, P.F.; Rais, O.; Gern, L. (1999). Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology*, **118**: 33-42.
- Humair, P.F.; Turrian, N.; Aeschlimann, A.; Gern, L. (1993a). *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitol*, **40**: 65-70.
- Humair, P.F.; Turrian, N.; Aeschlimann, A.; Gern, L. (1993b). *Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia Parasitol*, **40**: 237-242.
- Ijdo, J.W.; Zhang, Y.; Anderson, M.L.; Goldberg, D.; Fikrig, E. (1998). Heat shock protein 70 of the agent of human granulocytic ehrlichiosis binds to *Borrelia burgdorferi* antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, **5** (1): 118-120.

- Ishiguro, F.; Takada, N.; Nakata, K.; Yano, Y.; Suzuki, H.; Masuzawa, T.; Yamagihara, Y. (1996). Reservoir competence of the vole, *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*, for *Borrelia garinii* or *B. afzelii*. *Microbiol Immunol*, **40**: 67-69.
- Isogai, E.; Kamewaka, Y.; Isogai, H.; Kimura, K.; Fujii, N.; Nishikawa, T. (1994). Complement-mediated killing of *Borrelia garinii* – bactericidal activity of wild deer serum. *Microbiol Immunol*, **38**: 753-756.
- Izquierdo, G.; Aguilar, J.; Barranquero, A.; Navarro, G.; Borovio, M.V. (1992). Anticuerpos anti-*Borrelia* positivos en pacientes con manifestaciones clínicas de neuroborreliosis. *Neurología*, **7** (2): 50-54.
- Jacobson, R.H.; Chang, Y-F.; Shin, S.J. (1996). Lyme disease: laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. *Semin Vet Med Surg*, **11** (3): 172-182.
- Jaenson, T.G.T.; Tälleklint, L. (1992). Incompetence of roe deer as reservoir of the Lyme borreliosis spirochete. *J Med Entomol*, **29**: 813-817.
- Jensen, N.S. (1997). Detection, identification and subspecific differentiation of intestinal Spirochaetes. En: D.J. Hampson & T.B. Stanton (ed.). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Human*, CAB International, Cambridge. pp 323-341.
- Ji, B.; Thomas, C.B.; Collins, M.T. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses the 41-kd flagellin as the antigen for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cattle. *Am J Vet Res*, **55**: 1213-1219.
- Jiménez, A.; Ranilla, F.; Gegúndez, M.I.; Saz, J.V.; Merino, F.J.; García, V.; Beltrán, M. (1995). Seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en la provincia de Guadalajara: comparación del estudio de dos muestras poblacionales. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Johnson, M.; Noppa, L.; Barbour, A.G.; Bergstrom, S. (1992). Heterogeneity of outer membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*: comparison of osp operons of three isolates of different geographic origins. *Infect Immun*, **60**: 1845.
- Johnson, R.C. (1977). The spirochetes. *Annu Rev Microbiol*, **31**: 89-106.
- Johnson, R.C.; Marek, N.; Kodner, C. (1984a). Infection of syrian hamsters with Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol*, **20**: 1099-1101.
- Johnson, R.C.; Schmid, G.P.; Hyde, F.W.; Steigerwalt, A.G.; Brenner, D.J. (1984b). *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol*, **34**: 496-497.
- Kantor, F.S. (1994). La enfermedad de Lyme. *Investigación y Ciencia*, **11**: 6-11.

- Kärbohrer, A.; Liebisch, G.; Schönberg, A.; Liebisch, A. (1994). Serodiagnostik der Lyme-Borreliose: Entwicklung und Bewertung eines Testsystems für epidemiologische Untersuchungen beim Hund. *Dtsch Tierärztl Wschr*, **101**: 476-481.
- Kaufman, W.R. (1989). Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitol Today*, **5** (4): 47-56.
- Kawabata, H.; Masuzawa, T.; Yanagihara, Y. (1993). Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol*, **37**: 843-848.
- Kazmierczak, J.J.; Sorhage, F.E. (1993). Current understanding of *Borrelia burgdorferi* infection, with emphasis on its prevention in dogs. *J A V M A*, **203**: 1524.
- Keirans, J.E. ; Clifford, C.M. (1978). The genus *Ixodes* in the United States: a scanning electron microscope study and key to adults. *J Med Entomol (Suppl)*, **2**: 1-149.
- Khanakha, G.; Kmety, E.; Radda, A.; Stanek, G. (1994). Micromammals as reservoirs of *Borrelia burgdorferi* in Austria. *Proceeding of VI International Conference on Lyme Borreliosis*. Bologna, Italy. June, 19-22.
- Kimsey, R.B.; Spielman, A. (1990). Motility of the Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J Infect Dis*, **162**: 1205-1208.
- Kimura, K.; Isogai, E.; Isogai, H.; Kamewaka, Y.; Nishikawa, T.; Ishii, N.; Fujii, N. (1995). Detection of Lyme disease spirochetes in the skin of naturally infected sika deer (*Cervus nippon yeosoensis*) by PCR. *Appl Environ Microb*, **61**: 1641-1642.
- Koch, H.G.; Dunn, J.E. (1980). Ticks (*Amblyomma americanum*) collected from small and medium-sized wildlife hosts in Leflore County, Oklahoma, USA. *Southwest Entomol*, **5**: 214-221.
- Kochi, S.K. ; Johnson, R.C. (1988). Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. *Infect Immun*, **56**: 314-321.
- Korenberg, E.I. (1994). Comparative ecology and epidemiology of Lyme disease and tick-borne encephalitis in the former Soviet Union. *Parasitol Today*, **10** (4): 157-160.
- Kornblatt, A.N.; Steere, A.C.; Brownstein, D.G. (1984). Experimental Lyme disease in rabbits: spirochetes found in erythema migrans and blood. *Infect Immun*, **46**: 220-223.
- Kornblatt, A.N.; Urband, P.H.; Steere, A.C. (1985). Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. *J A V M A*, **186**: 960-964.
- Krinsky, W.L.; Brown, S.J.; Askenase, P.W. (1982). *Ixodes dammini*: induced skin lesions in guinea pigs and rabbits compared to erythema chronicum migrans in patients with Lyme arthritis. *Exp Parasitol*, **53**: 381-395.

