



## DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS

Las enfermedades transmitidas por garrapatas están aumentando globalmente. La enfermedad de Lyme es una de las infecciones transmitidas por vector más prevalentes en Estados Unidos y la Unión Europea, con cifras que alcanzan niveles epidémicos (Kugeler, 2015).

Si bien la mayoría de las garrapatas son capaces de transmitir numerosos patógenos al ser humano, la enfermedad de Lyme es la más conocida; ésta es causada por bacterias del género *Borrelia*, generalmente la espiroqueta Gram negativa *Borrelia burgdorferi*. Las espiroquetas son un grupo de bacterias filogenéticamente diferentes que presentan un modo único de desplazamiento a través de filamentos axiales (endoflagelos).

*Borrelia* se divide en “genoespecies”; entre las cuales las más comunes son *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* y la recientemente identificada *B. miyamotoi*.

*B. burgdorferi* invade la sangre y tejidos de varios mamíferos y aves a través de la mordida de las garrapatas del género *Ixodes*. El reservorio natural de *B. burgdorferi* parece ser el ratón de patas blancas; luego de la ingesta de sangre procedente de un animal infectado, la garrapata puede transmitir las espiroquetas a personas, ciervos, y otros animales de sangre caliente. En la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos, la infección por *B. burgdorferi* puede resultar en la enfermedad de Lyme; no obstante, existen portadores sanos (esto es, no todo aquel que es mordido por una garrapata se enferma). Cabe destacar que todas las especies de *Borrelia* causan enfermedades, 21 de las cuales están asociadas con enfermedad de Lyme.

Es importante recordar que la enfermedad de Lyme puede ser aguda (manifestándose inmediatamente luego de la mordedura de garrapata) o tardía/persistente/crónica (ocurriendo y persistiendo luego de la mordedura inicial; Donta 2002). Ha habido un intento de distinguir la enfermedad “tardía” de la forma “crónica”, infiriendo que dichos pacientes sufren de trastornos psiquiátricos; otros han usado el término “crónico” para designar la enfermedad posterior al tratamiento (post-Lyme), asumiendo que la infección ha sido tratada y los síntomas remanentes caen en la misma categoría que aquellos que sufren de fibromialgia o fatiga crónica (Seltzer et. al. 2000; Steere A. C. 2001). La existencia de la enfermedad de Lyme es avalada por estudios epidemiológicos que demuestran que el 30-50% de los pacientes desarrollan un trastorno con múltiples síntomas indistinguibles de la fibromialgia y fatiga crónica (Asch et. al. 1994; Shadick et. al. 1994).

Dado el número de posibles coinfecciones (es decir, infecciones transmitidas por garrapatas - TBI) transmitidas por garrapatas (como Bartonella, Babesia, Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia, etc.), es más correcto hablar de enfermedad transmitida por garrapatas en lugar de sólo la enfermedad de Lyme que sólo se refiere a la infección de *Borrelia*. A menudo, el término "enfermedad de Lyme" se utiliza ampliamente para las enfermedades transmitidas por garrapatas; sin embargo, el Dr. Horowitz propuso que la infección persistente/crónica por *Borrelia* y otras coinfecciones se denominara Lyme-MSIDS (síndrome de enfermedades infecciosas sistémicas

múltiples). Este es un nombre más adecuado, ya que las garrapatas pueden transmitir un gran número de otros patógenos en ausencia de Borrelia.

La borreliosis de Lyme es una enfermedad multisistémica con manifestaciones diversas que dificultan el diagnóstico clínico. La enfermedad de Lyme exhibe diversos síntomas que pueden confundirse con trastornos inmunes e inflamatorios (para más información consultar el libro del Dr. Horowitz titulado “¿Porque no puedo mejorarme?”). Hay diferentes guías (del Dr. Horowitz ó en la web [www.lymedisease.org](http://www.lymedisease.org)) para pacientes y doctores con la finalidad de tomar en consideración dichos síntomas. Una nueva guía revisada llamada HMQ (“El cuestionario médico Horowitz”, del inglés “The Horowitz Medical Questionnaire” y validada sobre 1600 pacientes) ha sido publicada en el nuevo libro del Dr. Horowitz (*Como puedo mejorarme*).

La inflamación alrededor de la mordida de la garrapata causa lesiones en la piel. El eritema crónico migrans (ECM) es una lesión típica en la piel con un centro claro con apariencia de diana o círculos concéntricos que se manifiesta en el estadio inicial de la enfermedad. La artritis, los síntomas neurológicos y enfermedad cardiovascular pueden manifestarse en estadios posteriores. Si bien el tratamiento temprano de la infección aguda es sencillo, pacientes diagnosticados posteriormente pueden sufrir de enfermedad crónica de Lyme y condiciones asociadas que son más difíciles de diagnosticar y tratar.

También es importante tener presente que el médico clínico necesita evaluar el escenario completo. El diagnóstico de la enfermedad de Lyme y otras IMG es extremadamente complejo, las complicaciones en el diagnóstico son resultado de pruebas de laboratorio inadecuadas. Los casos de enfermedad de Lyme suelen ser erróneamente diagnosticados y confundidos con otras patologías y, aun cuando el diagnóstico es efectuado correctamente, suele ser difícil de verificar debido a que las pruebas de laboratorio apropiadas no están siempre disponibles. Por ésta razón, algunos médicos basan su diagnóstico en la presencia de la lesión en forma de diana en la piel, sin realizar pruebas adicionales. Otros solicitan confirmación mediante pruebas de laboratorio antes de iniciar el tratamiento. Muy pocas pruebas para IMG tienen aprobación para diagnóstico clínico; la mayoría de ellos son “para investigación” y están orientados a ayudar al diagnóstico de pacientes con manifestaciones semejantes a las de la enfermedad de Lyme.

Las pruebas de laboratorio no solo contribuyen a diagnosticar una enfermedad, sino además al cuidado y tratamiento. Una buena prueba contribuye a que el médico evalúe la severidad de la enfermedad, el progreso de la misma, estabilidad o resolución, reincidencia, a elegir fármacos o ajustar el tratamiento. Desafortunadamente, un test con dichas prestaciones no se encuentra disponible para la enfermedad de Lyme. Se han hecho grandes esfuerzos monetarios para mejorar la eficacia del diagnóstico; no obstante, han resultado infructuosos para mejorar la eficacia de las pruebas. ¿Porque? Hay numerosas razones, pero la más importante es la naturaleza de éstos agentes infecciosos, que han desarrollado múltiples estrategias para evadir el sistema inmune. Las pruebas más comúnmente usadas son serológicas, pero muchos pacientes no producen anticuerpos, arrojando así resultados negativos. Hay numerosas razones por las cuales los anticuerpos no se observan cuando el paciente padece la infección de Lyme:

- (i) prueba diagnóstica efectuada precozmente (en el caso de infecciones agudas)
- (ii) la saliva de la garrapata posee inmunosupresores que previenen el inicio de la respuesta inmune
- (iii) cuando *Borrelia* está en forma de quiste no sintetizan moléculas de superficie contra las que se puedan generar anticuerpos

Adicionalmente, dado el número de cepas idénticas (sumado al hecho de que es probable que no todas han sido identificadas) las pruebas disponibles no abarcan a todas las cepas; luego, si un paciente es infectado por una cepa que no es cubierta por un test determinado, el resultado será negativo. Todo esto subraya la importancia de un Médico Especialista que sepa cómo aprovechar las pruebas de laboratorio correctas e interpretar los resultados. Un entendimiento de las limitaciones y significado de una prueba diagnóstica es de gran importancia.

A continuación se presentan la mayoría de los métodos diagnósticos utilizados para la evaluación de enfermedades crónicas y agudas. Un espacio aparte merece la enfermedad persistente/crónica puesto que requiere un abordaje más amplio basado en los síntomas múltiples desarrollados por pacientes crónicos.

## **MICROSCOPIA**

Consiste en el examen de un frotis sanguíneo o muestra de tejido usando un microscopio de alta definición con el propósito de detectar espiroquetas. Esta técnica es demandante y poco sensitiva cuando se emplean muestras de sangre debido al número de bacterias de *Borrelia* presentes, especialmente en fases iniciales de la infección. Además son muy pocos los ensayos clínicos que han empleado ésta técnica, dificultando el discernimiento acerca de su utilidad en el diagnóstico durante fases tempranas de la infección o una reactivación de la infección. Asimismo, otras enfermedades mediadas por espiroquetas deberían ser excluidas antes de emplear éste método.

La microscopía de foco flotante es una técnica desarrollada para detectar espiroquetas en muestras de tejido, pero no ha sido empleada fuera del laboratorio de investigación, y presenta la dificultad práctica de identificar tejidos infectados y efectuar la biopsia.

## **DETECCION EN CULTIVO**

Los requisitos de crecimiento de *Borrelia* vuelven a estos organismos difíciles de cultivar y, aún en condiciones óptimas, su crecimiento es lento. Esta es la razón por la cual el crecimiento bacteriano es impráctico para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Al estar *Borrelia* adaptada a la propagación en organismos vivos, su cultivo es dificultoso y los métodos de laboratorio asociados no son reproducibles. El crecimiento lento impide que los resultados sean informados en una franja de tiempo razonable.

## **BIOPSY**

Aproximadamente el 60-80% de los especímenes aislados mediante lavado salino y aspiración con aguja del borde de una lesión con diagnóstico presuntivo de eritema migrans o mediante biopsia por punción con aguja de 2 mm revelan *B. burgdorferi*. Sin embargo, debido a que la

presencia de la lesión en combinación con historia previa y manifestación clínica son suficientes para iniciar tratamiento es que estas biopsias de piel raramente se realizan.

