



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	4
MATERIAL Y METODOS	4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
1. CULTIVO	5
2. SEROLOGÍA: ELISA	5
3. EL DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LA NEUROBORRELIOSIS	8
4. INMUNOBLOT	10
5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	11
CONCLUSIONES.....	13
VALORACIÓN PERSONAL.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
Anexo I	22

RESUMEN

La borreliosis de Lyme es una enfermedad producida por el grupo de espiroquetas *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), y transmitida por las picaduras de garrapatas pertenecientes a la especie *Ixodes ricinus*. Produce un síndrome multisistémico que, si no se diagnostica y trata de manera temprana, puede llevar a complicaciones graves. El diagnóstico de esta enfermedad se lleva a cabo mediante una combinación del historial médico del paciente, la presencia de síntomas y signos clínicos, y una confirmación laboratorial de la infección por *Borrelia*. En Europa se encuentran las cuatro especies patógenas de *B. burgdorferi* s.l., lo que complica el diagnóstico laboratorial de la enfermedad, y la existencia de multitud de pruebas y de kits comerciales hace que la creación de un estándar para toda Europa sea difícil.

Teniendo en cuenta los diferentes métodos que se pueden usar para la detección de *Borrelia*, los menos interesantes a nivel de capacidad diagnóstica son el cultivo y PCR, a pesar de que ambos cuentan con alta especificidad (>90%), su sensibilidad es demasiado baja para ser considerados métodos de rutina, junto con otros defectos. Por otra parte, el inmunoblot también es muy específico (>87%), lo que lo hace muy buen complemento para la serología, que cuenta con una alta sensibilidad tras el estadio temprano localizado (>70%).

En el caso de la neuroborreliosis, contamos con métodos altamente sensibles, lo que puede dar lugar a falsos positivos, pero esa situación podría resolverse utilizando la detección del

biomarcador CXCL13 como prueba de confirmación, ya que cuenta con un valor predictivo positivo muy alto (>96%).

En todo caso, el diagnóstico laboratorial de esta enfermedad depende mucho de la situación de cada laboratorio, pero se puede asumir que, de forma general, el mejor método diagnóstico es la prueba serológica confirmada por otro método, normalmente inmunoblot.

Comparative study of laboratory diagnostic methods for Lyme borreliosis in Europe.

Lyme borreliosis is a disease produced by spirochetes from the Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.) group and transmitted through the bite of ticks from the Ixodes ricinus species. It produces a multisystemic syndrome that, if not diagnosed and treated early, could carry severe developments. Thus, the diagnosis of the disease is determined by a combination of the patient's medical history, the presence of symptoms and clinical signs, and the laboratory confirmation of a Borrelia infection. In Europe, the four B. burgdorferi s.l. pathogenic species exist, which further complicates the laboratory diagnosis; such difficulties are enhanced because of the existence of multiple different tests and commercial kits. Thus, the creation of a standard for all Europe is difficult.

Keeping in mind the different methods available for the detection of Borrelia, the least interesting ones, when it comes to diagnostic ability, are culture and PCR. Even though they have high specificity (>90%), their sensitivity is too low to be considered routine methods, among other defects. On the other hand, immunoblot is also highly specific (>87%), which makes it a good complement to the serology, which has high sensitivity after the early, localized stage (>70%).

In neuroborreliosis case, we count with highly sensitive methods, which can give place to false positives, but that situation could be resolved through the detection of the CXCL13 biomarker as the confirmation method, since it counts with a high positive predictive value (>96%).

In any case, the laboratory diagnosis of this disease depends a lot in the condition of each laboratory, but we can assume that, generally, the best diagnostic method is the serological test confirmed through other means, usually immunoblot.

INTRODUCCIÓN

La borreliosis de Lyme es la enfermedad transmitida por vectores más común en las zonas templadas del hemisferio norte (Lindgren y Jaenson, 2006). Se describió por primera vez en pacientes humanos en el año 1977, en Old Lyme, Connecticut, donde había una alta incidencia de niños con artritis reumatoide. Estudios posteriores verificaron que existían descripciones similares en Europa desde finales del siglo XIX (Wang y col., 1999).

El patógeno causante de la enfermedad se incluye en el grupo de espiroquetas *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), que producen un síndrome multisistémico. Sin embargo, si los signos tempranos no se diagnostican correctamente o se ignoran, la enfermedad puede complicarse

llevando a graves alteraciones del sistema nervioso, del corazón y de las articulaciones. Se transmite principalmente a través de la picadura de garrapatas duras pertenecientes al *Ixodes ricinus*. En Europa los principales vectores de la enfermedad son *I. ricinus* y, en menor medida, *I. persulcatus*, debido a razones meramente geográficas.

Borrelia burgdorferi s.l. son bacterias Gram negativas de la familia Spirochaetaceae. Cuando se llevó a cabo este estudio se continúan conociendo nuevas especies del complejo. Las más relevantes desde el punto de vista clínico son *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) y *B. garinii*. En Estados Unidos solo se encuentra *B. burgdorferi* s.s., mientras que en Europa se encuentran las cuatro especies patógenas.

Ixodes ricinus es la garrapata más importante en Europa, no solo por su capacidad para circular *Borrelia* en focos naturales, sino por su afinidad para picar a los humanos. Se suele encontrar en zonas con valores altos de humedad, con preferencia por el bosque templado caducifolio. Estas garrapatas pueden vivir más de tres años, según las condiciones climáticas. Pasan la mayor parte de su vida en el suelo, bien sea manteniendo sus propios niveles de humedad, mudando, poniendo huevos o hibernando.

Estas garrapatas pueden alimentarse sobre un amplio grupo de vertebrados, pero solo unos pocos de ellos pueden actuar como reservorio para el patógeno. Los reservorios competentes más importantes de *B. burgdorferi* s.l. en Europa son los roedores, especialmente los ratones pertenecientes a los géneros *Apodemus* y *Microtus*; insectívoros como erizos y musarañas; liebres; y muchas especies de aves que incluyen aves migratorias. Los animales de menor tamaño suelen ser infectados por larvas y a veces ninfas, mientras que los animales más grandes, como liebres o grandes mamíferos, pueden ser infectados por cualquier estadio. Esos grandes mamíferos no son reservorios, pero son importantes para la transmisión del patógeno ya que alimentan a multitud de hembras. La cantidad de reservorios en un hábitat es el principal factor que influye en la población de garrapatas infectadas. La transmisión vertical del patógeno en la garrapata es posible, pero rara. Solo un 1% de las larvas que buscan hospedador están infectadas, aunque se sospecha que esos hallazgos corresponden a otra especie de *Borrelia* del grupo de las fiebres recurrentes, *B. miyamotoi*, que sí tiene transmisión de la hembra al huevo. *Ixodes ricinus* tiene una clara actividad estacional, diferente según la zona geográfica. Se han declarado picos de actividad estacional de la garrapata unimodales y bimodales (con picos tanto en primavera como en otoño). La actividad de la garrapata depende mucho del clima: en aquéllos en los que la desecación es común, la actividad se reduce a solo unas semanas, mientras que en bosques densos, con alta humedad, el periodo de actividad puede durar varios meses. La borreliosis de Lyme se puede dividir en tres formas clínicas, que podemos ver en la tabla 1. Tiene un primer estadio temprano en los 2-30 días post infección que se manifiesta como un

eritema migratorio (EM), una lesión eritematosa en la zona de la picadura. Si no recibe tratamiento, la infección se puede diseminar y afectar al sistema nervioso (en un 20% de los casos), las articulaciones (en un 10% de los casos) y/o el corazón (raro) en un plazo de días a semanas. La borreliosis de Lyme crónica es poco común, y mientras en Estados Unidos se manifiesta en las articulaciones, en Europa hay una mayor variedad de síntomas, entre los que se incluye la acrodermatitis atrófica crónica, aunque el que se considere o no una verdadera forma clínica de la borreliosis de Lyme está en duda. Estas diferencias geográficas entre las formas clínicas los podemos ver en la tabla 1.

Además, algunos síntomas se asocian a determinadas especies de *Borrelia* o a determinadas zonas geográficas. *Borrelia garinii* suele asociarse a síntomas neurológicos, *B. afzelii* se suele asociar a la acrodermatitis atrófica crónica, y *B. burgdorferi* s.s. se suele asociar a manifestaciones articulares (Lindgren and Jaenson, 2006).

El diagnóstico de la borreliosis de Lyme se basa en la presencia de síntomas y signos clínicos típicos, en el historial médico del paciente y en una confirmación laboratorial de infección por *Borrelia*, excepto en el caso de EM, que se suele basar en un diagnóstico exclusivamente clínico (Steere y col., 2016) (Figoni y col., 2019). En Europa, es necesario armonizar los métodos de diagnóstico, que deben ser fiables, seguros, baratos y comparables, como paso previo a la definición consensuada de caso clínico.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Aunque existen diversas pruebas serológicas o basadas en la detección de ADN de la bacteria, es necesario comparar su eficiencia. Solamente con unas pruebas serológicas fiables podremos establecer una estadística armonizada en Europa, que es el objetivo actual del Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC). Este estudio pretende comparar los datos publicados acerca de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico laboratorial en Europa, para intentar obtener una panorámica de la(s) prueba(s) necesarias para obtener el diagnóstico más fiable.