- Kurtenbach, K.; De Michelis, S.; Etti, S.; Schäfer, S.M.; Sewell, H-S.; Brade, V.; Kraiczy, P. (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends Microbiol*, **10** (2): 74-79.
- Kurtenbach, K.; Dizij, A.; Seitz, H.M.; Margos, G.; Moter, S.E.; Kramer, M.D.; Wallich, R.; Schaible, U.; Simon, M.M. (1994). Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infect Immun*, **62** (12): 5344-5352.
- Kurtenbach, K.; Peacey, M.; Rijpkema, S.G.T.; Hoodless, A.N.; Nuttall, P.A.; Randolph, S.E. (1998a). Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microb*, **64**: 1169-1174.
- Kurtenbach, K.; Sewell, H.; Ogden, N.H.; Randolph, S.E.; Nuttall, P.A. (1998b). Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun*, **66**: 1248-1251.
- Lacombe, E.; Rand, P.W.; Smith, R.P.Jr. (1993). Disparity of *Borrelia burgdorferi* infection rates of adult *Ixodes dammini* on deer and vegetation. *J Infect Dis*, **167**: 1236-1238.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lane, R.S. (1990). Susceptibility of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*) to the Lyme borreliosis spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am J Trop Med Hyg*, **42** (1): 75-82.
- Lane, R.S.; Berger, D.M.P.; Casher, L.E.; Burgdorfer, W. (1994). Experimental infection of Columbian black-tailed deer with the Lyme disease spirochete. *J Wildlife Dis*, **30**: 20-28.
- Lane, R.S.; Brown, R.N. (1991). Wood rats and kangaroo rats: potential reservoirs of the Lyme disease spirochete in California. *J Med Entomol*, **28**: 299-302.
- Lane, R.S.; Burgdorfer, W. (1986). Potential role of native and exotic deer and their associated ticks (Acari: Ixodidae) in the ecology of Lyme disease in California, USA. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg (A)*, **263**: 55-64.
- Lane, R.S.; Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Barbour, A.G. (1985). Isolation of a spirochete from the soft tick *Ornithodoros coriaceus*: a possible agent of Epizootic Bovine Abortion. *Science*, **230**: 85-87.
- Lane, R.S.; Loye, J.E. (1989). Lyme disease in California: interrelationship of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae), the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*), and *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol*, **26**: 272-278.
- Lane, R.S.; Piesman, J.; Burgdorfer, W. (1991). Lyme borreliosis: relation of its causative agents to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu Rev Entomol*, **36**: 587-609.

- Lane, R.S.; Quistad, G.B. (1998). Borreliacidal factor in the blood of western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). *J Parasitol*, **84**: 29-34.
- Le Fleche, A.; Postic, D.; Girardet, K.; Péter, O.; Baranton, G. (1997). Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*, **47**: 921-925.
- Lebech, A.; Hindersson, P.; Vuust, J. (1991). Comparison of *in vitro* culture and polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissues from experimentally infected animals. *J Clin Microbiol*, **29**: 731-737.
- LeFebvre, R.B.; Perng, G.C.; Johnson, R.C. (1990). The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. *J Clin Microbiol*, **28**: 1673-1676.
- Lembke, L. (1989). Update on Lyme disease testing at the Regional Animal Health Laboratory. Animal Health WI Dept. of Agriculture, Trade, and Consumer Protection. Newsletter. Nov.
- León de Lope, M.; Leal Luna, A.; Gálvez Aceval, J.; Royo Aguado, J.L.; Romero Velasco, E.; Martínez Luengas, F. (1985). Borreliosis: descripción de 4 casos. *Med Clín (Barc)*, **85**: 111-113.
- Levin, M.; Levine, J.F.; Norris, D.E.; Howard, P.; Yang, S.; Apperson, C.S. (1993). Reservoir competence of the rice rat and lizards for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the 2nd Workshop on Lyme Disease in the Southeast*. Raleigh, North Carolina (USA). Sept., 7-9.
- Levin, M.; Levine, J.F.; Yang, S.; Howard, P.; Apperson, C.S. (1996). Reservoir competence of the southeastern five-lined skink (*Eumeces inexpectatus*) and the green anole (*Anolis carolinensis*) for *Borrelia burgdorferi*. *Am J Trop Med Hyg*, **54**: 92-97.
- Levine, J.F.; Wilson, M.L.; Spielman, A. (1985). Mice as reservoir of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg*, **34**: 355-360.
- Levy, S.A.; Barthold, S.W.; Dombach, D.M.; Wasmoen, T.L. (1993). Canine Lyme borreliosis. *Comp Cont Educ Pract*, **15** (6): 833-846.
- Levy, S.A.; Doombach, D.M.; Barthold, S.W.; Wasmoen, T.L. (1996). Borreliosis canina por enfermedad de Lyme. *Symposium sobre la Enfermedad de Lyme en Perros*. Madrid, 8 Mayo.
- Levy, S.A.; Dreesen, D.W. (1992). Lyme borreliosis in dogs. *Canine Pract*, **17** (2): 5-14.
- Levy, S.A.; Duray, P.M. (1988). Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. *J Vet Internat Med*, **2**: 138-144.