## SEROLOGIA

El sistema inmune humano produce anticuerpos específicos en respuesta a agentes foráneos en el cuerpo. Por lo tanto, las pruebas serológicas basadas en anticuerpos identifican los anticuerpos específicos generados en respuesta a una infección bacteriana. Aquellas que detectan anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* suelen ser las más comúnmente utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Este tipo de pruebas recibe el nombre de Serología. Si la respuesta mediada por los anticuerpos no se ha desarrollado lo suficiente, es posible que estas pruebas arrojen resultados negativos, a pesar de sufrir el paciente de una infección activa. Inversamente, también es posible que estas pruebas den resultados negativos, a pesar de la presencia de una infección activa. También es posible que los anticuerpos persistan durante años luego del tratamiento, luego, en ausencia de una infección activa es posible que los pacientes asintomáticos obtengan resultados positivos.

Las pruebas de laboratorio detectan dos tipos de anticuerpo: IgM e IgG.

- Las inmunoglobulinas M (IgM) anti-Borrelia son detectables en sangre alrededor de dos ó tres semanas luego del contagio. Los niveles de IgM alcanzan su máxima concentración a las seis semanas y luego comienzan a declinar.
- Las inmunoglobulinas G (IgG) no son detectables hasta varias semanas luego de la infección, alcanzan niveles máximos a los 4-6 meses de infección y pueden permanecer elevados por varios años.

Es importante destacar que *B. burgdorferi* puede modificar sus antígenos de superficie, evitando el reconocimiento inmune y dando lugar a falsos negativos.

Los dos ensayos basados en anticuerpos más comúnmente usados son el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el Western Blot (Inmunoblot).

Durante las primeras 4-6 semanas de la infección de Lyme estas pruebas suelen ser poco confiables debido a que la mayoría de los pacientes no ha desarrollado una respuesta inmune detectable mediante ésta prueba. Incluso en fases posteriores de la enfermedad, estas pruebas de dos etapas son poco sensitivas y no detectan aproximadamente la mitad de los casos de enfermedad de Lyme.

En la prueba de dos etapas, la primera fase comprende un ensayo de screening (por ejemplo, ELISA), el cual debería diagnosticar óptimamente a todos los pacientes que padecerían la enfermedad. No obstante, estas pruebas suelen producir frecuentemente falsos positivos. Por ello se suele continuar con una prueba confirmatoria (por ejemplo, Western Blot) orientada a asegurar que solamente gente con la enfermedad sea diagnosticada positivamente. Los ensayos que determinan esto con precisión suelen tener alta especificidad.

En la enfermedad de Lyme, la segunda prueba (por ejemplo: Western Blot) suele tener alta especificidad, suponiendo que los anticuerpos se les han generado durante la infección. Luego, suele haber muy pocos falsos positivos. Desafortunadamente, la prueba de screening es muy

poco sensitiva y falla en identificar con precisión a aquellos pacientes que sufren enfermedad de Lyme. Es por eso que la prueba de dos etapas suele arrojar falsos negativos en aproximadamente el 54% de los pacientes infectados.

Las pruebas serológicas son actualmente el método diagnóstico más empleado para la enfermedad de Lyme. Una prueba positiva sugiere solamente que el paciente ha sido expuesto a un patógeno y no sirve como diagnóstico de una infección activa. El uso de una prueba de ELISA como técnica de screening seguida de, si el resultado es positivo, Western Blot confirmatorio no es un enfoque adecuado. El ELISA es lo suficientemente sensible como método de screening, y existen numerosos pacientes que dan negativo para dicha prueba y son simultáneamente positivos para Western Blot. ELISA es la prueba más simple, barata, fácil, y frecuentemente demandada para la enfermedad de Lyme; consiste en la detección de anticuerpos en suero en respuesta a la exposición a *Borrelia burgdorferi*. Es la prueba preferida por los laboratorios clínicos, no porque sea más precisa que otras pruebas de Lyme, sino porque puede ser fácilmente automatizada. Por lo tanto, numerosas muestras diferentes de pacientes pueden ser evaluadas en una máquina simultáneamente. Esto permite un mayor recambio, menores costos y (teóricamente) resultados estandarizados que son consistentes entre laboratorios. La prueba de ELISA parece simple y sencilla, pero presenta serios defectos. *Borrelia* es una de las especies bacterianas más polimórficas que se conocen. En otras palabras, tiene una capacidad importante de cambiar sus proteínas de superficie durante la división celular para evadir nuestro sistema inmune, pudiendo diferir lo suficiente de las cepas de laboratorio como para arrojar resultados negativos, aún si hay anticuerpos presentes!. Tom Gries (microbiólogo y ex-paciente de Lyme) ha escrito numerosos artículos de revisión acerca de ensayos relacionados a la enfermedad de Lyme. El presenta un análisis muy convincente de porque los ensayos de ELISA son poco precisos en el diagnóstico de ésta patología: *“el método de ELISA depende de los anticuerpos activos libres para unirse los antígenos libres que están adheridos a la pared del tubo de ensayo. Si los anticuerpos en suero que están siendo evaluados están asociados a antígenos, entonces la reacción enzimática no puede desarrollarse. Si pensamos los anticuerpos como una serie de llaves que encajan en cerraduras, y en la superficie bacteriana hay cerraduras específicas a las cuales llamamos antígenos, entonces queda claro que una vez que la llave ha entrado en la cerradura la llave no puede abrir ninguna otra cerradura. Lo que hace que ésta prueba sea tan proclive a causar confusiones es que muchos médicos interpretan valores altos como indicadores de severidad de la infección. La lógica es exactamente lo opuesto. Si el paciente está infectado, eso significa que hay altos niveles de antígenos bacterianos flotando en la sangre y uniéndose a antígenos libres. Luego, conforme el nivel de antígeno libre aumenta, el número de anticuerpos libres disminuye. Dado que la prueba de ELISA detecta únicamente anticuerpos libres, un resultado negativo podría indicar una infección todavía más seria. Numerosas veces he visto pacientes totalmente asintomáticos con valores de ELISA mayores a 1000 siendo tratados como si estuvieran al borde de la muerte simplemente debido a una carga elevada de anticuerpos mientras los pacientes con cargas bajas incapacitados son ignorados debido a que una baja carga de anticuerpos indica una baja infección! Estas conclusiones son erróneas y exactamente opuestas a la realidad, donde una carga elevada de anticuerpos indica mayor inmunidad”*.

La técnica de Western Blot es específica debido a que aporta un mapa detallado de los diferentes anticuerpos que el sistema inmune produce contra estas bacterias. El mapa separa los anticuerpos según el peso de sus respectivos antígenos (proteínas bacterianas) y se reporta en

unidades llamadas kilodaltons (kDa). Por ejemplo, un Western Blot puede reportar bandas en 22, 23, 25, 31, 34, 39 y 41 kDa. Cada una de estas bandas representa una respuesta inmune a una proteína específica de la espiroqueta. La banda de 41 kDa indica un anticuerpo contra la proteína flagelar y es inespecífica en relación a la especie bacteriana. La banda de 31 kDa representa la proteína OSPA y es específica para unas pocas especies de *Borrelia*, de la misma forma que la banda OSPB de 34 kDa y la banda OSPC de 23 kDa.

Los ensayos de Western Blot se informan indicando que bandas son reactivas. Las bandas de 41 kDa aparecen tempranamente en el curso de la enfermedad pero pueden tener reactividad cruzada con otras espiroquetas. Las bandas 18 kDa, 23 a 25 kDa (Osp C), 31 kDa (Osp A), 34 kDa (Osp B), 37 kDa, 39 kDa, 83 kDa y 93 kDa son las específicas para cada especie, pero aparecen más tarde ó pueden no aparecer. Deben observarse al menos la banda de 41 kDa y una de las bandas específicas. Las bandas de 55 kDa, 60 kDa, 66 kDa y 73 kDa son inespecíficas y no tienen finalidad diagnóstica. Hay diferentes marcas de inmunoblot para diagnosticar *Borrelia*. El kit de Mikrogen detecta anticuerpos contra cuatro genoespecies inmunopatogénicas (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, y *B. bavariensis* en una sola tira reactiva:

- VIsE de genoespecies diferentes
- OspC de todas las genoespecies
- p18 (Decorin binding protein A = DbpA) de todas las genoespecies

Las ventajas de éste método, suponiendo que el paciente desarrolle una respuesta inmune, son su alta sensibilidad y especificidad, la fácil y clara interpretación debido a bandas fáciles de detectar, presentación óptima sin proteínas que ofrezcan reacciones cruzadas, antígenos inmunodominantes de las cuatro genoespecies (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* y *B. bavariensis*), detección diferencial de los anticuerpos IgG e IgM, y evaluación segura debido a controles específicos en la tira reactiva (punto de corte y control conjugado). Por lo tanto, en aquellos casos en los que el paciente ha desarrollado anticuerpos, ésta prueba revelará su presencia. Sin embargo, en casos donde el paciente no produjo anticuerpos, la prueba dará resultados negativos a pesar de la infección. Para asegurarse de que las bandas más específicas estén incluidas en el Inmunoblot, se recomienda solicitar al Laboratorio que informe los antígenos incluidos en el test y que le entregue el informe completo, no solamente el resultado final (positivo, negativo, borderline).

Se le presta especial atención a *B. miyamotoi*, que usualmente presenta reacciones cruzadas con ensayos para *B. burgdorferi* (Brandt & Rosenberg 2013; Lee et. al 2014). *B. miyamotoi* podría ser detectada mediante PCR ó EliSpot.

