

T UAB

4198

Universitat Autònoma de Barcelona
Servei de Biblioteques



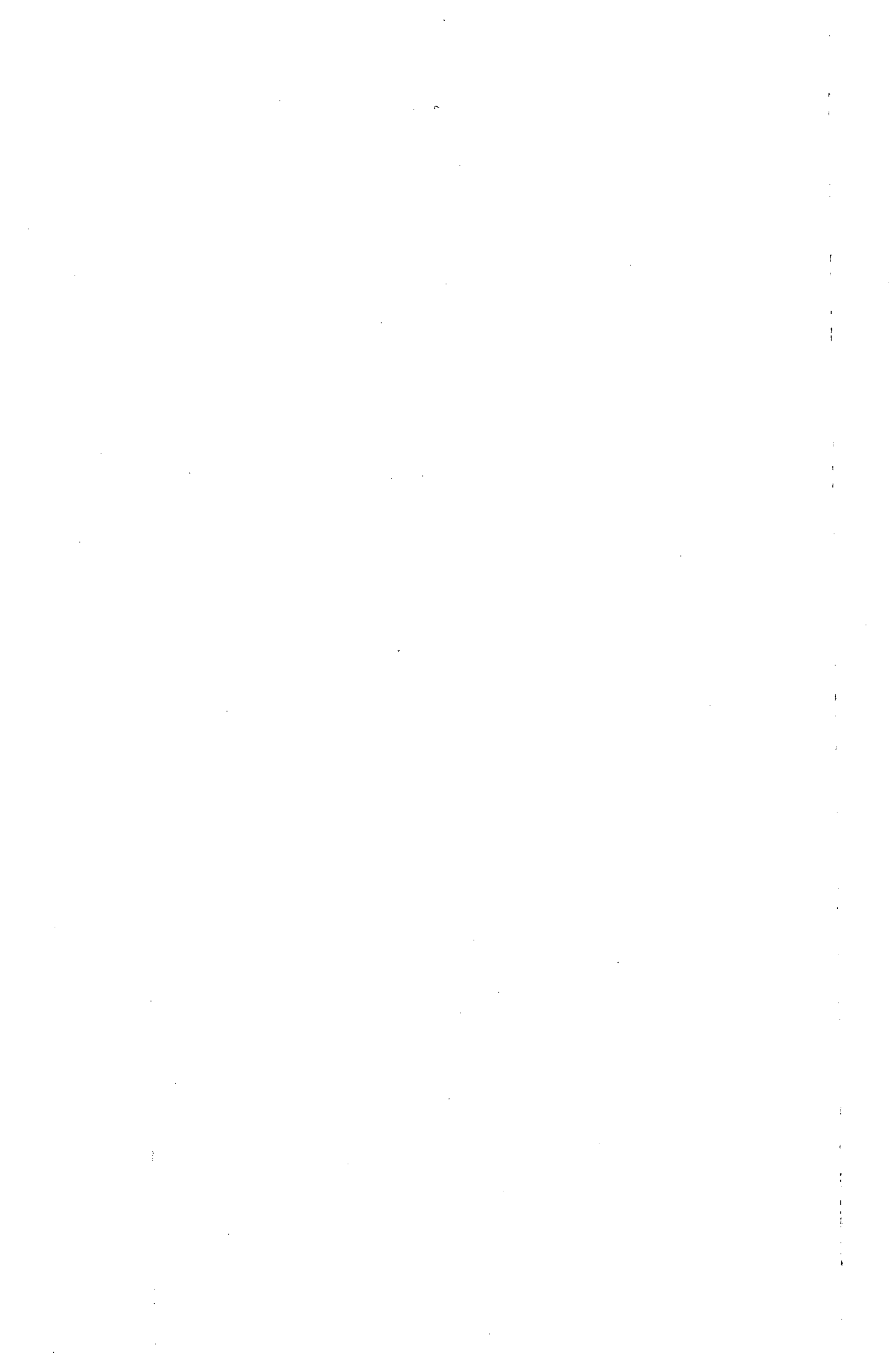
1500493583

**PAPER EPIDEMIOLÒGIC DE LES PAPPARRES I ELS
SEUS HOSTES EN EL MANTENIMENT I LA
TRANSMISSIÓ DE LA FEBRE BOTONOSA
MEDITERRÀNIA I LA MALALTIA DE LYME**

ANNA ORTUÑO ROMERO

TESI DOCTORAL

1997

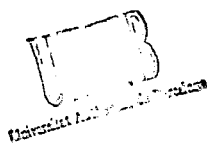


Jordi Casal i Fàbrega i Joaquim Castellà Espuny, professors Titulars del Departament de Patologia i Producció Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN que **L'Anna Ortuño i Romero** ha realitzat el seu treball de recerca titulat **PAPER EPIDEMIOLÒGIC DE LES PAPPARRES I ELS SEUS HOSTES EN EL MANTENIMENT I LA TRANSMISSIÓ DE LA FEBRE BOTONOSA MEDITERRÀNIA I LA MALALTIA DE LYME** en el Departament de Patologia i Producció Animals a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la seva direcció i a fi d'accedir al grau de Doctor.



Jordi Casal i Fàbrega

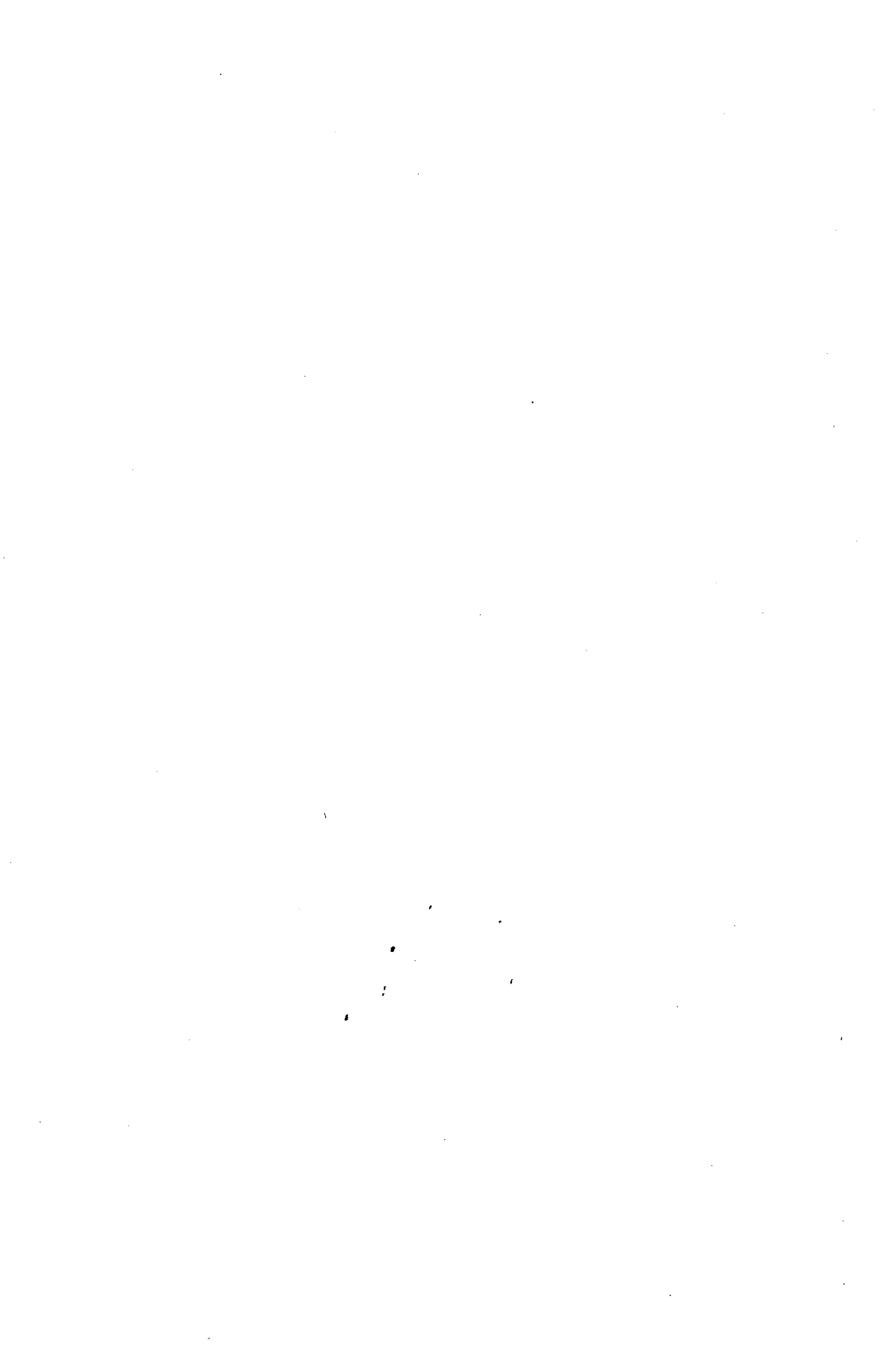


Biblioteca General
Llibreria
08193 Bellaterra (Barcelona) T. 93 581 1000



Joaquim Castellà Espuny

Bellaterra, 5 de novembre de 1997



* INTRODUCCIÓ.....	1
* OBJECTIUS.....	3
* REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.....	4
I. Febre Botonosa Mediterrània.....	4
1. Aspectes històrics.....	4
2. Agent etiològic.....	5
3. Epidemiologia.....	7
3.1. Els vectors.....	7
3.2. Els reservoris.....	10
3.3. Distribució geogràfica i estacional.....	12
3.4. Situació epidemiològica.....	13
3.4.1. Catalunya.....	13
3.4.2. Espanya.....	14
4. Quadre clínic.....	14
5. Mètodes de diagnòstic.....	16
5.1. Diagnòstic directe.....	16
5.2. Diagnòstic indirecte.....	18
6. Tractament.....	19
II. Malaltia de Lyme.....	20
1. Aspectes històrics.....	20
2. Agent etiològic.....	21
3. Epidemiologia.....	23
3.1. Els vectors.....	23
3.2. Els reservoris.....	26
3.3. Altres vies de transmissió.....	30
3.4. Situació epidemiològica.....	30
4. Quadre clínic.....	31
5. Mètodes de diagnòstic.....	33
5.1. Mètodes directes.....	33
5.2. Mètodes indirectes.....	37
5.3. Reaccions creuades.....	38
6. Resposta immunitària del gos.....	39
7. Tractament.....	39



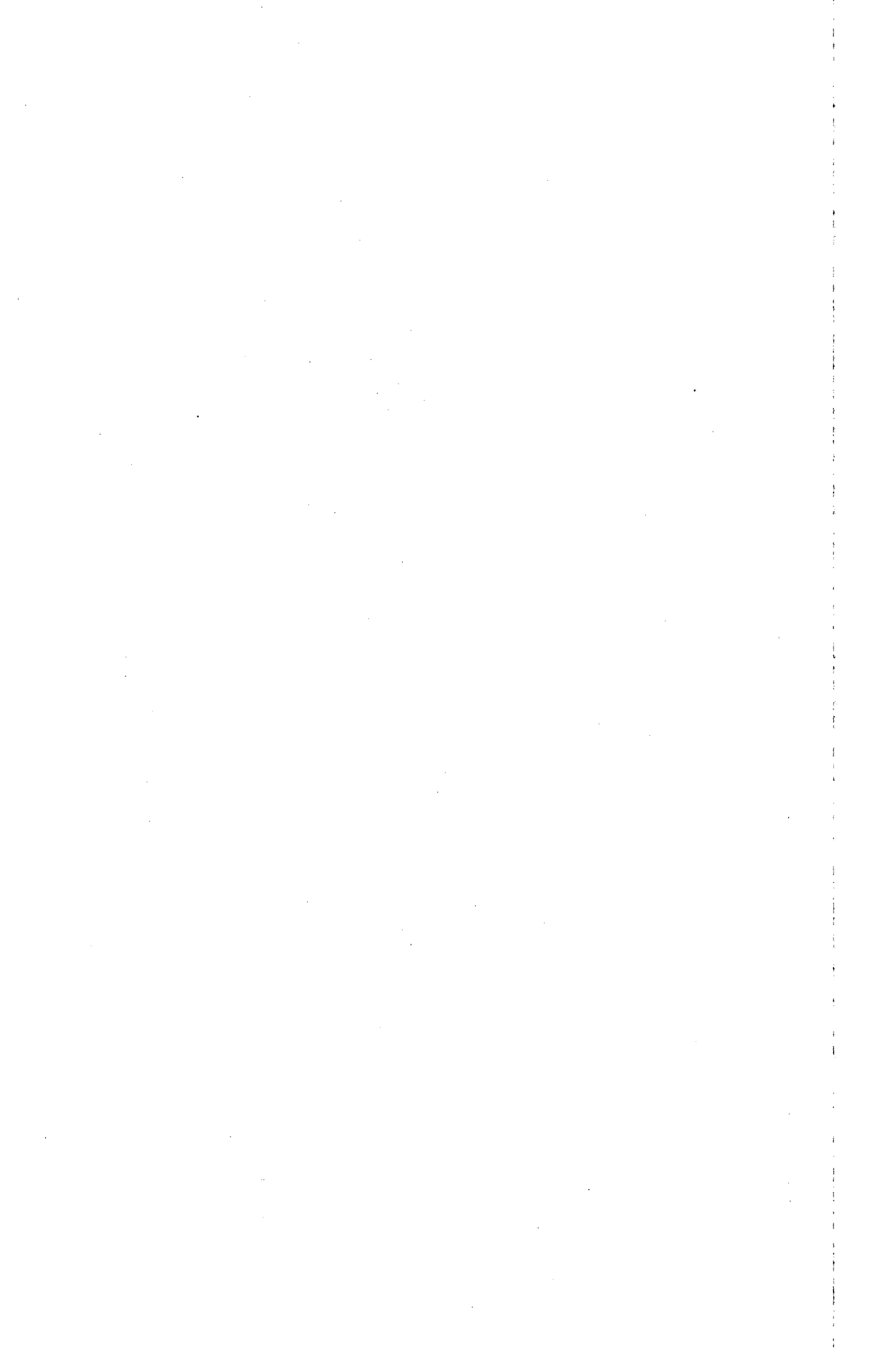
III. Control i profilaxi de les malalties transmeses per paparres.....	40
* MATERIAL I MÈTODES.....	41
I. Estudi serològic.....	41
1. Mostres de sèrum.....	41
2. Desenvolupament i posta a pun d'una tècnica d'immunofluorescència indirecta per al diagnòstic serològic de <i>Rickettsia conorii</i>	44
3. Tècnica serològica emprada.....	47
II. Estudi de les paparres.....	50
1. Recollida de paparres.....	50
2. Detecció de <i>Rickettsia</i> en paparres.....	51
3. Capacitat vectorial d' <i>Ixodes ricinus</i> en la transmissió de <i>Borrelia afzelii</i>	53
III. Anàlisi estadística.....	56
* RESULTATS.....	57
I. Cicle salvatge.....	57
1. Guineus.....	57
2. Conills.....	61
II. Cicle domèstic.....	65
1. Gossos de Catalunya.....	65
2. Gossos del Baix Llobregat.....	67
3. Variació estacional.....	69
4. Paparres.....	70
III. Estandarització d'una tècnica d'immunofluorescència indirecta.....	73
IV. Capacitat vectorial.....	75
* DISCUSSIÓ.....	77
I. Cicle salvatge.....	77
II. Cicle domèstic.....	86
III. Estandarització de la tècnica d'immunofluorescència indirecta.....	94
IV. Capacitat vectorial.....	96
* CONCLUSIONS.....	98
* BIBLIOGRAFIA.....	99

INTRODUCCIÓ

Les malalties transmeses per paparres presenten un patró de distribució en l'espai i en el temps paral·lel al de les espècies de paparres vectoros. Igualment, presenten dos cicles diferenciats: un cicle salvatge en el que determinades espècies d'animals silvestres constitueixen els hostes de les paparres vectoros i, per tant, poden mantenir la circulació del patògen a la natura i un cicle domèstic on es veuen implicades diferents espècies d'animals domèstics els quals podem actuar com a portadors de paparres infectades a l'ambient humà. Les paparres es troben al punt d'intersecció afavorint interconnexions entre ambdós cicles.

Les zoonosis transmeses per paparres més importants a Europa són la Febre Botonosa Mediterrània (FBM) i la Malaltia de Lyme.

La Febre Botonosa Mediterrània és una malaltia present a tota la vessant mediterrània. La principal espècie de paparra que la transmet és *R.sanguineus*, l'hoste principal de la qual és el gos, mentre que l'home constitueix un hoste accidental. Cal destacar l'especial afinitat d'aquesta paparra per les construccions humanes amb el consegüent risc per a la salut pública. Si bé l'agent etiològic d'aquesta malaltia és *R.conorii*, en els darrers anys s'han identificat noves soques de rickettsies el poder patògen de les quals es desconeix. A Catalunya, la identificació d'una nova soca, anomenada provisionalment MTU-5, en paparres capturades a diferents àrees fa pensar en una àmplia distribució d'aquesta. El cicle domèstic d'aquesta malaltia queda definit principalment pel gos, mentre que el cicle salvatge no està del tot clar.



La Malaltia de Lyme és una malaltia confinada a àrees de climatologia atlàntica, éssent més freqüent a l'Europa central. La paparra vectora és *Ixodes ricinus* amb uns requeriments climatològics força diferents dels de *R. sanguineus*, àdhuc, a diferència d'aquesta defuig de les construccions humanes. L'agent etiològic és *B. burgdorferi*. D'igual manera que en la FBM, també s'han identificat noves soques però, en aquest cas, sí que estan relacionades amb diferents quadres clínics en l'espècie humana. En el gos, en canvi, si bé s'han descrit casos clínics ocasionats per *B. burgdorferi sensu stricto*, no s'ha comunicat cap cas provocat per *B. afzelii* o *B. garinii*. El cicle salvatge d'aquesta malaltia s'ha estudiat amb més profunditat al EEUU on la incidència de la malaltia és marcadament superior a Europa. Aquí, en canvi, els treballs al respecte són escassos.

En aquest treball hem volgut aprofundir el coneixement sobre l'epidemiologia d'ambdues malalties tant en el cicle salvatge com en el domèstic, estudiant diferents poblacions de paparres i d'animals. D'igual forma hem intentat estandaritzar una Immunofluorescència Indirecta per al diagnòstic serològic de la FBM, donat que només existeix una IFI comercialitzada. Paral·lelament hem volgut establir la capacitat vectorial d'*I. ricinus* per a vehicular *B. afzelii*.

OBJECTIUS

A.- Conèixer la seroprevalença enfront de *Rickettsia conorii* i de *Borrelia burgdorferi* en el gos (*Canis familiaris*), la guineu (*Vulpes vulpes*) i el conill (*Oryctolagus cuniculus*).

B.- Determinar les espècies de paparres que parasiten els animals objectes de l'estudi i estudiar la prevalença d'infecció de rickettsies en les paparres recollides a Catalunya.

C.- Determinar la capacitat vectorial d'*Ixodes ricinus* en la transmissió de *Borrelia afzellei*, *in vitro*.

* Valorar l'eficàcia d'*Ixodes ricinus* com a vector de *Borrelia afzellei* *in vitro*.

* Determinar la variació del grau d'infecció en funció de la temperatura i el temps.

REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

I. FEBRE BOTONOSA MEDITERRÀNIA.

1. ASPECTES HISTÒRICS

Les rickettsiosis han representat històricament una de les grans plagues de la humanitat. Ja en el segle V a.C. les descripcions de Tucídides contingudes a la "Història de les Guerres del Peloponès" fan referència a un procés febril exantemàtic. Des d'aleshores i fins a l'actualitat, aquestes epidèmies sempre han estat lligades a situacions de fam i misèria. Així doncs, durant el setge de Granada (1483), les tropes dels Reis Catòlics van patir nombroses baixes conseqüència d'un brot de tifus exantemàtic. Sense anar més lluny, durant la Primera Guerra Mundial, més de 150.000 ciutadans moriren de tifus exantemàtic a Sèrbia (Segura i Font, 1985).

Les rickettsies reben el seu nom en honor a Howard Taylor Ricketts, metge americà que fou el primer en descriure-les com a causants del tifus exantemàtic i de les febres tacades, que morí al 1910 a conseqüència del tifus.

Pel que fa referència a l'ecologia de la malaltia, Cowdry, a l'any 1923, detectà microorganismes Gramnegatius, intracel·lulars, en diferents teixits d'insectes i aràcnids, entre d'altres a Argàsids i Ixòdids, suggerint que es tractava de rickettsies (Cowdry, 1923). La detecció a l'any 1925 d'aquests microorganismes als ous d'algunes paparres van fer pensar en la possibilitat d'una transmissió hereditària (Cowdry, 1925).

Respecte a la Febre Botonosa Mediterrània, les primeres observacions les van fer Conor i Bruch a Tunísia al 1910, en una de les comunicacions presentada a la Societat de Patologia Exòtica de París on es recollen les característiques clíniques, epidemiològiques i laboratorials d'un procés que els autors anomenaren provisionalment Febre Botonosa de Tunísia. En el mateix volum, Conor i Hayat parlaven d'un procés clínic diferent a altres processos febrils anomenant a l'exantema "botó". Simultàniament, es varen descriure casos a Marsella on el procés passà a anomenar-se Febre Marsellesa. Fou al 1925 quan Pieri

descriví per primera vegada l'escara a nivell del punt d'inoculació, la *Tache noire*. Entre 1930 i 1932, Caminopetros i Brumpt assenyalaren *Rickettsia conorii* com l'agent etiològic del procés i Duran i Coseil identificaren *Rhipicephalus sanguineus* com el reservori i el vector de la malaltia al Nord d'Àfrica (citat a Herrero-Herrero i Ruiz-Beltrán, 1994). La primera referència a Espanya sobre la infecció a l'espècie humana es remonta a 1928 (Tapia, 1930).

Aquesta malaltia es coneix amb el nom de Febre Botonosa Mediterrània des de 1932 quan s'adoptà aquesta denominació durant el Primer Congrés d'Higiene Mediterrània.