MATERIAL Y METODOS

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica y un posterior filtrado de los artículos recientes (desde el año 2000) sobre el diagnóstico de la borreliosis de Lyme. No se han incluido datos anteriores a esta fecha porque se ha considerado que los métodos estaban todavía poco desarrollados y los resultados podrían ser erróneos con su inclusión.

La búsqueda bibliográfica se ha realizado en PubMed, con las combinaciones de términos que se indican, y en las fechas en las que se señala. La inclusión final o rechazo de cada uno de los artículos, se ha realizado tras leer el título y el resumen correspondiente, eliminando aquellos artículos que no se referían a la sensibilidad y/o especificidad de los métodos de laboratorio:

Búsqueda en pubmed de “lyme diagnosis comparision” el 14/02/2020

Búsqueda en pubmed y Google académico de “guidelines borreliosis” el 09/03/2020

Búsqueda en pubmed y Google académico de “lyme serology” el 31/03/2020

Búsqueda en pubmed de “lyme borreliosis epidemiology” el 14/04/2020

Búsqueda en pubmed de “Borrelia spielmanii” el 23/04/2020

También se hizo uso de la bibliografía de los estudios escogidos para la amplificación de la información obtenida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han recopilado un total de 30 artículos que hacen referencia implícita al diagnóstico de la borreliosis de Lyme, en el periodo de tiempo comprendido entre los años 1986-2019. Los métodos no-clínicos de diagnóstico se basan en varios procedimientos laboratoriales, como el cultivo de la bacteria, la serología, y el hallazgo mediante amplificación de ácidos nucleicos.

1. CULTIVO

El medio recomendado para el cultivo de *B. burgdorferi* s.l. es el medio Kelly modificado (Preac-Mursic y col., 1991). Es un método muy lento, ya que los resultados pueden tardar entre 7 y 20 horas en aparecer, y que cuenta con baja sensibilidad en este estadio (Karlsson y col., 1990) (Arnež y col., 2001) (40-60%) (Eldin y col., 2019), especialmente cuando las muestras que estamos usando son fluidos corporales (Karlsson y col., 1990) (Arnež y col., 2001), ya que las muestras suelen contener números bajos de bacterias (Gocko y col., 2019). Puede resultar útil en casos individuales en los que la clínica sea indicativa de borreliosis de Lyme y otros métodos arrojaran resultados negativos, como se puede producir en algunos casos de eritema migratorio atípico, en la neuroborreliosis aguda sin detección de anticuerpos intratecales o cuando esa sospecha se da en pacientes con deficiencia inmune (Wilske y col., 2007). En general, no es un método muy común, apenas mencionado en las guías diagnósticas, y que, a pesar de contar con una especificidad de un 100% (Gocko y col., 2019), no es suficiente para compensar sus defectos y para ser recomendado como método diagnóstico de rutina.

2. SEROLOGÍA: ELISA

La mayoría de los estudios (Johnson y col., 1996; Gocko y col., 2019; Kodym y col., 2018; Figoni y col., 2019; Lager y col., 2019; Wilske y col., 2007; Eldin y col., 2019; Dickeson y col., 2016; Hofmann y col., 2017) recomiendan para el diagnóstico serológico de la borreliosis de Lyme un ensayo ELISA como “screening” acompañado de un ensayo de inmunoblot como confirmación. Sin embargo, este método diagnóstico basado en dos pruebas es caro, largo y laborioso. Los métodos ELISA actuales tienen, de forma general, una alta sensibilidad y especificidad (ambas por encima del 65%), aunque varían según el ensayo utilizado, cuya especificidad puede ser muy variable, y del momento de la detección (la sensibilidad mejora a lo largo de la infección, por

ejemplo); además son baratos y fáciles de realizar. Sin embargo, la interpretación clínica es limitada porque la aparición de anticuerpos es tardía en relación con la presentación clínica, como se puede ver en la tabla 2. Además, se pueden producir reacciones cruzadas de IgGs con antígenos de otros patógenos, lo que daría falsos positivos; y la alta persistencia de los anticuerpos y/o la alta seroprevalencia en la población sana de zonas endémicas puede afectar a la sensibilidad del diagnóstico (Lager y col., 2019). También hay una alta variabilidad antigénica en los kits comerciales disponibles, lo que dificulta la comparación de resultados. Fue para evitar estas reacciones cruzadas y para mejorar los valores predictivos de los ensayos serológicos que se empezó a utilizar el sistema de las dos pruebas (Dickeson y col., 2016).

Es de especial relevancia un estudio realizado por laboratorios del norte de Europa (Lager y col., 2019), en el que se comprobó que los ensayos IgM daban una imagen más heterogénea y que había una baja correlación tanto dentro de cada tipo de ensayo como entre ensayos. En cambio, los ensayos de IgG dieron una imagen más homogénea con alta correlación. Los autores demostraron que la sensibilidad en los cinco ensayos ELISA de IgM era relativamente baja, con una media de un 59% (50%-67%), y una alta heterogeneidad (40%-80%) en los pacientes con borreliosis de Lyme. Los donantes de sangre dieron una sensibilidad media de 9,5% (7%-14%) y los pacientes con otras enfermedades arrojaron una sensibilidad media de 68% (35%-71%). Estos resultados no son inesperados, ya que los anticuerpos IgM son menos maduros y específicos que los IgG.

En el caso de IgG, 4 de los 5 ensayos del estudio mencionado anteriormente mostraron una alta sensibilidad (85%-91%, con una media de 88%) en pacientes con borreliosis de Lyme. La sensibilidad media entre los donantes de sangre fue de 22% (20%-24%) y del 68% (35%-71%) entre los pacientes con otras enfermedades.

En general, en este estudio (Lager y col., 2019) se comprueba que los métodos serológicos que detectan IgG muestran alta concordancia, y una sensibilidad y especificidad que muestran su alta reproducibilidad al compararlas entre los diferentes laboratorios. Por el contrario, los ensayos IgM muestran mayor heterogeneidad y resultados menos sensibles, lo que sugiere que medir IgM en suero no añade ningún valor diagnóstico a la detección de IgG en pacientes sospechosos de borreliosis de Lyme (BL), ya que la sensibilidad es más baja y “se consigue una pérdida de especificidad”.

De nuevo, y como se ha venido mencionando en varios apartados, la diversidad de kits arroja resultados diferentes debido al uso de diferentes antígenos o combinaciones de antígenos con los que cuentan los diferentes productos comerciales. Por ejemplo, Enzygnost IgG detecta la VlsE recombinante de las 3 principales especies de *Borrelia* patógenas del grupo *B. burgdorferi* s.l., mientras que el ensayo Liaison IgG se basa solo en el antígeno VlsE recombinante de *B.*

garinii, por lo que la sensibilidad de este último será menor en aquellas zonas en las que otras especies tengan mayor representación. Sin embargo, a pesar de que VlsE es el antígeno más sensible para IgG en todos los estadios de borreliosis de Lyme, se pueden dar reacciones cruzadas de este antígeno entre diferentes especies.

Sin embargo, los ensayos IgM con mayor sensibilidad y especificidad pueden resultar interesantes en el caso de neuroborreliosis en niños, ya que los síntomas aparecen de manera muy temprana, cuando la producción de anticuerpos es baja y difícil de detectar. Dado que los anticuerpos IgM son de aparición más temprana que los IgG, un ensayo IgM podría estar más indicado para la detección de la neuroborreliosis en niños (Lager y col., 2019).

Otro meta-análisis (Dickeson y col., 2016) realizó una comparación de diferentes métodos serológicos con un consenso creado a partir de los resultados de tres ensayos inmunoenzimáticos (EIA) de suero de 222 pacientes para separar los “verdaderos positivos” de los “verdaderos negativos”, cuyos resultados se pueden ver en la tabla 4. El estudio muestra que todos los ensayos tienen una concordancia relativamente alta (desde 76% a 96%), excepto la medición simultánea de IgG e IgM, que sólo coincidía en un 56% de los resultados. En todos los ensayos la sensibilidad es alta, con un valor mínimo del 79%, mientras que la especificidad cuenta con números más variables (desde 38% hasta 100%). La especificidad es especialmente baja en el ensayo que medía tanto IgG como IgM, mientras que el resto medían solamente IgG, lo que podría explicar estos resultados, ya que IgG es más específico que IgM. Además, EUROIMMUN plus VlsE ELISA y MarDx IgG/IgM se basaban en extractos de antígenos enteros, por lo que la consecuente tendencia a la reacción cruzada puede explicar la peor especificidad. Es interesante destacar la especificidad especialmente alta, y por tanto un valor predictivo positivo especialmente alto, en aquellos ensayos que usaban antígenos recombinantes (Novalisa IgG EIA y EUROIMMUN Select IgG EIA, 96% y 100% respectivamente). Novalisa usa una combinación de antígenos recombinantes, siendo uno de ellos la flagelina, que puede dar una obvia reacción cruzada con otras bacterias. Por el contrario, en el panel de especificidad, se vio que aquellos kits comerciales que usaban lisados de células enteras arrojaron falsos positivos con muestras de pacientes con leptospirosis, mononucleosis y sífilis. Estos casos fueron negativos según el resultado de consenso, lo que puede indicar que los anticuerpos asociados con infecciones por *Treponema* originen reacciones cruzadas y, por tanto, falsos positivos. Si, en su lugar, se usan pruebas de EIA con antígeno recombinante, estos falsos positivos se eliminarían, ya que aquellos ensayos que usaban antígeno recombinante dieron una especificidad por encima del 95%, y no pasarían al segundo ensayo (Dickeson y col., 2016).