Por último, una nueva prueba serológica para la enfermedad de Lyme, llamada SeraSpot, ha sido fuertemente publicitada. Es muy similar al Western Blot, pero se presta a automatización y por lo tanto permite una evaluación más rápida en el laboratorio clínico. Dado que ambos métodos permiten cuantificación, no hay una mejoría real en las pruebas basadas en serología de SeraSpot en comparación al Western Blot, suponiendo que el Western Blot contenga antígenos específicos, tal cual es el caso del kit de Mikrogen ó el de IgeneX.

Un problema mayor con el diagnóstico de Lyme es que ningún ensayo ofrece resultados definitivos. Dos de los ensayos más comúnmente usados, ELISA y Western Blot, dependen de

la presencia de anticuerpos en suero contra *B. burgdorferi*. Desafortunadamente, los resultados de estos ensayos pueden ser imprecisos, y los resultados de estos ensayos pueden ser imprecisos, y los métodos de análisis no son siempre consistentes entre laboratorios. La prueba de ELISA puede dar un falso negativo si se efectúa precozmente, y el Western Blot debe efectuarse siempre para confirmar el resultado positivo del ELISA.

Como comentario final, las bacterias de Lyme pueden anclarse a proteínas, enmascarando así a las proteínas reconocidas por los anticuerpos. También poseen la capacidad para ingresar a las células, incluidas las de los sistemas nervioso e inmune. Una vez dentro de la célula, las bacterias quedan inaccesibles para los anticuerpos. Luego, si bien el Western Blot es muy específico en la detección de anticuerpos específicos para Lyme, ni éste ensayo ni la prueba de ELISA son útiles una vez que el cuerpo ha dejado de producir anticuerpos.

### **NUEVA GENERACIÓN DE PRUEBAS DE SEROLOGÍA: TICKPLEX**

El ensayo TickPlex se realiza en base a un ELISA. Sin embargo, en comparación con otros ensayos ELISA, esta prueba contiene un nuevo antígeno para cuerpos redondos/formas persistentes de *Borrelia*.

El test TICKPLEX® BASIC proporciona un ensayo cuantitativo y cualitativo in vitro para la detección de anticuerpos IgM e IgG humanos contra las infecciones de *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* y *Borrelia garinii*. El test incluye antígenos persistentes de las diferentes especies de *Borrelia*.

El test TICKPLEX® PLUS proporciona un ensayo cuantitativo y cualitativo in vitro para la detección de anticuerpos IgM e IgG humanos contra infecciones de *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* y *Borrelia garinii*. El test incluye antígenos persistentes de las diferentes especies de *Borrelia*.

Pruebas para otras LCT, las llamadas "coinfecciones" (*Babesia*, *Bartonella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*), e infecciones oportunistas (*Coxsackievirus*, virus de Epstein-Barr, parvovirus humano B19, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma pneumoniae*) asociadas a enfermedades transmitidas por garrapatas.

### **ENSAYO DE ELISA PARA C6**

El C6 es un péptido sintético (péptido C6) derivado de la proteína VisE que aparece en las fases temprana y tardía de la enfermedad de Lyme. El ensayo detecta la presencia de anticuerpos contra éste péptido sintético. Sin embargo, tiene una sensibilidad del 70-74%, resultando más baja que la de un Western Blot que incluye los antígenos altamente específicos (bandas de 23, 31, 34, 39, 83-93 kDa); luego, es prudente efectuar un Western Blot para confirmar el resultado. A la luz de esto, es más eficiente y menos costoso hacer únicamente un Western Blot confirmatorio. Embers y colaboradores (PLoS One 2012) han demostrado que el ensayo de péptido C6 es incapaz de detectar infecciones persistentes, aun cuando otros métodos confirman presencia bacteriana en tejido de monos infectados. Luego, se ha probado que éste ensayo es una herramienta diagnóstica poco confiable en monos tratados y no tratados, debido a que un resultado positivo puede volverse negativo.

### **CONTEO DE CELULAS CD57**

En la *Borreliosis* crónica de Lyme, el conteo CD57 es útil e importante. Las células CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> son una subpoblación de células natural killer (NK). Las células NK juegan un rol crucial en la

inmunidad innata, reconociendo y matando células infectadas por virus y células tumorales. El Dr. Stricker y colaboradores (Stricker y Winger 2001; Stricker et. al. 2002) reportaron que el número de células CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> estaba disminuido en la enfermedad crónica (no en la aguda) de Lyme. Si bien las enfermedades agudas pueden ser tratadas con antibióticos, el tratamiento fallido puede resultar en una enfermedad crónica y debilitante caracterizada por síntomas neurológicos y musculares. La enfermedad de Lyme puede ser difícil de tratar y de diagnosticar (Agüero-Rosenfeld et. al. 2005).

El número de células CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> está disminuido en pacientes con enfermedad crónica de Lyme, especialmente en aquellos con síntomas neurológicos pronunciados. Pacientes con bajo conteo CD57 son más susceptibles a coinfecciones y defectos inmunológicos persistentes que los pacientes con conteo elevado. En los pacientes que responden a la terapia con antibióticos, el número volverá a la normalidad luego del tratamiento, pero en pacientes con enfermedad persistente, los niveles de CD57 permanecen bajos. El ensayo es una prueba por citometría de flujo de tres colores. La sangre es incubada con anticuerpos contra los antígenos CD3 y CD57, el número absoluto de linfocitos CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> (células por cada microlitro de sangre) es cuantificado en el citómetro de flujo. El resultado indica la cantidad de linfocitos CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> en 1 microlitro de sangre. El rango normal es 60-360 células/microlitro, los pacientes crónicos de Lyme presentan menos de 60 células por microlitro.

Es destacable que se han registrado conteos bajos de CD57 en niños con trastornos de autismo (Siniscalco et. al. 2016). Esto también puede indicar la importancia de las infecciones múltiples en los trastornos del espectro autista.

## **PRUEBAS DE TRANSFORMACION DE LINFOCITOS**

La prueba de transformación de linfocitos (PTL) fue desarrollada originalmente durante la década de 1960 con la finalidad de evaluar antígenos histocompatibles HLA clase II. El método fue posteriormente modificado para la tipificación de antígenos clase II y aplicado extensivamente para detectar alergias tipo IV a drogas, metabolitos, organismos infecciosos y metales. La PTL se convirtió en una prueba común para la detección de alergias a berilio, níquel, oro, cobalto, cromo y paladio.

Estos ensayos son específicos para antígenos actuales y no para anticuerpos, y son considerados como más precisos en el diagnóstico de Lyme, especialmente en relación a infecciones activas.

### **1. PTL MELISA**

En 1994, Stejskal y colegas publicaron una modificación de la PTL para detectar sensibilidad a metales: la prueba MELISA. Dicha tecnología es actualmente aplicada al diagnóstico de la infección Lyme activa (Valenthine-Thon et. al. 2006).

Un resultado positivo en MELISA indica infección activa con *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Además de los cuatro antígenos recombinantes standard derivados de *B. afzelii* y *B. garinii*, la prueba usualmente incluye los tres antígenos adicionales derivados de *B. burgdorferi sensu stricto* (una proteína OspC de superficie externa, un fragmento interno recombinante p41, y un lisado antigénico completo).



MELISA es una prueba de transformación de linfocitos que no detecta anticuerpos sino la inmunoreactividad celular característica de las infecciones activas de *Borrelia burgdorferi*. El ensayo mejora el diagnóstico de laboratorio confirmando la infección activa en pacientes con síntomas clínicos de Lyme. Esta prueba está basada en el uso de células mononucleares de sangre periférica incubadas con controles en una placa multi-well revestida con antígenos recombinantes de *Borrelia* en tres diluciones diferentes a 37 °C en una atmósfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Si los linfocitos han sido expuestos anteriormente al antígeno, las células se dividirán y dicha división celular podrá ser medida mediante la incorporación de metil-timidina tritiada radioactiva. La PTL-MELISA puede medir actividad patológica en aquellos pacientes infectados que no han desarrollado una respuesta inmune apropiada; sin embargo, es recomendable efectuar Western Blot en paralelo debido a que pacientes positivos para Western Blot han resultado negativos para PTL-MELISA (Puri et. al. 2014).

## 2. ELISPOT Y LYMESPOT REVISADOS

El EliSpot (Ensayo Inmunospot Asociado a Enzimas) mide el número de linfocitos T activados en cultivo celular basándose en las citoquinas que liberan al ser expuestas al antígeno. Actualmente, hay pocas publicaciones al respecto y sus conclusiones son divergentes (Forsberg et. al. 1995; Nordberg et. al. 2012; Jin et. al. 2013).

El EliSpot (prueba para Interferón  $\gamma$ ) es una prueba para detectar una infección con *Borrelia* y otros co-patógenos.

Mientras el ensayo EliSpot existente se basa exclusivamente en la producción de Interferón  $\gamma$ , el nuevo LymeSpot también evalúa también la producción de la citoquina Interleukina (IL)-2. Si el cociente entre Interferón  $\gamma$  y IL-2 es invertido, se puede asumir una enfermedad latente.

Es cada vez mayor la cantidad de laboratorios que realizan PTL para *Borrelia* y otros agentes coinfectivos. En el caso del Western Blot, es muy importante saber que patógenos son usados en el ensayo. Se debe solicitar una lista con los antígenos usados y verificar la especificidad y la lista de especies cubiertas. No todos los laboratorios utilizan antígenos múltiples.

## PRUEBAS DE PCR

El uso de pruebas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser útil puesto que es una determinación diagnóstica del patógeno que no se basa en serología indirecta.