- Lewis, B. (1994). Treponimatosi and Lyme borreliosis connections: explanation for Tchefuncite disease syndromes?. *Am J Phys Anthropol*, **93**: 455-475.
- Lipsky, P.E.; Davis, L.S.; Cush, J.J. (1989). The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol*, **11**: 123-162.
- Lissman, B.A.; Bosler, A.M.; Camay, H.; Ormiston, B.G.; Benach, J.L. (1984). Spirochaete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *J A V M A*, **185**: 219-220.
- Lledó, L.; Díaz, C.; Saz, J.V.; Gegúndez, M.I.; Castillo, G.A.; Jiménez, A.; Beltrán, M. (1998). Seroprevalencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* en la Comunidad Autónoma de Madrid. *IV Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Setúbal (Portugal), 24-26 Sept.
- López Prieto, M.D.; Borobio, M.V. (1989). Prevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en la población de Sevilla. *Enf inf Microbiol Clin*, **7** (9): 489-490.
- López-Cortés, L.; Lozano de León, F.; Gómez-Mateos, J.M.; Sánchez-Porto, A.; Obrador, C. (1989). Tick-borne relapsing fever in intravenous drug users. *J Infect Dis*, **159**: 804.
- Lovrich, S.D.; Callister, S.M.; Lim, L.C.L.; DuChateau, B.K.; Schell, R.F. (1994). Seroprotective groups of Lyme borreliosis spirochetes from North America and Europe. *J Infect Dis*, **170**: 115-121.
- Lydyard, P.M.; van Eden, W. (1990). Heat shock proteins: immunity and immunopathology. *Immunol Today*, **11**: 228-229.
- Ma, B.; Christen, B.; Leung, D.; Vigo-Pelfrey, C. (1992). Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western Immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, **30** (2): 370-376.
- Macleod, J. (1935). *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. *Parasitology*, **27**: 123-144.
- Magnarelli, L.A. (1988). Serologic diagnosis of Lyme disease. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 154-161.
- Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Burgdorfer, W.; Chappel, W.A. (1984a). Parasitism by *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) and antibodies to spirochaetes in mammals at Lyme disease foci in Connecticut USA. *J Med Entomol*, **21**: 52-57.
- Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Johnson, R.C. (1987a). Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis*, **156**: 183-188.
- Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Kaufman, A.F.; Lieberman, L.L.; Whitney, G.D. (1985). Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *J A V M A*, **184**: 955-959.

- Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Schreier, A.B.; Ficke, C.M. (1987b). Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *J A V M A*, **191** (9): 1089-1094.
- Magnarelli, L.A.; Flavell, R.A.; Padula, S.J.; Anderson, J.F.; Fikrig, E. (1997). Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol*, **35** (1): 169-173.
- Magnarelli, L.A.; Meegan, J.M.; Anderson, J.F.; Chappell, W.A. (1984b). Comparison of an Indirect Fluorescent-Antibody Test with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serological studies of Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **20** (2): 181-184.
- Magnarelli, L.A.; Miller, J.N.; Anderson, J.F.; Riviere, G.R. (1990). Crossreactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **28**: 1276-1279.
- Mainil, J.G. (1994). La maladie de Lyme: une nouvelle maladie?. *Ann Méd Vét*, **138**: 373-383.
- Manweiler, S.A.; Lane, R.S.; Tempelis, C.H. (1992). The western fence lizard *Sceloporus occidentalis*: evidence of field exposure to *Borrelia burgdorferi* in relation to infestation by *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Am J Trop Med Hyg*, **47** (3): 328-336.
- Marconi, R.T.; Liveris, D.; Schwartz, I. (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragments length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochete: phylogenetic analysis of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol*, **33**: 2427-2434.
- Márquez, F.J.; Constan, M.C. (1990). Infection d'*Ixodes ricinus* et *Haemaphysalis punctata* par *Borrelia burgdorferi* dans le Nord de la Peninsule Iberique (Pays Basque espagnol et Navarre). *Bull Soc Franç Parasitol*, **8** (2) : 323-330.
- Martín Hernández, R. (1996). Respuesta inmune en los conejos a los distintos estadios de *Rhipicephalus sanguineus*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 209 pp.
- Martínez Fernández, A.R.; Cordero del Campillo, M. (1999). El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores. En: M. Cordero del Campillo & F.A. Rojo Vázquez (ed.). Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill, Interamericana. pp 22-38.
- Masuzama, T.; Komikado, T.; Iwaki, A.; Suzuki, I.; Kaneda, K.; Yanagihada, Y. (1996). Characterization of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *FEMS Microbiol Lett*, **142**: 77-83.

- Masuzawa, T.; Suzuki, H.; Kawabata, H.; Ishiguro, F.; Takada, N.; Yano, Y.; Yanagihara, Y. (1995). Identification of spirochetes isolated from wild rodents in Japan as *Borrelia japonica*. *J Clin Microbiol*, **33**: 1392-1394.
- Mather, T.N.; Telford III, S.R.; Moore, S.I.; Spielman, A. (1990). *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*: efficiency of transmission from reservoir to vector ticks (*Ixodes dammini*). *Exp Parasitol*, **70**: 55-61.
- Mather, T.N.; Wilson, M.L.; Moore, S.I.; Ribeiro, J.M.C.; Spielman, A. (1989). Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am J Epidemiol*, **130**: 143-150.
- Matuschka, F.R.; Eiffert, H.; Ohlenbusch, A.; Richter, D.; Schein, E.; Spielman, A. (1994a). Transmission of the agent of Lyme disease on a subtropical island. *Tropical Medicine and Parasitology*, **45**: 39-44.
- Matuschka, F.R.; Eiffert, H.; Ohlenbusch, A.; Spielman, A. (1994b). Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in Central Europe. *J Infect Dis*, **170**: 122-127.
- Matuschka, F.R.; Endepolis, A.; Richter, D.; Spielman, A. (1997). Competence of urban rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol*, **34**: 489-493.
- Matuschka, F.R.; Fischer, P.; Heiler, M.; Richter, D.; Spielman, A. (1992). Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochaete. *J Infect Dis*, **165**: 479-483.
- Matuschka, F.R.; Fischer, P.; Musgrave, K.; Richter, D.; Spielman, A. (1991). Host on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *Am J Trop Med Hyg*, **44** (1): 100-107.
- Matuschka, F.-R.; Heiler, M.; Eiffert, H.; Fischer, P.; Lotter, H.; Spielman, A. (1993). Diversionary role of hoofed game in the transmission of Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg*, **48** (5): 693-699.
- Matuschka, F.R.; Spielman, A. (1992). Loss of Lyme disease spirochetes from *Ixodes ricinus* ticks feeding on European blackbirds. *Exp Parasitol*, **74** (2): 151-158.
- Meier, C.; Srisopar, B.; Amtsberg, G. (1982). Untersuchungen zum Vorkommen von Treponemen bei Hunden mit Darmerkrankungen. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, **95**: 188-193.
- Merino, F.J.; Nuncio, S.; Saz, J.V.; Filipe, A. (1993). Enfermedad de Lyme: estudio de un área hiperendémica en España. *II Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Évora (Portugal), 1-4 Dic.
- Milne, A. (1950). The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Microhabitat economy of the adult tick. *Parasitology*, **40**: 13-34.