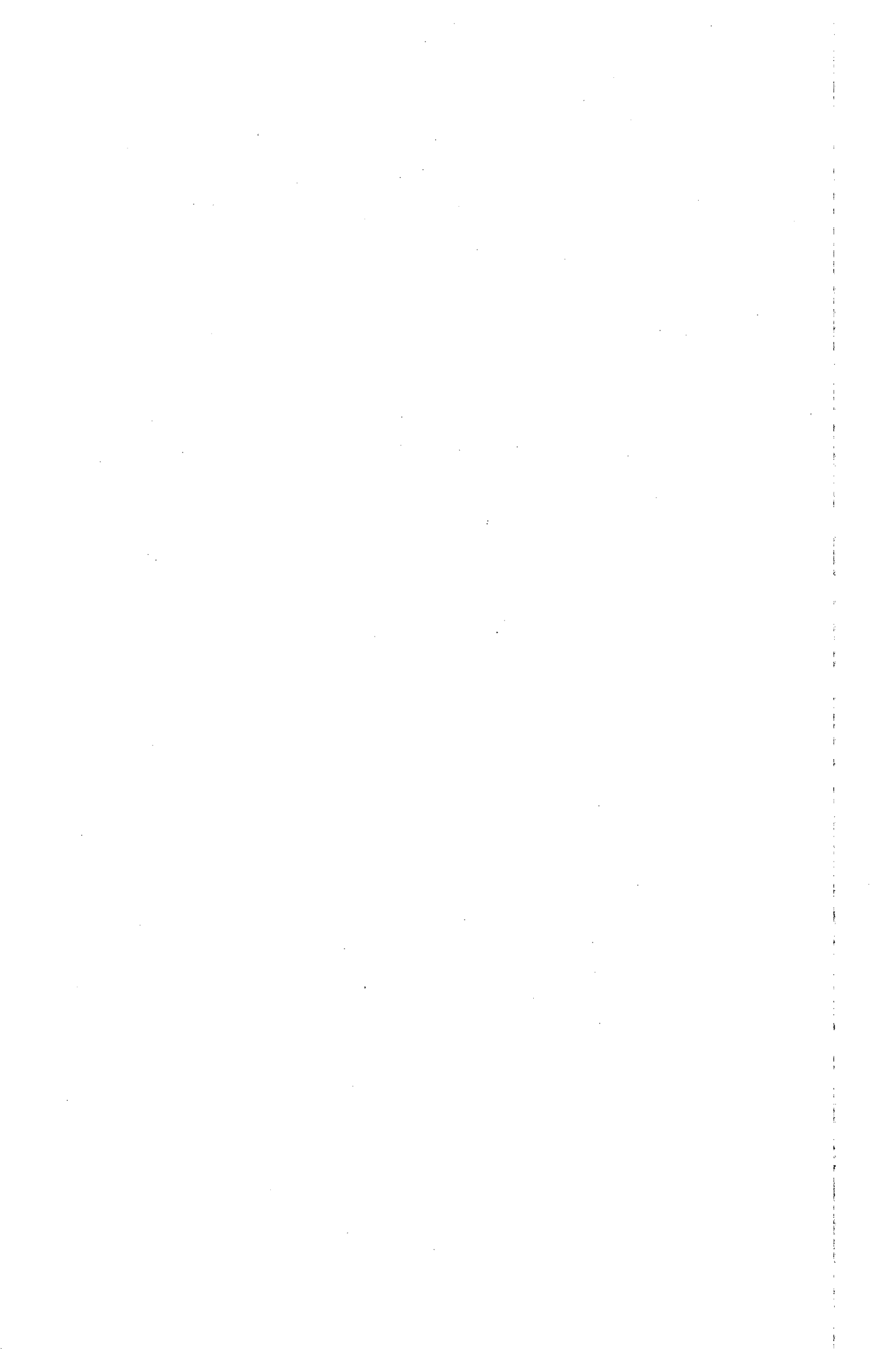
2. L'AGENT ETIOLÒGIC: *Rickettsia conorii*.

La Febre Botonosa Mediterrània (FBM) és una malaltia endèmica a la Conca Mediterrània que està produïda per *Rickettsia conorii*, la qual pertany al grup de les febres tacades.

Classificació de les rickettsies

Les zoonosis produïdes per rickettsies constitueixen un grup heterogeni de malalties de distribució mundial. Dins de l'Ordre Rickettsials, a la família Rickettsiaceae, tribu Rickettsieae s'inclouen tres gèneres: *Rickettsia*, *Coxiella* i *Rochalimaea* (Bergey's, 1974). Les espècies del gènere *Rickettsia* s'han reagrupat en tres entitats clíniques (Drancourt i Raoult, 1992) (Quenin i Savey, 1992) (Freney et al., 1992) :

- Grup Tifus: *R.prowazekii*, *R. tphi* i *R.canada*.
- Grup de les Febres Tacades: *R.conorii*, *R.rickettsi*, *R.sibirica*, *R.australis* i *R.akari*.
- Scrub tifus: *R.tsutsugamushi*.



Biologia de les rickettsies

Les rickettsies s'han considerat durant molts anys microorganismes situats entre els bacteris i els virus. Es tracta de bacteris pleomòrfics -generalment cocbacil.lars-, gram negatius ($0.3-0.5 \mu\text{m} \times 1-2\mu\text{m}$) que contenen ADN i ARN. La paret cel.lular conté una proteïna de membrana específica d'espècie i serotipus, de 120 Kda aproximadament, una lipoproteïna de 17 Kda i una capa de lipopolisacàrids on radiquen les diferències antigèniques més rellevants. Existeixen antigens comuns entre rickettsies i algunes soques del gènere *Proteus* (0x19, 0x2, 0xk) (Urbach i Schabinski, 1960)

Són paràsits intracel.lulars obligats que es multipliquen per fisió binària. En els mamífers, les cèl.lules hostes són les dels endotelis vasculars i les cèl.lules reticuloendotelials. Als artròpodes són les cèl.lules de l'epiteli intestinal, les de les glàndules salivars i els hemòcits (Rehacek, 1992) les que actuen com a cèl.lules diana. Si bé *R.conorii* es localitza lliure al citoplasma, ocasionalment es poden observar algunes a l'interior del nucli, característica pròpia del grup de les Febres Tacades i que no es dona ni en el grup de les febres tíffiques ni en *R. tsutsugamushi* -l'scrub tifus- (Rehacek, 1992).

El manteniment de rickettsies a nivell laboratorial requereix d'un suport cel.lular. Les línies cel.lulars més emprades són: fibroblasts d'embrió de pollastre, cèl.lules L d'origen murí, soques BHK 21 de hámster, cèl.lules Vero, entre d'altres (Quenin i Savey, 1992). La visualització de rickettsies sobre un teixit o un tapís cel.lular requereix l'aplicació de tècniques com les tincions de Giménez, Giemsa, Machiavello, o Stamp o bé, immunofluorescència directa (Quenin i Savey, 1992).

Noves soques

En els darrers anys s'han identificat noves soques pertanyents al grup de les febres botonoses en paparres (Beati i Raoult, 1992) com són *R.rhipicephali* aïllada en ous de *R.sanguineus* a Madrid (Herrero et al., 1992), *R.massiliae* -abans anomenada MTU-1- aïllada per primera vegada en *R.turanicus* al sud de França (Beati i Raoult, 1993) i MTU-5, anomenada així provisionalment i que fou aïllada per primera vegada al Sud de França en *Rhipicephalus turanicus* (Beati et al., 1992), éssent identificada posteriorment en especimens de *R.sanguineus* recollits a diferents àrees de Catalunya (Beati et al. 1996). Encara resta per determinar el poder patògen d'aquestes soques.

3. EPIDEMIOLOGIA.

3.1. ELS VECTORS: LES PAPPARRES.

La FBM es transmet per la picada de paparres, presentant la malaltia característiques focals i estacionals en funció de l'àrea de distribució de la paparra vectora i l'època d'activitat.

Les paparres són artròpodes de la classe Arachnida, ordre Metastigmata en el que es troben dues famílies: Ixodidae o paparres dures i Argasidae o paparres toves; les primeres presenten una cutícula quitinosa anomenada escut mentre que en el cas dels Argàsids no està quitinitzada i per tant és flexible.

Són paràsits hematòfags que realitzen la presa de sang d'una forma contínua. Presenten tres fases en el seu cicle biològic: LARVA amb tres parells de potes, NIMFA i ADULT, en ambdós casos amb quatre parells de potes. És necessària la ingesta de sang per a passar d'un estadi a l'altre.

Una paparra parasitarà al llarg de la seva vida a una, dues o tres espècies d'hostes depenent de si es tracta d'una espècie monotropa, és a dir, tanca el seu cicle biològic en el mateix hoste o bé d'una espècie ditropa la qual requereix de dos o més espècies d'hostes per a completar el seu cicle vital.

Transmissió de rickettsies en les paparres

La capacitat vectorial d'una paparra depèn de característiques fisiològiques, ecològiques i etològiques. La seva condició d'hematòfags obligats, l'ampli ventall d'hostes, l'elevada resistència, la necessitat d'una alimentació prolongada durant dies àdhuc la capacitat de transmetre transovàricament determinats patògens afavoreixen tant la transmissió com la dispersió de l'agent patògen (Anònim. 1983).

La transmissió de rickettsies en les paparres es produeix tant via transestadial com via transovàrica, però en aquest últim cas el percentatge de transmissió exitosa va davallant en les successives generacions (Rehacek 1992). La transmissió transovàrica no és del 100% a la natura, però sí és essencial per al manteniment de la infecció (Burgdorfer 1992).

Burgdorfer demostra la presència de rickettsies distribuïdes a diferents teixits de la paparra com són: budell mig, ovari i, ocasionalment, túbuls de Malpighi (Burgdorfer 1992). També s'han detectat a les cèl.lules de l'epiteli intestinal, cèl.lules de les glàndules salivars i hemòcits (Gage et al. 1992). L'alliberament de rickettsies per part de les paparres es produeix via femtes, via fluids coxals i via saliva, éssent aquesta la més important per a la transmissió (Rehacek 1992).

La infecció per rickettsies no és perjudicial per a la paparra. Infeccions massives rarament produeixen la mort de la paparra però ocasionen una disminució de l'oviposició (Rehacek 1992) (Burgdorfer 1992). El nivell d'infecció que pot tenir una paparra està relacionat amb el nombre d'organismes ingerits que, a la vegada, depèn del nivell de rickettsièmia de l'hoste i de la quantitat de sang ingerida (Rehacek 1992) (Burgdorfer 1992).

Espècies involucrades en la transmissió de la FBM

Són varies les espècies de paparres que poden transmetre la FBM, totes elles pertanyents a la família Ixodidae. Si bé clàssicament s'ha considerat *R.sanguineus* la principal espècie vectora a la vessant mediterrània, en els darrers anys s'ha definit el grup *Rhipicephalus sanguineus* (Morel Vasiliades, 1962) (Pegram et al. 1987 (a)) (Pegram et al. 1987 (b)) que inclou tres espècies estretament relacionades com són: *R.sanguineus*, *R.turanicus* i *R.pusillus* (Gilot et al. 1990). Totes tres poden estar involucrades en la transmissió de la FBM (Bacellar et al. 1995) (Oteo et al. 1996) (Guberman et al. 1996)

* *Rhipicephalus sanguineus*, la paparra marró del gos, s'associa a àrees de vegetació mediterrània però amb una especial afinitat per les construccions humanes on pot constituir característiques d'autèntica plaga. L'època de màxima activitat va de febrer a octubre, éssent les formes adultes actives durant la primavera mentre que les formes immadures ho són a l'estiu i principis de tardor (Gilot et al. 1990). Es tracta d'una paparra de 3 hostes monotropa, és a dir, per a mudar d'un estadi a l'altre requereix parasitar tres hostes, tot i que aquests poden ser de la mateixa espècie. L'hoste principal és el gos, animal que conviu més estretament amb l'espècie humana (Gilot et al. 1990).

* *Rhipicephalus turanicus*, també es troba associada a zones de climatologia mediterrània. Els adults d'aquesta espècie es poden trobar des de principis de març fins al mes de juny. Els estadis més immadurs, en canvi, són actius durant l'estiu. Els principals hostes d'aquesta espècie són els remugants (vaquí i oví, principalment), tot i que les formes immadures parasiten micromamífers (Gilot et al. 1990).

* *Rhipicephalus pusillus* és una espècie endòfila, que viu a l'interior dels caus dels seus hostes. Associada normalment al conill, també s'ha detectat a la guineu, la qual es sol parasitar per depredació o bé per ocupació de caus de conill abandonats. Al tractar-se d'una espècie endòfila, la seva activitat al llarg de l'any és pràcticament contínua (Castellà et al., 1996).

Una altra espècie que forma part del gènere *Rhipicephalus* però que no està inclosa en el grup sanguineus i en la que també s'han detectat rickettsies és *Rhipicephalus bursa* (Ortuño i Castellà, 1995) (Radulovic et al. 1994) que constitueix l'espècie més septentrional de totes. A la Península Ibèrica sol estendre's entre els 500 i 1100 metres sobre el nivell del mar. Parasita petits remugants (Estrada, 1994). Les larves i nimfes són actives durant l'hivern, mentre que és a partir dels mesos d'abril-juny quan s'activen les formes adultes.

Altres gèneres on també s'han detectat rickettsies del grup de les febres tacades són: *Dermacentor marginatus* (Beati et al. 1993) (Beati et al. 1994) (Radulovic et al. 1994), *Haemaphysalis punctata* (Ortuño i Castellà, 1996), *Haemaphysalis leachi* al Sud d'Àfrica (Kelly i Mason 1991) i *Ixodes ricinus* (Beati et al. 1994).



Si bé qualsevol de les espècies abans esmentades podria estar involucrada en la transmissió i manteniment de la FBM, és *Rhipicephalus sanguineus* la que té una major participació en l'epidemiologia d'aquesta malaltia. Els estadis immadurs són els responsables de la majoria dels casos de FBM a la Mediterrània (Rehacek i Tarasevich, 1988) (Gilot et al 1990) (Herrero et al. 1989). Gilot i col. (1990), en un estudi comparatiu de les dades acarològiques del grup sanguineus amb les dades epidemiològiques de la FBM en diferents regions de França, observen que el 90% de les *R. sanguineus* recollides sobre l'espècie humana són formes immadures, coincidint el pic estacional de la malaltia amb el moment de màxima activitat dels estadis immadurs i no amb el de les formes adultes. A més a més, les formes adultes rarament parasiten l'home (Raoult et al. 1993).

3.2. ELS RESERVORIS.

Entenent per reservori aquell organisme en el qual es multipliquen virus, bacteris o paràsits i que generalment no es veu afectat per aquests, les paparres poden actuar tant com a vectors biològics de *R. conorii* com a reservoris (Gilot et al. 1990).

En l'epidemiologia de les malalties transmiseses per paparres intervé un cicle salvatge que permet la circulació de l'agent a la natura i un cicle domèstic que implica la circulació de l'agent etiològic principalment entre la paparra i els animals domèstics, els quals constitueixen la font de contagi més important per l'home (Rehacek i Tarasevich 1991). Tots dos cicles s'interrelacionen entre ells a partir de les paparres (Joubert et al. 1983).

En general, el cicle salvatge de les rickettsies implica micromamífers mentre que el cicle domèstic es desenvolupa sota la influència de l'activitat humana, esdevenint els animals domèstics els principals portadors de paparres a l'ambient humà (Rehacek i Tarasevich 1991).

Cicle domèstic

En el cas de la FBM, el cicle domèstic o antropúrgic està constituït per *Rhipicephalus sanguineus* i el seu hoste principal, el gos (citat a Estrada 1994). En un estudi realitzat per Raoult i col. (1993) a Marsella, demostren que la incidència de la malaltia és superior a les àrees més deprimides on el contacte amb gossos i la parasitació d'aquests per *R. sanguineus* és més important. Es considera el gos com a principal portador de paparres infectades a l'ambient humà (Rehacek i Tarasevich 1991) (Breitschwerdt et al. 1987) (Espejo et al. 1993), ja que la transitorietat de la rickettsièmia que es produeix posterior a la infecció no permeten pensar que desenvolupi un paper de reservori. El gos podria actuar com a centinel·la per a establir la prevalença dels focus de rickettsiosis (Breitschwerdt et al. 1987). Així doncs, els estudis de seroprevalença en gossos constitueixen un bon marcador epidemiològic de l'estatus de FBM en una àrea determinada (Delgado i Cármenes, 1995).

Cicle salvatge

Respecte al cicle salvatge, els rosegadors i els lagomorfs constitueixen el focus natural de *R. conorii* (Joubert et al. 1983) (Rehacek i Tarasevich 1991) (Rehacek i Tarasevich 1988) (Ruiz-Beltran et al. 1992). Tot i que encara resta per determinar la importància que poden tenir els lagomorfs com la llebre *Lepus europaeus* o el conill de bosc *Oryctolagus cuniculus*, s'observà una davallada en el nombre de casos de FBM després de la introducció del virus de la mixomatosis al sud de França (Giroud et al. 1963); aquesta disminució de la prevalença fou paral·lela a la reducció de la població de conills en la zona. Respecte als rosegadors, Rehacek i col. (1992) demostra la susceptibilitat de *Apodemus flavicolis*, *Clethrionomys glareolus* i *Microtus arvalis* a diferents espècies de rickettsies, entre elles a *R. conorii*. Totes tres espècies són presents a la Península Ibèrica, però a Catalunya només són presents *C. glareolus* -talp roig- i *M. arvalis* -talp dels prats- (Gosalbez 1987).

Els animals salvatges desenvolupen un paper en la circulació i el manteniment de *R. conorii* a la natura. El paper epidemiològic d'aquests hostes és, com en el cas del gos, de disseminadors de paparres infectades (Herrero et al. 1989). Per la qual cosa, la seroconversió enfront de *R. conorii* en animals salvatges també constituirà un excel·lent indicador de l'activitat rickettsial al seu hàbitat (Magnarelli et al. 1981).

3.3. DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA I ESTACIONAL

La distribució geogràfica de la FBM es correspon a les àrees on es donen les condicions adequades per a l'espècie vectora. La infecció per *R. conorii* és endèmica a tota la conca mediterrània: Portugal, Espanya, Sud de França, Itàlia, Grècia, Rumania, Turquia, Israel, Marroc, Argèlia, Tunísia, Llíbia i Egipte. Però també s'han comunicat casos aïllats a zones que no corresponen a la seva distribució típica com és el cas de Suïssa on es declarà un brot de FBM posterior a la introducció d'un gos procedent d'Espanya (Peter et al. 1984).

La malaltia a l'espècie humana presenta la seva màxima incidència durant els mesos d'estiu-principis de tardor, coincidint amb el moment de màxima activitat de la paparra vectora.

Pel que fa referència al gos, Espejo et al. (1990) observen diferències significatives en la positivitat entre els sèrums recollits durant els mesos d'hivern (1% 1/97) i els recollits durant l'estiu (36.8% 38/97), conseqüència de que el gos respon immunitàriament a la infestació per paparres infectades. Aquesta resposta immunitària del gos, després d'un contacte amb *R. conorii*, persisteix durant períodes curts de temps. Espejo et al. (1993) observen que el 75% dels gossos esdevenen seronegatius entre 4 i 10 mesos després de la primera determinació. La persistència de títols elevats pot ser deguda a reinfeccions. Existeixen, doncs, variacions estacionals en la seroprevalença canina a *R. conorii* en la conca Mediterrània (Espejo et al. 1993).

3.4. SITUACIÓ EPIDEMIOLÒGICA.

3.4.1. CATALUNYA

El nombre de casos declarats de FBM a Catalunya en les darrers cinc anys es mostren a la tabla 1:

	Catalunya	Baix Llobrega t	Vallès Oc.
1992	202	22	14
1993	192	16	18
1994	197	10	13
1995	113	9	13
1996	133	6	6

Tabla 1: Nombre de casos declarats de FBM en els darrers cinc anys. Les dades han estat extretes del Butlletí Epidemiològic de Catalunya (Volums XV Juliol 94, XVI Juliol 95, XVII Agost 96).

Espejo i col. (1989) detectaren una seroprevalença enfront de *R.conorii* al Vallès Occidental del 11.6% a l'espècie humana i del 36.8% a l'espècie canina. Segura i col. (1994) en un estudi seroepidemiològic realitzat a la mateixa comarca cinc anys després observaren una prevalença del 8% a l'espècie humana i del 26.1% a l'espècie canina (Segura et al. 1994).

3.4.2. ESPANYA

Segons el Boletín Epidemiológico Semanal (BES 1996 Vol. 4 n.1 1- 12), la FBM continua el descens iniciat en la dècada dels noranta. (Figura ccc histograma 92 93 94 95).

Figura ccc: Distribució dels casos de FBM a Espanya des de 1992 a 1995

4. QUADRE CLINIC

A l'espècie humana, la infecció per *Rickettsia conorii* cursa amb simptomatologia clínica. Després d'un període d'incubació que oscil·la entre 4 i 20 dies, es desenvolupa una lesió ulcerosa en el punt de picada de la paparra, anomenada Taca negra o *Tache noire*. A continuació apareixen tot un seguit de signes inespecífics éssent els més comuns: febre alta (en el 100% dels casos), cefalees (71% dels casos), mialgies (71% dels casos) (Segura i Font, 1985). Entre el 2on i 5è dia de febre apareix l'exantema a les extremitats, que es va extenent a tronc, coll, palmes de les mans i dels peus i cap. L'exantema persisteix fins a 2-3 setmanes després de la remissió clínica (Herrero i Ruiz, 1994). També s'han descrit altres manifestacions atípiques com són: alteracions neurològiques, oftàlmiques, cardiovasculars, pulmonars, renals o digestives (Herrero i Ruiz, 1994).

Als animals, en canvi, la infecció és asimptomàtica produint-se només seroconversió (Joubert et al. 1983). S'han detectat anticossos enfront de *R. conorii* a diferents espècies animals com ases, vaques, cabres, ovelles, conills, cavalls, llebres, porcs (Herrero et al. 1989) àdhuc en gats (Matthewman et al. 1997). Magnarelli et al. (1979) detecten anticossos enfront de *R. rickettsii*, causant de la Febre de les Muntanyes Rocalloses, en cèrvols (*Odocoileus virginianus*), rosegadors (*Peromyscus leucopus*) i, sobretot, en ossos rentadors (mapatxes, *Procyon lotor*) principal hoste de la paparra vectora, *Dermacentor variabilis*. En cap cas es fa referència de malaltia clínica en els animals seropositius.

