

Borrelia burgdorferi, descubierta como responsable de la enfermedad de Lyme (Burgdorfer, 1982), se transmite al hombre a través de la picadura de garrapata del género *Ixodes* y se caracteriza desde el punto de vista clínico por la aparición de un cuadro multisistémico con afectación de varios órganos tales como piel, corazón, sistema nervioso central, articulaciones, etc.

El diagnóstico clínico es difícil, ya que un elevado número de enfermos no recuerdan el antecedente de la picadura de garrapata, y hasta en un 50 % de los afectados tampoco aparece la lesión cutánea característica, el eritema migrans. Las fases posteriores de la enfermedad se caracterizan por la inespecificidad de los signos y síntomas. Por todo ello es necesario la realización de pruebas de laboratorio que confirmen la existencia de infección.

1. DIAGNÓSTICO DIRECTO

Se basa, como siempre, en la visualización del microorganismo o su aislamiento. Para la realización de ambos se puede partir de sangre, muestras cutáneas (tomadas preferentemente de la periferia de la lesión del eritema), líquido cefalorraquídeo (LCR), sinovial o incluso orina. Si el cultivo no puede realizarse de forma inmediata, se recomienda transportar la muestra en caldo infusión corazón o tioglicolato.

1.1. Cultivo.

El medio más utilizado es el de Barbour-Stoenner-Kelley (BSK-I). Posteriormente, al mismo medio se le suprimió la glutamina (BSK-II) y, recientemente, se ha preconizado el BSK-H, idéntico al anterior pero sin gelatina. Además, todos deben contener L-cisteína, dilitotritol y antimicrobianos (Anderson, 1989; Berger, 1992). En teoría, la utilización de medios de cultivo es el procedimiento ideal para confirmar el diagnóstico etiológico, pero su complejidad, lentitud de crecimiento (3-4 semanas y, a veces, meses) y bajos índices de recuperación hacen que no se lleve a cabo de forma habitual (Stanek, 1991; Strle, 1996). Sin embargo, constituyen la principal forma de realizar el diagnóstico en la fase inicial de la enfermedad, ya que en condiciones estandarizadas su rentabilidad llega hasta el 50% (Strle, 1996).

1.2. Visualización.

Presenta serias dificultades, ya que *B. burgdorferi* se observa muy difícilmente en tejidos (debido al pequeño número de microorganismos), así como en LCR o muestras de sinovia. Se puede realizar con preparaciones no teñidas, en fondo oscuro, o teñidas. En este caso pueden ser fluorescentes (con anticuerpos monoclonales o con naranja de acridina) y no fluorescentes, por impregnación con plata. También son válidas para confirmar el crecimiento en cultivo.

2. DIAGNÓSTICO INDIRECTO

2.1. Antígenos.

Los antígenos disponibles incluyen células lisadas enteras de distintas cepas (Berardi, 1988), antígenos parcialmente purificados (Hansen, 1991), o proteínas recombinantes (Simpson, 1990). Recientemente se ha evaluado la inmunorreactividad de las proteínas 18, 21-25, 28, 30, 34, 39, 41, 45, 58, 66 y 83-93 kDa, cuyos pesos moleculares pueden variar ligeramente entre las cepas y tienen diferente localización en la bacteria (Johnson, 1990). Los principales inconvenientes de los antígenos derivan de dos problemas. Uno, su codificación genética en plásmidos, lo que les confiere una importante variabilidad. Y dos, su falta de especificidad, ya que muchos epítopos están presentes en otros microorganismos (espiroquetas, enterobacterias, etc.) o tejidos humanos (Robinson, 1993; Bruekbaver, 1991; Luft, 1991). Además, la presencia de anticuerpos frente a la proteína de 41 kDa puede desencadenar muchas de las alteraciones clínicas de la neuroborreliosis. De hecho, este tipo de anticuerpos han sido encontrados de forma más frecuente en diversas series, lo que puede ser por la razón mencionada o por tratarse de uno de los antígenos más inmunógeno y, a la vez, inespecífico. Actualmente se suele usar una forma purificada de la misma (Johnson, 1996) para detectar anticuerpos. Se ha estudiado específicamente otras proteínas para conocer su rentabilidad diagnóstica. Así, la lipoproteína de 39 kDa, es sensible y específica como marcador de estadio tardío de la enfermedad de Lyme (Sullivan, 1994), aún cuando algunos autores encuentran falsos positivos en casos de sífilis (Dressler, 1993); la proteína de 93 kDa es, igualmente, específica de estadios tardíos (Wilske, 1990; Hammann-Brand, 1994), mientras que, por el contrario, las proteínas de 21-25 kDa y la de 34 kDa son altamente específicas de estadios tempranos. Recientemente (Schwan, 1996), se ha identificado el antígeno GlpQ como un epítipo específico presente en enfermos con borreliosis recurrente. Este hecho es de gran interés clínico, ya que su incorporación en las pruebas nos puede excluir falsas serologías positivas en el diagnóstico de la borreliosis de Lyme.