- Mishchenko, N.K. (1960). The role of birds and reptiles in the maintenance of homes of the central Asiatic tick-borne recurrence. *Zool Zh*, **39**: 424-428.
- Moter, S.E.; Hofmann, H.; Wallich, R.; Simon, M.M.; Kramer, M.D. (1994). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by OspA-specific PCR. *J Clin Microbiol*, **32**: 2980-2988.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erhlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Sym*, **51**: 263-273.
- Nadelman, R.B.; Luger, S.W.; Frank, E.; Wisniewski, M.; Collins, J.J.; Wormser, G.P. (1992). Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in the treatment of early Lyme disease. *Ann Intern Med*, **117**: 273-280.
- Nakao, M.; Miyamoto, K. (1995). Mixed infection of different *Borrelia* species among *Apodemus speciosus* mice in Hokkaido, Japan. *J Clin Microbiol*, **33**: 490-492.
- Nakayama, Y.; Spielman, A. (1989). Ingestion of Lyme disease spirochetes by ticks feeding on infected hosts. *J Infect Dis*, **160**: 166-167.
- Niesebaum, K. (1991). La enfermedad canina de Lyme. *Waltham Int Focus*, **1** (4): 6-9.
- Nilsson, I.; von Rosen, I.A. (1996). Serum antibodies against *Borrelia afzelli*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and the 41-kilodalton flagellin in patients from a Lyme borreliosis endemic area: analysis by EIA and immunoblot. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **104** (12): 907-914.
- Nohlmans, L.M.K.E.; de Boer, R.; van der Bogaard, A.E,J,M.; van Boven, C.P.A. (1995). Genotypic and phenotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from The Netherlands. *J Clin Microbiol*, **33**: 119-125.
- Núncio, M.S. (2000). Diagnóstico de borreliose de Lyme. Situação em Portugal. *V Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Madrid, 27-29 Sept.
- Núncio, M.S.; Péter, O.; Alves, M.J.; Bacellar, F.; Filipe, A.R. (1993). Isolamento e caracterização de borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Port Doenç Infect*, **16**: 175-179.
- Núñez, F.; Gutiérrez, J.; Rodríguez, M.J.; Rodríguez, M.; Pardal, J.M.; Guerrero, M.; Maroto, C. (1995). Prevalencia de los anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* en el área sur de Granada. Su relación con la serología de sífilis. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Nuttal, G.H.; Warburton, C. (1991). Ticks. A monograph of the Ixodoidea. Cambridge University Press (1ª Ed.). 348 pp.

- Ogden, N.H.; Nuttall, P.A.; Randolph, S.E. (1997). Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by cofeeding ticks. *Parasitology*, **115**: 591-599.
- Olmeda García, A.S. (1992). Transmisión experimental de *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) por *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 185 pp.
- Olmeda García, A.S.; Valcárcel Sancho, F.; Suárez Ferreiro, P.; Rodríguez Rodríguez, J.A.; Solana, A. (1991). Presencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) en perros, en la provincia de Madrid. *I Simposio Ibérico sobre Garrapatas Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Zaragoza, 2-5 Dic.
- Olmeda, A.S.; Caride, E. (1999). Garrapatas. En: Artrópodos Parásitos de los Pequeños Rumiantes. *Ovis*, **63**: 25-39.
- Olsen, B. ; Jaenson, T.G.T. ; Noppa, L. ; Bunikis, J. ; Bergstrom, S. (1993). A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature (London)*, **362** (6418): 340-342.
- Olsen, B.; Duffy, D.; Jaenson, T.G.T.; Gylfe, A.; Bonnedahl, J.; Bergström, S. (1995a). Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *J Clin Microbiol*, **33**: 3270-3275.
- Olsen, B.; Jaenson, T.G.T.; Bonnedahl, J.; Bergström, S. (1995b). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – infected ticks on migrating birds. *Appl Envir Microbiol*, **61**: 3082-3087.
- Oteo, J.A. ; Martínez de Artola, V. ; Casas, J.M.; Estrada-Peña, A. (1991). Enfermedad de Lyme en La Rioja. *Med Clín*, **96** (15): 599.
- Oteo, J.A.; Backenson, P.B.; Vitutia, M.M.; García-Moncó, J.C.; Rodríguez, I.; Escudero, R.; Anda, P. (1998). Use of the C3H/He Lyme disease mouse model for the recovery of a Spanish isolate of *Borrelia garinii* from erythema migrans lesions. *Res Microbiol*, **149** (1): 39-46.
- Oteo, J.A.; Elías, C.; Martínez de Artola, V.; Pérez, D. (1993a). Infección por *Borrelia burgdorferi* en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Un problema diagnóstico. *Med Clín*, **101**: 207-209.
- Oteo, J.A.; Estrada-Peña, A. (1991). *Ixodes ricinus*, vector comprobado de *Borrelia burgdorferi* en España. *Med Clín*, **96** (14): 599-603.
- Oteo, J.A.; Martínez de Artola, V.; Casas, J.; Lozano, A.; Fernández Calvo, J.L.; Grandival, R. (1992). Epidemiology and prevalence of seropositivity against *Borrelia burgdorferi* antigen in La Rioja, Spain. *Rev Epidém et Santé Publ*, **40**: 85-92.
- Pachner, A.R.; Steere, A.C. (1985). The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology*, **35**: 47.