Pel que fa referència al gos, si bé la infecció per *Rickettsia conorii* només produeix una resposta humoral de curta durada (Espejo et al. 1993) sense manifestacions clíniques, no passa el mateix en el cas de la infecció per *Rickettsia rickettsii*, la qual produeix un quadre clínic al gos similar al que es produeix a l'espècie humana, amb letàrgia, febre, descàrrega òculo-nasal i afectació nerviosa (Breitschwerdt et al. 1985) (Keenan et al. 1977). Adhuc Breitschwerdt i col. (1990) suggereixen que la resposta immunitària enfront de *R. rickettsii* en el gos romà de per vida.

A nivell experimental, Kelly i col. (1992) portaren a terme una infecció experimental en gossos amb una soca autòctona de *R. conorii* observant només dolor, eritema i edema al lloc de la inoculació així com limfadenopatia regional; deu dies post-inoculació es detectà rickettsièmia intermitent, sense observar-se en cap cas, però, canvis hematològics o bioquímics.

5. MÈTODES DE DIAGNÒSTIC

El diagnòstic laboratorial de la Febre Botonosa Mediterrània es pot realitzar de forma directa que inclou la detecció de rickettsies en paparres o a partir de mostres clíniques o bé, de forma indirecta on s'inclouen les tècniques serològiques:

5.1. Diagnòstic directe:

**Detecció de rickettsies en paparres:

La detecció de rickettsies en les paparres es realitza a partir del test de l'hemolimfa que consisteix en l'amputació de la part distal d'una pota de la paparra amb tissores de dissecció (Burgdorfer, 1970) (Rehacek et al. 1971). La gota d'hemolimfa obtinguda es fixa sobre un porta i a continuació es processa per Immunofluorescència (Filipe et al. 1992) o per Tinció de Giménez (Giménez, 1964).

Les rickettsies s'observen a l'interior dels hemòcits, sia a nivell intracitoplasmàtic sia intranuclear. En el cas de la tinció de Giménez, les rickettsies apareixen com cocabacils - tot i que sovint són pleomòrfics- que es tenyeixen de color rosa o vermell a l'interior dels hemòcits els qual prenen una coloració verd-blavosa (Foto n^ox). Respecte a la immunofluorescència es tracta d'una Immunofluorescència directa en la que es detecta la presència d'antigen a partir d'un sèrum positiu marcat amb fluoresceïna.

El test de l'hemolimfa és una tècnica dirigida a la detecció de rickettsies en paparres adultes (Burgdorfer 1970), però si aquestes encara no han iniciat la presa de sang, les rickettsies resten acantonades a nivell d'ovari i no es visualitzen als hemòcits (Rehacek et al. 1971).

Degut a que la interpretació dels resultats obtinguts, sia per tinció de Giménez sia per IFD, és sovint difícil, altres autors han posat a punt tècniques com el ELISA de captura d'antigen (Mumcough et al. 1993) o el mètode d'immunoperoxidasa indirecta (IPI) (Yano et al. 1993) per a confirmar els resultats.

El test de l'hemolimfa és una tècnica ràpida, fàcil i econòmica (Rehacek et al. 1971) (Burgdorfer 1970) que permet una detecció preliminar de les rickettsies.

Tanmateix, en els darrers anys i gràcies a l'aplicació de tècniques de biologia molecular, s'han identificat noves soques de rickettsies del grup de les febres tacades com la MTU-5 -abans esmentada- o la *Rickettsia massiliae* (Beati i Raoult 1993 (b)) (Beati i Raoult 1993 (a)), les quals comparteixen trets ecològics (distribució geogràfica, vectors comuns etc.) i presenten reaccions serològiques creuades amb *Rickettsia conorii*. Aquest fet fa necessari, en determinats casos, l'aplicació de tècniques com l'amplificació del DNA per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) en combinació amb l'anàlisi de restricció enzimàtica (RFLP). Aquestes tècniques permeten no només la detecció de les rickettsies sinó també la seva identificació (Regnery et al. 199) (Beati et al. 1992).

** Detecció a partir de mostres clíniques

La demostració de rickettsies sobre mostres clíniques també es pot realitzar a partir de tècniques d'immunofluorescència (Raoult et al. 1984). Actualment són les tècniques de biologia molecular les que donen millors resultats tant en la detecció com en la identificació de rickettsies a partir d'una mostra clínica (Tzianabos et al. 1989).

** Aïllament

Les rickettsies, degut a la seva condició de paràsits intracel.lulars obligats, requereixen una metodologia de diagnòstic basada en l'aïllament -sia a partir de mostres clíniques sia a partir de paparres- en animals de laboratori, inoculació en embrions de pollastre o cultius cel.lulars. Les línees cel.lulars més freqüentment utilitzades són: L929, HEL o Vero. La infecció per *R.conorii* en un tapís cel.lular de cèl.lules Vero a 35°C produeix la formació de plaques 6 dies post-infecció (Rehacek i Tarasevic, 1988).

Marrero i Raoult (1989) descriuen la tècnica de centrifugació en shell-vial que permet una ràpida detecció de rickettsies a partir d'hemocultius. Péter i col. (19) realitzen l'aïllament de rickettsies a partir d'una gota d'hemolimfa seguint aquesta mateixa tècnica.

5.2. Diagnòstic indirecte. Proves serològiques

** Immunofluorescència Indirecta

La tècnica serològica més comunment emprada és la Immunofluorescència indirecta (Lefebvre et al. 1979) (Newhouse et al. 1979) (Raoult et al. 1985 (b)). És la tècnica recomanada per la OMS (WHO, 1982) ja que es tracta d'un mètode sensible i específic. Raoult et al. (1985) (a) en un estudi comparatiu de tres tècniques serològiques com són la Immunofluorescència Indirecta, l'Hemaglutinació Indirecta i l'Aglutinació en làtex, conclou que la IFI és la que dona uns millors resultats tant respecte a la sensibilitat com a l'especificitat .

Aquesta tècnica es basa en la detecció d'anticossos enfront de l'antígen rickettsial visualitzant la reacció a partir d'un conjugat marcat amb fluoresceïna. La IFI té l'avantatge de detectar tant IgM - indicadors d'infeccions recents- com IgG, per la qual cosa el diagnòstic es pot realitzar de forma precoç, tan aviat comencen a produir-se anticossos - aproximadament cap als 7 dies post-infecció- (Lefebvre et al. 1979)

* Altres tècniques:

** Aglutinació de Weil-Felix: Basada en l'aglutinació de certes soques de *Proteus* en presència de sèrums de pacients amb FBM, degut a la reacció creuada entre antígens de *Proteus* i *R. conorii*. S'ha demostrat que són les aglutinines OX19 i OX2 les que són presents al sèrum dels pacients amb FBM. Es tracta d'un mètode poc sensible i poc específic, per la qual cosa la seva utilització no està justificada (Weil and Felix, 1916).

** Fixació de complement: Es força específic de grup i d'espècie, però els resultats varien en funció del nombre d'unitats d'antígen emprades. És poc sensible, amb la qual cosa el seu ús s'ha vist reemplaçat per altres tècniques (Pickens et al. 1965)

** Hemaglutinació indirecta: Basada en l'aglutinació d'hematies d'ovella sensibilitzats amb l'antígen rickettsial en presència d'anticossos enfront de *R. conorii* (Anacker et al. 1975).

** Aglutinació del làtex: L'antígen està fixat sobre boles de làtex on s'incuba el sèrum, procedint a la lectura sobre un fons negre (Hechemy et al. 1986).

** Western Blot: S'utilitza en aquells casos en els que la IFI encara no evidencia resultats positius (Raoult, 1989). No és una tècnica de rutina per la dificultat d'obtenció de l'antígen purificat apropiat.

**** Reaccions creuades**

El grup de les febres botonoses no és un grup antigènicament homogeni. Philipp i col. (1978) observaren que inoculant conills porquins amb *Rickettsia rickettsii* - rickettsia del SFG patògena-, aquests desenvolupaven reacció immunitària humoral enfront d'altres rickettsies del grup. Així doncs, es presenten reaccions creuades entre les rickettsies del grup de les febres tacades. L'exposició a rickettsies no patògenes del grup de les febres tacades donarà lloc a la producció d'anticossos que reaccionaran de forma creuada amb l'antígen patògen. Breitschwerdt i col. (1990) afirmen que, generalment, els títols enfront de la rickettsia causant del quadre clínic són superiors als títols d'anticossos enfront d'altres antígens rickettsials.

6. TRACTAMENT

El tractament de la Febre Botonosa es basa en antibioteràpia, éssent les tetraciclines, especialment la Doxiciclina, l'antibiòtic d'elecció. La Josamicina podria ser el tractament d'elecció per a nens i dones gestants, on el tractament amb Tetraciclines no estaria recomanat (Raoult 1989).

II. MALALTIA DE LYME

1. ASPECTES HISTORICS

La primera descripció de la Malaltia de Lyme es remonta a principis del nostre segle a Europa. L'any 1909 un metge suec, Arvid Afzelius, va descriure l'aparició d'un exantema cutani que s'anava extenent i que anomenà eritema migratori. Lipschutz l'any 1913 anomenà aquest procés Eritema Cronicum Migrans (ECM). Al 1922, Garin i Bujadoux varen descriure problemes neurològics relacionats amb l'aparició del ECM, concretament una meningoplineuritis, més coneguda com a Síndrome de Bannwarth. Al 1948, Lenhoff descobrí microorganismes compatibles amb espiroquetes en biòpsies de ECM, però l'eventual rol de virus o rickettsies en el procés de la malaltia no quedà descartat fins al 1962. Al 1955 Binder i col. demostraren que l'ECM era degut a un agent infecciós, sensible a la penicil.lina, transmès per *Ixodes ricinus* (Extret de Raffi, 1990).

De forma independent als esdeveniments ocorreguts a Europa, la malaltia s'estudià més profundament l'any 1975 al declarar-se un brot d'artritis reumatoide juvenil al comtat de Lyme (Connecticut, EEUU). Allen Steere i cols. establiren una relació entre l'exantema i la posterior aparició de simptomatologia artrítica. L'any 1977, Andrew Spielman identificà *Ixodes scapularis* (sin. *Ixodes dammini*), com a possible vector de la malaltia en un pacient que posteriorment havia desenvolupat simptomatologia clínica.

Tot i que ja des d'un principi es sospità d'una etiologia bacteriana, no fou fins al 1981 quan Willy Burgdorfer detectà per primera vegada espiroquetes en un frotis de budell mig realitzat en *Ixodes scapularis* recollides al comtat de Lyme. El mateix any, Barbour i col. aconseguiren l'aïllament i cultiu d'espiroquetes en medi pur. L'any 1982 Russell C. Johnson i col. determinaren que les espiroquetes causants de la malaltia de Lyme constituïen una espècie nova del gènere *Borrelia*. Al 1984 aquesta nova espècie s'anomenà *Borrelia burgdorferi*, en honor al seu descobridor (Habicht et al. 1987). Aquestes investigacions varen permetre establir que es tractava del mateix procés descrit a Europa durant la primera meitat de segle.

Pel que fa referència a Espanya, ja l'any 1977 Uruñuela i Díez havien descrit casos d'eritema crònic migratori; però el primer cas confirmat serològicament fou descrit per Uría i col. l'any 1987. Oteo i Estrada, al 1990, detectaren per primera vegada espiroquetes compatibles amb *Borrelia burgdorferi* en *Ixodes ricinus* (Oteo i Estrada, 1991). L'any 1992 García-Moncó i col. varen aïllar una soca espanyola de *Borrelia burgdorferi* en paparres *Ixodes ricinus* recollides a Cantàbria (Garcia Monco et al. 1992). Font i col.(1992) varen descriure per primera vegada l'any 1992 un cas de infecció per *Borrelia burgdorferi* en el gos a Espanya .

2. L'AGENT ETIOLOGIC: *Borrelia burgdorferi*

Classificació

Les borrelies pertanyen al Ordre Spirochaetales, Família Spirochaetaceae que inclou els següents gèneres: Gènere Spirocheta, Gènere Cristispira, Gènere Treponema, Gènere Leptospira i Gènere Borrelia (Bergey's, 1974).

Totes elles presenten una estructura filamentosa i són extraordinàriament llargues i flexibles , presentant una forma característica de molla o espiral.

Característiques biològiques

Borrelia burgdorferi és un bacteri gram negatiu, flexible i molt mòbil amb moviments de translació i de rotació. Es tracta de l'espiroqueta més llarga (20 a 30 micres) i la més estreta (0.2-0.3 micres). Presenta entre 7 i 10 endoflagels. El nombre d'endoflagels, juntament amb altres factors com la morfologia, s'han vingut usant per a diferenciar espiroquetes del gènere borrelia d'altres com les del gènere treponema. Cal tenir en compte que el nombre d'endoflagels pot variar depenent de l'estat fisiològic de l'espiroqueta (Hayes i col., 1988).

El cultiu de *Borrelia* és molt delicat puix que presenta requeriments nutritius complexos. Per al seu cultiu *in vitro* s'utilitza el medi Barbour-Stoenner-Kelly BSK II, éssent necessàries condicions de microaerofília a 32-33°C de temperatura (Barbour, 1984). La visualització de les espiroquetes en cultius es realitza a partir de tincions com Gram, Giemsa, impregnacions argèntiques o la coloració argèntica modificada de Steiner o bé la microscopia en contrast de fases o en camp fosc.

Característiques antigèniques

Les proteïnes de superfície com són la Osp A i la Osp B juntament amb la proteïna flagel.lar p41 són de les més immunògenes (Benach et al, 1988). Wilske i col. (1988) detecten variacions antigèniques en les diferents soques de *B.burgdorferi* ; així, constaten que les soques europees són heterogènies respecte a la OspA mentre que en les soques americanes aquesta heterogenicitat és palesa en la OspB; a més a més, en els aïllaments europeus és present una altra proteïna, d'aproximadament 20 Kda, anomenada pC amb un important rol immunògen.

Noves soques

Barbour et al.(1985) assenyalen que les soques de *Borrelia burgdorferi* procedents dels Estats Units són generalment menys variables que les soques europees. A Europa, la varietat de genoespecies de borrelia no només és superior a la dels Estats Units sinó que mostren una gran heterogenicitat entre elles.

Aquests grups genòmics o genoespecies han estat catalogats com *Borrelia burgdorferi* sensu lato que inclou *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* i el grup VS461 (Oliver et al. 1996). *B.burgdorferi sensu stricto* ha estat aïllada a partir de mostres clíniques, rosegadors i paparres a Europa i als EEUU, i inclou la soca de referència americana B-31. *Borrelia garinii* s'ha aïllat a partir de mostres clíniques i paparres d'Europa i del Japó i fins al moment no ha estat aïllada als Estats Units. En el grup VS461, recentment classificat com *Borrelia afzelii* per Canica et al (1993),

s'inclouen aïllaments procedents d'Europa i Japó (Baranton et al. 1992). D'altra banda, Rijpkema et al. (1995) detecten un altre grup genòmic anomenat VS116 del qual si bé es desconeix la seva importància en l'etiologia de la borreliosis de Lyme, sembla que està ben establert a Europa.

En un estudi realitzat per Rijpkema i col (1996) identifiquen quatre grups genòmics en *Ixodes ricinus* capturades a una zona endèmica de Croàcia: *B. afzelii*, *B. garinii*, grup VS116 i *B. burgdorferi sensu stricto*, així com infeccions mixtes de *B. afzelii* amb VS116 i amb *B. burgdorferi sensu stricto*.

La majoria dels aïllaments europeus corresponen a *Borrelia afzelii* i a *Borrelia garinii*, mentre que gairebé tots els aïllaments identificats als USA corresponen a *B. burgdorferi sensu stricto* (Stanek et al. 1996).

3. EPIDEMIOLOGIA

3.1. ELS VECTORS: LES PAPPARRES

La malaltia de Lyme es transmet per la picada de paparres del gènere *Ixodes*. Aquest gènere inclou un gran nombre d'espècies i a més a més algunes d'elles poden tenir un ventall d'hostes molt ampli, com és el cas de *Ixodes ricinus*.

D'altra banda, alguns autors han apuntat la implicació d'insectes hematòfags com mosquits i tabànids en la transmissió de la malaltia, però, tot i que durant la ingesta de sang poden adquirir *B. burgdorferi*, sembla que aquests insectes no són adequats per a una transmissió biològica de l'espироqueta (Magnarelli i Anderson, 1988).

Transmissió d'espiroquetes en les paparres

La transmissió de borrelia es produeix via transestadial, tot i que la tasa d'infecció va disminuint en cada fase (Monin et al. 1989). Magnarelli et al. (1987) constaten que les larves d'*Ixodes dammini* adquireixen *B.burgdorferi* a partir de la presa de sang en rosegadors espiroquetèmics i la transmeten a nimfes i adults. Cal destacar, però, l'existència d'una altra via de transmissió en la que paparres infectades transmeten la borrelia a paparres no infectades quan ambdues s'alimenten a la vegada sobre un hoste no espiroquetèmic. Aquesta transmissió es produeix a partir de la pell, és a dir, del punt d'inoculació de la borrelia i les paparres no infectades que es "co-alimenten" aprop de la paparra infectada poden adquirir la Borrelia (Randolph et al. 1996).

La transmissió transovàrica és molt menys eficaç (Magnarelli et al. 1987) i no justifica el manteniment de *B.burgdorferi* en poblacions de paparres (Schoeleer i Lane, 1993). Tot i que s'han descrit alguns casos de transmissió transovàrica en *I.ricinus* (Burgdorfer et al. 1983), *I.scapularis* (Magnarelli et al. 1986) (Piesman et al. 1986), Burgdorfer i col. (1988) observen que el nombre d'organismes transmesos a la progènie és massa petit com per a establir infeccions permanents, conseqüència possiblement de la mort gradual de les borrelies i així ho constata la disminució de les taxes d'infecció en larves i l'absència d'espiroquetes en les nimfes.

B.burgdorferi es limita en la majoria de les paparres a nivell del budell mig on s'acumula en la paret dels microvillis i en els espais intersticials de les cèl.lules epitelials; és en aquest nivell on persisteix i es multiplica. Durant la presa de sang, les espiroquetes s'activen i migren del budell mig cap als acini de les glàndules salivars (Spielman A. *ii*). A partir dels fluids salivars es produeix la transmissió de borrelia a l'hoste (Gern et al. , 1990). Semblen existir, però, variacions entre les genoespècies de *Borrelia* i els seus vectors. Korenberg i Moskvitina (1996), observen que la presència d'espiroquetes a nivell de les glàndules salivars té lloc més freqüentment en adults d'*Ixodes persulcatus* infectats amb *Borrelia afzellii* i *Borrelia garinii* que no pas en *I. scapularis* infectats amb *B.burgdorferi sensu stricto*. Ocasionalment, però, la borrelia pot penetrar la paret intestinal i produir una infecció generalitzada, especialment en els teixits del gangli central, túbuls de Malpighi i ovari (Burgdorfer et al. 1988).

Infeccions massives provoquen la mort prematura dels ous ja que les espiroquetes inhibeixen la formació de la cutícula (T10).

Espècies involucrades en la transmissió de *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Diferents espècies del gènere *Ixodes* són vectoros de la malaltia de Lyme. Als Estats Units *Ixodes scapularis* i *Ixodes pacificus* són les principals responsables de la transmissió de la malaltia, mentre que a Europa la principal espècie vectora és *Ixodes ricinus* (Sonenshine, 1993) tot i que altres espècies també poden estar involucrades en la transmissió com *Ixodes hexagonus*, *Ixodes canisuga*, *Ixodes frontalis* i *Haemaphysalis punctata* (Estrada et al. 1995)(Doby et al. 1991)(Marquez i Constan, 1990).

* *Ixodes ricinus* és una paparra pròpia de remugants i vulgarment se la coneix com la "paparra de la ovella". També pot parasitar, però, altres espècies com cànids -gos i guineu (Harris i Thompson, 1978) (Aubert, 1975), èquids, mustèl.lids, cèrvids, bòvids, càprids etc. És una paparra ditropa amb un cicle biològic de tres hostes. Els estadis immadurs s'alimenten sobre rosegadors, insectívors o aus, mentre que els adults tendeixen a fer la presa de sang sobre mamífers de grandària superior (Aubert, 1975) (Arthur, 1963). És activa fonamentalment durant la tardor, tot i que en algunes zones la seva activitat pot començar a finals d'estiu (Estrada-Peña, 1994). És una paparra higròfila que colonitza preferentment biotops de climatologia atlàntica, éssent absent de les àrees de vegetació mediterrània.

* *Ixodes hexagonus* és una paparra típica de l'eriçó (*Erinaceus europaeus*), tot i que també sol parasitar mustèl.lids i guineus. Esporàdicament, també s'ha descrit en animals domèstics com el gos, gat, vaca, conill (ARTHUR,1963). La seva màxima activitat es concentra entre els mesos d'Abril i Maig, davallant a l'estiu per a tornar a recuperar-se des de finals d'Agost fins a finals d'Octubre. Presenta un cicle monotrop de tres hostes (Aubert, 1975).