La PCR es una prueba basada en sangre que amplifica un fragmento clave de ADN de las bacterias de Lyme para su detección. Si bien la PCR es muy precisa cuando detecta el ADN de Lyme, también puede producir numerosos falsos negativos. Esto se debe a que las bacterias de Lyme están muy dispersas y pueden no estar presentes en la muestra de sangre analizada. En lugar de identificar anticuerpos contra *Borrelia*, la PCR es una determinación directa del microorganismo. Desafortunadamente, las pruebas de PCR suelen producir falsos negativos debido a que las bacterias de Lyme residen en la sangre por períodos cortos de tiempo, prefiriendo alojarse en tejidos con circulación vascular reducida.

La PCR es una prueba específica y sensible para la detección rápida y directa de *B. burgdorferi*. Ha probado ser de utilidad para la detección de ADN de *Borrelia* procedente de biopsias de lesiones ECM, así como en la detección de ADN en fluido sinovial y cerebrospinal durante las fases

tardías de la enfermedad. Los resultados de la PCR deben estar correlacionados con las manifestaciones clínicas del paciente. Debido a la limitada sensibilidad de la prueba, un resultado negativo no excluye la presencia del organismo ó enfermedad activa de Lyme. Asimismo, un resultado negativo no excluye la posibilidad de enfermedad de Lyme, puesto que puede haber inhibidores de PCR en el espécimen. Mediante el diseño de primers degenerados es posible detectar numerosas especies en una sola prueba; también es posible diseñar primers para identificar una especie determinada. Los resultados de ésta prueba deben ser utilizados para ayudar en el diagnóstico y no como criterio único para determinar si el paciente está o no enfermo. Estos resultados deben correlacionarse con la presentación clínica del paciente. Se han reportado infecciones concurrentes con numerosos patógenos propagados por garrapatas, incluyendo a *Bartonella*, *Ehrlichia chaffensis*/*Anaplasma phagocytophilum* y *Babesia microti*; y se debe considerar el diagnóstico de otros patógenos si la clínica lo indica.

Si bien la PCR es un método inherentemente específico y sensible, los resultados son frecuentemente negativos aún si el paciente está infectado. Esto suele ocurrir debido a la ausencia de bacterias en la muestra biológica. La muestra de sangre puede ser negativa para el ADN de Lyme debido a que cuando *Borrelia* está alojada en forma de quiste en el tejido raramente libera material genético a la circulación. Además los pacientes con enfermedad de Lyme suelen oscilar entre períodos sintomáticos y asintomáticos, lo cual refleja la actividad bacteriana.

Algunos desarrollos recientes, que están casi listos para ser incluidos en los paneles de pruebas, son la técnica HybriSpot (de Master Diagnostica) con su TICK-BORNE BACTERIA FLOW CHIP que permite la detección simultánea (por PCR y blot) de 7 géneros de bacterias transmitidas por garrapatas: Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Francisella, Bartonella, Borrelia y Coxiella. Esta técnica es compatible con muestras humanas, animales y de garrapatas. Aunque es muy prometedora, la técnica no ofrece una buena reproducibilidad, ya que muestra diferencias y defectos de un lote a otro cuando se mezclan varios tipos de bacterias.

### **PRUEBA DE FÁGICA DE FÉLIX: Una forma revolucionaria de detectar bacterias intracelulares y una respuesta a los enfermos no diagnosticados**

#### ***¿Qué son los bacteriófagos?***

Los fagos pertenecen a la forma de vida más simple y primitiva (virus). Son extraordinariamente específicos del huésped bacteriano que infectan para propagarse. Pueden infectar rápidamente a su huésped e insertar su material genético en el mismo. Como resultado, producen un gran número de copias que pueden infectar aún más (y en algunos casos diezmar) la bacteria responsable de la infección. También pueden hacer que las bacterias sean vulnerables a los tratamientos convencionales al alterar su material genético. Lo más importante es que los bacteriófagos pueden tener una capacidad destructiva. Los fagos son tan pequeños que pueden penetrar y posiblemente interrumpir las biopelículas bacterianas. Estas biopelículas son una barrera importante utilizada por las bacterias contra los antibióticos y, por lo tanto, contribuyen significativamente a la resistencia a los antibióticos. La capacidad de los fagos para penetrar en las biopelículas permite que se propaguen a altos niveles en centros localizados de infección bacteriana y que destruyan allí las bacterias, produciendo un poderoso pero muy localizado efecto terapéutico. Los bacteriófagos son omnipresentes y forman parte del ecosistema natural de los ciclos de vida y la replicación de las bacterias. Decidimos centrarnos en los bacteriófagos como objetivo para la detección directa de la infección porque son específicos y más numerosos que la población bacteriana patógena.

### *¿Por qué utilizar los bacteriófagos como herramienta de diagnóstico?*

Las infecciones transmitidas por garrapatas están aumentando en todo el mundo - la enfermedad de Lyme es una de las infecciones transmitidas por vectores más extendidas en los Estados Unidos y Europa y está alcanzando niveles epidémicos (Kugeler et al. 2015; Sykes et al. 2014). Mientras que la mayoría de las garrapatas tienen la capacidad de transmitir una serie de patógenos que causan enfermedades en los humanos, la enfermedad de Lyme es la enfermedad más conocida transmitida por garrapatas y es causada por bacterias del género *Borrelia*; típicamente *Borrelia burgdorferi* que son bacterias espiroquetas Gram-negativas. Los *Borrelia* se dividen en diferentes especies; entre las más comunes se encuentran *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* y el recién identificado *B. miyamotoi*. La alta tasa de fracaso general de las pruebas de infección por garrapatas (TBI) subraya la necesidad de nuevos enfoques, es decir, de no depender de la serología y de las pruebas en dos etapas.

Las pruebas basadas en la PCR se utilizan cada vez más en entornos clínicos y tienen varias ventajas claras sobre la serología. Detectan directamente la presencia de agentes infecciosos. A diferencia de la serología, no dependen del desarrollo de anticuerpos, que puede llevar varias semanas, y no todos los pacientes son capaces de desarrollarlos. Sin embargo, la prueba de PCR también tiene sus limitaciones: Las pruebas de ADN no distinguen entre organismos vivos y muertos. El concepto es que ya no buscamos la bacteria, sino su bacteriófago obligado, que busca encontrar la bacteria para sobrevivir. El material genético del bacteriófago es específico de las bacterias con las que está asociado. Esto significa que diferentes especies de bacterias tendrán diferentes bacteriófagos.

Los bacteriófagos sólo están presentes en las infecciones bacterianas activas; por lo tanto, una prueba basada en los fagos es una evidencia directa de una infección activa. El cuello de botella actual en la detección de *Borrelia* por PCRs es su baja sensibilidad. Hemos desarrollado un método más sensible, directo y específico. Nuestro método de detección (patentado por Phelix R&D y la Universidad de Leicester, WO2018083491A1) consiste en detectar la presencia de un exceso de profilácticos en el ciclo lisogénico de las bacterias. Específicamente, una forma de aumentar la sensibilidad de un ensayo de PCR es aumentar el número de objetivos de PCR. A diferencia de los métodos actuales de PCR para el diagnóstico de la borreliosis, que amplifican regiones del ADN genómico bacteriano que sólo tienen una copia en cada bacteria (como el gen del ARNr 16S rRNA bacteriano, el gen *RecA* y la región intergénica 5S-23S), ofrecemos un ensayo de PCR más sensible, basado en fagos, para detectar la borreliosis y la fiebre recurrente causada por la *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Para ello, nos centramos en una secuencia de ADN fágico específica de todas las especies de *Borrelia*: enfermedad de Lyme y fiebre recurrente. Nuestros proyectos actuales basados en la fase de investigación se centran ahora en una serie de otras bacterias que se sabe que están involucradas en las infecciones bacterianas crónicas como *Rickettsia*, *Bartonella*, *Sutterella* y *Mycoplasma*. Los bacteriófagos podrían convertirse en una herramienta de diagnóstico basada en el principio de que si hay fagos es porque hay bacterias vivas. Los fagos están en el torrente sanguíneo buscando bacterias, porque si no las encuentran, morirán. Y hay muchos más fagos que bacterias (hay de 10 a 100 fagos por bacteria). Este enfoque ofrece una mayor sensibilidad debido al hecho de que hay muchos más fagos circulantes que bacterias, por lo que es preciso y más sensible que las pruebas de PCR convencionales que a menudo son negativos debido a los bajos niveles de bacterias en la sangre. También es una prueba DIRECTA, que pone de relieve el material genético bacteriano específico del organismo, a diferencia de todas las pruebas indirectas existentes (ELISA, Western BLOT, LTT/ELISPOT). En segundo lugar, permite diferenciar los diferentes subtipos de bacterias (*B. burgdorferi s.l.*, *B. miyamotoi*, ...), así como las fiebres recurrentes. Finalmente, esta prueba es también la mejor opción para la detección temprana (recuerde que los anticuerpos necesitan varias semanas para

aparecer...).