- Padgett, P.J.; Bamford, L.; Gallas, T. (1996). Determination of the infection rate of small mammals using the polymerase chain reaction. *96th General Meeting of the American Society for Microbiology*. New Orleans. May, 19-23.
- Padula, S.I.; Dias, F.; Sampieri, A.; Craven, R.B.; Ryan, R.W. (1994). Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **32**: 1733-1738.
- Pérez-Eid, C. (1989). Dynamique saisonnière des nymphes et adultes d'*Ixodes ricinus* en phase libre sur la végétation, dans le foyer alsacien d'encéphalite à tiques. *Acarologia*, **XXX** (3) : 192-207.
- Perng, G.C.; Lefebvre, R.B.; Johnson, R.C. (1991). Further characterization of a potent immunogen and the chromosomal gene encoding it in the Lyme disease agent, *B. burgdorferi*. *Infect Immun*, **59**: 2070-2074.
- Persing, D.H.; Telford III, S.R.; Rys, P.N.; Dodge, D.E.; White, R.J.; Malawista, S.E.; Spielman, A. (1990). Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Museum Specimens of *Ixodes dammini* Ticks. *Science*, **249**: 1420-1423.
- Péter, O.; Bretz, A.-G. (1992). Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for the classification. *Zentralbl Bakteriol*, **277**: 28-33.
- Philipson, A. (1991). Antibiotic treatment in Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis*, **77**: 145-150.
- Piesman, J. (1991). Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) during partial blood meals. *J Med Entomol*, **28**: 259-262.
- Piesman, J. (1995). Dispersal of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari, Ixodidae). *J Med Entomol*, **32**: 519-521.
- Piesman, J.; Mather, T.N.; Telford III, S.R.; Spielman, A. (1986a). Concurrent *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* infection in nymphal *Ixodes dammini*. *J Clin Microbiol*, **24**: 446-447.
- Piesman, J.; Donahue, J.G.; Mather, T.N.; Spielman, A. (1986b). Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field-collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, **23**: 219.
- Piesman, J.; Hicks, T.C.; Sinsky, R.J.; Obiri, G. (1987a). Simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* by individual nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J Clin Microbiol*, **25**: 2012-2013.

- Piesman, J.; Mather, T.N.; Sinsky, R.J.; Spielman, A. (1987b). Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol*, **25**: 557-558.
- Piesman, J.; Maupin, G.D.; Campos, E.G.; Happ, C.M. (1991). Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J Infect Dis*, **163**: 895-897.
- Piesman, J.; Oliver, J.R.; Sinsky, R.J. (1990). Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg*, **42** (4): 352-357.
- Piesman, J.; Sinsky, R.J. (1988). Ability of *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis*, and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to acquire, maintain, and transmit Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J Med Entomol*, **25**: 336-339.
- Piesman, J.; Spielman, A. (1980). Human babesiosis on Nantucket Island: prevalence of *Babesia microti* in ticks. *Am J Trop Med Hyg*, **29**: 742-746.
- Piesman, J.; Spielman, A. (1982). *Babesia microti*: Infectivity of parasites from ticks for hamsters and white-footed mice. *Exp Parasitol*, **53**: 242-248.
- Pindak, F.F.; Clapper, W.E.; Sherrod, J.H. (1965). Incidence and distribution of spirochetes in the digestive tract of dogs. *Am J Vet Res*, **26**: 1391-1402.
- Post, J.E.; Shaw, E.E.; Wright, S.D. (1988). Suspected borreliosis in cattle. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 488.
- Postic, D.; Assous, M.V.; Grimont, P.A.D.; Baranton, G. (1994). Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (SS)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol*, **44**: 743-752.
- Postic, D.; Baranton, G. (1994). Molecular fingerprinting and phylogeny of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, p. 133-147. En: Yanagihara, Y.; Masuzawa, T. (eds.). Proceedings of the International Symposium on Lyme Disease in Japan. Kanzanji, Hamamatsu, Shizouka, Japan.
- Postic, D.; Edlinger, C.; Richaud, C.; Grimont, F.; Dufresne, Y.; Perolat, P.; Baranton, G.; Grimont, P.A.D. (1990). Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol*, **141**: 465-475.
- Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Patsouris, E. y cols. (1992). Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection*, **20**: 342-349.
- Radda, A.; Burger, I.; Stanek, G.; Wewalka, G. (1986). Austrian hard ticks as vectors of *Borrelia burgdorferi*, overview. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A)*, **263**: 79-82.

- Ranilla, F.; Abdalla, S.; Saz, J.V.; Gegúndez, M.I.; Jiménez, A.; Mayor, L.; Beltrán, M. (1995). Anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en la población de Menorca. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Raoult, D.; Hechemy, K.E.; Baranton, G. (1989). Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen from patients with Human Immunodeficiency Virus infection, Syphilis, and Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, **27**: 2152-2155.
- Ras, N.M.; Postic, D.; Foretz, M.; Baranton, G. (1997). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto; a bacterial species “made in the USA”?. *Int J Syst Bacteriol*, **47** (4): 1112-1117.
- Ribeiro, J.M. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol*, **32**: 463-478.
- Ribeiro, J.M.; Makoul, G.T. ; Levine, J. ; Robinson, D. R. ; Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med*, **161**: 332-344.
- Ribeiro, J.M.; Mather, T.N.; Piesman, J., Spielman, A. (1987). Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, **24** (2): 201-205.
- Richter Jr., P.J.; Kimsey, R.B.; Madigan, J.E.; Brooks, D.L. (1996). Compatibility of two species of *Ixodes* ticks with murid hosts and its effects on transmission of Lyme disease spirochaetes. *Med Vet Entomol*, **10**: 291-294.
- Rodhain, F. (1985). Transmission vectorielle: aspects actuels des recherches et perspectives. *Bull de l'Institut Pasteur*, **83**: 221-243.
- Rodríguez, M. ; Gutiérrez, J.; Pardal, J.M.; Núñez, F.; Rodríguez, M.J.; Guerrero, M.; Piédrola, G. (1995). Diagnóstico de la enfermedad de Lyme mediante la investigación de anticuerpos IgG. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Rodríguez-Rodríguez, J.A.; Martín Espada, M.C. (1994). Enfermedad de Lyme (borreliosis canina). *Inform Veter*, **149**: 41-50.
- Rogers, A.B.; Smith, R.D.S.; Kakoma, Y. (1999). Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi*, and *Borrelia coriaceae* in cattle. *Am J Vet Res*, **60** (6): 694-697.
- Rojo Vázquez, J. (1997). Seroprevalencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia conorii* en población humana y canina de la zona básica de salud de San Andrés del Rabanedo (León, España). *Rev Esp Salud Pública*, **71**: 173-180.