Como conclusión, la sensibilidad de la serología es muy alta, especialmente tras pasar el estadio localizado temprano, mientras que su especificidad cuenta con valores más variables. Es allí

donde se aprecian las diferencias entre IgG e IgM, siendo IgM mucho menos específico y con tendencia a dar resultados muy heterogéneos, lo que hace que la detección de IgM no tenga utilidad, aunque podría resultar interesante en casos muy específicos. Por el contrario, IgG muestra una especificidad mucho más alta, especialmente en aquellos kits que utilizaban antígenos recombinantes, que daban valores predictivos por encima del 90%. Estos kits podrían resultar muy interesantes para aquellos laboratorios que quisieran evitarse la realización de dos pruebas diagnósticas. Por el contrario, aquellos kits que contaban con el antígeno VIsE daba peores especificidades, probablemente por las posibles reacciones cruzadas con otras bacterias.

3. EL DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LA NEUROBORRELIOSIS

Según el consenso europeo, el diagnóstico definitivo de una neuroborreliosis aguda (forma clínica nerviosa de la borreliosis de Lyme) precisa la detección de *B. burgdorferi* s.l. en cultivo o PCR o en pruebas de producción de anticuerpos específicos (Mygland y col., 2009). Esta prueba de anticuerpos debería basarse en dos pruebas serológicas simultáneas, buscando síntesis intratecal de IgG frente a *B. burgdorferi* s.l. tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Gocko y col., 2019). Los anticuerpos suelen estar presentes en suero, pero a veces arrojan resultados negativos en los estadios tempranos de la enfermedad, mientras que la PCR y el cultivo son raramente positivos (Cerar y col., 2008) (Roux y col., 2007) (Wilske y col., 1986). Los índices de anticuerpos (AI) tienen una sensibilidad moderada de 55-80% al principio de la infección, y los anticuerpos persisten incluso después del tratamiento (Tjernberg y col., 2011) (Krüger y col., 1989).

Diferentes estudios (Tjernberg y col., 2011; Schmidt y col., 2011; Wutte y col., 2011; Wutte y col., 2011) demuestran lo interesante que puede resultar el biomarcador CXCL13 para el diagnóstico de la neuroborreliosis. El CXCL13 es una quimiocina que atrae a los linfocitos B y que se expresa en los órganos linfoides secundarios. Durante los procesos inflamatorios, como es la neuroborreliosis, el CXCL13 se produce de manera ectópica en el LCR, el suero y los tejidos inflamados, donde induce la agregación y neogénesis de linfocitos B y la formación de folículos linfoides, lo que promueve una respuesta inmune humoral. Se ha visto que pacientes con neuroborreliosis muestran niveles altos de CXCL13 en el LCR, mientras que pacientes con otras enfermedades inflamatorias el sistema nervioso central, excepto en el caso de la neurosífilis, muestran niveles normales (Narayan y col., 2005; Rupprecht y col., 2007). Este biomarcador tiene altos valores predictivos para el diagnóstico de neuroborreliosis aguda, y es capaz de detectar pacientes con posible neuroborreliosis pero que han dado negativo al AI de ELISA (ELISA-AI) o para confirmar el diagnóstico. No es una herramienta diagnóstica de rutina, pero su detección puede ser una opción para mejorar la sensibilidad y precisión del diagnóstico, ya que en la mayoría de dichos estudios se ha visto una sensibilidad cercana al 100% (por encima del

96%) y una especificidad similar. No nos interesa su detección en suero de pacientes con neuroborreliosis, porque se ha demostrado que los niveles de CXCL13 no son elevados (Senel y col., 2009).

Para que un paciente se considere enfermo de neuroborreliosis de forma definitiva, tiene que cumplir los siguientes tres requerimientos: que presente signos clínicos de meningitis/parálisis facial o meningorradiculitis, que presente una pleiocitosis en el LCR ≥ 4 células/ μ L, y que tenga producción intratecal de anticuerpos específicos frente a *Borrelia*. Cumpliendo dos de estos requerimientos se considera que el paciente tiene una “posible” neuroborreliosis (Mygland y col., 2009).

En un estudio (Wutte y col., 2014) se comprobó que, de un total de 50 pacientes, 40 (80%) mostraron pleiocitosis en LCR y un 37 (74%) tuvieron serología positiva frente a Lyme, mientras 17 (26%) fueron negativos. Estos datos se pueden observar en la figura 1. Hasta 31 pacientes mostraron tanto producción de anticuerpos intratecales como pleiocitosis, por lo que fueron diagnosticados con neuroborreliosis definitiva. De esos 31, 29 eran seropositivos y 2 seronegativos. Para la detección de producción de anticuerpos intratecales en LCR se usó un ELISA recombinante (rELISA), que es un ELISA indirecto usado para identificar IgG e IgM contra *B. burgdorferi* s.l., un ELISA flagelo (fELISA), que es un ELISA usa como antígeno el flagelo de la cepa *B. afzelii* DK1, e inmunoblot (IB), o la combinación de estos métodos (rELISA confirmado por IB o fELISA confirmado por IB). Nos referimos a estos métodos cuando hablamos de los tests LCR.

De los pacientes con neuroborreliosis definitiva, 29 se identificaron con rELISA y 17 con fELISA. En 19 de los pacientes, los resultados del rELISA se confirmaron con inmunoblot, mientras que el fELISA se confirmó con inmunoblot en 15 pacientes. En 20 pacientes se confirmaba la neuroborreliosis definitiva al combinar rELISA con CXCL13, y en 16 pacientes al combinar fELISA y CXCL13. De los 50 pacientes, 13 fueron positivos a las cuatro pruebas. Esto se ve en la figura 2. En el caso de las posibles neuroborreliosis, como se puede ver en la figura 3, se diagnosticaron como tal a 11 pacientes (22%). De ellos, 2 pacientes eran seropositivos y tuvieron un test LCR positivo (uno con rELISA, otro con inmunoblot), pero no mostraban pleiocitosis en LCR. Por el contrario, los otros 9 pacientes mostraban pleiocitosis pero el test LCR dio negativo. Como podemos ver, ningún paciente dio positivo con fELISA o con CXCL13.

Los 8 pacientes que no mostraron pleiocitosis ni producción de anticuerpos intratecales se clasificaron como controles. De ellos, 4 eran seropositivos, y todos eran niños que habían sido diagnosticados con parálisis facial idiopática.

En el caso de CXCL13, estaba aumentado por encima del punto de corte el LCR en 22 de los pacientes con neuroborreliosis definitiva, y ningún paciente control o con posible neuroborreliosis fue positivo a CXCL13.

La sensibilidad de los kits comerciales es muy variable, lo que afecta mucho al diagnóstico. De manera general se detectaban más pacientes positivos con rELISA que con fELISA, inmunoblot o detectando niveles de CXCL13, y entre estos tres últimos no había grandes diferencias. Por tanto, podemos determinar que fELISA tiene una menor sensibilidad que rELISA. Sin embargo, si solo usamos rELISA como test para determinar si los pacientes son positivos, dada su alta sensibilidad, se podrían dar falsos positivos; pero como no existe ningún estándar a seguir, un resultado positivo por cualquiera de los tests se podría considerar una confirmación de un diagnóstico sospechoso.

CXCL13 no es un método establecido para detectar neuroborreliosis, a pesar de tener una alta sensibilidad diagnóstica, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad, antes de que se pueda medir la producción de anticuerpos intratecales. Un 20% de los pacientes IgM positivos no mostró síntesis de anticuerpos intratecales a pesar de que se detectara una síntesis intratecal de IgG. Esto indica que, aunque haya ausencia de anticuerpos IgM en suero, puede haber síntesis de anticuerpos intratecales. Como esta síntesis intratecal se suele poder detectar antes de la detección de anticuerpos específicos en suero, podemos encontrar pacientes seronegativos que tengan neuroborreliosis. Todos los pacientes a los que diagnosticaron con neuroborreliosis definitiva, y solamente ellos, tenían altos niveles de CXCL13.