### ***¿Qué es el test de Phelix Phage?***

La prueba de Phelix Phage (patente nº WO2018083491A1) se realiza en sangre entera, pero también puede utilizarse para cualquier otro material que se sospeche que contiene un patógeno determinado (biopsia, líquido de punción articular hinchado, líquido cefalorraquídeo o directamente en garrapatas). El primer paso consiste en extraer el ADN mediante un método manual específico para garantizar la mejor recuperación posible del ADN patógeno. El ADN extraído se somete a la qPCR utilizando cebadores y sondas patentados para la detección de fagos específicos. Los fragmentos amplificados se analizan luego por secuenciación para confirmar la positividad de la muestra (es decir, para descartar falsos positivos). Esta técnica se aplica ahora por primera vez para la detección de *Borrelia* (*B. burgdorferi* s.l. y posiblemente *B. miyamotoi*, *B. hermsii*, *B. duttonii*, etc.). Esta técnica se está probando actualmente para otras enfermedades transmitidas por garrapatas (*Bartonella*, *Rickettsia*, etc.). Con el fin de mejorar aún más la dosis, actualmente estamos probando el mismo procedimiento en muestras de orina y saliva. Para ello, todos los pacientes reciben en el kit de prueba 2 tubos de EDTA para sangre entera, así como un recipiente para la primera orina de la mañana y otro para la saliva. Nuestro objetivo es comparar la sensibilidad de la prueba entre la sangre y la orina o la saliva y si esta prueba es concluyente, permitirá una prueba en la orina y/o la saliva y así evitar la toma de muestras de sangre invasiva, permitiendo una prueba más fácil para todos los pacientes, especialmente los niños. El precio de la prueba incluye y apoya esta investigación y desarrollo en curso.

### ***Interpretación***

Es importante analizar el resultado de la prueba en el contexto clínico de la persona que se está probando. El resultado de la prueba Phage PCR se reporta como positivo o negativo. En algunos casos, también se puede informar como "límite", lo que significa que sólo se encontraron pequeños fragmentos de ADN (como resultado del aumento de la apoptosis, la resolución de una infección, etc.). Un resultado positivo significa que en el momento de la prueba, el paciente tenía la *Borrelia* presente en su cuerpo. Un resultado positivo en la ausencia de síntomas sugiere que, a pesar de la presencia de bacterias, el sistema inmunológico parece estar en control. En el caso de una prueba positiva después de un diagnóstico serológico reciente o anterior, es importante discutir la posibilidad de un síndrome post-lyme tardío o una forma crónica de *Borreliosis*. Un resultado negativo significa que en el momento de la prueba y en una muestra determinada, no se detectó la presencia de *Borrelia*. Es importante recordar que en una etapa avanzada, el número de bacterias es muy bajo y la mayoría de las veces están escondidas en el tejido; por lo tanto, el número de fagos circulantes también será bajo. Es aconsejable volver a realizar la prueba cuando los síntomas empeoren. Recuerde que las garrapatas portan y transmiten muchos otros patógenos (*Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, etc.) que tienen todos síntomas muy similares. Por lo tanto, una prueba de *Borrelia* negativa con síntomas persistentes podría sugerir la presencia de otros patógenos. Por último, también es importante recordar que en las etapas avanzadas, los síntomas reflejan una profunda desregulación inmunológica y gastrointestinal debido a una o más enfermedades transmitidas por vectores no tratadas previamente. La inflamación crónica y las infecciones de bajo grado son las complicaciones resultantes de las enfermedades transmitidas por vectores descubiertas y, por lo tanto, deben ser tratadas además de la búsqueda de la presencia de un patógeno específico.

### **PRUEBAS DE DETECCION DE ANTIGENO**

Las pruebas de detección de antígenos buscan una proteína de Lyme única en el líquido (p. ej.

sangre, orina, líquido sinovial). A veces, las personas cuyas pruebas indirectas son negativas dan positivo en esta prueba.

Recientemente, la Prueba Nanotrap® LA ha recibido notoriedad nacional gracias a una subvención de 1 millón de dólares otorgada por la Fundación Bill y Melinda Gates. Esta prueba utiliza la tecnología Nanotrap® para medir directamente los antígenos de Lyme en orina utilizando un formato de Western blot. La prueba Nanotrap® está diseñada para proporcionar una alta sensibilidad y precisión, ofreciendo resultados seguros en las primeras etapas de la infección. La prueba Nanotrap® LA utiliza un enfoque directo que identifica un antígeno de la bacteria de Lyme, que está presente en el cuerpo y que puede ser detectado a los pocos días de la infección inicial. Por el contrario, la prueba Nanotrap® LA proporcionará un resultado negativo que indica que no hay presencia del antígeno si la infección se ha eliminado con un tratamiento eficaz. Esta prueba todavía no está lista para el mercado europeo.

## **PRUEBAS ENERGETICAS**

No existe una prueba de "patrón oro" para todas las infecciones de la enfermedad de Lyme que sea 100% exacta. Por esta razón, muchos doctores alfabetizados en Lyme diagnostican la *Borrelia* y otras LCT basándose en los síntomas, pruebas de laboratorio y tipos de pruebas alternativas no convencionales, pero a veces más sofisticadas, como las pruebas energéticas.

Los dispositivos electrodérmicos de monitoreo (tales como el ZYTO ó ASYRA), por ejemplo, emplean un software y la respuesta galvánica de la piel para detectar desequilibrios energéticos en el cuerpo. Pueden emplearse también para detectar las frecuencias energéticas de una amplia variedad de microorganismos patógenos y, por lo tanto, su presencia. Un software conectado a una pulsera de mano u otro instrumento monitorea el cuerpo en busca de infecciones y otros desequilibrios y luego hace un informe de los diferentes organismos que se sospecha están en el cuerpo y a que niveles. Numerosos expertos en Lyme, como Lee Cowden, consideran que el ZYTO tiene una precisión del orden del 90%. Otros instrumentos pueden ser más o menos precisos.

La kinesiología aplicada o los métodos de prueba de fuerza muscular tales como la Prueba de Respuesta Autónoma (PRA), desarrollada por el especialista en Lyme Dietrich Klinghardt, son otra forma de evaluar la presencia de infecciones utilizando la energía del cuerpo humano y el sistema nervioso autónomo. La kinesiología aplicada puede ser muy útil en el diagnóstico.

En las pruebas PRA y otros métodos de prueba muscular, el médico aplica fuerza en uno de los músculos del paciente (normalmente el brazo), mientras sostiene una sustancia (en éste caso una firma energética o un compuesto del patógeno) contra el cuerpo del paciente. A continuación, le pedirá al paciente que resista. El sistema autónomo del paciente responderá a dicho compuesto o patógeno creando una respuesta muscular fuerte o débil en el brazo. Los resultados dependen en gran medida de la experiencia del especialista.

## **EVALUANDO COINFECCIONES**

En la borreliosis se producen frecuentemente infecciones concurrentes. El impacto clínico y patológico de las LCT fue reconocido por primera vez en los años noventa (Mitchell y al. 1996). Su sinergia patológica puede exacerbar la enfermedad de Lyme o inducir manifestaciones similares de la enfermedad. Los agentes coinfectantes pueden transmitirse junto con la *Borrelia burgdorferi* por la mordedura de garrapata resultando en múltiples infecciones, pero una fracción de coinfecciones ocurre independientemente de la mordedura de garrapata. Las infecciones

causadas por estos agentes patógenos en pacientes no infectados por *Borrelia burgdorferi* pueden dar lugar a síntomas clínicos similares a los de la borreliosis. Esto se aplica especialmente a las infecciones causadas por *Bartonella henselae*, *Yersinia enterocolitica* y *Mycoplasma pneumoniae*. La *Chlamydia trachomatis* es la principal causa de poliartritis. *Chlamydia pneumoniae* no sólo causa artritis, sino que también afecta al sistema nervioso y al corazón, lo que dificulta el diagnóstico diferencial. El diagnóstico es aún más complejo cuando otras LCT ocurren en asociación con la enfermedad de Lyme (Berghoff 2012).

En relación a las pruebas diagnósticas, son muy similares a las que hay disponibles para la Borreliosis de Lyme. Las técnicas de PCR, ELISA y/o inmunofluorescencia están disponibles para la mayoría pero no cubren la totalidad de las especies. Asimismo, los resultados deben ser analizados e interpretados en el contexto de las manifestaciones clínicas.

- **Babesia:** FISH (hibridación in-situ fluorescente, es la más específica y sensitiva), frotis de Giemsa, Inmunofluorescencia (IFA), serología y PCR.
- **Bartonella:** solo hay pruebas serológicas contra *B. henselae* y *B. quintana*, no hay Western Blot disponible. Bartonella es muy difícil de detectar, pues hay múltiples especies (más de 30) y frecuentemente se organizan en biofilms (que contienen células y sustancia extracelular polimérica, creando así una matriz que provee una barrera física para el diagnóstico y tratamiento). Dentro de las pruebas diagnósticas, la IFA está disponible (poco confiable), PCR (que requiere numerosos sets de primers y suele fallar en presencia de biofilms), frotis de sangre, y raramente cultivo celular + PCR. Como opción indirecta, la prueba de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es frecuentemente útil puesto que la Bartonellosis es frecuentemente acompañada de la angiogénesis, induciendo granulomas en diversas regiones de la piel (Kempf et. al. 2001). Los niveles de VEGF aumentarán en presencia de una infección con *Bartonella* solamente en ausencia de infecciones con hongos. Las erupciones de piel características de *Bartonella* también tienen un gran valor diagnóstico.
- **Brucella:** BrucellaCAPT, anticuerpos aglutinantes, PCR.
- **Ehrlichia/Anaplasma:** ELISA, ELISpot, PCR, frotis de Giemsa.
- **Rickettsia:** PCR, serología/IFA.
- **Coxiella:** PCR, IFA.
- **Tularemia:** pruebas de detección de antígenos, ELISA, PCR, cultivo celular, anticuerpos directos fluorescentes.
- **Leptospira:** inmunocromatografía.
- **Leishmania:** serología
- **Mycoplasma:** serología (ELISA), PCR (a partir de muestras de sangre, esputo e hisopados), cultivo bacteriano.
- **Chlamydia:** Western Blot, ELISA, PCR, ELISpot.
- **Yersinia:** Western Blot (*Y. enterocolitica* y *Y. pseudopneumoniae*), ELISpot, prueba de

detección de antígeno en heces (solamente para *Y. enterocolitica*). Cabe mencionar que una respuesta inmune a los antígenos de *Yersinia* puede jugar un rol importante en la patogénesis de artritis crónica indiferenciada e inflamación crónica (Van der Heijden et. al. 1997; Saebo & Lassen 1994).