2.2. Métodos de diagnóstico.

Los métodos más utilizados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA indirecto o de captura y el Western-Blot o

Immunoblot. Todas ellas han tenido, al menos durante muchos años, el inconveniente de una falta de reproducibilidad inter e intralaboratorio.

Inmunofluorescencia indirecta. Aunque algunos autores preconizan que es tan reproducible como el ELISA (Bakken, 1992), lo cierto es que es más difícil de estandarizar. Es rentable en estadios tardíos de la enfermedad, pero cuando la manifestación que se presenta es el eritema migrans. Uno de los aspectos importantes sería establecer la dilución óptima para el punto de corte, ya que se han llegado a manejar valores tan dispares como 1/16, 1/128 o incluso 1/256, con lo que la interpretación es difícil y la influencia en los resultados epidemiológicos, notable (Gutiérrez, 1995b).

ELISA. Puede ser de tipo indirecto o de captura IgM. Tiene la ventaja de su automatización, lo que permite el procesamiento de un volumen grande de muestras, así como una mejor estandarización. El ELISA de captura IgM ha demostrado ser más sensible (Callister, 1993), estando menos influenciado por la presencia de anticuerpos IgG y factor reumatoide. El ELISA de captura IgM presenta menores ventajas (Tilton, 1994).

Western-blot. Se utiliza para la confirmación de las pruebas de IFI y ELISA en base a que permite conocer frente a qué antígenos ocurre la síntesis de anticuerpos. Su interpretación debe de hacerse de forma cuidadosa y estricta, existiendo en este momento diferentes criterios según los diversos autores. Estos criterios pueden ser de tipo *cualitativo* (Tilton, 1994), valorando como positiva la infección por *B. burgdorferi* cuando aparecen determinadas bandas, *cuantitativo* (Dressler, 1993), valorando no tanto el tipo de bandas, sino el mayor o menor número de las mismas, o una combinación de ambos criterios (Engstrom, 1995). En la tabla 1 aparecen reflejados los distintos criterios existentes en el momento actual. Estos se han establecido para detectar la enfermedad por *B. burgdorferi* o, al menos, la infección previa, ya que la simple presencia de bandas no es indicativo de la misma por los motivos antes expuestos. Nosotros, en nuestro Departamento (Núñez, 1996) hemos intentado seleccionar bandas mediante la elección de aquellas que reflejaran los anticuerpos IgG menos frecuentes en individuos que carecían de factores que pudieran interferir en la respuesta de anticuerpos y las que presentaban un comportamiento adecuado, dada su frecuencia, en un grupo con diagnóstico establecido para la borreliosis de Lyme. Posteriormente, y tras comprobar la utilidad diagnóstica con los criterios establecidos por otros autores, comprobamos cómo la presencia de anticuerpos frente a las proteínas de 93, 39, 34 y 23 kDa mostraba una mayor rentabilidad. Como en el caso del ELISA, se han descrito resultados falsamente positivos en infecciones por el virus herpes simple (Huycke, 1992; Gutiérrez, 1995a).