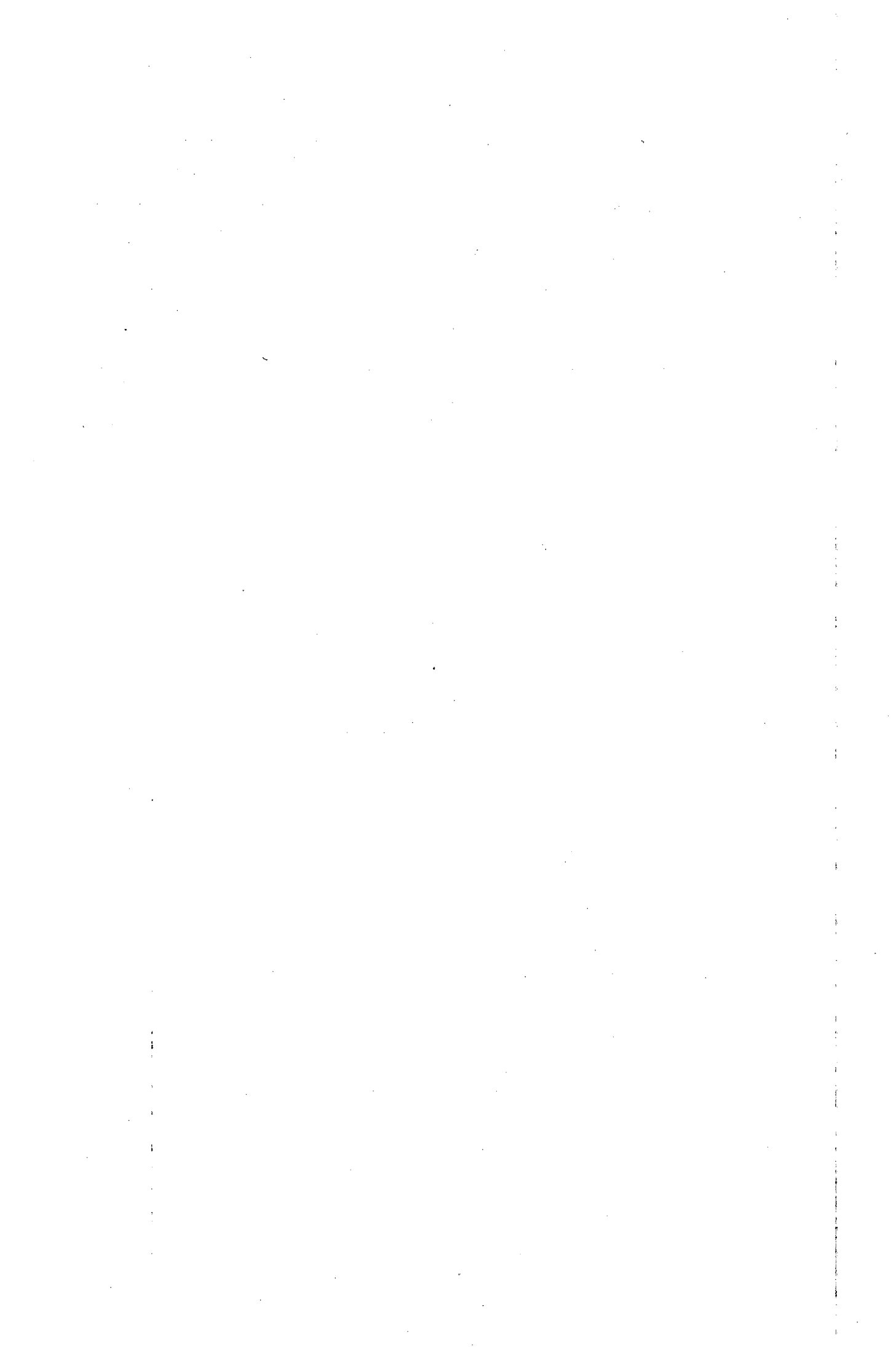
* *Ixodes canisuga*. Parasita, gairebé exclusivament, a les guineus (*Vulpes vulpes*) i els toixons (*Meles meles*) (Arthur 1963) (Harris i Thompson, 1978) (Aubert, 1975). També pot parasitar al gos, àdhuc en determinades àrees geogràfiques pot constituir característiques de plaga en gosses (Arthur, 1963). Presenta un cicle trifàsic monotrop. Té un comportament similar al d'*I. ricinus* pel que respecte a l'hàbitat, tot i que s'han detectat exemplars en àrees de transició entre la vegetació mediterrània i l'atlàntica.

Segons Aubert (1975), ni *I. canisuga* ni *I. hexagonus* no han estat mai capturades lliures al medi ambient; normalment es solen trobar a l'interior de grutes, caus i en zones freqüentades per carnívors.

3.2. ELS RESERVORIS

Cicle salvatge

El paper de la fauna salvatge en l'epidemiologia de la malaltia de Lyme no està del tot clarificat (Burgess, 1991). Si bé s'han detectat anticossos enfront de *Borrelia burgdorferi* a diferents espècies animals (tabla 2), no totes es poden considerar reservoris. Cal diferenciar entre animals que actuen simplement com a suport tròfic de les diferents fases de la paparra vectora -tot i que poden tenir contacte amb l'espiroqueta- i animals reservoris, els quals desenvolupen una espiroquetèmia suficient per a infectar noves paparres i per tant intervenen en el manteniment i la transmissió de la infecció (Mather et al. 1989). Randolph et al. (1996) apunten que qualsevol hoste que suporta una elevada tasa de parasitació de paparres podria ésser considerat un "amplificador" de borrelia, ja que, tot i que no desenvolupi una infecció sistèmica pot contribuir de forma significativa en la transmissió de la malaltia: Això és degut al fet que *B. burgdorferi* no es dissemina a la circulació immediatament, sinó que romàn al lloc d'inoculació durant un cert temps, moment idoni per a que paparres no infectades que es localitzin allà es puguin infectar.

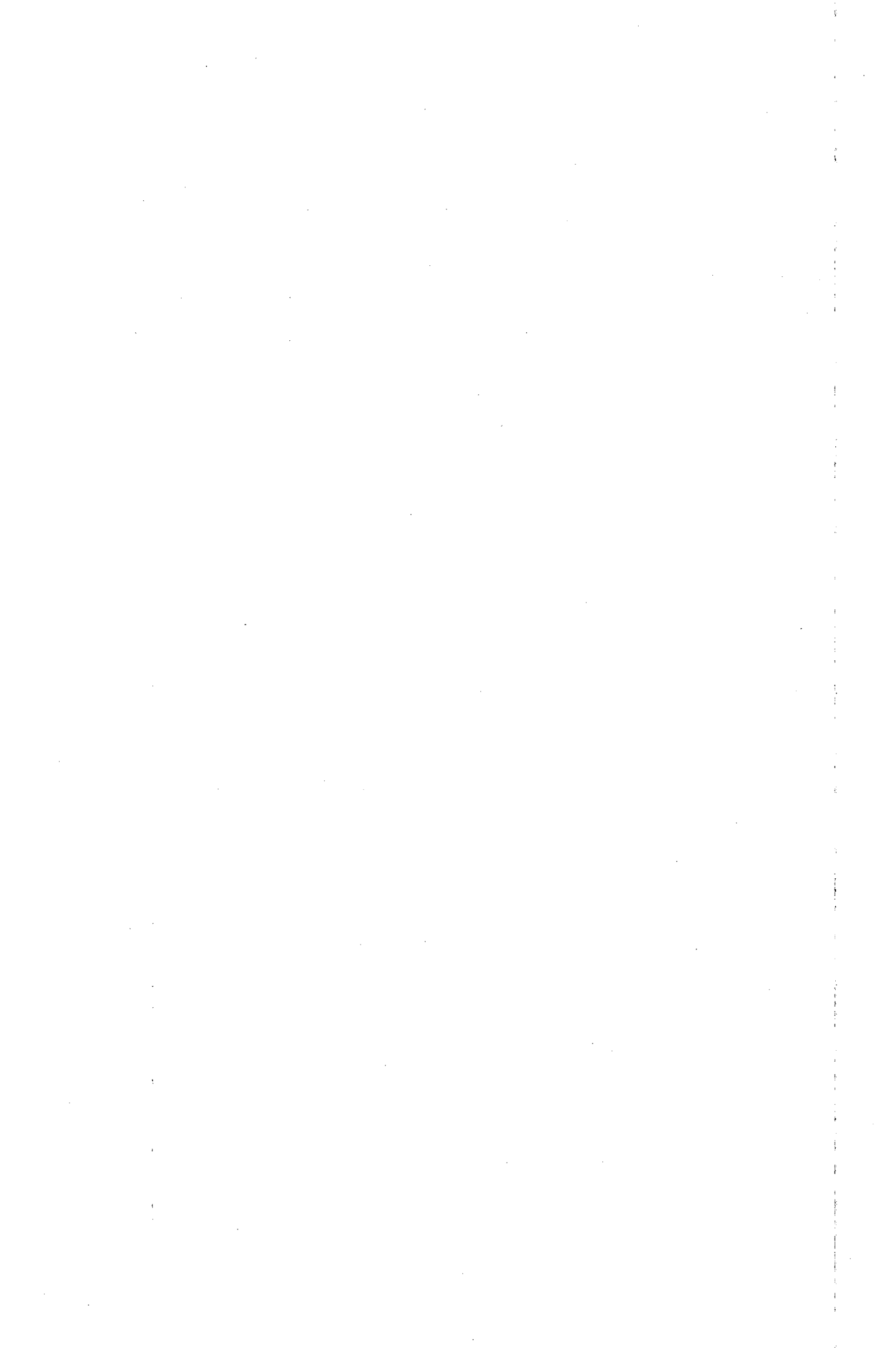


ESPÈCIE	LLOC	TECNICA	PREVAL	REF
<i>P.leucopus</i>	EEUU	ELISA	25.1%	Magnarelli et al. 1988
<i>A.sylvaticus</i>	França	HP	28.4%	
<i>C.glareolus</i>	França	HP	5.7%	
<i>S.floridanus</i>	EEUU	ELISA	56%	Magnarelli et al. 1990
<i>O.cuniculus</i>	Itàlia	IFI	15%	Virga et al. 1992
<i>S.scrofa</i>	França	HP	19.7%	Doby et al. 1992
<i>C.capreolus</i>	França	HP	18%	Idem
<i>C.elaphus</i>	França	HP	20%	Idem
<i>O.virginianus</i>	EEUU	ELISA	56%	Magnarelli et al. 1985
<i>P.lotor</i>	EEUU	ELISA	15%	Idem
<i>V.vulpes</i>	França	HP	42.8%	
<i>C.lupus</i>	EEUU	IFI	2.5%	
<i>C.familiaris</i>	Suïssa	IFI	10.1%	

Tabla x: Espècies animals i seroprevalença de *B.burgdorferi*.

Els rosegadors, desenvolupen un important paper epidemiològic en la transmissió i manteniment de la malaltia de Lyme tant a Europa com als EEUU. Als EEUU és *Peromyscus leucopus*, el ratolí de potes blanques, el principal reservori de la malaltia i hoste de la paparra vectora *Ixodes scapularis* (Levine et al. 1985)

En *P.leucopus* s'ha detectat espiroquetúria persistent durant llargs períodes de temps, la qual cosa fa pensar que la orina podria constituir una altra via de transmissió de *B.burgdorferi* entre poblacions de *P.leucopus* (Bosler i Schulze, 1986).



Diferents espècies del gènere *Apodemus*, *Apodemus agrarius* (Matuscka et al. 1991), *A. flavicollis* (Hovmark et al., 1988), *A. sylvaticus* (Nuncio et al. 1995) (Matuscka et al. 1991) constitueixen els reservoris de la malaltia a Europa. És important destacar que *Apodemus* spp. ocupa el mateix nínxol ecològic a Europa que *P. leucopus* als EEUU (Hovmark et al. 1988).

També s'ha assenyalat el campanyol (*Clethrionomys glareolus*) com a possible reservori (Hovmark et al. 1988) (Vitoz et al. 1990). Doby i col. (1991) detecten una positivitat superior al 28% enfront de *Borrelia burgdorferi* en *A. sylvaticus*, éssent aquest inferior al 6% en el cas de *C. glareolus*. Tant *A. sylvaticus* com *C. glareolus* són presents a la Península Ibèrica (Gosalbez, 1987), mentre que *A. agrarius* es troba confinat a l'Europa central i de l'est (Matuscka et al. 1991).

L'erició europeu *Erinaceus europaeus* constitueix un altre reservori competent de *B. burgdorferi*. Aquesta espècie, pot suportar una elevada tasa de parasitació per estadis immadurs de *I. ricinus* i és capaç de permetre la circulació de la soca de *B. burgdorferi* a través de les paparres a altres hostes reservoris com *A. sylvaticus* (Gray et al. 1994).

També els lagomorfs actuen com a reservoris de la malaltia de Lyme a Europa. Les llebres (*Lepus europaeus* i *Lepus timidus*) apareixen involucrades en l'epidemiologia de la malaltia, actuant com a suport tròfic de tots els estadis d'*Ixodes ricinus* i com a reservoris (Talleklint i Jaenson, 1993). Aquests autors, en el mateix treball, demostren el manteniment per part de les llebres de poblacions d'*Ixodes ricinus* infectades per *Borrelia burgdorferi* en ecosistemes on hi són absents els rosegadors. Igualment, els lagomorfs també intervenen en el cicle salvatge de la malaltia de Lyme als EEUU, en concret el conill de cua de cotó, *Sylvilagus floridanus*, juga un paper de reservori (Telford III i Spielman, 1989). A nivell experimental, Burgdorfer (1984) demostra la capacitat del conill per a desenvolupar espiroquetèmies de suficient magnitud com per a infectar posteriorment noves paparres.

Pel que fa referència al cànids salvatges, tot i que la detecció d'anticossos en llops i en guineus reflexa l'exposició a *Borrelia burgdorferi*, es desconeix si desenvolupen una espiroquetèmia de suficient magnitud per a infectar noves paparres i considerar-los reservori de la malaltia (Thieking et al. 1992) (Kazmierczak i Burgess, 1989)

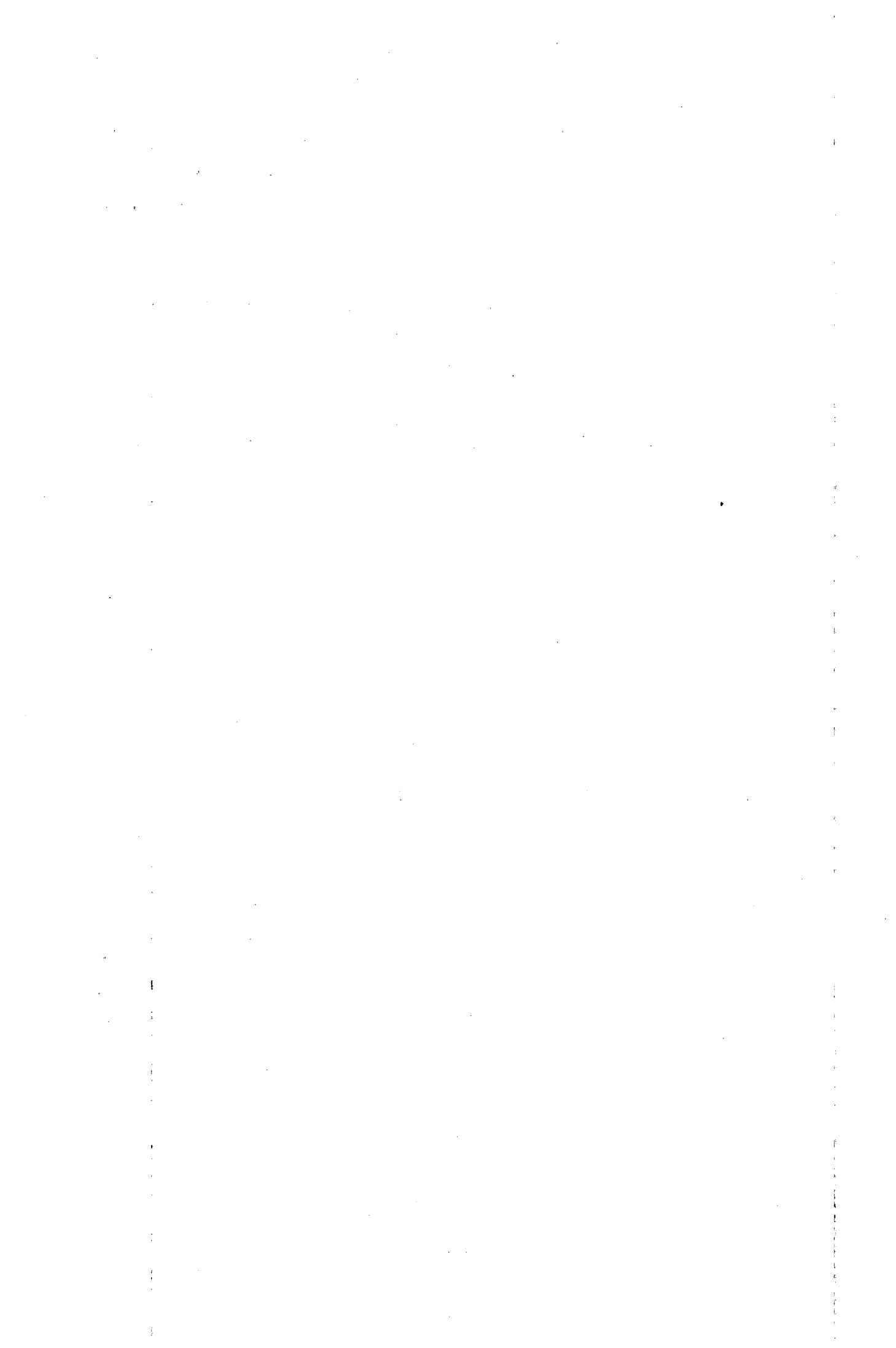
D'altres espècies com el cèrvol (*Odocoileus virginianus*) o el cabirol (*Capreolus capreolus*), no constitueixen uns reservoris competents sinó simplement actuen com a suport tròfic de les paparres (Jaenson i Tälleklint, 1992) (Teford II et al. 1988).

D'altra banda, algunes espècies d'aus, especialment de la família Turdidae, juguen un paper important especialment en relació a la disseminació de l'espiroqueta (Gray 1996) ja que actuen com a hostes de les fases immadures d'*Ixodes ricinus*. Estrada i col. (1995) detectaren una prevalença enfront de *B.burgdorferi* superior al 50% en nimfes de *I.ricinus* i *I.frontalis* capturades sobre aus de la Família Turdidae.

Cicle Domèstic

El gos és capaç de transmetre espiroquetes a les fases immadures de la paparra constituïnt, per tant, un reservori de la malaltia. Els resultats obtinguts per Burgess (1986) després d'inocular experimentalment beagles amb *B.burgdorferi*, demostren l'important paper que pot desenvolupar el gos en l'epidemiologia de la malaltia. El gos pot ser portador de l'espiroqueta durant llargs períodes de temps -sense manifestar necessàriament simptomatologia clínica- i actuar com a hoste pels estadis nimfals i adults d'*I.scapularis*, de manera que pot constituir una font d'infecció per a les paparres (Burgess, 1986).

Cal destacar que si bé *Ixodes ricinus*, la principal paparra vectora a Europa, té com a principals hostes els remugants, inoculacions experimentals de *B.burgdorferi* en ovelles no han evidenciat cap simptomatologia clínica, ni canvis hematològics ni resposta immunitària (Stuen i Fridriksdóttir, 1991). Tanmateix, els mateixos autors descriuen dos casos clínics en ovelles on es sospita de Borreliosis de Lyme basant-se en una simptomatologia compatible, seroconversió i procedència de zones altament parasitades per *I.ricinus*, l'aïllament del patògen a partir de diferents mostres clíniques fou infructuós (Fridriksdóttir et al. 1992).



3.3. ALTRES VIES DE TRANSMISSIÓ

Com ja hem vist, la transmissió de la malaltia de Lyme es produeix principalment per picada de paparres, de les que ja hem parlat en l'apartat anterior. Diversos autors, però, han assenyalat altres vies de transmissió.

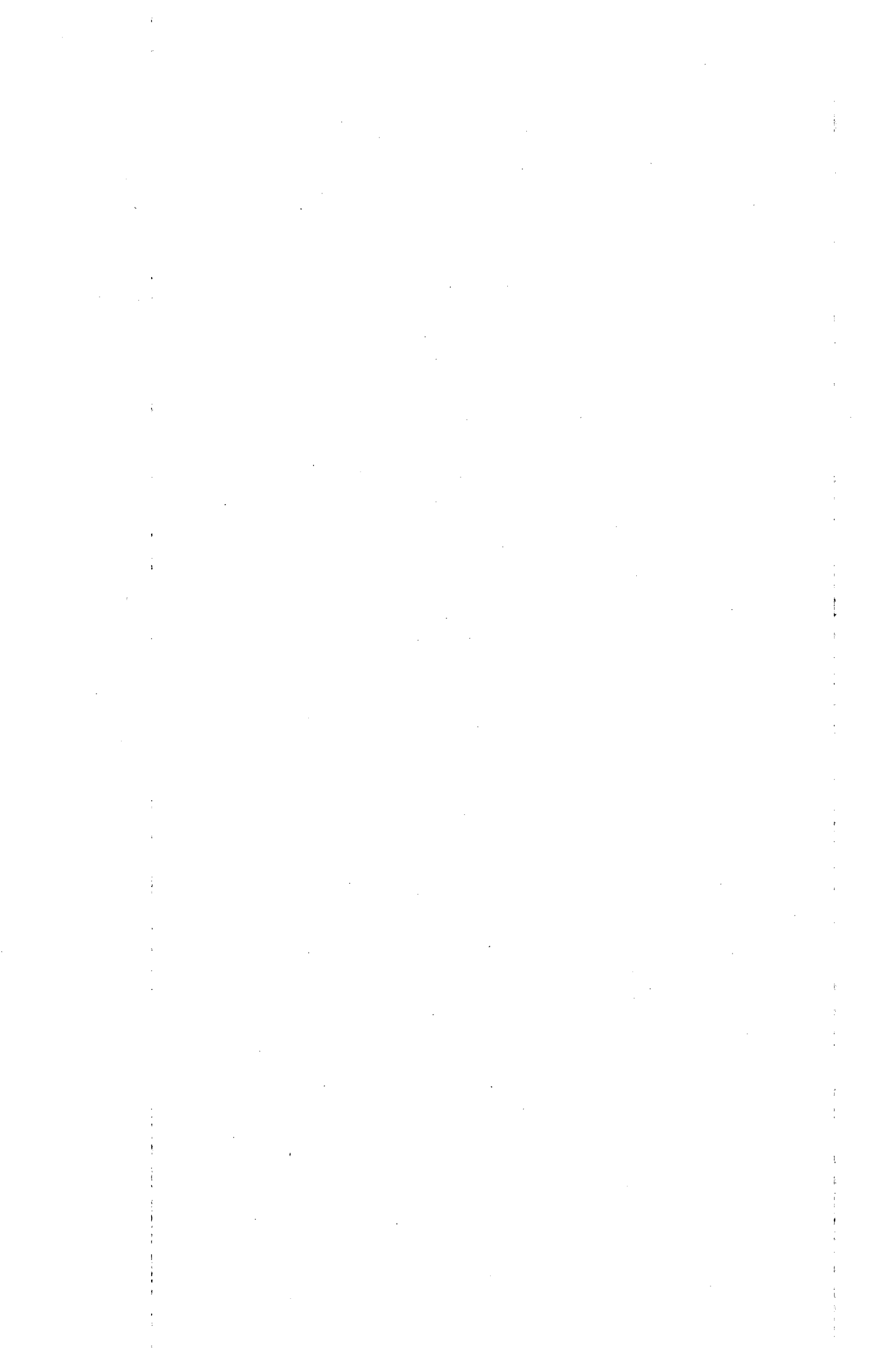
* L'eliminació d'espiroquetes per orina durant un període de temps prolongat suggereix la possibilitat d'una transmissió de *B.burgdorferi* per contacte directe, en absència del vector (Burgess, 1986). Cerri i col.(1994) infectaren experimentalment beagles amb una soca italiana de *B.burgdorferi* aïllada en *I.ricinus*. Només un dels gossos esdevingué infectat -sense manifestar simptomatologia clínica- i en el qual es detectaren espiroquetes en sang i orina 3-4 setmanes post-infecció. En aquest moment, es deixà un dels gossos control amb el gos infectat, presentant el primer una serconversió 4 setmanes després.