Como conclusión, podemos ver que la rELISA es la prueba con mayor sensibilidad de las cuatro utilizadas (93'55% en el caso de la neuroborreliosis definitiva), pero debido a ello hay mayor riesgo de obtener falsos positivos. Los otros tres métodos tienen sensibilidades similares, siendo el fELISA el de menor sensibilidad (54,84%).

CXCL13 resulta muy interesante por su alta sensibilidad, con la capacidad de detectar positivos antes de la aparición de anticuerpos intratecales, y su alto valor predictivo positivo. Sin embargo, es complicado sospechar de neuroborreliosis antes de la aparición de síntomas y, por tanto, de la aparición de anticuerpos, por lo que su utilidad como diagnóstico precoz es escasa con los métodos de diagnóstico actuales. Sí se podría usar como confirmación de verdaderos positivos, lo que resolvería el problema de la alta sensibilidad del rELISA.

4. INMUNOBLOT

En el mismo estudio mencionado anteriormente (Dickeson y col., 2016) se realizó una comparación del consenso establecido con tres ensayos inmunoblot (IB). En la tabla 5 podemos ver que no hay grandes diferencias de concordancia. Lo que buscamos con un IB es aumentar los valores predictivos del primer ensayo al que acompaña, es decir, que tenga una mayor

sensibilidad y/o especificidad. En el caso del IB con respecto a la serología, donde más vemos esa mejora es en la especificidad, por lo que tendremos pocos falsos positivos y, por tanto, el valor predictivo positivo también mejora, y en ese aspecto sí que se ve una importante diferencia entre la EUROLINE Recombinant line blot (70%) y los dos Western blot (91 y 92%).

En el diagnóstico convencional de BL se usa el WCS Western Immunoblot con el estricto criterio CDC de 5 bandas específicas en un paciente que ha dado IgG positivo. Con esto se busca una alta especificidad a costa de una posible pérdida de sensibilidad, y en este estudio se observó que el WCS Western Immunoblot fue la técnica de inmunoblot con menor sensibilidad.

Aunque, de estos tres ensayos, alguno cuente con mejores resultados, como ocurre con el Trinity Biotech EU Lyme + VlsE IgG Western Blot, la diferencia con el resto no es tan grande como para que resulte relevante a la hora de preferir un método sobre otro.

Además, en este estudio se hizo una comparación de la especificidad entre los diferentes kits, tanto serológicos como de IB, cuyos resultados se pueden apreciar en la tabla 6. En él se vio que el WCS Western IB no dio ningún falso positivo, y que el EUROLINE Recombinant Line Blot mostró menos especificidad que Trinity Biotech Western Blot. También se vio que dos de los tres métodos empleados de IB detectaron un total de 4 falsos positivos (EUROIMMUN Anti-Borrelia (IgG) EUROLINE-RN-AT Recombinant line blot contaba con una especificidad de 87% y Trinity Biotech EU Lyme + VlsE IgG Western Blot con 96%, en lugar del 100% de WB WCS IgG) (Dickesony col., 2016).

En el caso de la neuroborreliosis, en el siguiente estudio (Wutte y col., 2014) los anticuerpos intratecales más comunes estaban dirigidos contra los antígenos p41 y VlsE (IgM e IgG). Se encontraron en LCR bandas nuevas o más fuertes que en suero en el 44% de los pacientes y estaban dirigidas contra VlsE, p41, p100, p39 y p18. Las nuevas bandas sólo aparecían en pacientes adultos, y los niños solo mostraban bandas más intensas, tanto en LCR como en suero. Cuatro pacientes sin un índice de anticuerpos (AI) positivo tenían muchas bandas IgG positivas en suero y LCR, indicando una infección previa.

Es de destacar pues que un resultado de inmunoblot negativo tiene alto valor diagnóstico para descartar la infección por borrelia. Además, puede dar información extra sobre pacientes que no cuentan con síntomas neurológicos específicos.

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Hay muchos estudios sobre los métodos de amplificación del ADN y las diferentes secuencias dianas que han sido utilizadas, pero no hay consenso sobre cuál es el mejor método. La PCR es de poco interés ya que, en el caso de *B. burgdorferi* s.l., se pueden encontrar números muy bajos de espiroquetas, no lo suficientemente altos como para ser detectados por PCR, y por tanto es

raro dar con casos positivos. La existencia de resultados negativos no excluye la posibilidad de infección (Wilskey col., 2007).

Su sensibilidad es similar a la del cultivo, como se puede ver en la tabla 3, y no está indicada como herramienta primaria para el diagnóstico de BL, probablemente por el bajo número de espiroquetas en la mayoría de los casos clínicos, pero se puede usar como suplemento para la serología y para la confirmación y el genotipado de las espiroquetas de *Borrelia* infectantes (Aguero-Rosenfeld y col., 2005).

Las muestras clínicas con mayor sensibilidad para la detección de *B. burgdorferi* s.l. por PCR son las biopsias cutáneas de pacientes con *eritema migrans* y con acrodermatitis atrófica crónica (Aguero-Rosenfeld y col., 2005), así como el líquido sinovial de pacientes con artritis de Lyme. Las muestras con menor sensibilidad son el LCR (Mygland y col., 2009; Cerar y col., 2008) y la sangre (Aguero-Rosenfeld y col., 2005; Cerar y col., 2008).

En un estudio comparativo (Lager y col., 2017) se realizaron tres paneles, cada uno con una muestra diferente, comparando ocho métodos de PCR a tiempo real. En el panel 1 se realizó una PCR a tiempo real de cDNA obtenido de agua libre de RNAsas contaminada con concentraciones conocidas de cepas de *Borrelia* cultivadas. En la tabla 8 se puede ver que hay concordancia entre los ocho protocolos hasta las 10^3 espiroquetas/ml para *B. afzelii* Lu1 y *B. burgdorferi* s.s. B31, y hasta 10 espiroquetas/ml para *B. garinii* Lu59. A la concentración diana de 102 espiroquetas/mL o menos, la capacidad de detectar cDNA de *Borrelia* spp. variaba entre protocolos, especialmente los protocolos que no estaban basados en la detección de 16S rRNA, ya que tienen menor sensibilidad analítica frente a *B. afzelii* Lu81 y *B. burgdorferi* s.s. B31.

Por tanto, cuando se usa cDNA como patrón, se aprecia una mayor sensibilidad analítica en aquellos protocolos que usan el gen 16SrRNA como diana que aquellos que no lo hacen. Otros estudio (Ornstein y Barbour, 2006) han demostrado que los ensayos que replicaban 16S rRNA son más sensibles que aquellos que replicaban el plásmido que contiene la proteína ospA. Además, nos interesa replicar un gen que tenga un número de copias consistente en el genoma bacteriano, lo que es más complicado de conseguir con un plásmido como ospA. Sin embargo, en el estudio comparativo (Lager y col., 2017) se ve que el uso de RNA tiene sus desventajas frente al uso de DNA, como el mayor coste de trabajo y la mayor susceptibilidad a la degradación.

Todos los controles negativos del estudio comparativo (Lager y col., 2017) fueron negativos, excepto el protocolo número 8 por lo que la especificidad de los protocolos de PCR, contando las 5 muestras, es de 97,5%.

En el panel 2 se realizó una PCR a tiempo real con muestras de LCR conteniendo concentraciones conocidas de cepas de *Borrelia* cultivadas, cuyos resultados podemos ver en la tabla 9. En este

panel se vio que los siete protocolos utilizados mostraban plena concordancia hasta 103 espiroquetas/ml para *B. afzelii* Lu81 y *B. burgdorferi* s.s. B31 y hasta 102 espiroquetas/ml para *B. garinii* Lu59. Por debajo de 102 espiroquetas/ml la capacidad de detectar cDNA o DNA de *Borrelia* variaba entre protocolos, especialmente para los protocolos que extraían ácido nucleico total, mientras que los métodos que extraían DNA mostraban plena concordancia hasta 102 espiroquetas/mL frente a las tres genopecies de *Borrelia*. Aquí se aprecia que la sensibilidad analítica de los protocolos que analizaban DNA fue mayor que los de aquellos de analizaban cDNA.

En el panel 3 se realizó una PCR a tiempo real de diluciones seriadas de DNA extraído de nueve especies de *B. burgdorferi* s.l.. Los ocho protocolos mostraban resultados concordantes positivos hasta 2 espiroquetas/ μ l en cepas de *B. burgdorferi* s.s. Pbre, *B. afzelii* PKo y PVPM, *B. garinii* PBr, PHei, PWudII, PRef y Pla. En el caso de *B. burgdorferi* s.s. B31, los protocolos encontraron resultados concordantes positivos hasta >1 espiroqueta/ μ l.

La sensibilidad analítica en este panel de los diferentes genes diana fue en general alta y comparable, aunque no se aprecia ningún tipo de relación entre el DNA y el gen diana como en el panel 1. Tan solo 1 de las 24 muestras que contenían *Leptospira* o *T. phagedenis* fue positiva, por lo que la especificidad analítica de los protocolos PCR total fue de un 96%.

De manera general, se ve que la concordancia y sensibilidad analítica de los protocolos es alta. Sin embargo, también muestra la importancia de la selección del gen diana.