2.3. Significado clínico.

Para su análisis lo hemos sistematizado en los siguientes apartados:

- En términos generales, el serodiagnóstico con los distintos métodos disponibles es complicado en la enfermedad de Lyme por las reacciones cruzadas de distintos polipéptidos con otros antígenos, la demora en el desarrollo de la respuesta inmune humoral y el efecto supresivo de la terapia antimicrobiana temprana sobre dicha respuesta (Berardi, 1988; Gerber, 1996) ya que, a veces se puede asistir a una serorreversión después del tratamiento (Gutiérrez, 1995c). A pesar de todo, hoy día es la mejor prueba de laboratorio de que se dispone, aunque hay que saber interpretarla.
- La determinación de anticuerpos es generalmente positiva cuando existen manifestaciones generales y en fases secundaria y terciaria de la enfermedad. Cuando la única manifestación es el eritema migrans, los anticuerpos suelen aparecer en menos del 50 % de los casos (Strle, 1996; Hoffman, 1996).
- En ausencia de antecedentes de eritema migrans y, antes de aplicar las pruebas serológicas, se debe excluir cualquier otra causa etiológica para aumentar el rendimiento de las mismas (Seltzer y Shapiro, 1996). Partiendo de esta base, se debe realizar una prueba ELISA (anticuerpos totales o IgG e IgM) y, en su defecto, una prueba de IFI. Todo resultado positivo o dudoso se debe confirmar con Western-blot de IgG y/o IgM. Para establecer el diagnóstico de la enfermedad actual o, en su defecto, de infección previa, los resultados de IgM se deben interpretar según los criterios de Engstrom (1995), y los de IgG según los de Dressler (1993), en base a los estudios de Johnson (1996) y Leude (1996).
- Cuando se quiera diagnosticar neuroborreliosis con métodos serológicos es necesario demostrar la producción local de anticuerpos, aunque se han descrito falsos resultados negativos en el 10% de los enfermos en fases iniciales (Haass y Treib, 1996).
- Los anticuerpos IgM pueden persistir durante mucho tiempo y, en estos casos, se debe considerar la realización de un nuevo tratamiento si se produce un aumento significativo del título de anticuerpos acompañado de nuevos síntomas de la enfermedad (Gutiérrez, 1993; Hofman, 1996).
- Puede existir reactividad serológica compartida con infecciones por otras espiroquetas y falsa reactividad en las infecciones agudas por herpes virus, individuos infectados por el VIH, pacientes con manifestaciones neurológicas y reumatológicas, mujeres gestantes e incluso en sujetos sanos (Núñez, 1996). La causa de todos estos falsos positivos pudiera deberse a la síntesis de anticuerpos frente a estructuras antigénicas similares a *B. burgdorferi*, aún cuando no puede excluirse de forma taxativa el hecho de que estén realmente infectados por esta espiroqueta. Por ello, es necesario realizar nuevas pruebas. La utilización de antígenos purificados parece mejorar la especificidad, sobretudo cuando se demuestra una persistencia en el tiempo de una prueba serológica positiva. En ausencia de tratamiento específico, la sero-reversión se debe asociar a una prueba falsamente positiva.
- La simple positividad de bandas en el Western-blot puede indicar que estamos ante un contacto pasado con el microorganismo, una infección aguda activa, una infección persistente, síndromes post-infecciosos, reactividad cruzada con otros microorganismos, o ser fruto de una estimulación monoclonal o policlonal inespecífica de linfocitos B en el curso de infecciones por virus linfotropos.

3. TECNICAS DE AMPLIFICACION GENETICA

La detección directa de secuencias de ADN específicas mediante PCR puede ser una técnica prometedora que complemente las pruebas serológicas, si bien no está exenta de problemas. La causa de error más frecuente es la aparición de falsos positivos como consecuencia de la amplificación de un ADN distinto en la muestra analizada y la dificultad surgida, a veces, en la hibridación de los *primers* al ADN diana debido a la gran variabilidad genómica en *B. burgdorferi*. Los falsos negativos se deben, sobre todo, a la existencia de una pequeña cantidad de ADN diana y a la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa. La aparición de estos inhibidores depende del tipo de muestra siendo poco frecuentes en LCR y más en muestras de orina, biopsias de tejidos y sangre.