- Rosa, P.A.; Hogan, D.M. (1992). Colony formation by *Borrelia burgdorferi* in solid medium clonal: analysis of Osp locus variants. *First International Conference on Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface: An Agenda for Research*. Saint Paul, Minnesota, USA. pp 95-103.
- Rothwell, J.; Christie, B.; Williams, D.; Walker, K. (1989). Suspected Lyme disease in a cow. *Aust Vet J*, **66**: 296-298.
- Ruiz, E.M.; Rodríguez, L.A.; Gegúndez, M.I.; Jiménez, A.; Saz, J.V.; Beltrán, M. (1998). Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en pequeños mamíferos de una localidad de los montes de Toledo. *IV Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Setúbal (Portugal), 24-26 Sept.
- Russell, H.; Sampson, J.S.; Schmid, G.P.; Wilkinson, H.W.; Plikaytis, B. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J Infect Dis*, **149**: 465-470.
- Sáez, S.; Sánchez Covisa, A.; Guerrero Espejo, A. (1991). Garrapatas y enfermedad de Lyme. *Enf Infecc y Microbiol Clín*, **9** (2): 111-115.
- Saint Girons, I.; Gern, L.; Gray, J.S.; Guy, E.C.; Korenberg, E.; Nuttall, P.A.; Rijpkema, S.G.T.; Schönberg, A.; Stanek, G.; Postic, D. (1998). Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zbl Bakt-Int J Med M*, **287**: 190-195.
- Sánchez Porto, A.; Crespo Anguita, M.; Iglesias, C.; Lucio Villegas, M.C. (1991). Brote de borreliosis: a propósito de 7 casos. *Enf Infecc Microbiol Clín*, **9**: 125.
- Sánchez Serrano, L.P.; Vitutia García, M.M. (1994). Enfermedad de Lyme en España. *Boletín Epidemiológico y Microbiológico*, **2** (12): 229-232.
- Sato, Y.; Miyamoto, K.; Iwaki, A.; Musuzawa, T.; Yanagihara, Y.; Korenberg, E.I.; Gorelova, N.B.; Volkov, V.I.; Ivanov, L.I.; Liberova, R.N. (1996). Prevalence of Lyme disease spirochetes in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in far Eastern Russia. *Appl Environ Microb*, **62**: 3887-3889.
- Saz, J.V.; Merino, F.J.; Beltrán, M. (1995a). Situación actual de la enfermedad de Lyme en España: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Rev Clín Esp*, **195** (1): 44-49.
- Saz, J.V.; Merino, F.J.; Gegúndez, M.I.; Serrano, J.L.; Nuncio, M.S.; Filipe, A.R.; Beltrán, M. (1995b). Enfermedad de Lyme: relación entre población humana y canina en la población de Soria. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Saz, J.V.; Nuncio, S.; Merino, F.J.; Aquisé, M.; Medina, J.; Filipe, A. (1994). Enfermedad de Lyme en la provincia de Soria: estudio clínico-epidemiológico. *Enf Inf Microbiol Clín*, **12**: 52-59.

- Schillhorn van Veen, T.W.; Murphy, A.J.; Colmery, B. (1993). False positive *Borrelia burgdorferi* antibody titres associated with periodontal disease in dogs. *Vet Rec*, **132**: 512.
- Schmid, G.P. (1985). The global distribution of Lyme disease. *Rev Infect Dis*, **7**: 41-49.
- Schmid, G.P. (1989). Epidemiology and clinical similarities of human spirochetal diseases. En: Lyme Disease and other Spirochetal Diseases. *Rev Infect Dis*, **2** (6): 1433-1526.
- Schwan, T.G.; Burgdorfer, W. (1987). Antigenic changes of *Borrelia burgdorferi* as a result of *in vitro* cultivation. *J Infect Dis*, **156**: 852-853.
- Schwan, T.G.; Burgdorfer, W.; Garon, C.F. (1988). Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of *in vitro* cultivation. *Infect Immun*, **56** (8): 1831-1836.
- Schwan, T.G.; Simpson, W.J. (1991). Factors influencing the antigenic reactivity of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Scand J Infect Dis*, **77**: 94-101.
- Scriba, M.; Ebrahim, J.L.; Schlott, T.; Eiffert, H. (1993). The 39 kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: a target for bactericidal human monoclonal antibodies. *Infect Immun*, **61**: 4523-4526.
- Sellwood, R.; Bland, A.P. (1997). Ultrastructure of intestinal spirochaetes. En: D.J. Hampson & T.B. Stanton (ed.). Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Human. CAB International, Cambridge. pp 109-150.
- Serrano, J.L.; Merino, F.J.; Saz, J.V.; Filipe, A.R. (1994). Estudio epidemiológico y de seroprevalencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en una muestra de la población canina de la provincia de Soria. *1^{er} Congreso de Veterinarios de Castilla y León*. León, 27-29 Oct.
- Shih, C.-M.; Pollack, R.J.; Telford III, S.R.; Spielman, A. (1992). Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. *J Infect Dis*, **166**: 827-831.
- Shin, S.J.; Chang, Y.F.; Jacobson, R.H.; Shaw, E.; Lauderdale, T.L.; Appel, M.J.; Lein, D.H. (1993). Crossreactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. *Vet Microbiol*, **36**: 161-174.
- Sigal, L.H.; Zahradnik, J.M.; Lavin, P.; Patella, S.J.; Bryant, G.; Haselby, R.; Hilton, E.; Kunkel, M.; Adler-Klein, D.; Doherty, T.; Evans, J.; Malawista, S.E.; the Recombinant Outer Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. (1998). A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. *New Engl J Med*, **23**: 216-222.