* També s'ha demostrat experimentalment la transmissió intrauterina en gossos, constituint aquesta una altra via a partir de la qual els cadells podrien esdevenir infectats en absència de la paparra vectora (Gustafson et al.1993). La transmissió transplacentària s'ha demostrat també en *Mus musculus* i *Peromyscus domesticus* (Burgess et al. 1993)

3.4. SITUACIÓ EPIDEMIOLÒGICA

3.4.1. CATALUNYA

La notificació microbiològica de *Borrelia burgdorferi* des de l'any 1994 fins al mes de febrer de 1997 publicada al Butlletí Epidemiològic de Catalunya indica 56 casos l'any 1994, 28 durant 1995, 4 l'any 1996 i 1 fins al mes de febrer de l'any en curs. (BEC. volum XVII gener 96).



En un estudi sero-epidemiològic realitzat durant 1993-94 a la comarca del Vallès Occidental es detectà una prevalença en l'espècie humana del 4.4% (Segura i col., 1994).

Respecte a la població canina es realitzà un estudi a la província de Girona durant 1996, detectant una prevalença del 2% (Ortuño et al. 1996 pòster AVEPA).

3.4.2. ESPANYA

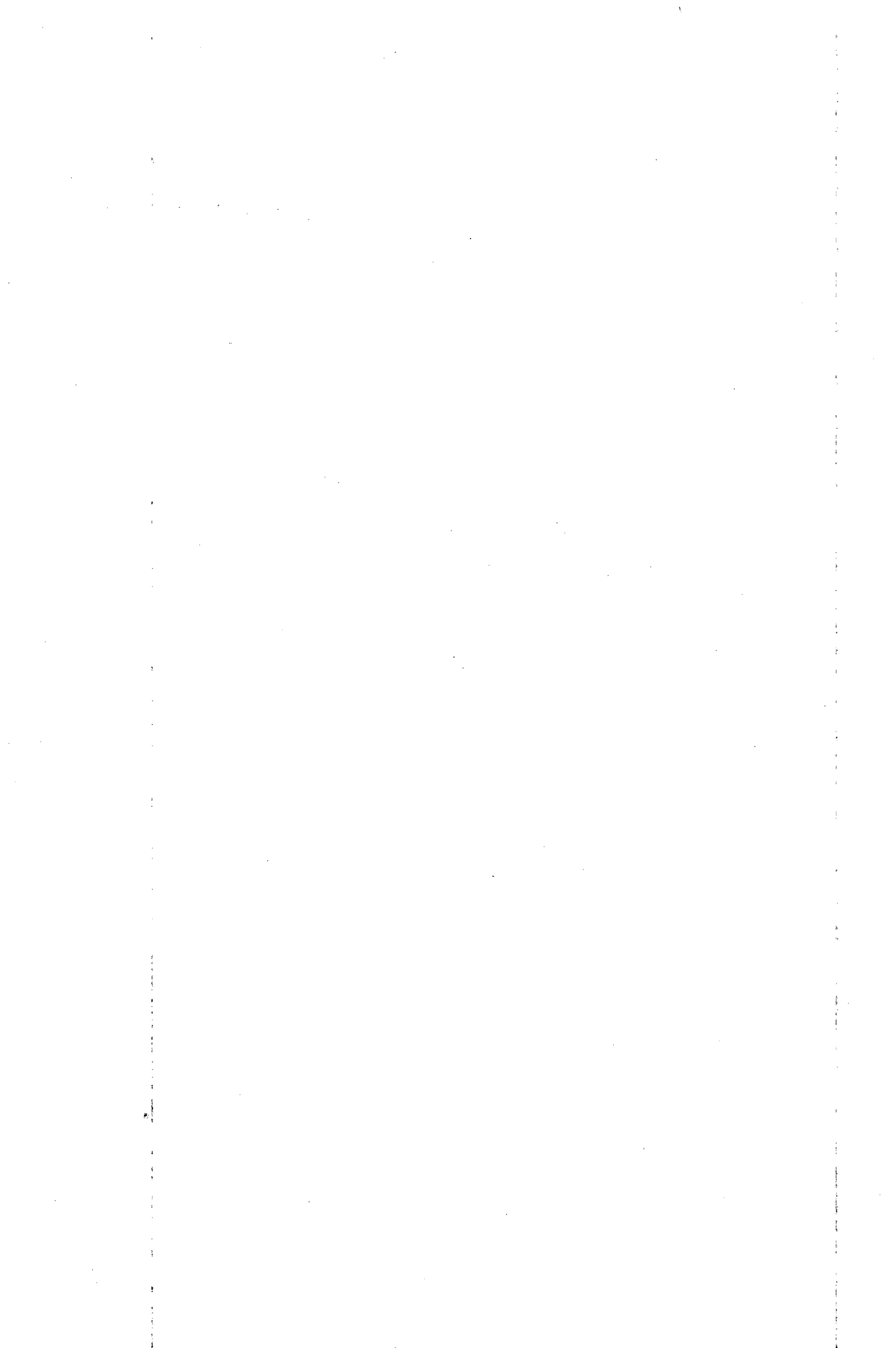
Durant els anys 1994, 1995 i 1996 la notificació microbiològica de *Borrelia burgdorferi* a l'Estat Espanyol fou de 88, 31 i 9 casos respectivament. (BES. 1996. Vol 4 (42): 353-364).

En un estudi de seroprevalença realitzat l'any 1989 a Espanya en l'espècie humana per Anda P. i col., es detectà una prevalença del 9%, observant-se una disminució dels casos de nord a sud, així el 41% dels pacients positius procedien del nord mentre que només el 26% procedien del sud (Anda et al. 1993).

Respecte a la població canina, Delgado i Cármenes detectaren una prevalença del 21% en gossos a Castilla-León (Delgado i Cármenes, 1995)

4. QUADRE CLINIC

La borreliosis de Lyme afecta principalment a l'espècie canina i humana. S'han descrit casos a ovelles (Fridriksdottir et al. 1992), cavalls (Madigan 1993) i vaques (Parker i White, 1992). Als gats s'han detectat anticossos però no s'ha descrit mai simptomatologia clínica (May et al. 1994) (Powers et al. 1994) (Magnarelli et al. 1990).



Espècie canina

Només un baix percentatge de gossos exposats a *Borrelia burgdorferi* desenvolupa símptomes compatibles amb la malaltia de Lyme (Breitschwerdt 1993). Es desconeixen quins factors intervenen en l'aparició o no de manifestacions clíniques (Burgess 14); sembla ser que la presència d'altres malalties recurrents o estats d'immunodeficiència afavoriran la presentació de símptomes (Breitschwerdt, 1993).

El quadre clínic es caracteritza per una artritis oligoarticular que es pot produir tant en les fases agudes com les cròniques. De fet, el dipòsit d'immunocomplexes circulants al líquid sinovial sembla ser el responsable de les manifestacions cròniques (Breitschwerdt, 93 Vet.Techn.).

Els signes observats en el quadre agut són febre, letàrgia, apatia, anorexia, dolor articular inespecífic i rigides d'aparició aguda (Green, 1991). Les articulacions més freqüentment afectades són el carp i el tars (Levy et al. 1993). En les manifestacions cròniques, apareix una artritis recurrent i intermitent (Levy i Dreesen, 1992). Aproximadament el 33% dels gossos amb manifestacions clíniques pateixen diferents episodis de coixera en intervals de temps que oscil·len entre 1 i 23 mesos (la mitjana sol ésser de 11 mesos) (Breitschwerdt, 1993).

Altres síndromes associades a la borreliosis de Lyme però de presentació molt menys freqüent són: alteracions cardíques amb bloqueig atrioventricular de segon grau (Breitschwerdt, 1993) (Green, 1991); nefropaties; alteracions neurològiques o neuroborreliosis, Mckenna i col. (1995) descriuen un quadre de paràlisi dels parells cranials amb disfàgia en gossos diagnosticats de borreliosis de Lyme que prèviament havien mostrat una simptomatologia articular i postració; alteracions oftalmològiques amb uveïtis (Munger 1990). Les lesions dèrmiques poden passar desapercebudes en el gos, Pfister i col. (1989) descriuen dermatitis associada a la infecció per *Borrelia burgdorferi* en gossos.

Fins a l'actualitat, no s'ha descrit cap cas clínic provocat per *Borrelia afzelli* o *B. garinii* en el gos.



Espècie humana

Tot i que el signe més característic de la malaltia a l'espècie humana és l'eritema crònic migratori i quan apareix és similar arreu del món, no passa el mateix amb la resta de manifestacions clíniques així com tampoc amb la severitat del procés ni amb la freqüència de presentació d'alguns símptomes. Aquest fet podria ser una conseqüència de les variacions regionals de les diferents genoespècies de *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

A Europa, la majoria dels aïllaments corresponen a *Borrelia afzelii* que apareix relacionada en casos d'acrodermatitis i *Borrelia garinii* particularment associada a manifestacions neurològiques (Stanek et al. 1996). Als USA, en canvi, gairebé tots els aïllaments corresponen a *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, responsable de quadres articulars.

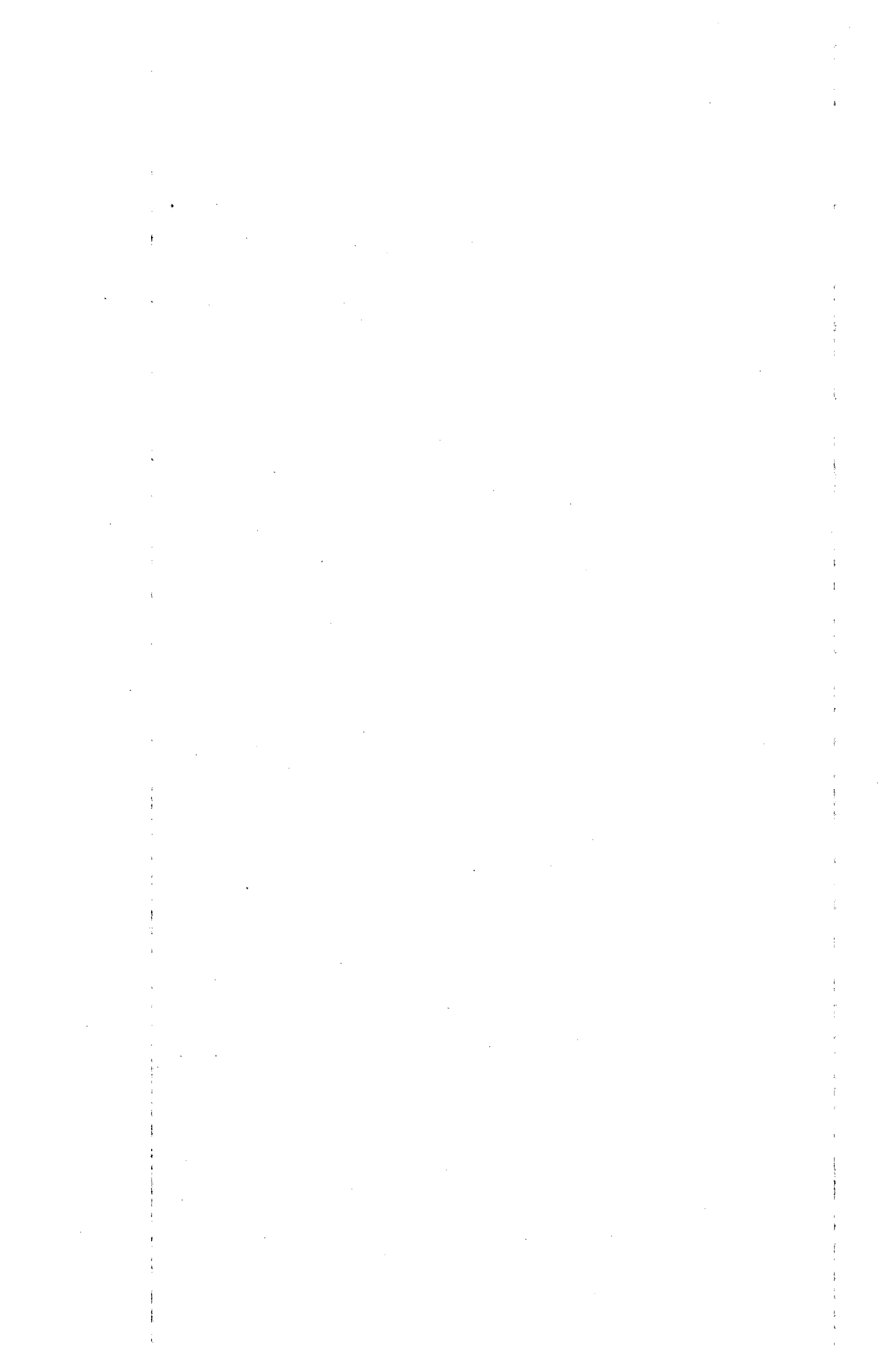
5. METODES DE DIAGNÒSTIC

Els criteris diagnòstics per a la borreliosis de Lyme es basen en aspectes clínics, epidemiològics i serològics (Arzouni et al. 1993). És obvi que la detecció directa i posterior aïllament del patògen és la prova més específica però, les dificultats tècniques que ofereix aquest microorganisme per al seu aïllament a nivell laboratorial, així com la baixa concentració de les borrelies en les teixits (Barbour, 1984) fan que, en l'actualitat, sigui d'elecció el diagnòstic serològic (Oteo, 1994).

5.1. Diagnòstic directe

** Detecció d'espiroquetes en les paparres

A les nimfes i als adults, les espiroquetes es concentren sobretot a nivell del budell mig de la paparra (Burgdorfer i Gage, 1986). La detecció d'aquestes en les paparres es fa a partir de la dissecció de budell mig en els especimens adults, en el cas de les nimfes i larves es realitza un frotis de tota la paparra triturada (Lane i Burgdorfer, 1988). La visualització de les espiroquetes es porta a terme a partir de microscopia de camp fosc,



immunofluorescència directa (IFD) o immunofluorescència indirecta (IFI) (Burgdorfer, 1984) (Burgdorfer et al. 1985) (Magnarelli, 1987).

En el cas de la IFD s'utilitza una immunoglobulina de conill enfrontada a la soca americana B31 marcada amb fluoresceïna. En el cas de la IFI s'han emprat anticossos monoclonals murins (H5332) els quals reconeixen la principal proteïna de superfície de *B.burgdorferi* comuna als aïllaments del patògen a Nord-Amèrica (Magnarelli, 1987) (Magnarelli et al. 1993).

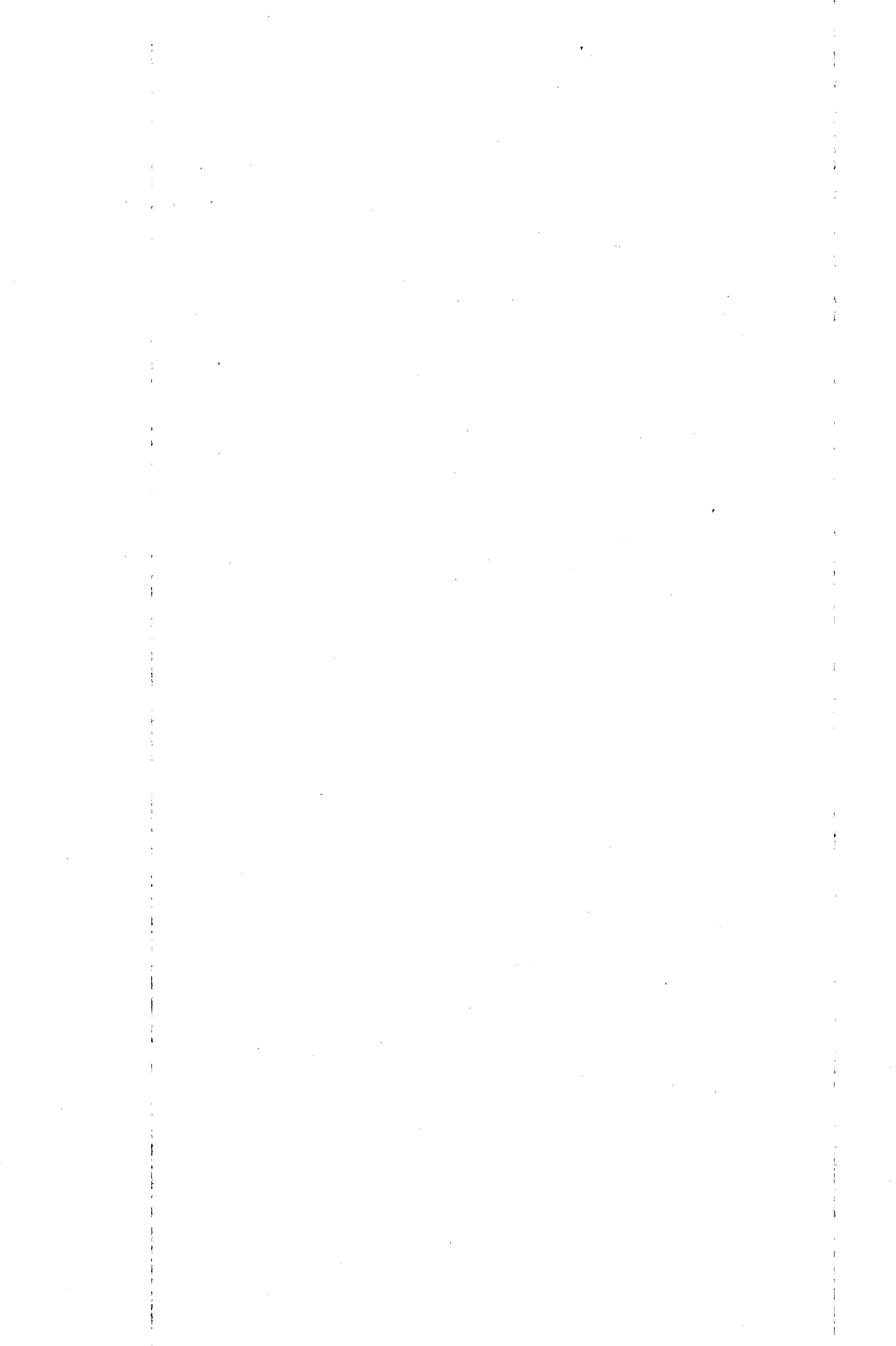
Lane i Burgdorfer (1988) processen els frotis de budell mig o de paparres senceres triturades per Immunofluorescència directa usant un conjugat polivalent de conill enfront de *Borrelia burgdorferi*. Les mostres positives són processades per una IFI usant anticossos monoclonals murins H9724 que reconeix els membres del gènere *Borrelia* i H5332 específics de *Borrelia burgdorferi* soca B-31. Observen que els especimens que havien presentat un fluorescència reduïda en l'IFD no reaccionaven enfront dels anticossos monoclonals específics de la soca B-31, la qual cosa suggereix que la utilització d'un conjugat polivalent reacciona de forma inespecífica.

Burgdorfer et al.(1985) observen una disminució de la fluorescència en altres teixits que no siguin budell mig , la qual cosa, suggereixen, podria ser un reflexe de condicions fisiològiques adverses per al desenvolupament de les espiroquetes a l'hemocele.

** Xenodiagnòstic

El xenodiagnòstic és un mètode proposat per Brumpt l'any 1914 que involucra l'ús d'un artròpode vector no infectat el qual s'alimenta sobre un individu suposadament malalt i on el patògen es multiplica facilitant la seva detecció (Harwood i James, 1987).

Paparres no infectades (generalment larves) es dipositen sobre hostes infectats de forma natural o experimental. La detecció de les borrelies en les paparres repletes o mudades es realitza mitjançant diferents tècniques com el cultiu, immunofluorescència o PCR (Randolph et al. 1996).



La capacitat d'una espècie animal per a actuar com a reservori d'un patògen vehiculat per paparres es pot realitzar a partir del xenodiagnòstic o bé comparant el nivell i la durada de la infecció en l'hoste amb la infecció umbral mínima necessària per a infectar una determinada proporció de paparres determinada experimentalment (Randolph et al. 1996).

Si bé aquesta tècnica no té, ara per ara, una aplicació pràctica, sí que s'utilitza a nivell experimental per a valorar la capacitat de determinats models animals per actuar com a hostes i reservoris de les paparres i de les malalties que aquestes transmeten. Burgdorfer (1984) utilitza el conill blanc neozelandès com a reservori experimental per a infectar paparres amb espiroquetes. Els gèrbids (*Meriones unguiculatus*) produeixen una espiroquetèmia aparent quan han estat prèviament esplenectomitzats (Krampitz H.E. 1986). El mateix autor considera el gèrbid com a excel·lent hoste, en el qual cada fase de *Ixodes ricinus* pot infectar-se a partir de la ingesta de sang i l'hoste pot infectar-se a partir de la picada de la paparra; àdhuc aconsegueix provocar la infecció gèrbid a gèrbid mitjançant la inoculació via intraperitoneal de sang infectada que prèviament ha estat congelada i criopreservada. Sonnesyn S.W. i col. (1993) suggereixen el conill porquí com a nou model animal per a l'estudi de les interaccions hoste-espiroqueta, apunten, però, que la susceptibilitat a la infecció depèn de l'edat de l'animal observant que conills porquins de més de 6 mesos d'edat mostren resistència a la infecció degut a que el sistema immuntari ja està totalment desenvolupat. Richter i col (1996) utilitzen el xenodiagnòstic com a tècnica per a detectar la capacitat de dues espècies de *Ixodes* -*I. scapularis* i *I. pacificus*- per a la transmissió de la borrelia usant hostes murins.

** Detecció a partir de mostres clíniques

La detecció de *Borrelia burgdorferi* en mostres clíniques es pot realitzar a partir de tècniques com la immunofluorescència indirecta, microscopia en camp fosc, tincions com Giemsa o argèntiques com la tinció de Warthin-Starry (Kornblat et al. 1984) o immunoperoxidasa a partir de biòpsies de pell.



