



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).

La distinción entre enfermedad aguda y tardía/persistente/crónica es importante debido a las diferencias en cuanto a diagnóstico y tratamiento de cada una.

Debido al número de coinfecciones posibles (i.e. infecciones mediadas por garrapatas – IMG) transmitidas por garrapatas (tales como *Bartonella*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*,

etc), es más apropiado hablar de enfermedad mediada por garrapatas que exclusivamente de enfermedad de Lyme mediada por garrapatas, puesto que ésta última se refiere exclusivamente a la infección con *Borrelia*. A menudo vemos que el término “enfermedad de Lyme” es utilizado ampliamente para enfermedades mediadas por garrapatas; sin embargo el Dr. Horowitz propuso que la infección persistente/crónica con *Borrelia* y otras infecciones sea llamada Lyme-SEIM (Síndrome de Enfermedad Infecciosa Multisistémica).

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) 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* (Branda & 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.

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⁺/CD3⁻ 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⁺/CD3⁻ 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⁺/CD3⁻ 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⁺/CD3⁻ (células por cada microlitro de sangre) es

cuantificado en el citómetro de flujo. El resultado indica la cantidad de linfocitos CD57⁺/CD3⁻ 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 CO₂. 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 γ) 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 γ , el nuevo LymeSpot también evalúa también la producción de la citoquina Interleukina (IL)-2. Si el cociente entre Interferón γ 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 coinfecciosos. 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.

La prueba de PCR puede resultar positiva ó negativa dependiendo del nivel de actividad de la infección. En etapas tardías de la enfermedad, es más probable que la bacteria se desplace a tejidos con consecuentes resultados negativos en las muestras de sangre.

PRUEBAS DE DETECCION DE ANTIGENO

Son pruebas que evalúan la presencia de una única proteína en fluido (sangre, líquido sinovial). A veces los pacientes infectados cuyas pruebas indirectas son negativas presentan resultados positivos mediante ésta técnica.

Recientemente, la prueba Nanotrap[®] LA ha recibido notoriedad nacional cuando la fundación Bill y Melinda Gates le otorgó un subsidio de 1 millón de dólares. Esta prueba emplea la tecnología Nanotrap[®] para medir directamente antígenos Lyme en orina usando el formato Western Blot, proveyendo alta sensibilidad y precisión y aportando resultados confiables para las fases iniciales de la infección.

La prueba Nanotrap[®] emplea una aproximación directa para la identificación del antígeno Lyme presente en el cuerpo y que puede ser detectado pocos días después de la infección inicial. Inversamente, Nanotrap[®] LA provee resultado negativo indicando la ausencia de antígeno si la infección fue tratada efectivamente y eliminada.

PRUEBAS ENERGETICAS

No existe un standard universal que aplique a todas las infecciones de Lyme y que sea 100% preciso. Esta es la razón por la cual numerosos Médicos especialistas en Lyme diagnostican *Borrelia* y otras coinfecciones basándose en la sintomatología, los ensayos de laboratorio y pruebas sofisticadas poco convencionales; entre ésta última categoría podemos citar 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 Autonómica (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 enfermedad de Lyme es frecuente observar infecciones concurrentes. El impacto clínico y patológico de las infecciones fue reconocido por primera vez en los 90 (Mitchell et. al. 1996). El sinergismo patológico puede exacerbar la enfermedad de Lyme o inducir manifestaciones similares. Los agentes coinfecciosos pueden ser transmitidos conjuntamente con *Borrelia burgdorferi* a través de una mordedura de garrapata resultando en infecciones múltiples, pero una fracción de ellas ocurre en independientemente de la mordedura. Las infecciones causadas por estos patógenos en pacientes no infectados por *Borrelia burgdorferi* pueden resultar en síntomas clínicos semejantes a los observados en la enfermedad de Lyme. Esto aplica particularmente a infecciones causadas por *Bartonella henselae*, *Yersinia enterocolitica*, y *Mycoplasma pneumoniae*. *Chlamydia trachomatis* causa poliatritis. *Chlamydia pneumoniae* no solo causa artritis, sino además afecta el sistema nervioso y el corazón, lo cual dificulta el diagnóstico. El diagnóstico se vuelve aún más complejo cuando las coinfecciones ocurren en asociación a 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 (Kemp 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 agentes coinfecciosos no es exhaustiva. Nuevos patógenos son frecuentemente evidenciados, al igual que patógenos oportunistas. Paralelamente, se están desarrollando nuevos ensayos que completaran y mejorarán el listado de pruebas ofrecido.

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) 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 mejorar?”.