Se han utilizado diversas secuencias diana con genes específicos que incluyen los correspondientes a la proteína de superficie A (Osp A), la flagelina y el ADNr 16S, con una sensibilidad muy similar en todos ellos (tabla 2). En líquido sinovial parece más conveniente la amplificación del gen Osp A (Nocton, 1994), aún cuando su utilización en nuestro medio está dificultada por presentar una homología con las cepas europeas de sólo el 80%. De esta forma, las infecciones por *B. garinii* no serían detectadas utilizando los mencionados *primers*. En la artritis de Lyme, la investigación de ADN en orina es menos sensible que los métodos serológicos, posiblemente al bajo número de microorganismos y a su aparición en forma intermitente. En los casos de neuroborreliosis, la PCR pudiera ser una técnica a tener en cuenta dada la dificultad del diagnóstico por cultivo en muestra de LCR. No obstante, la últimas aportaciones son poco alentadoras, con tasas de positividad del 25% (nocton, 1996).

Resumen, la PCR es una técnica sensible y específica, pero tiene el inconveniente de no haber encontrado la diana idónea, unas veces por falta de expresión (ADNr 16S) y otras por variabilidad en la secuencia (Osp A). En este momento, no sustituye a la evaluación clínica y a la serología, aunque si completa el diagnóstico en aquellos casos en los que se puede obtener un resultado positivo (Gutiérrez, 1995d). Un resultado negativo no excluye la existencia de enfermedad.

Como conclusión, y debido a la dificultad del diagnóstico serológico de la borreliosis de Lyme, proponemos la realización del siguiente protocolo de actuación.

1. Determinación de anticuerpos tan sólo en aquellos enfermos en los que se hay excluido cualquier causa compatible clínicamente con la enfermedad de Lyme.
2. Aplicación secuencial de varias pruebas ELISA que demuestren la presencia persistente de anticuerpos frente a antígenos de *B. burgdorferi*.
3. Interpretación del Western-blot mediante criterios preestablecidos y contrastados.
4. Caso de estar disponible, se puede realizar una prueba de PCR, valorando muy bien la interpretación de la misma según lo señalado anteriormente. Nunca debe realizarse de forma sistemática en la rutina diaria.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen JF, Magnarelli La, Le Febvre RB. Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. J Clin Microbiol 1989; 27:13-20.
- Bakken L, Cade K, Callister S. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. JAMA 1992; 268:851-895.
- Berardi V, Weeks K, Steere C. Serodiagnosis of early Lyme disease analysis of IgM and IgG antibody responses by using and antibody-capture enzyme immunoassay. J Infect Dis 1988; 158:754-760.
- Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. J Clin Microbiol 1992; 30:359-361.
- Bruckbauer H, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 11:225-232.
- Burgdorfer W, Barbour A, Hayes S, Benach J, Grunwaldt R, Davis J. Lyme disease, a tick-borne spirochetosis? Science 1982; 216:1317-1319.
- Callister S, Schell R, Cade K. Characterization of the borreliosis antibody response to *Borrelia burgdorferi* in humans: a serodiagnosis test. J Infect Dis 1993; 167:158-164.
- Dressler F, Whales J, Reinhardt B, Steere A. Western-blottin in the serodiagnosis of Lyme disease. J Infect Dis 1993; 167:392-400.
- Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol 1995; 33:419-427.
- Gerber MA, Shapiro ED, Burke GS, Parcels VJ, Bel GL, and the Pediatric Lyme Disease Study Group. Lyme disease in children in southeastern Connecticut. N Eng J Med 1996; 335:1270-1274.
- Gilmore RD, Kappel KJ, Johnson, BJB. Molecular characterization of a 35-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*, an antigen of