- Simon, M.M.; Schaible, U.; Kramer, M.D.; Eckerskorn, C.; Müller, M.; Hermelink, H.K.; Wallich, R. (1991). Recombinant outer surface protein A from *Borrelia burgdorferi* induces antibodies protective against spirochetal infection in mice. *J Infect Dis*, **164**: 123-132.
- Simpson, W.J.; Schrupf, M.E.; Hayes, S.F.; Schwan, T.G. (1991). Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, **29**: 1940-1948.
- Simpson, W.J.; Schrupf, M.E.; Schwan, T.G. (1990). Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, **28**: 1329-1337.
- Smith, C.N. (1945). Biology of *Ixodes dentatus* Neumann (Ixodidae). *Ann Entomol Sci Am*, **38**: 223-233.
- Sonenshine, D.E. (1978). Radiant energy and tick activity. En: T.E. Gibson (ed.). Weather and Parasitic Animal Disease. Technical note WHO No.159.
- Sonenshine, D.E.; Atwood, E.L.; Lamb, J.T.Jr. (1966). The ecology of ticks transmitting Rocky Mountain spotted fever in a study area in Virginia. *Ann Entomol Soc Am*, **59**: 1234-1262.
- Sonenshine, D.E.; Clifford, C.M. (1973). Contrasting incidence of Rocky Mountain spotted fever in ticks infesting wild birds in eastern U.S. piedmont and coastal areas, with notes on the ecology of these ticks. *J Med Entomol*, **10**: 497-502.
- Sonenshine, D.E.; Stout, I.J. (1970). A contribution to the ecology of ticks infesting wild birds and rabbits in the Virginia – North Carolina Piedmont (Acarina: Ixodidae). *J Med Entomol*, **7**: 645-654.
- Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. En: Lea & Febiger (ed.). Philadelphia.
- Speck, S.; Reiner, B.; Wittenbrink, M.M. (2001). Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. *Vet Rec*, **149**: 19-20.
- Spielman, A. (1994). The emergence of Lyme disease and human babesiosis in a changing environment. *Ann N Y Acad Sci*, **740**: 146-156.
- Spielman, A.; Clifford, C.M.; Piesman, J.; Corwin, M.D. (1979). Human babesiosis on Nantucket Island, USA: description of the vector, *Ixodes (Ixodes) dammini*, n. sp. (Acarina: Ixodidae). *J Med Entomol*, **15**: 218-234.
- Spielman, A.; Kimsey, R.B. (1991). Zoonosis. *Encyclopaedia of Human Biology*, **7**: 891-900.
- Spielman, A.; Wilson, M.L.; Levine, J.; Piesman, J. (1985). Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu Rev Entomol*, **30**: 439-460.

Stanton, T.B. (1997). Physiology of ruminal and intestinal spirochaetes. En: D.J. Hampson & T.B. Stanton (ed.). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Human*. CAB International, Cambridge. pp 7-45.

Steere, A.C. (1989). Lyme disease. *N Engl J Med*, **321**: 586-596.

Steere, A.C. (1995). *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease, Lyme borreliosis). En: G.L., Mandell; R.G., Douglas; J.E., Bennett (ed.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, Inc. pp 2143-2155.

Steere, A.C.; Malawista, S.E.; Snyderman, D.R.; Andymann, W.A.; Ross, M.R.; Steele, F.M. (1977). Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Reum*, **20**: 7-17.

Stevens, A. (1989). Lyme borreliosis in domestic animals. *Connecticut Medicine*, **53** (6): 352-353.

Stiernstedt, G.; Ericksson, G.; Enfors, W.; Jörbeck, H.; Svenungsson, B.; Sköldenberg, B.; Granström, M. (1986). Erythema chronicum migrans in Sweden: clinical manifestations and antibodies to *Ixodes ricinus* spirochete measured by indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Infect Dis*, **18**: 217-224.

Stiernstedt, G.; Gustafsson, R.; Karlsson, M.; Svenungsson, B.; Skoldenberg, B. (1988). Clinical manifestations and diagnosis of neuroborreliosis. En: J.L. Benach & E.M. Bosler (ed.). *Lyme Disease and Related Disorders*. New York Academy of Science, New York. pp 46-55.

Tälleklint, L.; Jaenson, T.G.T. (1993). Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. *J Med Entomol*, **33**: 339-343.

Tälleklint, L.; Jaenson, T.G.T. (1994). Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J Med Entomol*, **31**: 880-886.

Tamayo, L.; García-Moncó, J.C.; Bratos, M.A.; Orduña, A.; Ortiz de Lejarazu, R.; Rodríguez-Torres, A. (1990). Anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en un grupo de población de Valladolid. *Enf Inf Microbiol Clín*, **8**: 661-664.

Telford III, S.R.; Fikrig, E. (1995). Progress towards a vaccine for Lyme Disease. *Clin Immunother*, **4** (1): 49-60.

Telford III, S.R.; Spielman, A. (1989). Enzootic transmission of the agent of Lyme disease in rabbits. *Am J Trop Med Hyg*, **41** (4): 482-490.

Telford III, S.R.; Urioste, S.S.; Spielman, A. (1992). Clustering of host-seeking nymphal deer ticks (*Ixodes dammini*) infected by Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Am J Trop Med Hyg*, **47** (1): 55-60.