Como conclusión sobre la PCR, vemos que la sensibilidad es muy variable según la muestra tomada, y que es de muy poco interés en el caso del eritema migrans, que no precisa de diagnóstico laboratorial, y de la neuroborreliosis aguda, cuya sensibilidad está por debajo del 30%. Sí cuenta con una muy alta especificidad, siendo capaz de detectarse a concentraciones de muy bajas, llegando hasta a 1 espiroqueta/mL. Sin embargo, es muy dependiente de la selección del gen diana y del tipo de ácido nucleico escogido para la replicación, por lo que si se realiza PCR se debe ser cuidadoso tanto con la muestra escogida como con el procedimiento a seguir. Aún con todo, dado que no es un método que todos los laboratorios puedan reproducir fácilmente, no se encontraría entre los métodos más recomendados para el diagnóstico de la borreliosis de Lyme.

CONCLUSIONES

Debemos comenzar teniendo en cuenta que ningún método va a ser más seguro que el otro, ya que en todo caso estamos trabajando con material biológico posiblemente infectado, por lo que la seguridad no va a ser un motivo de peso para la decisión de un método u otro. Sí lo va a ser, en cambio, la velocidad de obtención de resultados, pues estamos hablando de una enfermedad cuyas complicaciones pueden ser muy graves, y por lo que nos interesa que el proceso sea lo

más ágil posible. Es por esto por lo que no vamos a darle prioridad a aquellos métodos más lentos. También hemos de tener en cuenta que un factor determinante para decidir qué método usar será el precio y la disponibilidad del laboratorio, porque no todos van a tener acceso al equipamiento necesario.

Desde estas premisas, consideramos que el método más barato va a ser el cultivo, ya que los materiales necesarios para su desarrollo son fácilmente accesibles. Sin embargo, el cultivo no es el mejor método para la detección de la borreliosis de Lyme, ya que es un proceso largo y cuenta con baja sensibilidad, aunque, a falta de otros métodos diagnósticos mejores, serviría como alternativa. Su ventaja es que cuenta con una alta especificidad, por lo que su valor predictivo positivo será alto, y de ser necesario se podría utilizar como prueba de confirmación.

Dado que el método más recomendado por todas las guías es la serología, asumimos que se trata de un método asequible, por lo que el coste no debería suponer un gran problema. Habrá que tener en cuenta los kits comerciales utilizados según cuál sea nuestra intención. Si se quiere realizar una sola prueba serológica, teniendo en cuenta que todas cuentan con alta sensibilidad, habrá que valorar si se quiere una alta especificidad o no. Los kits comerciales que detectan anticuerpos IgG usando antígenos recombinantes cuentan con buenos niveles de sensibilidad y especificidad, lo que podría sustituir el método de las dos pruebas para ahorrar tiempo. No recomendamos el usar un solo kit que tenga baja especificidad, porque, aunque tendremos un buen valor predictivo negativo y, por tanto, podremos descartar fácilmente a los verdaderos negativos, tendríamos muchos pacientes positivos a los que tratar, y el tratamiento es largo y costoso. En caso de querer usar uno de esos kits, se tendría que acompañar de una segunda prueba de confirmación, normalmente inmunoblot, ya que cuenta con una alta especificidad. De este modo, con ese primer descarte de los pacientes negativos, podremos localizar a los verdaderamente positivos de entre los pacientes restantes.

En el caso del inmunoblot nos encontramos con una prueba altamente específica. Si realizamos una prueba de alta especificidad y baja sensibilidad en primer lugar, localizamos a los verdaderos positivos en el primer momento, pero luego tenemos que volver a los pacientes negativos y realizar una segunda prueba altamente sensible para encontrar a los verdaderos negativos, lo que parece un malgasto de recursos y tiempo. Es por esto por lo que el inmunoblot, y otras pruebas de alta especificidad, se dejan como pruebas de confirmación en lugar de como prueba rutinaria.

El problema del PCR es que cuenta con una sensibilidad y especificidad similares al cultivo, por lo que, de nuevo, podría usarse como prueba de confirmación, pero además la accesibilidad de los equipos de PCR está mucho más limitada. La decisión de qué método de diagnóstico se usa es de cada uno, y aquellos que quieran usar la PCR para el diagnóstico de esta enfermedad

pueden hacerlo, siempre que tengan en cuenta que debería ser acompañado por una prueba serológica previa, y que no es apta para muchos laboratorios.

En el caso de la neuroborreliosis vemos que realizar serología no da ninguna indicación sobre la posible neuroborreliosis, ya que pacientes seropositivos pueden no tener neuroborreliosis y pacientes seronegativos pueden tener neuroborreliosis. Por tanto, la única forma de obtener un verdadero diagnóstico es a través de la obtención de LCR y comprobar la existencia de pleocitosis y de producción de anticuerpos intratecales. En este último caso, ya que ningún método es fiable al 100%, lo ideal sería realizar dos pruebas, empezando por un rELISA, ya que ha demostrado tener mayor sensibilidad. Como segunda prueba se podría hacer inmunoblot o, a ser posible, detección del biomarcador CXCL13, ya que cuenta con un muy alto valor predictivo positivo. En todo caso, lo mejor que se puede hacer es realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad y frenarla antes de llegar a este punto. No recomendamos usar fELISA dada su baja sensibilidad.

Como recomendación personal, consideramos que el sistema de las dos pruebas, un ensayo de "screening" serológico y una prueba de confirmación, sigue siendo el método más fiable y preciso. La búsqueda de sensibilidad en la primera prueba es clave para poder ir descartando a los pacientes negativos y poder quedarnos con los posibles positivos. Desde allí, dadas las limitaciones del cultivo y de la PCR, consideramos que la mejor opción para la prueba de confirmación es el IB, aunque, de no poder realizarse, cualquiera de las otras dos son posibles alternativas. De solo poder realizarse una prueba, optaríamos por una prueba serológica que usase antígenos recombinantes, ya que han demostrado tener alta sensibilidad y especificidad, y por tanto serán los que menos problemas de falsos positivos o negativos den. En el caso de la neuroborreliosis, realizar un rELISA del LCR junto con la detección de CXCL13 para confirmar sería lo ideal. En caso de no poder hacerse, es preferible intentar realizar al menos el ensayo rELISA, a pesar del riesgo de tener falsos positivos, a utilizar otros métodos. En ningún caso debería usarse la serología para determinar la posibilidad de neuroborreliosis, ya que ya hemos visto que la seropositividad o la seronegatividad no son indicadores de esta forma clínica, y siempre va a ser necesaria la obtención de LCR para su diagnóstico.

We should start by saying that no method will be more secure than the other, since in every case we are working with possibly infected biological material, so the security of the method will not be a decisive factor in our decision. However, the quickness in which we get the results will be a decisive factor, since we are talking about a disease whose developing can result in severe complications, and thus it is in our interest that the process is as agile as possible. We should also keep in mind that another decisive factor will be the costs and the laboratory's availability, because not every laboratory will have access to the required equipment.

Starting from these premises, we consider that the cheapest method will be culture, since all the necessary material for its development are easily accessible. However, culture is not the best method for the detection of Lyme borreliosis, since it is a long process and it has low sensibility, although, if we cannot access other, better diagnostic methods, it is a good enough alternative. It does count with high specificity, so its positive predictive value will be high, and if we have no other options it could work as a confirmatory tool.

Since the most recommended method is serology, we assume it is an affordable method, so the costs should not be a problem. We should keep in mind which commercial kits we want to use depending on our intention. If we want to perform only one serological test, since every test has high sensitivity, we should consider if we want high specificity or not. The commercial kits detect IgG antibodies though recombinant antigens have good sensitivity and specificity levels, which could serve as a substitute of the two-tier assay to save time. We do not recommend using only one low-specificity kit, because, even though we will have a high negative predictive value and, therefore, we will be able to easily rule out the true negatives, we would have a lot of positive patients to be treated, and the treatment is long and expensive. In the case we do want to use one of those kits, it would have to go with a second, confirmatory method, usually immunoblot, since it has high specificity. This way, with that first screening of the negative patients, we can locate the true positives out of the rest of patients.

In immunoblot's case, we find ourselves with a highly specific test. If we start with a highly specific and lowly sensitive test, we would be able to locate the true positives in the first screening, but then we would have to go back to the negative patients and put them through a second, highly sensitive test to find the true negatives, which seems like a waste of time and resources. That is why immunoblot, and other specific test, are left as confirmatory tools rather than routine tests.

The problem with PCR is that it has similar sensitivity and specificity than a culture, so, again, it could be used as a confirmatory test, but, on top of everything else, the accessibility of the PCR equipment is much more limited. The decision of the diagnostic method to be used is of each one to decide, and those who want to use PCR for the diagnosis of this disease can do it, but always keeping in mind that it should have been through a serological screening test first, and that it is not suitable for a lot of laboratories.