- diagnostic importance in early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1997; 35:86-91.
- Gutiérrez J, Palermo M, Maroto MC, Abellán M. Atypical bilateral symmetric erosive chronic polyarthritis in the course of Lyme disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:787-789.
- Gutiérrez J, Maroto MC. False positive antibodies to *Borrelia burgdorferi* in infections by herpes virus. *Biomed Letter* 1995a; 52:33-35.
- Gutiérrez J, Maroto MC, de la Higuera A. Three years study of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995b; 14:542-545.
- Gutiérrez J, Núñez F, Uvilla N, Maroto MC. Borreliosis de Lyme en el niño: doble infección o evolución atípica. *Med Clin (Barc)* 1995c; 105:317-318.
- Gutiérrez J, Rodríguez MA, Maroto MC. Applications of PCR to diagnose Lyme borreliosis. *Serol Immunother* 1995d; 7:107-125.
- Haas A, Treib J. Neurological manifestations and classification of borreliosis. *Infection* 1996; 24:467-469.
- Hammand-Brand A, Flondo M, Brade V. Evolution of a passive hemmagglutination assay as screening test and of a recombinant immunoblot as confirmatory test for serological diagnosis of Lyme disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13:572-575.
- Hansen K, Pii K, Lebech A. Improved IgM serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a microcapture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella. *J Clin Microbiol* 1991; 26:338-346.
- Hofman H. Lyme borreliosis. Problem of serological diagnosis. *Infection* 1996; 24:470-471.
- Huycke M, DAlessio D, Marx J. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* by indirect fluorescent antibody assay, ELISA and Western-blot in healthy adults in Wisconsin and Arizona. *J Infect Dis* 1992; 165:1133-1137.
- Johnson BJB, Robbins KE, Bailey RE. Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996; 174:346-353.
- Leude TB, Collins MF, Craig WY. New laboratory guidelines for serologic diagnosis of Lyme disease: evaluation of the two-test protocol. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2343-2350.
- Luft B, Pawagi G, Jiang W, Fiseene S, Gorevia P, Dunn J. Analysis and expression of the *Borrelia burgdorferi* P/Gav Fla gene: identification of heterogeneity with 1331 strains. *FEMS Microbiol Letters* 1991; 935963.
- Nocton J, Dressler F, Rutledge B, Rys F, Persing D, Steere A. Detection of *Borrelia* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid in Lyme arthritis. *N Eng J Med* 1994; 330:229-234.
- Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme dermatitis. *J Infect Dis* 1996; 174:623-627.
- Núñez F. Borreliosis de Lyme. Rentabilidad diagnóstica de distintas técnicas de investigación de anticuerpos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1996.
- Robinson J, Pilot-Matias T, Pratt S, Pates B, Bevit T, Humt J. Analysis of the humoral response to the flagellin proteins of *Borrelia burgdorferi*: cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from syphilis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:629-635.
- Schwan TG, Schrupf ME, Glinnebusch BJ, Anderson DE, Konkel ME. GIpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2483-2492.
- Seltzer EG, Shapiro ED. Misdiagnosis of Lyme disease: when not to order serological tests. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:762-763.
- Simpson W, Schrupf M, Schwan J. Reactivity of human Lyme borreliosis sera with 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1327-1329.
- Stanek G. Laboratory diagnosis and seroepidemiology of Lyme disease. *Infections* 1991; 19:263-267.
- Strle F, Nelson JA, Ruzic-Sabljić E. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis* 1996; 23:61-65.
- Sullivan T, Hechemy K, Harris H. Monoclonal antibody to native P39 protein from *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:423-429.
- Tilton R. Laboratory aids for the diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection. *J Spiroch Tick-Borne Dis* 1994; 1:18-23.
- Wilske B, Preac-Mursic R, Fuchs H. Immunodominant proteins to *Borrelia burgdorferi*: implications for improving serodiagnosis of Lyme borreliosis. En: Neu HC (ed). *New antibacterial strategies*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1990; 47-63.
-

Tabla 1. Criterios de positividad según las bandas observadas en el Western-blot de *Borrelia burgdorferi sensu strictu* (bandas de 93, 66, 60, 58, 45, 41, 39, 37, 34, 31, 30, 28, 23, 21 y 18 kDa).

	Resultados	Western-blot IgG	Western-blot iGM
Engstrom	Positivo		2 bandas (23-24, 39, 41)
	Negativo		Otra combinación distinta a la anterior
Dressler	Positivo	5 bandas (18, 21-23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, 93)	
	Negativo	Otra combinación distinta a la anterior	