** Aïllament

L'aïllament de *Borrelia burgdorferi* a partir de paparres es realitza inoculant budell mig o, en cas d'infeccions generalitzades, altres teixits com glàndules salivars, ovari o hemolimfa en medi Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK) a 32°C durant 6 setmanes. Setmanalment s'examinen els cultius per microscopia de camp fosc (Livesley et al. 1994)(Miyamoto et al., 1992)(Pelz et al., 1989).

També s'ha aconseguit l'aïllament d'espiroquetes a partir de mostres clíniques com sang, biòpsies de pell o líquid cefaloraquidi (81) mitjançant el cultiu en medi BSK II modificat (81)(Benach et al., 1983)(Berger et al., 1985). Tanmateix, la sensibilitat de la tècnica és baixa, oscil.lant entre 30-70% en biòpsies de pell i inferior al 5% pel cultiu realitzat a partir de líquid cefaloraquidi (Asbrink i Hovmark, 1985)(Karlsson et al. 1990).

El cultiu de borrelia és difícil, sovint requereix llargs períodes de temps per a donar un resultat positiu, a més a més, generalment la concentració d'espiroquetes sia a la sang sia als fluids corporals és baixa . És per aquests motius que l'aïllament no sigui una tècnica de rutina per a la detecció en especímens clínics (Kaufman et al. 1993).

Les tècniques de biologia molecular, concretament l'amplificació de cadenes de la polimerasa (PCR) constitueixen el mètode més sensible i específic per a la detecció d'espiroquetes. Tanmateix, els resultats de la PCR depenen de la concentració d'espiroquetes en les mostres. La sensibilitat de la tècnica aplicada en biòpsies de pell és alta; no així quan s'aplica sobre mostres de sang ja que l'espiroquetèmia és transitòria i només es poden esperar resultats òptims al principi de la infecció (Schmidt, 1997). Sembla ser que la orina pot constituir una mostra adequada per al diagnòstic (Schmidt, 1997).

5.2. Diagnòstic indirecte.

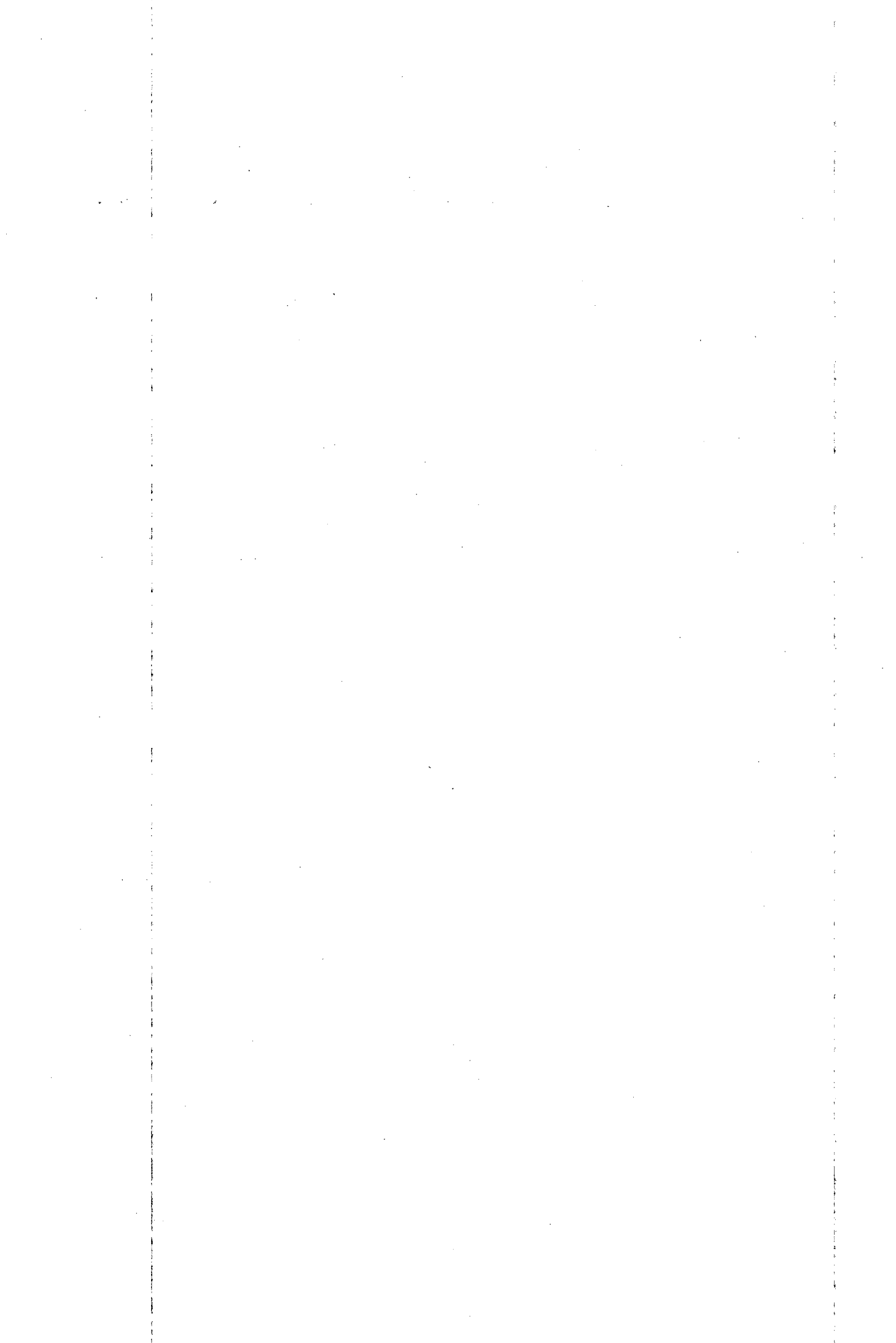
La confirmació de la infecció es basa en la detecció d'anticossos (IgM o IgG o ambdues) mitjançant proves serològiques (Rusell et al. 1984). Els nivells de IgM augmenten al principi de la malaltia (entre la 3a i 6a setmana) per anar disminuint gradualment; les IgG es mantenen a nivells baixos durant les primeres setmanes però aconseguen nivells màxims mesos després i poden romandre elevades durant anys (Graft et al. 1984). Segons Magnarelli (1991) la seroconversió durant la fase inicial de la malaltia és un indicatiu força concluent d'infecció activa.

En qualsevol cas, el diagnòstic de la malaltia no es pot basar exclusivament en títols d'anticossos. Un resultat positiu indica infecció o exposició prèvia però no vol dir que l'animal estigui malalt (Burgess et al. 1989) (Green et al. 1988).

Les tècniques serològiques més comunament emprades són la Immunofluorescència Indirecta (IFI) i l'ELISA, éssent aquesta última la més sensible i específica (Graft et al. 1984). Tanmateix, durant els primers estadis de la malaltia ambdues tècniques mostren una sensibilitat baixa (Arzouni et al. 1993) (Magnarelli, 1988). Per aquest motiu s'han desenvolupat altres mètodes com l'Immunoblot que, en determinats casos, pot constituir el millor mètode per al diagnòstic serològic de la malaltia (Gordzicki i Steere, 1988), tot i que s'ha de tenir en compte la gran heterogenicitat observada en els patrons d'immunoblot depenent de les diferents soques de *Borrelia burgdorferi* emprades com a antígen (Green et al. 1988).

En l'actualitat, el Westernblot és la tècnica confirmatòria del diagnòstic de la malaltia de Lyme (Arzouni et al., 1993) (Banerjee et al. 1996) ja que es tracta d'una tècnica sensible i específica, d'elecció per a estudis seroepidemiològics.

La presència d'altres soques fa imperativa la utilització d'antígens més específics que permetin un diagnòstic vàlid de la infecció tant en animals com en l'espècie humana. Els antígens més específics són p100 -específic de gènere-, p41 -proteïna flagellar-, OspA -rar a Europa- i el pC -immunodominant a Europa i que permet la detecció precoç d'anticossos- (Bruckbauer et al. 1992). El mateix autor assenyala els antígens p100, p41 i el pC com els més adequats per al serodiagnòstic. Doby et al. (1992) demostra en un



estudi serològic realitzat a França que la utilització d'una soca francesa autòctona de *Borrelia* com a antígen permet detectar un major nombre de positius que no pas si s'usa la soca de referència americana B-31 com antígen. Artursson et al. (1994) desenvolupen una tècnica de IFI usant com antígen *Borrelia afzelii* per a un estudi seroepidemiològic portat a terme a Suècia.

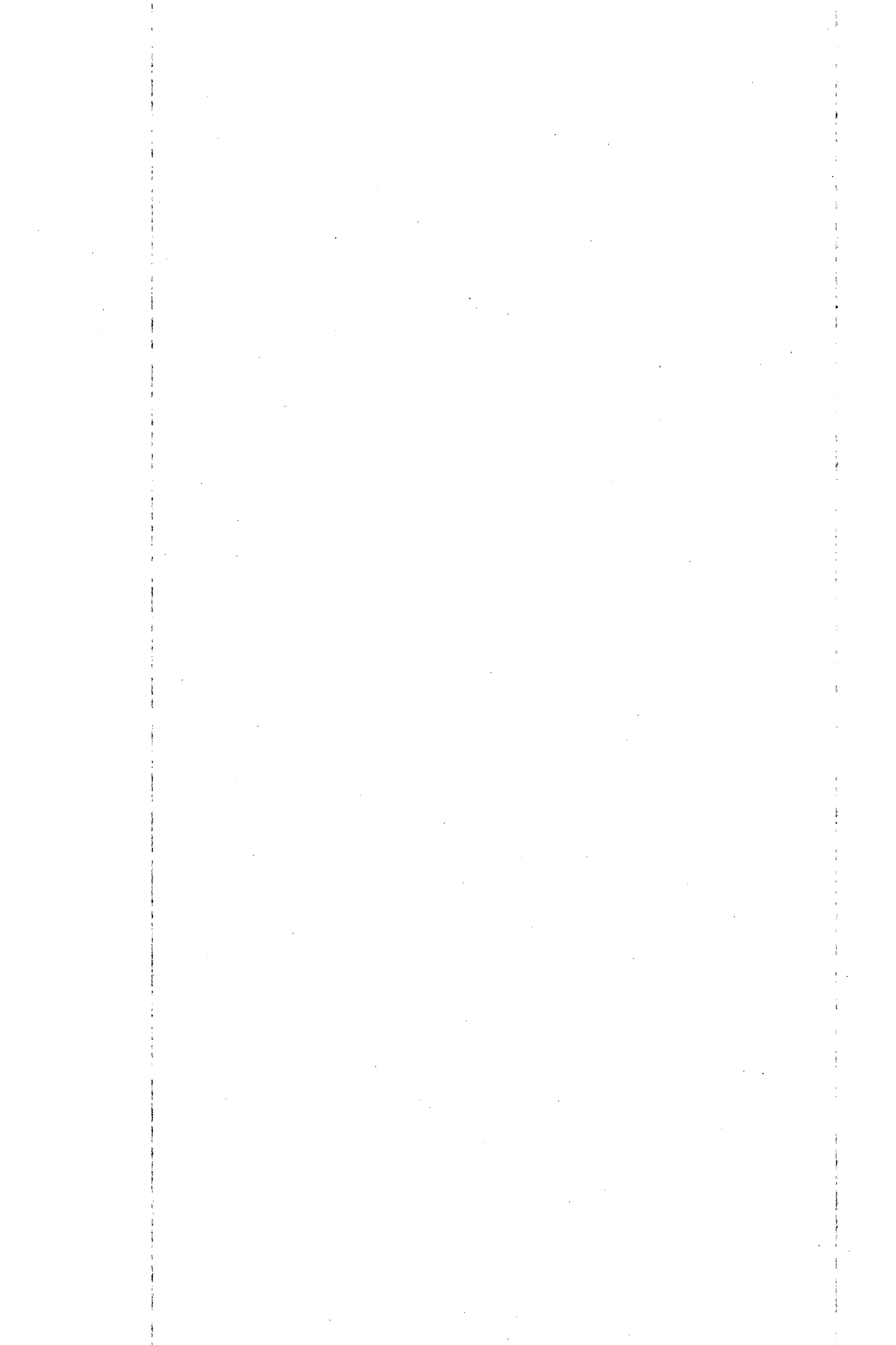
Els principals inconvenients del diagnòstic serològic són: baixa sensibilitat en les infeccions precoç, reaccions creuades i incapacitat de distingir entre infeccions actives o passades degut a la persistència d'anticossos (Magnarelli et al. 1990).

5.3. Reaccions creuades

Tant en IFI com en ELISA, es descriuen reaccions serològiques creuades amb altres espiroquetes conseqüència de la presència d'antígens comuns (Johnson, 1977). Aquestes reaccions creuades es produeixen enfront de treponemes -sia patògens o sapròfits- i diferents serovars de leptospira (Sugiyama et al. 1993)(Bruckbauer et al. 1992)(Russell et al. 1984)(Shin et al. 1993).

Shin et al. (1993) observen en gossos que els anticossos enfront de leptospira reaccionen més enfront d'antígen de *Borrelia burgdorferia sensu lato* que no pas al contrari; això fa pensar que la vacuna enfront de leptospira podria interferir en la interpretació dels resultats serològics enfront de la borreliosis de Lyme. Altres autors, en canvi, afirmen que la vacuna enfront de leptospira no causa resultats falsos positius en les serologies de Lyme per IFI. Així ho constata Donoghue et al. (1989) però cal tenir en compte que l'autor estableix un cut-off superior o igual a 1/320.

Respecte als treponemes, aquests formen part de la flora sapròfita de les mucoses dels mamífers. Determinades espècies, però, són patògenes com *Treponema pallidum* causant de la sífilis de l'home. D'altra banda, el conill és sensible a *Treponema paraluis-cuniculi*, agent etiològic de la sífilis del conill. També un determinat nombre d'espècies de treponema estan implicades en processos periodontals tant en l'espècie canina com humana. Gossos amb malalties periodontals donen resultats falsos positius en el diagnòstic serològic de Lyme (Van Veen i col. (1993)(Magnarelli et al. 1987).



Tot això fa imperatiu la preabsorció dels sèrums en *Treponema phagedenis* (Bruckbauer et al. 1992) o en un sonicat de Treponemes de Reiter (Rusell et al., 1984) com a immunosorbent amb l'objectiu d'eliminar aquestes reaccions inespecífiques. Virga i col () en un estudi seroepidemiològic en conills de bosc, observen un prevalença enfront de *B.burgdorferi* molt més elevada en sèrums que no han estat adsorbits concluent que l'adsorció dels sèrums en un immunosorbent de *T.phagedenis* agaranteix una bona especificitat dels resultats. Amb el mateix objectiu, en els estudis de seroprevalença realitzats en l'espècie humana, les mostres positives són processades per una IFI de Treponema (Anda et al. any).

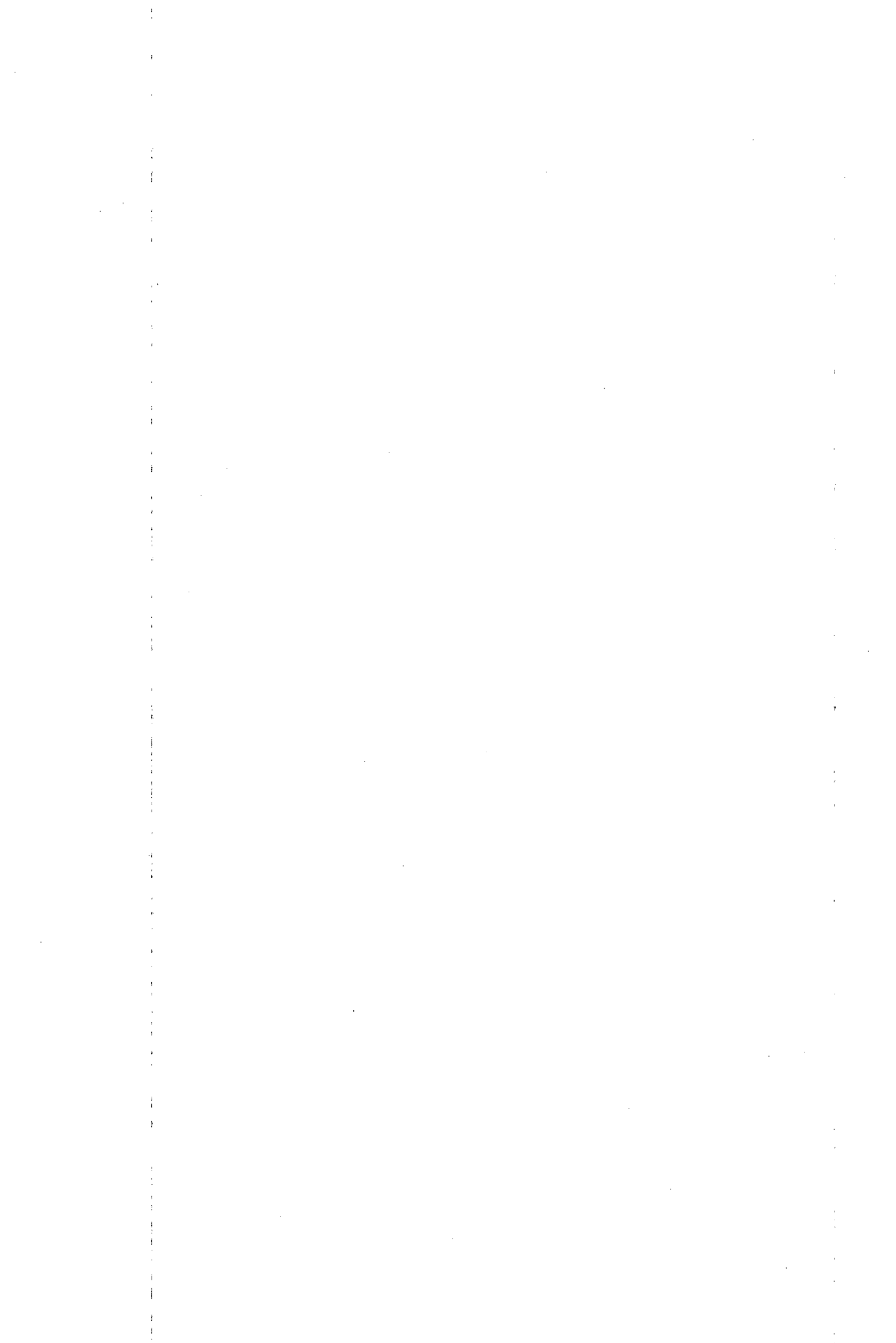
6. RESPOSTA IMMUNITÀRIA DEL GOS.

La seropositivitat en el cas del gos no constiuix un indicador pel desenvolupament posterior de simptomatologia clínica (Levy i Magnarelli, 1992)(Green, 1989). Gossos aparentment sans poden presentar anticossos enfront de la borrelia (Magnarelli et al. 1990). Si bé, les IgM romanen durant un període de temps curt, en determinats casos, aquestes han persistit durant llargs períodes de temps, possiblement com a conseqüència de la persistència de *B.burgdorferi* en els teixits (Magnarelli et al. 1990). Les IgG, en canvi, romanen durant molt de temps -mínim 2 mesos-; Green et al. (1988) detecten IgG en gossos infectats experimentalment durant 8 mesos post-infecció.

La persistència de IgM o IgG pot indicar la persistència del patògen, tot i que no s'ha de descartar la possibilitat d'exposicions repetides a paparres vectoros infectades (Magnarelli et al. 1990). En el mateix treball, l'autor no observa canvis en el títol d'anticossos -o aquests són molt lleus- en gossos convalescents tractats ni en gossos assintomàtics dos o més mesos després de prendre la primera mostra.

7. TRACTAMENT

El microrganisme és altament sensible a les tetraciclins, l'ampicilina, l'amoxicilina i la ceftriaxona. En les fases inicials de l'afecció es recomanable el tractament amb doxicil.lina. Per als infants és d'elecció l'amoxicilina degut als escassos efectes secundaris. La ceftriaxona s'utilitza en aquells casos que presenten complicacions a nivell cardíac, neurològic o articular (Oteo, 1994)



III. CONTROL I PROFILAXI DE LES MALALTIES TRANSMESSES PER PAPPARRES

La profilaxi de les malalties transmeses per paparres ha d'anar dirigida al vector. És important evitar el contacte amb les paparres mitjançant una cultura sanitària adequada.

La desparasitació sistemàtica dels animals de companyia així com dels locals, gosses etc. on aquests hi viuen constituïran les mesures profilàctiques més importants per aplicar en l'ambient domèstic. En les sortides al camp, especialment en zones de risc (Estrada, 1997), l'estratègia a seguir per evitar entrar en contacte amb les paparres serà anar provist de roba clara que cobreixi turmells, braços i cap, aplicar repel.lents sobre la roba així com la inspecció minuciosa de la roba i el cos constituïran les estratègies de control (Oteo, 1995)(Annals p.218).

Donat que la paparra necessita està adherida a la pell durant varies hores - 20h. en el cas de *R. conorii* i 24h. en el cas de *B.burgdorferi* abans de ser capaç de transmetre el patògen, la mesura preventiva més eficaç serà l'eliminació de la paparra el més aviat possible.

Segons Oteo i col.(1996) l'eliminació de les paparres mitjançant pinces redueix significativament el risc de complicacions i d'infeccions transmeses per l'artròpod. Respecte a la profilaxis antibiòtica, el mateix autor suggereix que, amb l'objectiu de racionalitzar l'ús profilàctic dels antibiòtics, és important conèixer el percentatge d'espècies de paparres infectades per *B.burgdorferi* o *R. conorii*, el grau de replecció així com el temps transcorregut des de la picada i la forma de retirada de les paparres. No existeix, però, consens entre els autors respecte aquest punt.

L'eficàcia de les vacunes enfront de la FBM en l'espècie humana no està del tot confirmada (Oteo, 1995). Resultats preliminars sobre una vacuna recombinant de *R. conorii* a nivell experimental (Vishwanath et al. 1990) podria constituir un primer pas cap a la profilaxis vacunal enfront de la malaltia. Darrerament s'ha desenvolupat una vacuna inactivada per a la prevenció de la infecció per *B.burgdorferi* en gossos. L'aplicació d'aquesta mesura té sentit en àrees endèmiques, no així en àrees on la malaltia té una presentació esporàdica (Green 1990).