In neuroborreliosis' case, we can see that serology does not give us any insight about a possible neuroborreliosis, since seropositive patients may not have neuroborreliosis and seronegative patients may have neuroborreliosis. Therefore, the only way to obtain a proper diagnosis is through CSF samples, checking the existence of pleocytosis and intrathecal antibody production. In this last case, since no method is a 100% reliable, the ideal procedure would be performing a

two-tier assay, starting with a rELISA, since it shows the highest sensitivity. As the second method, we could use immunoblot or, if possible, CXCL13 biomarker detection, since it has a high positive predictive value. In any case, the best thing to do is perform an early diagnosis of the disease and controlling it before reaching this point. We do not recommend using fELISA because of its low sensitivity.

As a personal recommendation, we consider that the two-tier approach, with a serological screening assay and a confirmatory test, is still the most reliable and precise method. The search for sensitivity in the first assay is key to being able to rule out the negative patients and to keep the possible positive patients. From there, keeping in mind the culture's and the PCR's limitations, we consider that the best option for the confirmatory test is IB, although, if we cannot perform it, any of the other two tests are possible alternatives. If only one test can be performed, we recommend a serological assay that uses recombinant antigens, since its high sensitivity and specificity has been proven, and therefore they will bring less issues with false positive or false negative patients. In neuroborreliosis' case, the ideal situation would be performing a CSF rELISA with a confirmatory CXCL13 detection. If that is not possible, we recommend performing at least the rELISA assay, despite the risk of finding false positives, rather than other methods. In no situation should serology be used to determine a possible neuroborreliosis, since we have already seen that seropositivity or seronegativity are not indicators of this clinical manifestation, and we will always need CSF samples for its diagnosis.

VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo ha resultado muy revelador en todos los sentidos. Me ha permitido aplicar los conocimientos previos obtenidos a lo largo de la carrera, especialmente aquellos relacionados con las pruebas laboratoriales y con epidemiología, a realizar una búsqueda y selección de información correcta y crítica, y a aprender a cribar la información relevante. También he aprendido mucho sobre el diagnóstico de la borreliosis de Lyme, ya que, a pesar de haber aprendido sobre ella a lo largo de la carrera, la parte del diagnóstico laboratorial había sido más escasa, y por tanto toda la información ha resultado muy interesante. Teniendo en cuenta la situación pandémica en la que nos encontramos actualmente y la necesidad de teletrabajar, considero que el trabajo realizado ha sido correcto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguero-Rosenfeld, M., Wang, G., Schwartz, I. and Wormser, G., 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), pp.484-509.
2. Arnež, M., Ružić-Sabljić, E., Ahčan, J., Radšel-Medvešček, A., Pleterski-Rigler, D. and Strle, F., 2001. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of children with solitary erythema migrans. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 20(3), pp.251-255.
3. Cerar, T., Ogrinc, K., Cimperman, J., Lotric-Furlan, S., Strle, F. and Ruzic-Sabljić, E., 2008. Validation of Cultivation and PCR Methods for Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), pp.3375-3379.
4. Dickeson, D., Chen, S. and Sintchenko, V., 2016. Concordance of four commercial enzyme immunoassay and three immunoblot formats for the detection of Lyme borreliosis antibodies in human serum: the two-tier approach remains. *Pathology*, 48(3), pp.251-256.
5. Eldin, C., Raffetin, A., Bouiller, K., Hansmann, Y., Roblot, F., Raoult, D. and Parola, P., 2019. Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(2), pp.121-132.
6. Figoni, J., Chirouze, C., Hansmann, Y., Lemogne, C., Hentgen, V., Saunier, A., Bouiller, K., Gehanno, J., Rabaud, C., Perrot, S., Caumes, E., Eldin, C., de Broucker, T., Jaulhac, B., Roblot, F., Toubiana, J., Sellal, F., Vuillemet, F., Sordet, C., Fantin, B., Lina, G., Gocko, X., Dieudonné, M., Picone, O., Bodaghi, B., Gangneux, J., Degeilh, B., Partouche, H., Lenormand, C., Sotto, A., Raffetin, A., Monsuez, J., Michel, C., Boulanger, N., Cathebras, P. and Tattevin, P., 2019. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French Scientific Societies (I): prevention, epidemiology, diagnosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(5), pp.318-334.
7. Gocko, X., Lenormand, C., Lemogne, C., Bouiller, K., Gehanno, J., Rabaud, C., Perrot, S., Eldin, C., de Broucker, T., Roblot, F., Toubiana, J., Sellal, F., Vuillemet, F., Sordet, C., Fantin, B., Lina, G., Sobas, C., Jaulhac, B., Figoni, J., Chirouze, C., Hansmann, Y., Hentgen, V., Caumes, E., Dieudonné, M., Picone, O., Bodaghi, B., Gangneux, J., Degeilh, B., Partouche, H., Saunier, A., Sotto, A., Raffetin, A., Monsuez, J., Michel, C., Boulanger, N., Cathebras, P. and Tattevin, P., 2019. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(5), pp.296-317.
8. Hofmann, H., Fingerle, V., Hunfeld, K., Huppertz, H., Krause, A., Rauer, S. and Ruf, B., 2017. Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger Med Sci*, 15, Doc14.
9. Karlsson, M., Hovind-Hougen, K., Svenungsson, B. and Stiernstedt, G., 1990. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), pp.473-479.

10. Kodym, P., Kurzová, Z., Berenová, D., Pícha, D., Smíšková, D., Moravcová, L. and Malý, M., 2018. Serological Diagnostics of Lyme Borreliosis: Comparison of Universal and Borrelia Species-Specific Tests Based on Whole-Cell and Recombinant Antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(11).
11. Krüger, H., Reuss, K., Pulz, M., Rohrbach, E., Pflughaupt, K., Martin, R. and Mertens, H., 1989. Meningoradiculitis and encephalomyelitis due to *Borrelia burgdorferi*: a follow-up study of 72 patients over 27 years. *Journal of Neurology*, 236(6), pp.322-328.
12. Lager, M., Faller, M., Wilhelmsson, P., Kjelland, V., Andreassen, Å., Dargis, R., Quarsten, H., Dessau, R., Fingerle, V., Margos, G., Noraas, S., Ornstein, K., Petersson, A., Matussek, A., Lindgren, P. and Henningson, A., 2017. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* – An analytical comparison of real-time PCR protocols from five different Scandinavian laboratories. *PLOS ONE*, 12(9), p.e0185434.
13. Lager, M., Dessau, R., Wilhelmsson, P., Nyman, D., Jensen, G., Matussek, A., Lindgren, P., Henningson, A., Baqir, H., Serrander, L., Johansson, M., Tjernberg, I., Skarstein, I., Ulvestad, E., Grude, N., Pedersen, A., Bredberg, A., Veflingstad, R., Wass, L., Aleke, J., Nordberg, M., Nyberg, C., Perander, L., Bojesson, C., Sjöberg, E., Lorentzen, Å., Eikeland, R., Noraas, S., Henriksson, G. and Petrányi, G., 2019. Serological diagnostics of Lyme borreliosis: comparison of assays in twelve clinical laboratories in Northern Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(10), pp.1933-1945.
14. Lindgren, E. and Jaenson, T., 2006. *Lyme Borreliosis In Europe: Influences Of Climate And Climate Change, Epidemiology, Ecology And Adaptation Measures*. [online] World Health Organisation. Available at: <<http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/lyme-borreliosis-in-europe.-influences-of-climate-and-climate-change,-epidemiology,-ecology-and-adaptation-measures>> [Accessed 24 April 2020].
15. Mygland, Å., Ljøstad, U., Fingerle, V., Rupprecht, T., Schmutzhard, E. and Steiner, I., 2009. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Neurology*, 17(1), pp.8-e4.
16. Narayan, K., Dail, D., Li, L., Cadavid, D., Amrute, S., Fitzgerald-Bocarsly, P. and Pachner, A., 2005. The nervous system as ectopic germinal center: CXCL13 and IgG in lyme neuroborreliosis. *Annals of Neurology*, 57(6), pp.813-823.
17. Ornstein, K. and Barbour, A., 2006. *A Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction Assay Of Borrelia Burgdorferi 16S Rrna For Highly Sensitive Quantification Of Pathogen Load In A Vector | Vector-Borne And Zoonotic Diseases*. [online] Mary Ann Liebert, Inc., publishers. Available at: <<http://doi.org/10.1089/vbz.2006.6.103>> [Accessed 13 June 2020].