- **Virus Epstein-Barr (EBV):** Western Blot, PCR, ELISpot, serología, pruebas antigénicas.
- **Citomegalovirus (CMV):** Western Blot, PCR, ELISpot, serología, pruebas antigénicas.
- **Coxsackievirus:** PCR, pruebas antigénicas.
- **Herpesvirus:** serología, PCR.

La lista de posibles LCT no es exhaustiva. Frecuentemente se evidencian nuevos patógenos, así como infecciones oportunistas. También, nuevas pruebas de investigación están en desarrollo y se espera que completen y mejoren las pruebas existentes ofrecidas.

## **ABORDAJE INTEGRAL PARA INFECCIONES TARDIAS/PERSISTENTES/CRONICAS PROPAGADAS POR GARRAPATAS**

A fin de ofrecer una mejor asistencia a los pacientes con infecciones tardías/crónicas y/persistentes difíciles de detectar, Laboratorios R.E.D. ([www.redlabs.com](http://www.redlabs.com)) se enfoca en el abordaje integral, que incluye la detección directa de patógenos al igual que pruebas indirectas complementarias. La alta tasa de fallos de pruebas relacionadas a IMG, especialmente en infecciones tardías/persistentes/crónicas resalta la necesidad de enfocarse en los síntomas informados por el paciente e investigar cualquier desregulación y lesión inhabilitante resultante de las IMG.

Las IMG crónicas pueden mimetizar cada proceso patológico, incluyendo el síndrome de fatiga crónica (encefalomielitis miálgica), fibromialgia, enfermedades autoinmunes, incluidas la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, condiciones psiquiátricas que incluyen la depresión y la ansiedad, y problemas de concentración y memoria que se asemejan a la demencia temprana. Es por ello que el Dr. Richard Horowitz la ha llamado “El gran imitador” en su libro titulado “¿Porque no puedo mejorarme?”.

Las infecciones IMG persistentes han sido reportadas en numerosos pacientes autistas (Brainsfield et. al. 2008; Kuhn et. al. 2012; Kuhn & Brainsfield 2014). De hechos numerosos médicos especialistas se enfocan en IMG cuando están evaluando trastornos del espectro autista.

Si una persona sufre de una condición crónica de salud, desde la artritis o el síndrome de fatiga crónica a fibromialgia es importante descartar la enfermedad de Lyme. Parece que numerosos casos de fibromialgia y síndrome de fatiga crónica son en realidad enfermedad de Lyme encubierta (Nicholson & Nicholson 1998).

Los pacientes crónicos de Lyme también padecen “coinfecciones” tales como *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Ehrlichia*, *Bartonella* y *Babesia*. Estos son diferentes tipos de “bichos” que disfrutan de la compañía de *B. burgdorferi*.

Los pacientes de Lyme y IMG pueden presentarse primeramente con manifestaciones

gastrointestinales. Estos pacientes pueden padecer trastornos gastrointestinales complejos ó persistentes que involucran el tracto gastrointestinal alto, medio ó bajo. Es probable que el número de pacientes que presenta estos síntomas esté alcanzando proporciones epidémicas (Dr. Rahban, ILADS Conference Augsburg 2015). Las pruebas de detección gastrointestinales deben ser incluidas.

En concordancia, el **panel integrativo inicial** incluye:

- *Teste Phelix Borrelia Fhage*

- *Serología IgG e IgM para Borrelia (immunoblot)*

Se trata de un inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en suero humano, plasma o fluido cerebroespinal. Detecta anticuerpos contra cuatro especies inmunopatogénicas (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*). Permite la detección de p100, VisE, p58, p41, p39, OspA (sin distinción de genoespecies), OspC de todas las genoespecies y p18 de todas las genoespecies. La finalidad de la prueba no es distinguir genoespecies sino ofrecer la máxima cobertura en cuanto a detección de enfermedad de Lyme.

- *Serología IgG e IgA/M para Chlamydia (immunoblot)*

Este es un immunoblot para la detección de anticuerpos IgG e IgA contra *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*. Las garrapatas no son vector para *Chlamydia*, sino que *Chlamydia* se reactiva con IMG.

- *Serología IgG e IgA/M para Yersinia (immunoblot)*

Un immunoblot para la detección de anticuerpos IgG e IgA contra todas las proteínas externas de *Yersinia* (YOPs). La diferenciación serológica de las infecciones con *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* es posible por primera vez con el uso de nuevos antígenos especie-específicos (PsaA, MyfA).

*Prueba de Babesia FISH*: detección de infección con *Babesia* mediante inmunofluorescencia in situ

- *Diagnóstico de infecciones con Mycoplasma vía PCR*

Se ha descubierto que las garrapatas pueden ser portadoras de *Mycoplasma*. Estas infecciones exacerban el cuadro clínico, especialmente en pacientes crónicos, y en aquellos con manifestaciones autoinmunes. *Mycoplasma spp.* causa la sobreestimulación de células B, promoviendo patologías autoinmunes y Enfermedad Reumatoidea. *Mycoplasma* incrementa la producción de IL-1 $\beta$  y IL-6.

- *Conteo absoluto de células CD57*

Las células CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> son una subpoblación de células NK. El número absoluto de células CD57<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> es bajo en pacientes que sufren de enfermedad crónica de Lyme. Pacientes con conteos bajos de CD57 presentan más coinfecciones y defectos inmunológicos persistentes que pacientes con conteos elevados.



#### - Niveles de PGE2

El PGE2 es un compuesto derivado de los fosfolípidos de membrana, es también mediador inmunopatológico en infecciones crónicas y cáncer. El PGE2 aumenta su propia producción pero suprime a los mediadores inflamatorios agudos, resultando en su predominancia en etapas tardías/crónicas de la respuesta inmune. El PGE2 suprime selectivamente las funciones efectoras de los macrófagos y neutrófilos y la respuesta inmune tipo 1 mediada por células Th1-, CTL- y NK; pero promueve las respuestas de células Th2, Th17 y T regulatorias. PGE2 está sobreexpresado en pacientes crónicos con IMG (Prof. De Meirleir, ILADS workshop Antwerp 23/04/2016).

#### - IL-8

Cuando *Borrelia* migra, inicia una respuesta inflamatoria multisistémica. IL-1 y TNF  $\alpha$  promueven la quimiotaxis. Esta migración induce la expresión de citoquinas tales como IL-8, la cual está sobreexpresada en pacientes crónicos con IMG (Prof. De Meirleir, ILADS workshop Antwerp 23/04/2016).

#### - sCD14

CD14 es una molécula que se expresa en monocitos y macrófagos y juega un rol crítico en el reconocimiento de los componentes de pared celular bacteriana (LPS). La parte extracelular de CD14 puede ser clivada y liberada al plasma sanguíneo, en donde inactivará al LPS en circulación. Los niveles séricos de CD14 son significativamente elevados en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedad de Crohn, pero también en pacientes que sufren de Brucellosis ó enfermedad de Lyme. Pacientes con enfermedad de Lyme en fase inicial ó no tratada mostraron niveles de sCD14 significativamente más altos que los controles saludables (Lin et. al., 2000).

#### - VEGF

El VEGF juega un rol importante en condiciones fisiopatológicas asociadas a enfermedades autoinmunes, tales como el lupus sistémico eritematoso (LSE), artritis reumatoide (AR), y esclerosis múltiple. Niveles anormalmente altos de VEGF en un entorno libre de hongos podrían sugerir infección con *Bartonella* (Kempf et. al. 2001).

#### - CD 38

CD 38 es una molécula que tiene un rol importante en la quimiotaxis de las células dendríticas (CD) y la migración a los nódulos linfáticos que se ha visto fuertemente inducida por LPS pero no por *Borrelia garinii* (induciendo así neuroborreliosis). Este hallazgo ha sido confirmado por RT-PCR cuantitativa y citometría de flujo.

Adicionalmente, la RT-PCR ha mostrado que CCR7 (que induce la maduración de células dendríticas) se ha visto expresado 11 veces más en células estimuladas con LPS que en células estimuladas con *Borrelia garinii*.

Estos descubrimientos sugieren que *Borrelia garinii* puede afectar funciones cruciales de las CD a través del bloqueo de la inducción de moléculas importantes para la migración de células

dendríticas a los nódulos linfáticos, afectando las respuestas inmunes posteriores en la infección por borreliosis de Lyme (Hartiala et. al. 2007). Posteriormente, Hartiala y colegas (J. immunol, 2010) estimularon CD con *B. burgdorferi sensu stricto* y *B. afzelii* a fin de evaluar la incapacidad de *B. garinii* para inducir la expresión de CD 38. Ninguna de las dos genoespecies indujo la expresión de CD 38.