- Telford, S.R.III.; Mather, T.N.; Moore, S.I.; Wilson, M.L.; Spielman, A. (1988). Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg*, **39**: 105-109.
- Tesouro, M.A.; Bacellar, F.; Sainz, A.; Nuncio, M.S.; Filipe, A. (1995). Valoración inmunológica frente a *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia conorii* en perros de la Comunidad Autónoma de Madrid infestados por garrapatas. *III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas*. Alcalá de Henares, 5-7 Nov.
- Thomas, D.D.; Comstock, L.E. (1989). Interaction of Lyme disease spirochetes with cultured eucaryotic cells. *Infect Immun*, **57**: 1324.
- Tovornik, D. (1989). Red squirrel (*Sciurus vulgaris* Linne, 1758) and fat dormouse (*Glis glis* Linne, 1766) as hosts of ixodid ticks in Slovenia (Yugoslavia). *Biol Vestin*, **37**: 83-96.
- Towbin, H.; Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J Imm Methods* **72**, 313.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *PNAS USA* **76**, 4350-4354.
- Tugwell, P.; Lancaster, J.L.Jr. (1962). Results of a tick-host study in Northwest Arkansas. *Journal of the Kansas Entomological Society*, **35**: 202-211.
- Uría, D.F.; Calatayud, M.; Mongelos, J.M.; Miguel, M.D.; Cobos, A.; Suárez, T. (1987). Meningopolineuritis como manifestación de la enfermedad de Lyme. *Med Clín*, **89**: 381-383.
- Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. (1987). Veterinary parasitology. En: Longman Scientific & Technical (ed.).
- van Dam, A.P.; Kuiper, H.; Vos, K.; Widjojokusumo, A.; de Jongh, B.M.; Spanjaard, L.; Ramselaar, A.C.P.; Kramer, M.D.; Dankert, J. (1993). Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*, **17**: 708-717.
- Volkman, D.J.; Luft, B.J.; Gorevic, P.D.; Schultz, J.; Padovano, L. (1991). Characterization of an immunoreactive 93-KDa core protein of *Borrelia burgdorferi* with a human IgG monoclonal antibody. *J Immunol*, **146**: 3177-3182.
- Wallich, R.; Helmes, C.; Schaible, U.E.; Lobet, Y.; Moter, S.E.; Kramer, M.D.; Simon, M.M. (1992a). Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of OspA, fla, HSP60 and HSP70 gene probes. *Infect Immun*, **60**: 4856-4866.

- Wallich, R.; Moter, S.E.; Kramer, M.D.; Gern, L.; Hofmann, H.; Schaible, U.E.; Simon, M.M. (1992b). Untersuchungen zur genotypischen und phänotypischen Heterogenität von *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose Infection. En: Hassler, D.; Kramer, M.; Maiwald, M.; Marget, W.; Zöller, L. (eds.). *Fortschritte der Infektiologie*, München: M M V Verlag. pp 176-191.
- Wallich, R.; Moter, S.E.; Simon, M.M.; Ebnet, K.; Heiberger, A.; Kramer, M.D. (1990). The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect Immun*, **58**: 1711-1719.
- Wallis, R.C.; Brown, S.E.; Kloter, K.O.; Main, A.J.Jr. (1978). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: field study of ticks. *Am J Epidemiol*, **108** (4): 322-327.
- Weber, A.; Heim, U.; Schafer, R. (1991). Zum Vorkommen von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* bei Hunden einer Kleintierpraxis in Nordbayern. *Berl Munch Tierärztl*, **104** (11): 384-386.
- Wells, S.J.; Trent, A.M.; Robinson, R.A.; Knutson, K.S.; Bey, R.F. (1993). Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. *Am J Vet Res*, **54** (3): 398-405.
- Westrom, D.R.; Lane, R.S.; Anderson, J.R. (1985). *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae): population dynamics and distribution of Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J Med Entomol*, **22**: 507-511.
- Wheeler, C.M.; Coleman, J.L.; Habicht, G.S.; Benach, J.L. (1989). Adult *Ixodes dammini* on rabbits: development of acute inflammation in the skin and immune response to salivary gland, midgut, and spirochetal components. *J Infect Dis*, **159**: 265-273.
- Wieler, L.H.; Szattelberger, C.; Weiss, R.; Bauerfeind, R.; Kutzer, P.; Failing, K.; Baljer, G. (1999). Serum antibodies against particular antigens of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and their potential in the diagnosis of canine Lyme borreliosis. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, **112** (12): 465-471.
- Wilske, B.; Anderson, J.F.; Barbour, A.G.; Hovind-Hougen, K.; Johnson, R.C.; Preac-Mursic, V. (1991). Taxonomy of *Borrelia* spp. *Scand J infect Dis Suppl*, **77**: 108-129.
- Wilske, B.; Barbour, A.G.; Bergstrom, S.; Burman, N.; Restrepo, B.I.; Rosa, P.A.; Schwan, T.; Soutschek, E.; Wallich, R. (1992). Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res Microbiol*, **143**: 583-596.
- Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Fuchs, R.; Bruckbauer, H.; Hofmann, A.; Zumstein, G.; Jauris, S.; Soutschek, E.; Motz, M. (1990). Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*; implications for improving serodiagnosis of Lyme borreliosis. En: *New Antibacterial Strategies* (Neu, H.C.). Churchill Livingstone (ed.), London. pp 47-63.

- Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Göbel, U.B.; Graf, B.; Jauris, S.; Soutschek, E.; Schwab, E.; Zumstein, G. (1993a). An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol*, **31**: 340-350.
- Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Jauris, S.; Hofmann, A.; Pradel, I.; Soutschek, E.; Schwab, E.; Will, G.; Wanner, G. (1993b). Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, **61**: 2182-2191.
- Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Schierz, G.; Busch, R.V. (1986). Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl Bakt Hyg*, **263**: 92-102.
- Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Schierz, G.; Kuhbeck, R.; Barbour, A.G.; Kramer, M. (1988). Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci*, **539**: 126-143.
- Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Schierz, G.; Liegl, G.; Gueye, W. (1989). Detection of IgM- and IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi* using different strains as antigen. En: Stanek (ed.). Lyme Borreliosis II. *Zbl Bakt Suppl* 18. Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
- Wilson, M.L.; Telford III, S.R.; Piesman, J.; Spielman, A. (1988). Reduced abundance of immature *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) following elimination of deer. *J Med Entomol*, **25**: 224-228.
- Wittenbrink, M.M.; Failing, K.; Krauss, H. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs. The impact of serum absorption with homologous and heterologous bacteria. *Veterinary Microbiology*, **48**: 257-268.
- Wright, S.D.; Nielsen, S.W. (1990). Experimental infection of the white-footed mouse with *Borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res*, **51** (12): 1980-1987.
- Young, R.A.; Elliot, T.J. (1989). Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell*, **59**: 5-8.
- Zoller, L.; Burkard, S.; Schäfer, M. (1991). Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol*, **29**: 174-182.
- Zung, J.L.; Lewengrub, S.; Rudzinska, M.A.; Spielman, A.; Telford, S.R.; Piesman, J. (1989). Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. *Can J Zool*, **67**: 1737-1748.