MATERIAL I MÈTODES

I. ESTUDI SEROLÒGIC

1. MOSTRES DE SÈRUM:

a.- Guineus

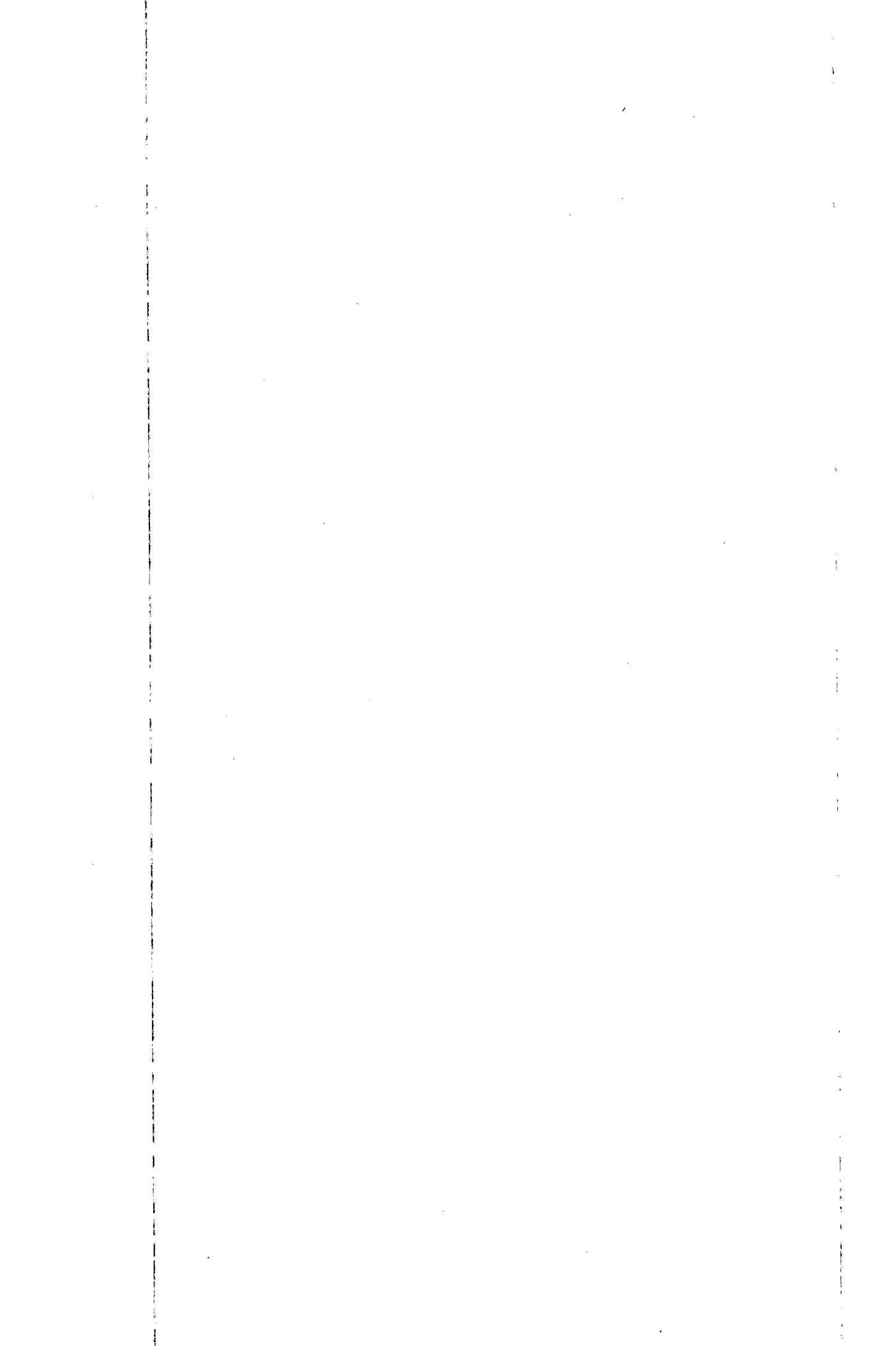
Es van examinar un total de 122 sèrums de guineus que varen ser caçades durant el període comprès des de gener de 1989 fins a juliol de 1994 a les àrees de regadiu del riu Ebre i a zones de secà de la Vall Mitja de l'Ebre. L'extracció de sang es realitzà per punció intracardíaca utilitzant tubs estèrils per a sèrum. En el laboratori, les mostres varen ser centrifugades per a l'obtenció del sèrum i congelades a -20°C fins a ser processades.

b.- Conills

Es varen estudiar 90 sèrums de conills capturats des de març de 1992 fins a desembre de 1994 a la zona d'Arpal (Saragossa) i Almudevar (Osca). En aquest cas, l'animal era alliberat després de la captura, per la qual cosa l'extracció de sang es realitzà a partir d'un petit tall a pabelló auricular prèviament impregnat de vaselina per augmentar el temps de coagulació i facilitar així el sagnat. La sang fou desuerada i congelada a -20°C .

Tant en el cas de les guineus com en el dels conills, es varen prendre mostres de sang i paparres, en el cas de que estiguessin parasitats¹.

¹ Tant les mostres de conills com les de guineus van ésser obtingudes per a la realització d'altres treballs realitzats a la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Veterinària de Saragossa..



c.- Gossos

L'estudi epidemiològic del cicle domèstic es va portar a terme a partir de sèrums de gossos recollits a diferents àrees de Catalunya. El tamany de la mostra es calculà mitjançant el programa Statcalc del paquet estadístic i epidemiològic EPI-INFO versió 6²:

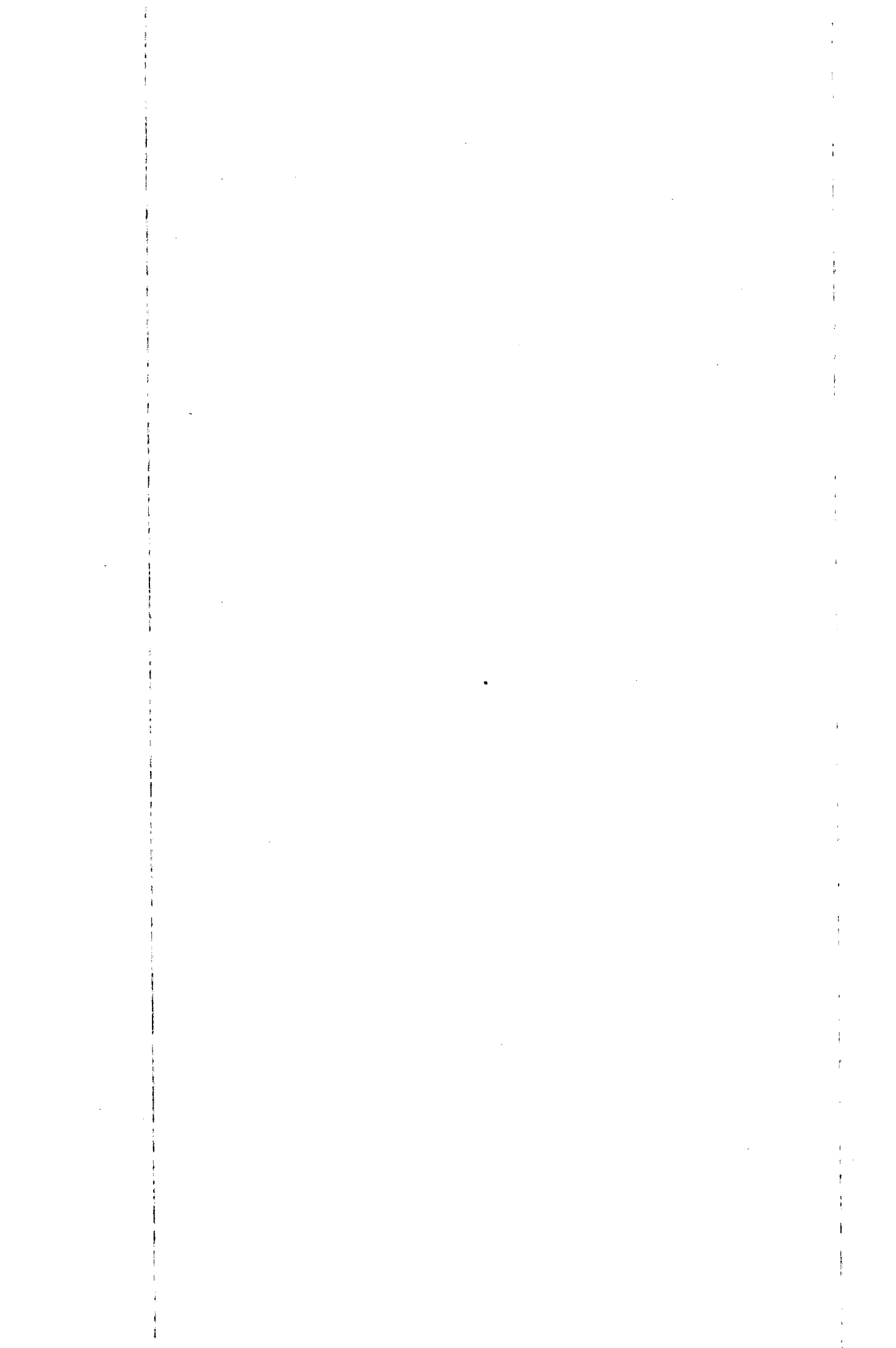
Per a l'estudi serològic de *R. conorii*, es va treballar amb tres grups de sèrums de gossos, un d'ells per a estudiar la seroprevalença de la infecció a Catalunya (a), l'altre per a l'estudi de la seroprevalença a la comarca del Baix Llobregat durant els mesos d'estiu amb la possibilitat d'obtenir també mostres de paparres (b) i un tercer (c) per a valorar l'evolució d'anticossos al llarg dels mesos.

* (a) Sèrums recollits en clíniques veterinàries d'arreu de Catalunya: Les mostres foren preses durant els mesos de Març, Abril, Maig i Juny de 1994. Les clíniques veterinàries s'escolliren a l'atzar. Es va fer una estimació prèvia de prevalença del 30% sobre una població estimada de 200.000 individus. El valor calculat fou de 130 individus amb un nivell de confiança del 95% i una precisió del 8%. Dels sèrums rebuts, es varen triar 130 a l'atzar.

* (b) Sèrums recollits en àrees peri-urbanes: El tamany de la mostra es calculà de la mateixa manera que en el grup anterior. Durant els mesos de juny i juliol de 1994, es van prendre mostres de sang de 130 gossos que habitaven als afores de diferents poblacions del Delta del Llobregat: Castelldefels, El Prat del Llobregat, Gavà i Viladecans (comarca del Baix Llobregat). L'extracció de sang es realitzà per punció en vena cefàlica amb Venoject®.

* (c) Variació estacional d'anticossos enfront de *R. conorii*: Es varen prendre mostres de sang de gossos mensualment al llarg de 16 mesos. Aquests sèrums es varen recollir de 18 gossos de forma seriada des del mes de juny de 1995 fins a setembre de 1996. Els gossos estaven distribuïts en 3 lots diferents: El primer lot, que vàrem anomenar "Llatzaret", estava format per 8 gossos (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 i F8) que viuen al llatzaret en un ambient

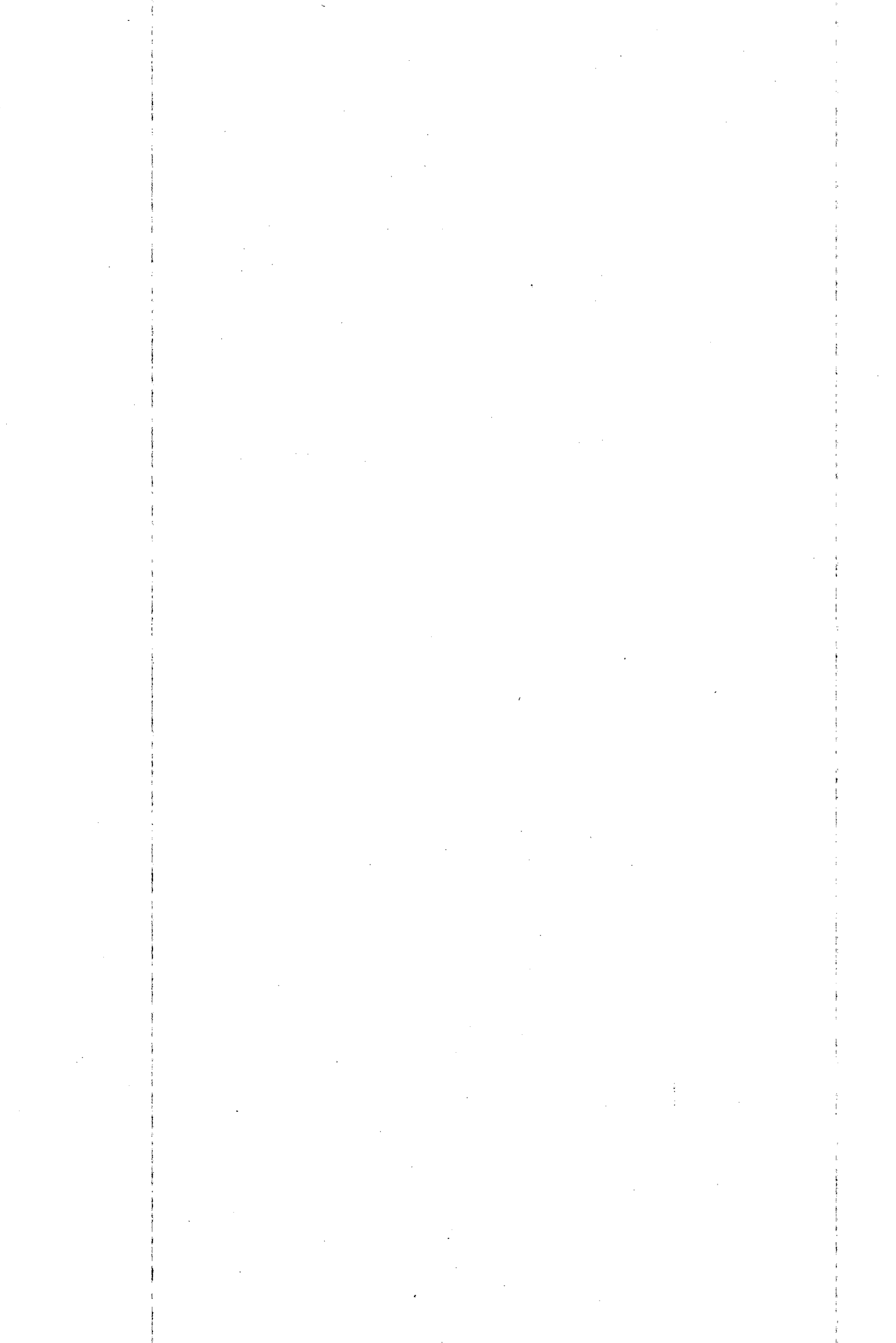
² Dean AG., Dean JA., Coulombier D. et al. 1994. Epi Info, Versió 6.



controlat i lliure de paparres; un segon lot, anomenat "Gossera" format per 5 gossos (C1,C2,C3,C4 i C5) que viuen a la gossera de la Facultat i tenen contacte amb paparres, tot i que es porten a terme desparasitacions quinzenals a partir de la primavera i un tercer lot, "Facultat", constituït per 5 gossos, propietat de l'Hospital Clínic Veterinari i de Patologia General, que viuen en semi-llibertat i tenen contacte amb paparres però el control que s'estableix envers aquests ectoparàsits és força més estret que en el grup anterior.

En el cas de *B. burgdorferi*, la prevalença esperada fou del 5% amb una precisió de $\pm 3,5\%$, sobre la mateixa grandària de població estimada, éssent el valor calculat de 155 individus amb un nivell de confiança del 95%. En aquest cas, es varen processar únicament les mostres del grup (a).

Les mostres de sang es mantingueren en condicions de refrigeració fins arribar al laboratori. Un cop allà, totes les mostres es varen deixar coagular i, posteriorment, varen ésser centrifugades a 1000 rpm durant 15 minuts i desuerades. S'amagatzemaren a -20°C fins al seu processament. De cada gos es complimentà un questionari on hi constaven dades com raça, edat, sexe, longitud del pèl, aptitud, *modus vivendi*, desplaçaments, visites al veterinari, símptomes presumptius d'alguna malaltia etc.



2. DESENVOLUPAMENT I POSTA A PUNT D'UNA TÈCNICA DE IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA PER AL DIAGNÒSTIC SEROLÒGIC DE *R. conorii*.

El cultiu de *R. conorii* requereix d'un sustrate cel.lular. Per aquest motiu, fou necessària la producció d'un cultiu cel.lular infectat amb *R. conorii* a partir del qual, prèvia purificació, s'obtingué l'antigen per a desenvolupar una tècnica diagnòstica.

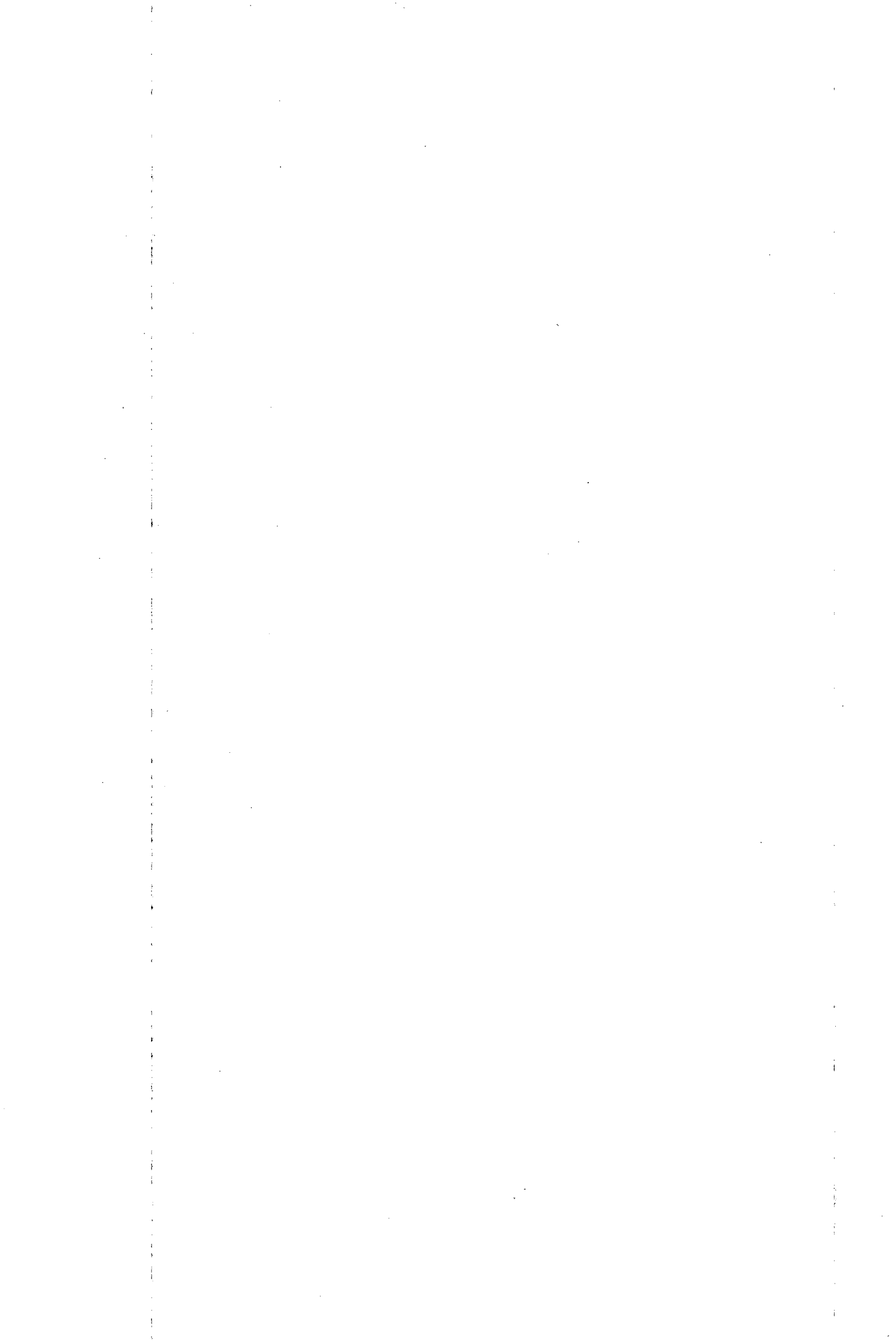
a.- Cultiu cel.lular.

El cultiu cel.lular s'inicià a partir d'un flascó de Roux de 25 cm² amb tapís de cèl.lules Vero*. El manteniment del cultiu cel.lular es realitzà tripsinitzant el tapís amb Tripsina al 10% (Trypsin-EDTA, Gibco®) que es deixà incubar a 37°C durant 3-4 minuts; posteriorment s'afegí Sèrum Fetal Boví (SFB, Gibco®) filtrat amb filtre Milipore - 0.22µm- (Costar®) al 4% per a inactivar la tripsina. A continuació, el contingut constituït per tripsina, SFB i cèl.lules es repartí als nou flascons en passis de 1:2 (1 flascó a dos) o bé 1:3. Per últim, es completà el volum amb medi cel.lular Minimum Essential Medium (MEM, Sigma®) enriquit amb 1% de L-Glutamina (L-Glu 200mM, Gibco®) i s'incubà a 37°C 5% CO₂ amb el tap semi-obert en els nous flascons i tancat al flascó original. En tots els casos, es realitzà control bacteriològic per a detectar possibles contaminacions, inoculant una gota de medi en un brou d'enriquiment (H₂O peptona) i incubant a 37°C en condicions de microaerofília.

b.- Infecció de les cèl.lules

La infecció de les cèl.lules es va portar a terme amb *Rickettsia conorii* soca Moroccan³, soca de referència. La infecció es realitzà sobre tapís de cèl.lules Vero en flascó de Roux de 150cm² inoculant 5 ml. de cultiu infectat amb *R. conorii* i deixant incubar a la campana de fluxe laminar durant 1 h. a temperatura ambient. Posteriorment

³ Centre de Rickettsiosis de Marsella. Dr. Didier Raoult.



s'enriquí amb 25 ml. de medi constituït per MEM, 1% L-Glutamina i 4% SFB i s'incubà a 32°C amb el tap tancat.