### **- Pruebas diagnósticas para problemas gastrointestinales**

#### **1. Prueba MSA en heces**

Los investigadores de R.E.D. han desarrollado y validado un nuevo procedimiento para analizar las poblaciones bacterianas en una muestra de materia fecal: la prueba MSA es una técnica molecular nueva que involucra la secuenciación de regiones específicas de ADN bacteriano (metagenómica). Esta prueba puede ser efectuada a partir de organismos muertos (la exposición a oxígeno o bajas temperaturas no es un problema). Hasta hace poco, la investigación sobre la composición de la microbiota dependía casi exclusivamente del cultivo celular, en un escenario donde

- (i) el 40-80% de las bacterias intestinales no puede ser cultivado
- (ii) la identificación de colonias puede ser difícil
- (iii) las bacterias deben estar vivas; el estudio de anaerobios es muy difícil debido a pérdidas significativas durante la recolección y procesamiento de las muestras
- (iv) el uso de métodos de cultivo puede cubrir solamente una fracción reducida de todas las especies bacterianas (10%).

En contraste, la identificación de cada bacteria mediante la comparación de secuencias con bases de datos públicas es extremadamente precisa, no subjetiva, y el uso de tecnologías de alta resolución permite la identificación de decenas sino cientos de organismos en una sola muestra.

#### **2. Calprotectina en heces**

La calprotectina es una proteína ubicada en el citosol de los neutrófilos, tiene propiedades antimicrobianas y su concentración está aumentada durante la inflamación intestinal.

#### **3. D-lactato en suero**

El D-lactato es un producto metabólico bacteriano, no es producido ni metabolizado por las células de mamífero. Típicamente, los niveles elevados de D-lactato se deben a infección bacteriana o Síndrome de Intestino Corto. Debido a su baja metabolización y excreción, los niveles elevados de D-lactato pueden provocar acidosis y encefalopatía.

Dado que las infecciones persistentes promueven daño corporal significativo que debe ser reparado, las siguientes pruebas también deberían ser consideradas para una aproximación integral más amplia que se enfoque no solamente en el agente causal infeccioso sino además en los daños globales:

- Ensayo para Tularemia (búsqueda de anticuerpos contra *Francisella tularensis*)
- Ensayo para Brucellosis (el ensayo BrucellaCapt es muy específico y sensitivo)

- Ensayo para Coxiella, Anaplasma, Rickettsia, Bartonella (PCR y/o serología)
- Ensayo para EBV (preferentemente por inmunoblot y PCR)
- Ensayo para infecciones por Herpesvirus (HHV6)
- Ensayo para infecciones por hongos (especialmente Candida)
  - Ensayo para inflamación, niveles de citoquinas (ver Grab et. al. 2007) y estrés oxidativo: la inflamación crea radicales libres y estrés oxidativo que daña las membranas celulares, mitocondria, las células nerviosas, creando el “síndrome de la enfermedad” (fatiga, dolor, disfunción cognitiva, cambios en los estados de ánimo)
  - Pruebas del sistema del complemento (C3a y C4a): C4a parece ser un marcador inmunológico valioso en pacientes con síntomas persistentes de enfermedad de Lyme (Stricker et. al. 2009).
  - Pruebas para envenamiento por metales pesados y deficiencias nutricionales (minerales, vitaminas, etc)
- Pruebas de metabolitos tóxicos (amonio, ácidos quinurénico y quinolínico)
  - Pruebas de autoanticuerpos para enfermedades de tejido conectivo (inmunoblots para ANA/ENA)
  - **Pruebas diagnósticas para intestino permeable (zonulina en heces, anticuerpos contra bacterias intestinales en suero)**

IgA/IgM contra bacterias intestinales: un panel de detección de anticuerpos (IgA e IgM) dirigido contra antígenos de patógenos intestinales. La IgA es secretada desde las células intestinales, la IgM es producida por células inmunitarias en la sangre. En personas sanas las bacterias patógenas se encuentran en bajas cantidades en el intestino, y el nivel de anticuerpos en sangre es muy bajo. No obstante, en caso de crecimiento bacteriano excesivo (disbiosis), se producen grandes cantidades de IgA y una fracción estará presente en el torrente sanguíneo. En el caso el intestino permeable, las bacterias pueden entrar al torrente sanguíneo, una IgM específica es producida. Por lo tanto, altos niveles de IgM específicas para bacterias intestinales son indicadores de alta permeabilidad intestinal.

Pruebas de ZONULIN ELISA en las heces: La zonulina modula la permeabilidad de las uniones apretadas entre las células de la pared del tracto digestivo. A medida que el nivel de Zonulina aumenta, el sello entre las células intestinales disminuye, abriendo espacios entre las células que permiten el paso de numerosas macromoléculas. Esto se denomina "intestino con fugas".

**- Pruebas diagnósticas para inflamación intestinal (sIgA, EDN/EPX,  $\beta$ -defensin-2)**

ELISA para sIgA en muestras fecales: la principal función de sIgA es unirse a microorganismos invasores y toxinas y atraparlos en la capa mucosa o en las células epiteliales, de forma de inhibir su movilidad gastrointestinal, aglutinar los organismos y neutralizar sus exotoxinas y luego contribuir a su eliminación contribuir a su eliminación inocua del cuerpo en la materia fecal. La concentración de sIgA nos da información acerca de la defensa inmune intestinal: una ausencia de

sIgA indica actividad reducida del sistema inmune intestinal, niveles altos de sIgA indican inflamación intestinal.

ELISA para EPX/EDN en muestras fecales: la acumulación de EDN en el intestino se asocia con la inflamación y el daño tisular. La determinación de EDN en materia fecal puede servir como parámetro objetivo de inflamación crónica clínica ó sub-clínica en el área gastrointestinal. La EDN fecal es considerada la mejor de las proteínas granulares citotóxicas para la evaluación de inflamación gastrointestinal, dado que refleja las observaciones clínicas, endoscópicas e histológicas de actividad patológica y daño mucosal. Niveles elevados de EDN fecal están relacionados a numerosas condiciones inflamatorias, tales como alergia/sensibilidad a la comida, infecciones patogénicas (*C. difficile* y *H. pylori*), IBS, y trastornos gastrointestinales eosinofílicos.

ELISA para  $\beta$ -defensina-2: las  $\beta$ -defensinas son una parte integral del sistema inmune hereditario y contribuyen mediante su efecto antimicrobiano a la función protectora de las células epiteliales intestinales. Las defensinas ejercen una actividad antimicrobiana de grado variable contra bacterias, hongos y ciertos virus encapsulados; su expresión es inducida por citoquinas pro-inflamatorias y también mediante microorganismos (por ejemplo, *E. coli*, *H. pylori* ó *P. aeruginosa*) y por microorganismos probióticos. Una deficiencia en  $\beta$ -defensina-2 puede observarse, por ejemplo, en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn. El sistema de defensa de la membrana mucosa está por lo tanto restringido y permite la invasión de bacterias, pudiendo dar lugar a una infección típica en pacientes con enfermedad de Crohn. Resultados recientes sugieren que  $\beta$ -defensina-2 está sobreexpresada en inflamación intestinal activa, especialmente en la colítis ulcerativa.

Estos no son las únicas pruebas que pueden ser útiles en un abordaje integral. Basándose en el examen clínico, el médico clínico puede elegir otras que resulten relevantes. Un amplio rango de consideraciones potencialmente útiles es enumerado en los libros del Dr. Horowitz. Las conferencias científicas y médicas especializadas son también una gran fuente de información útil.

## **POSIBILIDADES FUTURAS PARA PRUEBAS DIAGNOSTICAS**

Se anticipan mayores avances en el diagnóstico a medida que la información genética se combina con los avances en la tecnología de microarrays, imágenes y proteómica. Se espera que estos crecientes campos de la ciencia conduzcan a la mejora de las herramientas de diagnóstico, así como que proporcionen nuevos conocimientos sobre la patogénesis de la borreliosis. Con la creciente atención que se le da hoy en día a la LCT, las pruebas existentes (como las PCR) también son mejoradas constantemente y están llevando a mejores resultados.

La prueba de Phage es una nueva herramienta prometedora para la detección de otras infecciones transmitidas por garrapatas (*Bartonella*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, etc.) y pronto se unirá a la detección de *Borrelia* Phage.

Compartir la información y difundir el conocimiento es el primer paso para mejorar las pruebas.

## **CONCLUSIONES FINALES**

Resumir las pruebas relacionadas con las LCT es una empresa enorme. Muchos artículos, libros, sitios web, blogs, etc. están disponibles hoy en día (vea abajo una pequeña selección), y se

celebran múltiples conferencias cada año. La meta de la presente contribución fue reunir parte de esta información como un recurso conveniente para los pacientes para promover la comprensión de la utilidad pero también las limitaciones de las pruebas disponibles y las razones subyacentes del fracaso. El objetivo final también fue enfatizar aún más la necesidad de un enfoque global e integrador para un mejor manejo de las LCT.

*Contribución por Tatjana Mijatovic, PhD*

*CSO y Manager de Laboratorio \* [www.redlabs.com](http://www.redlabs.com)*

## **REFERENCES AND SELECTED SOURCE READINGS:**

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 18(3) :484-509, 2005.

Asch ES, Bujak DI, Weiss M, Peterson MG, Weinstein A. Lyme Disease: an infectious and postinfectious syndrome. *J Rheum* 21:454-61, 1994.

Bakken LL, Case KL, Callister SM, et al. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme Disease serology. *JAMA* 268:891-5, 1992.

Berghoff W. Chronic Lyme Disease and Co-infections: Differential Diagnosis. *Open Neurol J.* 6:158-78, 2012.

Berghoff W. *Open Neurol J.* 6:158-78, 2012.

Branda JA, Rosenberg, E.S. *Borrelia miyamotoi*: A lesson in disease discovery. *Ann Intern Med* 159: 61-2, 2013.