18. Preac-Mursic, V., Wilske, B. and Reinhardt, S., 1991. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 10(12), pp.1076-1079.
19. Roux, F., Boyer, E., Jaulhac, B., Dernis, E., Closs-Prophette, F. and Puéchal, X., 2007. Lyme meningoradiculitis: prospective evaluation of biological diagnosis methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(10), pp.685-693.
20. Rupprecht, T., Kirschning, C., Popp, B., Kastenbauer, S., Fingerle, V., Pfister, H. and Koedel, U., 2007. *Borrelia garinii* Induces CXCL13 Production in Human Monocytes through Toll-Like Receptor 2. *Infection and Immunity*, 75(9), pp.4351-4356.
21. Senel, M., Rupprecht, T., Tumani, H., Pfister, H., Ludolph, A. and Brettschneider, J., 2009. The chemokine CXCL13 in acute neuroborreliosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 81(8), pp.929-933.
22. Schmidt, C., Plate, A., Angele, B., Pfister, H., Wick, M., Koedel, U. and Rupprecht, T., 2011. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology*, 76(12), pp.1051-1058.
23. Steere, A., Strle, F., Wormser, G., Hu, L., Branda, J., Hovius, J., Li, X. and Mead, P., 2016. Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1).
24. Tjernberg, I., Henningsson, A., Eliasson, I., Forsberg, P. and Ernerudh, J., 2011. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid chemokine CXCL13 and antibodies to the C6-peptide in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Infection*, 62(2), pp.149-158.
25. Wang, G., van Dam, A., Schwartz, I. and Dankert, J., 1999. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), pp.633-653.
26. Wilske, B., Fingerle, V. and Schulte-Spechtel, U., 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(1), pp.13-21.
27. Wilske, B., Schierz, G., Preac-Mursic, V., von Buscb, K., Kuhbeck, R., Pfister, H. and Einhaupl, K., 1986. Intrathecal Production of Specific Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Patients with Lymphocytic Meningoradiculitis (Bannwarth's Syndrome). *Journal of Infectious Diseases*, 153(2), pp.304-314.
28. Wutte, N., Archelos, J., Crowe, B., Zenz, W., Daghofer, E., Fazekas, F. and Aberer, E., 2014. Laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis is influenced by the test used: Comparison of two ELISAs, immunoblot and CXCL13 testing. *Journal of the Neurological Sciences*, 347(1-2), pp.96-103.
29. Wutte, N., Berghold, A., Krainberger, I. and Aberer, E., 2011. Serum CXCL13 Chemokine is Not a Marker for Active Lyme Borreliosis. *Acta Dermato Venereologica*, 91(6), pp.724-725.

30. Wutte, N., Berghold, A., Löffler, S., Zenz, W., Daghofer, E., Krainberger, I., Kleinert, G. and Aberer, E., 2011. CXCL13 chemokine in pediatric and adult neuroborreliosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 124(5), pp.321-328.

Anexo I

Figura 1: Resultados neuroborreliosis (Wutte y col., 2014)

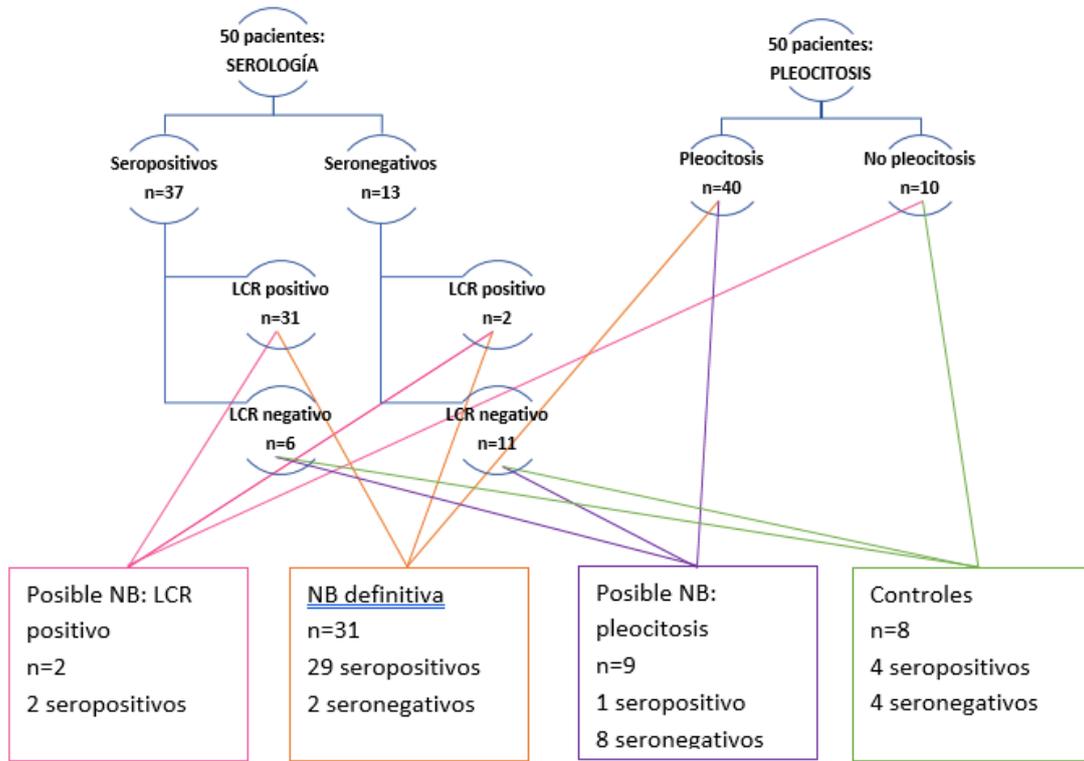


Figura 2: Neuroborreliosis definitiva (Wutte y col., 2014)

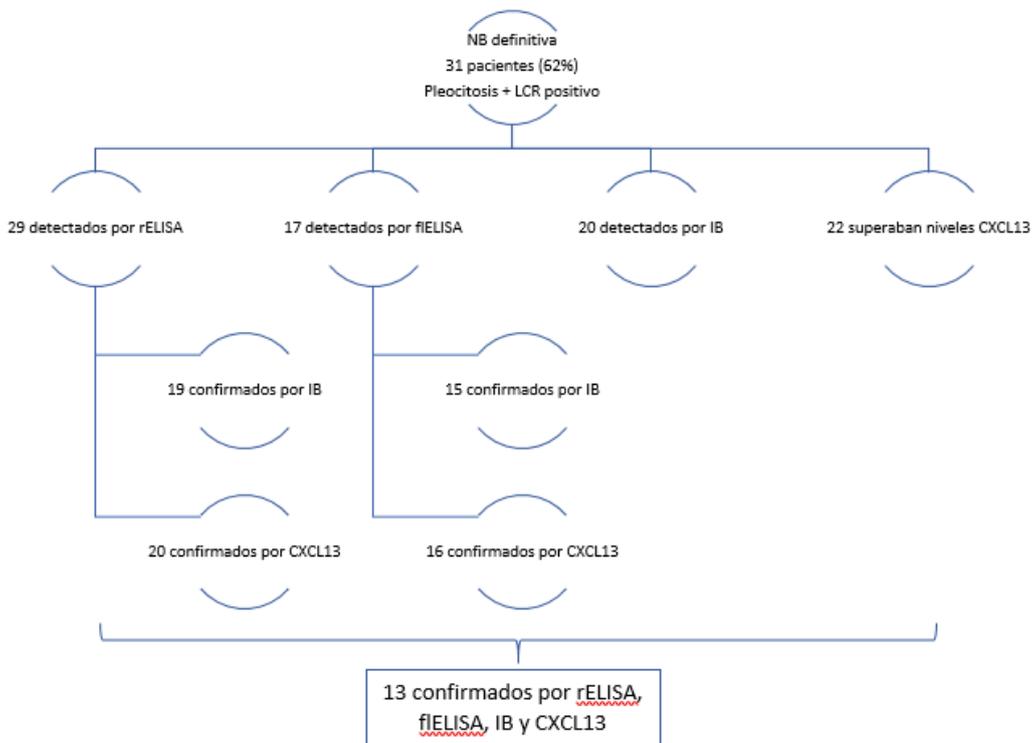


Figura 3: Posible neuroborreliosis (Wutte y col., 2014)

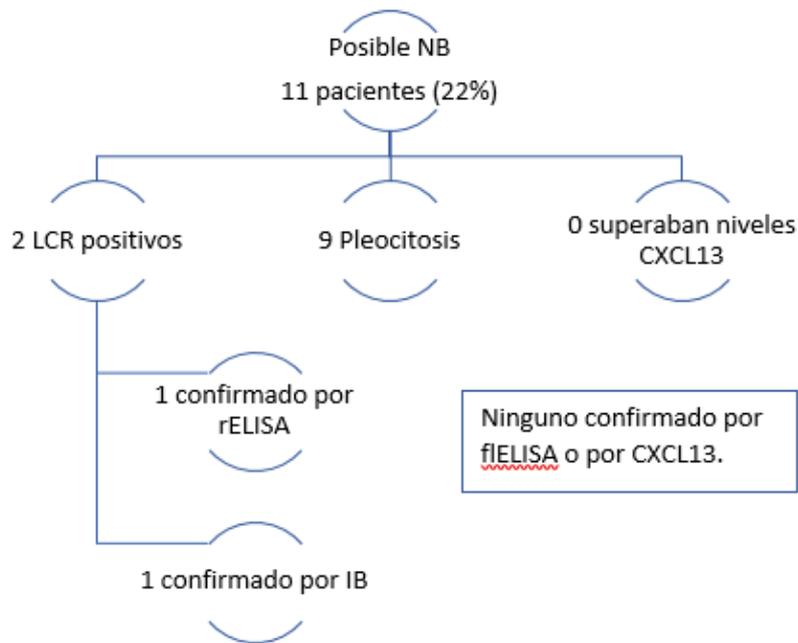


Tabla 1: Síntomas de la borreliosis de Lyme según región (Wang, van Dam, Schwartz and Dankert, 1999)