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*, *Chlamydias*, *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:

- *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 inmunoblot 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 (inmunoblot)*

Un inmunoblot 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 exacerbaban 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 β y IL-6.

- *Ensayos de actividad (PTL-MELISA ó ELISPOT PTL)*

- *Conteo absoluto de células CD57*

Las células CD57⁺/CD3⁺ son una subpoblación de células NK. El número absoluto de células CD57⁺/CD3⁻ 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 α 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. burgdorferii 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 Brucelosis (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 ELISA para zonulina en materia fecal: la zonulina modula la permeabilidad de las uniones estrechas entre células de la pared del tracto digestivo. A medida que los niveles de zonulina aumentan, la permeabilidad entre las células intestinales aumenta, se abren espacios entre ellas por los cuales pueden pasar numerosas macromoléculas. Esto se conoce como “intestino permeable”.

- Pruebas diagnósticas para inflamación intestinal (sIgA, EDN/EPX, β -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 β -defensina-2: las β -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 β -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 β -defensina-2 está sobreexpresada en inflamación intestinal activa, especialmente en la colitis 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

Debido a que el tratamiento es más efectivo en las fases tempranas de la enfermedad de Lyme, hay una gran necesidad de desarrollar pruebas diagnósticas para determinar si las personas han sido infectadas. De acuerdo al Instituto de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID), “investigadores financiados por el NIAID han identificado secuencias genómicas de numerosas cepas de *B. burgdorferi*. Se han anticipado mayores avances en diagnósticos en la medida de que la información genética vaya siendo combinada con avances en la tecnología de microarrays, imagen, y proteómica. Se espera que estos campos científicos en expansión den lugar a herramientas diagnósticas mejoradas y aporten nuevas perspectivas sobre la patogénesis de la enfermedad de Lyme. Algunos ejemplos de herramientas futuras que están siendo desarrolladas con ayuda del NIAID incluyen el uso de la metabolómica en la caracterización de nuevos marcadores de infección, ensayos de próxima generación basados en células T, y antígenos nuevos para la determinación mejorada de tratamientos efectivos”.

TickPlex es un nuevo método nanotecnológico de un grupo finlandés que está siendo desarrollado como una prueba diagnóstica para infecciones múltiples.

Algunos desarrollos recientes que están casi listos para ser incluidos en los paneles de ensayo son la técnica HybriSpot (de Master Diagnostica) con su Kit Tick-borne bacteria flow CHIP que permite la detección simultánea (por PCR y blot) de siete géneros de bacterias transmitidas por garrapatas: *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Francisella*, *Bartonella*, *Borrelia* y *Coxiella*.

Esta técnica todavía no ofrece buena reproducibilidad, manifestando diferencias entre números de lote y fallos cuando diferentes tipos bacterianos son mezclados.

Finalmente, con la atención creciente que reciben las IMG, las pruebas existentes (como las PCR) están siendo constantemente mejoradas y van llevando a mejores resultados.

Compartir la información y el conocimiento es el primer paso para mejorar el diagnóstico.

CONCLUSIONES FINALES

Hacer un resumen de las IMG es una labor intensa. Existen numerosos artículos, libros, sitios web, blogs, etc, que están disponibles en la actualidad (ver abajo para una selección breve), y múltiples conferencias se llevan a cabo cada año. El propósito de ésta contribución es recopilar parte de ésta información y ponerla a disposición de los pacientes a fin de promover un entendimiento de la utilidad conjuntamente con las limitaciones de las pruebas disponibles, y las causas ocultas de su fracaso. También tiene por finalidad enfatizar la necesidad de una aproximación global e integral para una mejor gestión de las IMG.

*Contribución por Tatjana Mijatovic, PhD
CSO y Manager de Laboratorio * 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 brainmicrovascular 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 loopdependent 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.ceresnano.com/>

www.prohealth.com

www.ilads.org

<https://www.arminlabs.com/>

www.igenex.com/

www.bca-lab.de/

<http://labo-barla.eu/>

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

www.melisa.org/

<http://tickplex.com/>

<http://norvect.no/>

www.tiredoflyme.com

www.columbia-lyme.org

www.lymediseasechallenge.org

www.lymeneteurope.org

www.ticktalkireland.org

www.tekentiques.net

www.lymeresearchalliance.org

www.emedicine.medscape.com

www.lymediseaseaction.org.uk

www.lymedisease.org

www.labtestsonline.org

<https://canlyme.com>

www.francelyme.fr

CONFERENCES:

ILADS Augsburg 25-26/4/ 2014

ILADS Augsburg 8-9/5/2015

ILADS Helsinki 11-12/6/2016

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