Bransfield RC, Wulfman JS, Harvey WT, Usman AI. The association between tick-borne infections, Lyme borreliosis and autism spectrum disorders. *Med Hypotheses.* 70(5):967-74, 2008.

Donta ST. Lyme Disease: A clinical challenge. *J Spirochet and Tick Dis* 2:50-51, 1995. Donta ST. Late and chronic Lyme disease. *Med Clin North Am.* 86(2):341-9, 2002.

Embers ME, Barthold SW, Borda JT, Bowers L, Doyle L, Hodzic E, Jacobs MB, Hasenkampf NR, Martin DS, Narasimhan S, Phillippi-Falkenstein KM, Purcell JE, Ratterree MS, Philipp MT. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection. *PLoS One.* 2012;7(1):e29914. doi: 10.1371/journal.pone.0029914. Erratum in: *PLoS One.* 2013;8(9). doi:10.1371/annotation/f84663e3-0a2c-4243-8f973a58133c1b0f. *PLoS One.* 2012;7(4):10.1371/annotation/4cafed66-fb84-4589-a001131d9c50aea6.

Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, Roberg M, Vrethem M, Bergström S. The outer surface proteins of Lyme disease borrelia spirochetes stimulate T cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol.* 101(3):453-60, 1995.

Grab DJ, Nyarko E, Barat NC, Nikolskaia OV, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum* *Borrelia burgdorferi* co-infection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 14(11):1420-4, 2007.

Hartiala P, Hytönen J, Pelkonen J, Kimppa K, West A, Penttinen MA, Suhonen J, Lahesmaa R,

Viljanen MK. Transcriptional response of human dendritic cells to *Borrelia garinii*--defective CD38 and CCR7 expression detected. *J Leukoc Biol.* 82(1):33-43, 2007.

Hartiala P, Hytönen J, Yrjänäinen H, Honkinen M, Terho P, Söderström M, Penttinen MA, Viljanen MK. TLR2 utilization of *Borrelia* does not induce p38- and IFN-beta autocrine loop-dependent expression of CD38, resulting in poor migration and weak IL-12 secretion of dendritic cells. *J Immunol.* 184(10):5732-42, 2010.

Horowitz Richard, book: *Why Can't I Get Better? Solving the Mystery of Lyme and Chronic Disease.* St Martin's Press US, 2013.

Horowitz Richard, book: *How Can I Get Better? An Action Plan for Treating Resistant Lyme and Chronic Disease.* St Martin's Press US, 2016.

Jin C, Roen DR, Lehmann PV, Kellermann GH. An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells.* 2(3):607-20, 2013.

Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, Autenrieth IB. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol.* 3(9):623-32, 2001.

Kugeler KJ, Farley GM, Forrester JD, Mead PS. Geographic Distribution and Expansion of Human Lyme Disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 21(8):1455-7, 2015.

Kuhn M, Bransfield R2. Divergent opinions of proper Lyme disease diagnosis and implications for children co-morbid with autism spectrum disorder. *Med Hypotheses.* 83(3):321-5, 2014.

Kuhn M, Grave S, Bransfield R, Harris S. Long term antibiotic therapy may be an effective treatment for children co-morbid with Lyme disease and autism spectrum disorder. *Med Hypotheses.* May 78(5):606-15, 2012.

Lee SH, Vigliotti JS, Vigliotti VS, Jones W, Shearer DM. Detection of *Borreliae* in archived sera from patients with clinically suspect Lyme disease. *Int J Mol Sci* 15: 4284-98, 2014.

Lin B, Noring R, Steere AC, Klempner MS, Hu LT. Soluble CD14 levels in the serum, synovial fluid, and cerebrospinal fluid of patients with various stages of Lyme disease. *J Infect Dis.* 181(3):1185-8, 2000.

Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of co-infection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic Ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol.* 34(3):724-7, 1996.

Nicolson GL, and Nicolson NL. Chronic infections as a common etiology for many patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and Gulf War Illness. *Intern J Med* 1:42-6, 1998.

Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, Skogman BH, Nyberg C, Ernerudh J, Eliasson I, Ekerfelt C. Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? *Cells.* 1(2):153-67, 2012

Pachner AR, Delaney E, O'Neill T, Major E. Inoculation of nonhuman primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. *Neurology* 45:165-72, 1995.

Puri B, Segal D, Monro J. Diagnostic use of the lymphocyte transformation test-memory

lymphocyte immunostimulation assay in confirming active Lyme borreliosis in clinically and serologically ambiguous cases. *Int J Clin Exp Med* 7(12):5890-5892, 2014.

Saebo A, Lassen J. *Yersinia enterocolitica*: an inducer of chronic inflammation. *Int J Tissue React.* 16(2):51–7, 1994.

Seltzer EG, Gerber MA, Carter ML, Freudigman K, Shapiro ED. Long-term outcomes of persons with Lyme disease. *JAMA* 283:609-616, 2000.

Shadick NA, Phillips CB, Logigian EL, Steere AC, Kaplan RF, Berardi VP, Duray PH, Larson MG, Wright EA, Ginsburg KS, Katz JN, Liang MH. The long-term clinical outcomes of Lyme Disease. *Ann Intern Med* 121:560-7, 1994.

Siniscalco D, Mijatovic T, Bosmans E, Cirillo A, Kruzliak P, Lombardi VC, De Meirleir K, Antonucci N. Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder. *In Vivo.* 30(2):83-9, 2016.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest.* 113(8):1093-1101, 2004.

Steere AC. Lyme Disease. *NEJM* 345:115-25, 2001.

Stricker RB, Burrascano J, Winger E. Long term decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic Lyme disease. *Ann Agric Environ Med.* 9 :111-3, 2002.

Stricker RB, Johnson L. Lyme disease diagnosis and treatment: lessons from the AIDS epidemic. *Minerva Med.* 101(6):419-25, 2010.

Stricker RB, Savely VR, Motanya NC, Giclas PC. Complement split products c3a and c4a in chronic lyme disease. *Scand J Immunol.* 69(1):64-9, 2009.

Stricker RB, Winger EE. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunol Lett.* 76(1):43-8, 2001.

Sykes R. An Estimate of Lyme Borreliosis Incidence in Western Europe. *Res Medica* 22(1): 76-87, 2014.

Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am.* 22(2):217-34, 2008.

Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTTMELISA) for Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 57(1):27-34, 2007.

van der Heijden IM, Res PC, Wilbrink B, Leow A, Breedveld FC, Heesemann J, Tak PP. *Yersinia enterocolitica*: a cause of chronic polyarthritis. *Clin Infect Dis.* 25(4):831–7, 1997.

Wormser G, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, Rush TJ, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis* 31(S1):S1-S14, 2000.

#### **WEBSITES :**

<http://whatislyme.com/tom-grier-microbiologist/>

[www.redlabs.com/](http://www.redlabs.com/)

<http://www.ceresnano.com/>

[www.prohealth.com](http://www.prohealth.com)  
[www.ilads.org](http://www.ilads.org)  
<https://www.arminlabs.com/>  
[www.igenex.com/](http://www.igenex.com/)  
[www.bca-lab.de/](http://www.bca-lab.de/)  
<http://labo-barla.eu/>  
<http://www.klinghardtacademy.com/>  
[www.melisa.org/](http://www.melisa.org/)  
<http://tickplex.com/>  
<http://norvect.no/>  
[www.tiredoflyme.com](http://www.tiredoflyme.com)  
[www.columbia-lyme.org](http://www.columbia-lyme.org)  
[www.lymediseasechallenge.org](http://www.lymediseasechallenge.org)  
[www.lymeneteurope.org](http://www.lymeneteurope.org)  
[www.ticktalkireland.org](http://www.ticktalkireland.org)  
[www.tekentiques.net](http://www.tekentiques.net)  
[www.lymeresearchalliance.org](http://www.lymeresearchalliance.org)  
[www.emedicine.medscape.com](http://www.emedicine.medscape.com)  
[www.lymediseaseaction.org.uk](http://www.lymediseaseaction.org.uk)  
[www.lymedisease.org](http://www.lymedisease.org)  
[www.labtestsonline.org](http://www.labtestsonline.org)  
<https://canlyme.com>  
[www.francelyme.fr](http://www.francelyme.fr)

**CONFERENCIAS:**

ILADS Boston 31/10-3/11/2019  
ILDS Madrid 2019  
ILADS Chicago 2018  
ILADS Paris 2017  
ILADS Helsinki 2016  
ILADS Augsburg 2015  
ILADS Augsburg 2014  
2nd Lyme-Disease Update, Klagenfurt 25/4/2015  
BBOW-APSO Lyme Conference, Antwerp 12-13/9/2015  
France Lyme Conference, Paris 14/11/2015  
ILADS one-day workshop Antwerp 23/4/ 2016  
The Tick Factor, Amsterdam 17-18/9/2016

**Phelix Phage Test; References:** This new approach, developed by Phelix R&D and the Laboratory directed by Pr Matha Clockie at University of Leicester, was presented on several international Conferences:

1. Lecture at ILADS Paris 2017 : Dr Louis Teulières
2. Poster at ILADS Paris 2017: Dr Jinyu Shan (University of Leicester)
3. Lecture at Chronic Pathologies Conference Antwerp 2018: Dr Louis Teulières
4. Lecture at international Lyme Conference Madrid 2018: Dr Louis Teulières
5. Lecture at ILADS Chicago 2018: Dr Louis Teulières
6. Poster at ILADS Chicago 2018: Dr Jinyu Shan (University of Leicester)
7. Lecture at Crypto-Infections Conference Dublin 2019: Dr Jinyu Shan (University of Leicester)