ESTADIO	MANIFESTACIÓN CLÍNICA	INCIDENCIA EN:	
		Norteamérica	Europa
I	Infección temprana local		
	EM	Común (60-90%)	Común (~77%)
II	Infección temprana diseminada		
	EM múltiple	Común (>18%)	Inusual (6%)
	Neuroborreliosis	Común (10-20%)	Común (16-80%)
	Meningorradiculitis	3-21%	37-61%
	Meningitis	2-17%	4-27%
	Carditis	0,5-10%	0,5-4%
	Linfocitoma borreliar	Raro	Bien documentado (3%)
III	Borreliosis de Lyme tardía		
	Artritis de Lyme	Común (51-57%)	Poco común (~7%)
	ACA	Raro	Bien documentado (3%)
	Neuropatía periferal	30-70%, neuroborreliosis tardía	40-63%, pacientes con ACA
	Involucramiento del SNC	Bien documentado	<9% neuroborreliosis
	Encefalomiелitis	Raro (0,1%)	4-6%
	Meningoencefalitis	9%	0,5-4%

Tabla 2: Sensibilidad de la detección de anticuerpos (Wilske, Fingerle and Schulte-Spechtel, 2007)

ESTADÍO	SENSIBILIDAD	OTROS
TEMPRANO, LOCALIZADO	20-50%	Predomina IgM
TEMPRANO, DISEMINADO	70-90%	Si la enfermedad ha durado poco tiempo, predomina IgM. Si ha durado mucho tiempo, predomina IgG
TARDÍO	~100%	Normalmente solo IgG*

*Si en este estadio se detectan IgM sin IgG no es diagnóstico de enfermedad tardía

Tabla 3: Sensibilidad del cultivo y PCR (Wilske, Fingerle and Schulte-Spechtel, 2007)

Muestra	Forma clínica	Sensibilidad	
Piel	Eritema migrans, acrodermatitis	50-70%	
	Neuroborreliosis aguda	10-30%	
Líquido sinovial	Artritis de Lyme	50-70%*	Solo PCR

*El cultivo da muy raramente positivo

Tabla 4: Serología: resultados (Dickeson, Chen and Sintchenko, 2016)

PRUEBA	CONCORDANCIA N=222	CONCORDANCIA POSITIVA (SENSIBILIDAD) N=66	CONCORDANCIA NEGATIVA (ESPECIFICIDAD) N=156	VP+	VP-
MARDX IGG/IGM WCL EIA	124 (56%)	65 (98%)	59 (38%)	40%	98%
EUROIMMUN PLUS VLSE IGG WCL EIA	169 (76%)	66 (100%)	103 (66%)	55%	100%
NOVALISA IGG EIA (AG RECOMBINANTE)	214 (96%)	65 (98%)	149 (96%)	90%	99%
EUROIMMUN SELECT IGG EIA (AG RECOMBINANTE)	208 (94%)	52 (79%)	156 (100%)	100%	92%

Tabla 5: Immunoblot: resultados (Dickeson, Chen and Sintchenko, 2016)

PRUEBA	CONCORDANCIA N=222	CONCORDANCIA POSITIVA (SENSIBILIDAD) N=66	CONCORDANCIA NEGATIVA (ESPECIFICIDAD) N=156	VP+	VP-
WESTERN BLOT WCS IGG	195 (88%)	43 (65%)	152 (97%)	91%	87%
EUROIMMUN ANTI-BORRELIA (IGG)	185 (83%)	50 (76%)	135 (87%)	70%	89%
EUROLINE-RN-AT RECOMBINANT LINE BLOT					
TRINITY BIOTECH EU LYME + VLSE IGG WESTERN BLOT	201 (91%)	49 (74%)	152 (97%)	92%	90%

Tabla 6: Especificidad de EIA e IB (Dickeson, Chen and Sintchenko, 2016)

Consenso EIA n=23, todos negativos

ENSAYO	ESPECIFICIDAD	ESPECIES DETECTADAS POSITIVAS
MARDX IGG/IGM WCL EIA	87%	1 x Leptospirosis 1 x EBV 1 x Sífilis
NOVALISA IGG RECOMBINANT AG	96%	1 x factor antinuclear (ANF)
EUROIMMUN PLUS VLSE IGG WCL EIA	83%	1 x Leptospirosis 1 x EBV 1 x factor reumanoide 1 x Sífilis
EUROIMMUN SELECT IGG RECOMBINANT AG	100%	
WB WCS IGG	100%	
EUROIMMUN ANTI-BORRELIA (IGG)	87%	1 x Leptospirosis 1 x <i>H. pylori</i> 1 x Sífilis
EUROLINE-RN-AT RECOMBINANT LINE BLOT		
TRINITY BIOTECH EU LYME + VLSE IGG WESTERN BLOT	96%	1 x Sífilis

Tabla 7: IB: bandas obtenidas (Dickeson, Chen and Sintchenko, 2016)

Estamos usando el criterio de Western WCS IgG Inmunoblot como referencia.

WESTERN WCS IGG INMUNOBLOT	EUROIMMUN BORRELIA (IGG) RN-AT (% DISCORDANCIA)		ANTI-EUROLINE-DE (% DE DISCORDANCIA)		TRINITY BIOTECH EU LYME + VLSE IGG WESTERN BLOT (% DE DISCORDANCIA)		EIA CONSENSO (% DE DISCORDANCIA)	
	Positivo	Negativo	Postivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
WBLOT ≥ 5 BANDAS N=47	39	8 (17%)	41	6 (13%)	43	4 (9%)		
WBLOT = 4 BANDAS N=9	3 (33%)	6	3 (33%)	6	4 (44%)	5		
WBLOT = 3 BANDAS N=22	9 (41%)	13	6 (27%)	16	5 (23%)	17		
WBLOT = 2 BANDAS N=46	7 (15%)	39	1 (2%)	45	6 (13%)	40		
WBLOT = 1 BANDAS N=49	8 (16%)	41	2 (4%)	47	4 (8%)	45		
WBLOT = 0 BANDAS N=49	5 (10%)	44	0 (0%)	49	4 (8%)	45		
TOTAL = 222	71	151	53	169	66	156		

Tabla 8: PCR panel 1 (Lager y col., 2017)

Cepa	Concentración*	Laboratorio A		Lab B		Lab C	Lab D		Lab E
		16S rRNA	flaB	16S rRNA	ospA	16S rRNA	16S rRNA	16S rRNA	16S rRNA
		Protocolo 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8
<i>B. afzelii</i> Lu81	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	-	+	+	+	+	+	+
	10 ¹	+	-	+	-	+	+	+	+
	10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> Lu59	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	-	+	-	+	+	+	+
	10 ¹	+	-	+	-	+	+	+	+
	10 ⁰	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> J1	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
Agua libre de RNAsas		-	-	-	-	-	-	-	+
		-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-

*En el caso de las cepas de *Borrelia* la unidad es espiroquetas/mL, en *E. coli* es ng/μl.

Tabla 9: PCR panel 2 (Lager y col., 2017)

Cepa	Concentración*	Laboratorio A		Lab B		Lab C	Lab D	
		cDNA Protocolo 1	cDNA Protocolo 2	DNA Protocolo 3	DNA Protocolo 4	DNA Protocolo 5	DNA Protocolo 6	DNA Protocolo 7
<i>B. afzelii</i> Lu81	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	-	-	+	+	+	+	+
	10 ¹	-	-	+	+	-	-	-
	10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> Lu59	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	+	+	+	+	+	+
	10 ¹	-	-	-	-	+	+	+
	10 ⁰	-	-	+	+	-	+	+
<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31	10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+
	10 ³	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	-	-	+	-	+	+	+
	10 ¹	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-

*La unidad de las cepas de *Borrelia* es espiroquetas/mL.

Tabla 10: PCR panel 3 (Lager y col., 2017)

Cepa	Concentración*	Laboratorio A		Lab B		Lab C	Lab D		Lab E
		Protocolo 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8
<i>B. afzelii</i> PKo	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>B. afzelii</i> PVPM	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. garinii</i> PBr	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	+	+	+	+	+	+	-	+
	10 ⁻¹	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>B. garinii</i> PHei	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	-	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> PWudll	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	-	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>B. garinii</i> PRef	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>B. garinii</i> PLa	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	+	+	+	-	+	+	-	+
	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31	10 ⁴ -10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. burgdorferi</i> s.s. Pbre	10 ⁴ -10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁰	-	+	+	+	+	-	+	+
	10 ⁻¹	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>T. phagedenis</i>	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptospira</i>	10 ⁴	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Leptospira</i>	10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-

*Cantidad de espiroquetas de *Borrelia* en 5µl