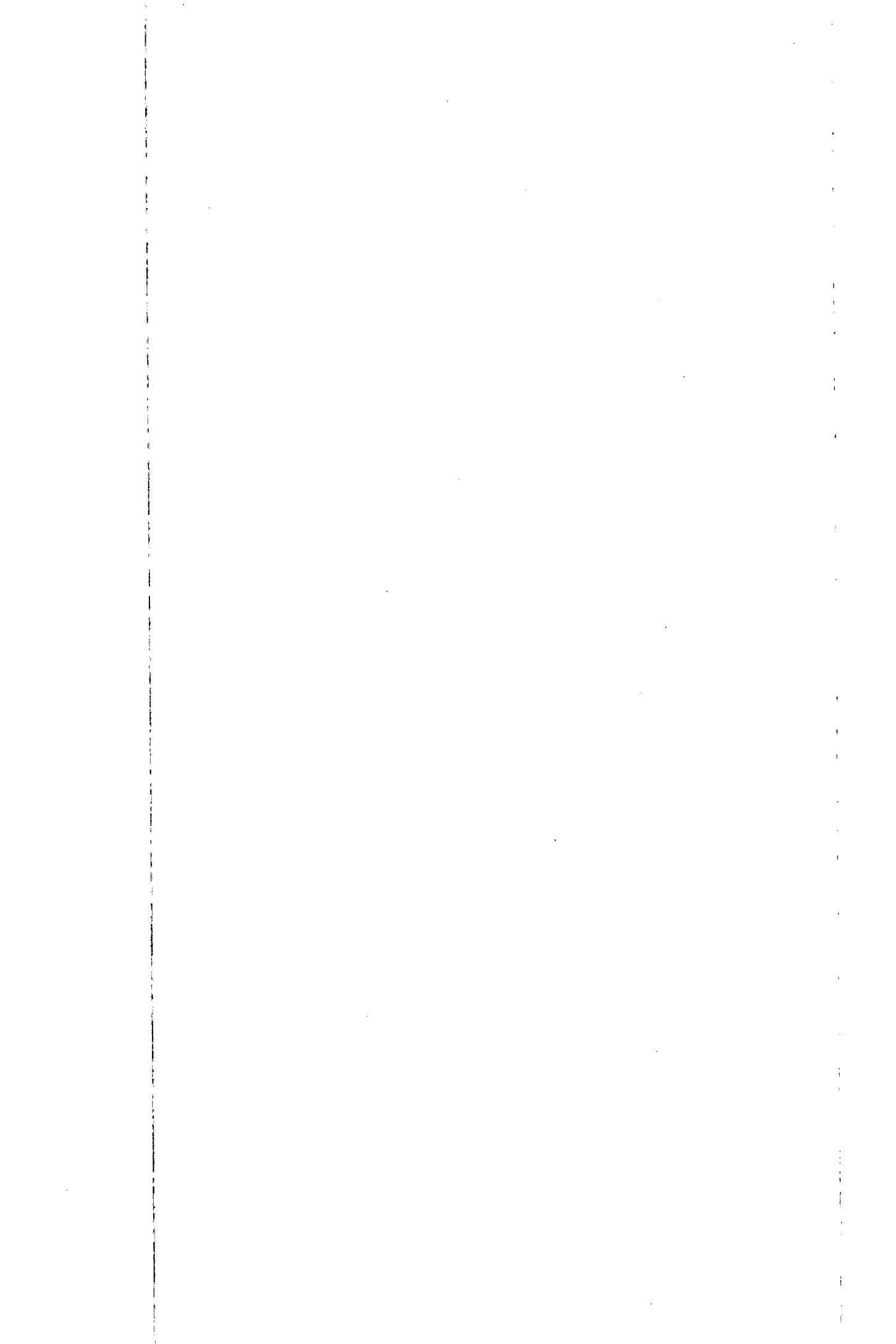
Tres dies després es comprovà la infecció observant l'aspecte macroscòpic del medi -acidificació i lleugera turbidesa degut a la presència de cèl.lules mortes surant en ell- ; a nivell microscòpic l'efecte citopàtic s'observava per la presència de cèl.lules vaquolitzades i d'espais buits entre elles conseqüència de la mort cel.lular. Paral.lelament es prenia una mostra per a fer **Tinció de Giménez**.

Aproximadament al cinquè dia es valorava el nivell d'infecció mitjançant la tinció de Giménez; si el nombre de rickettsies per cèl.lula era ≥ 10 es considerà el moment idoni per a infectar nous flascons; en cas contrari, es valorà diàriament fins aconseguir el nivell d'infecció adequat. El tapís infectat es recuperà mitjançant boles de vidre estèrils per arrossegar el tapís format per cèl.lules infectades -al citoplasma de les quals es troba *R.conorii*- i es varen infectar nous flascons inoculant 5ml. de tapís infectat per flascó. La resta del volum es congelà a -80°C.

c.- Purificació antigènica i antigenació de portes

El cultiu cel.lular infectat i congelat a -80°, es va descongelar ràpidament a 37°C i es va tornar a congelar de nou a -20°C, repetint la mateixa operació tres vegades, amb l'objectiu de trencar les cèl.lules i obtenir la rickettsies lliures en el medi. A continuació, es centrifugà a 150g durant 15 minuts. Es descartà el "pellet" i el sobrenadant s'ultracentrifugà a 15.000g durant 45 minuts. El "pellet" resultant es recuperà i es va resuspendre en formalina al 0.1%, per a inactivar la rickettsia (Bacellar, comunicació personal).

Es determinà la dilució d'antígen màxima que permetia discernir clarament sèrums positius de negatius. Amb aquest objectiu, s'antigenaren portes per a immunofluorescència resistents a l'acetona a diferents dilucions de l'antígen cru (1%, 2%, 3%, 4%, 5%), dispensant 10 µl per pou i deixant assecar a l'aire. En cadascun dels portes es deixà un pouet sense antigenar. Posteriorment, es fixà en acetona durant 10 minuts i es varen rentar



en PBS pH= 7.2, 3 vegades. A continuació, s'incubà PBS amb un 1% BSA (Albúmina Sèrica Bovina) i es varen amagatzemar a 4°C.

Un cop valorada la dilució òptima d'antigen i amb l'objectiu d'equiparar els diferents lots de purificats, es procedí al contacte de rickettsies mitjançant una IFI, usant com a antigen una dilució 1:10 de la dilució d'antigen que havia donat millor resultat. Es varen comptar el nombre de rickettsies en 10 camps i es calculà la mitjana.

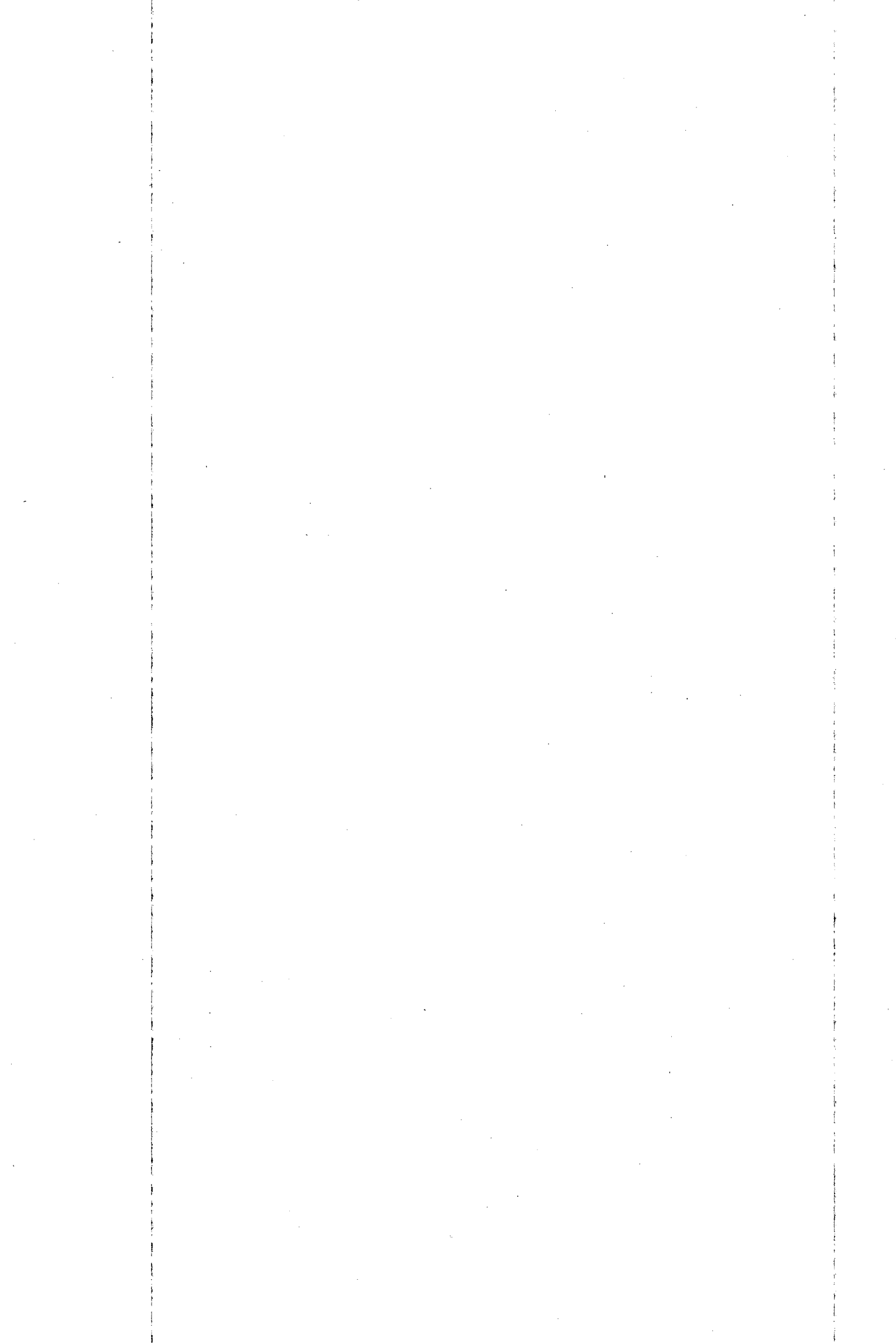
d.- Immunofluorescència Indirecta

d.1.- Dilució dels sèrums

Per a realitzar la Immunofluorescència indirecta, els portes es varen rentar en PBS-5% Tween 20 durant 15 minuts. A continuació, es varen incubar dilucions seriades del sèrum control positiu i del sèrum control negatiu. Aquest sèrums havien estat processats prèviament en un IFI comercial (R.conori- spot IF, bioMérieux®). La incubació es portà a terme en cambra humida a 37°C durant 30 minuts. Es rentaren 2 vegades en PBS-1%BSA i s'incubà el conjugat marcat amb isothiocianat de fluoresceïna a la dilució de treball i en les mateixes condicions que els sèrums. Es rentaren amb PBS-5% Tween 20 3 vegades, esbandint ràpidament en aigua destil.lada. Es varen assecar i es va muntar el cubre-objectes amb una solució 1:9 de Glicerol-PBS. Els cubre-objectes muntats es deixaren assecar a la foscor abans de procedir a la lectura.

d.2.- Assaig pilot de la prova

Per estandaritzar la prova, es varen processar els sèrums destinats a l'estudi de la variació estacional per duplicat, és a dir, per l'IFI comercial (R. conori spot-IF, bioMérieux®) i pel desenvolupat per nosaltres. Es realitzaren dilucions en base 2 de cada sèrum a partir de 1/20 i es seguí el mateix protocol per totes dues proves.



d.3.- Càlcul de la sensibilitat i de l'especificitat. Concordància entre proves. Valor Kappa.

La concordància entre l'IFI comercial i el desenvolupat per nosaltres es calculà mitjançant el valor Kappa i prenent com a prova de referència la IFI comercial de bioMérieux. El càlcul es realitzà a partir del programa EPISERA*.

d.4.- Aplicació al banc de sèrums

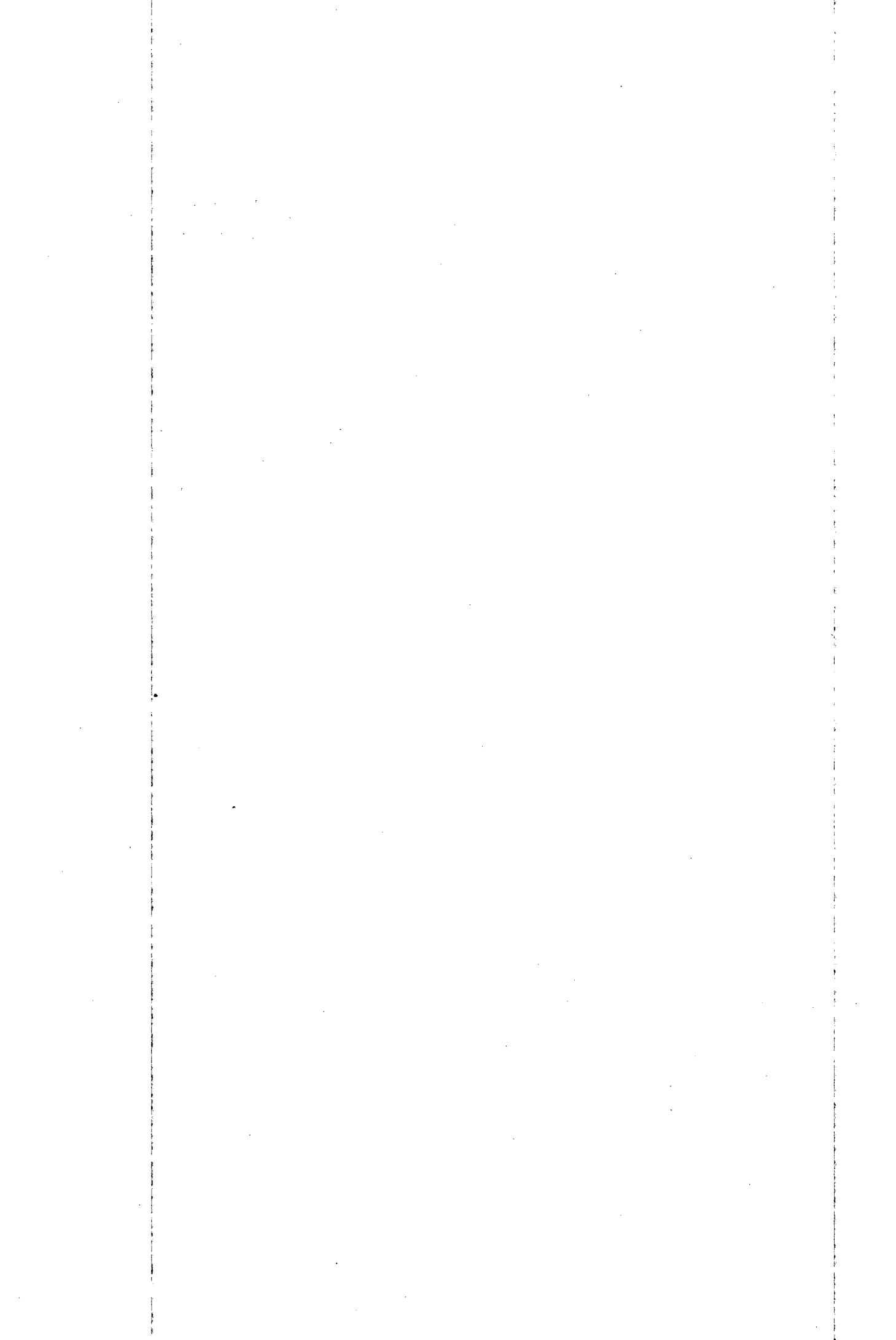
Finalment, la IFI desenvolupada s'aplicà a un banc de sèrums constituït per sèrums canins recollits a clíniques veterinàries d'arreu de Catalunya.

3. TÈCNICA SEROLÒGICA EMPRADA

La tècnica emprada per al diagnòstic serològic de *R. conorii* i de *B. burgdorferi* fou la Immunofluorescència Indirecta.

L'estudi de seroprevalença de *R. conorii* es realitzà a partir d'un antígen comercial (bioMérieux Conori-spot IF®) excepte l'estudi de seroprevalença de sèrums canins procedents de diferents clíniques veterinàries -grup (a)- que com ja s'ha assenyalat en l'apartat d.2., es portà a terme a partir d'una IFI estandaritzada per nosaltres emprant com a antígen *R. conorii*, soca de referència Morocco.

En ambdós casos, es varen fer dilucions del sèrums en PBS a 1/40. Aquestes foren incubades a 37°C durant 30 minuts en càmara humida. A continuació es procedí a rentar en PBS-5% Tween dues vegades durant 5 minuts i s'esbandí amb aigua destil.lada. Seguidament s'incubà el conjugat marcat amb isothiocianat de fluoresceïna diluït en PBS a la dilució de treball, en les mateixes condicions que el sèrum. Abans de procedir a la lectura, es repetiren els rentats i es varen cobrir les preparacions amb un "cubre" muntat amb Glicerol-PBS (dilució 1:9).



Per al diagnòstic serològic de *B. burgdorferi* s'emprà la mateixa tècnica, usant com a antígen *Borrelia burgdorferi* B-31 soca americana (bioMérieux Lyme-spot IF®). Les dilucions dels sèrums es van fer en tampó BABS. La dilució de sèrum emprada fou de 1/64. Aquests es varen incubar durant 45 minuts a 37°C en càmera humida. El conjugat fou diluït en tampó BABS a la dilució de treball i s'incubà a 37°C durant 30 minuts en càmera humida. Després de cada incubació es realitzaren rentats amb PBS-5% Tween dues vegades 5 minuts, esbandint posteriorment en aigua destil·lada. En aquest cas, no es va procedir al muntatge de les preparacions per optimitzar la visualització de les borrelies.

El conjugat emprat per a l'estudi serològic de cànids (guineus i gossos) fou una immunoglobulina de conill anti-IgG de gos (Fluoline dog, bioMérieux®), la dilució de treball del qual fou de 1:200. L'utilitzat per al diagnòstic de conills fou una immunoglobulina de cabra anti-IgG de conill (Antirabbit IgG, Sigma Immunochemicals®) i es treballà a una dilució de 1:40.

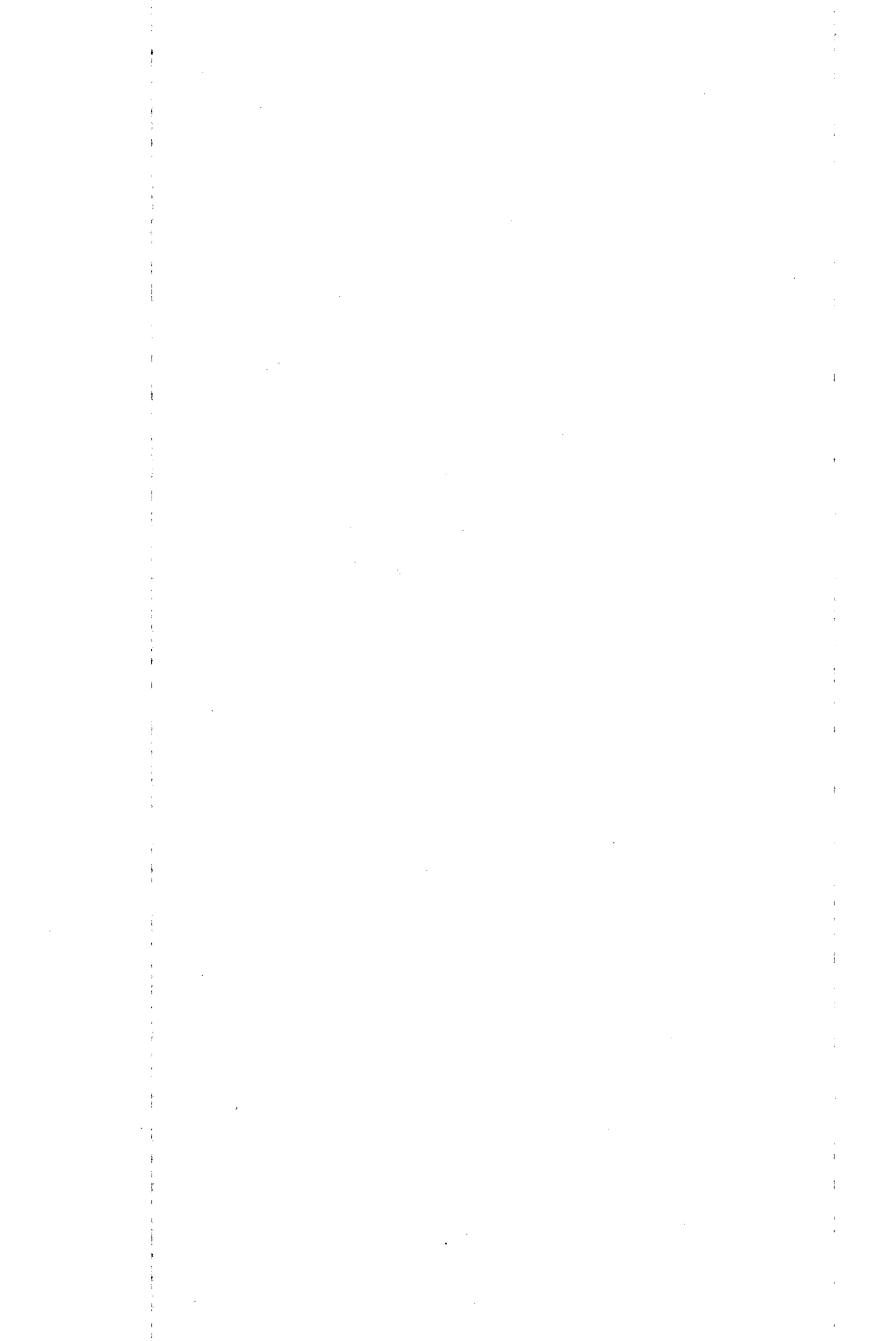
En ambdós casos, s'emprà un control positiu (sèrum comercial) i un control negatiu (PBS per a *R. conorii* i BABS per a *B. burgdorferi*). La lectura es realitzà en microscopi de fluorescència a 1000 augments (BH2 OLYMPUS).

Es consideraren positives les mostres amb títol $\geq 1/40$ per a *R. conorii* i $\geq 1/64$ per a *B. burgdorferi*. Els sèrums positius foren posteriorment titulats.

* Reaccions creuades enfront de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

** *Treponema*

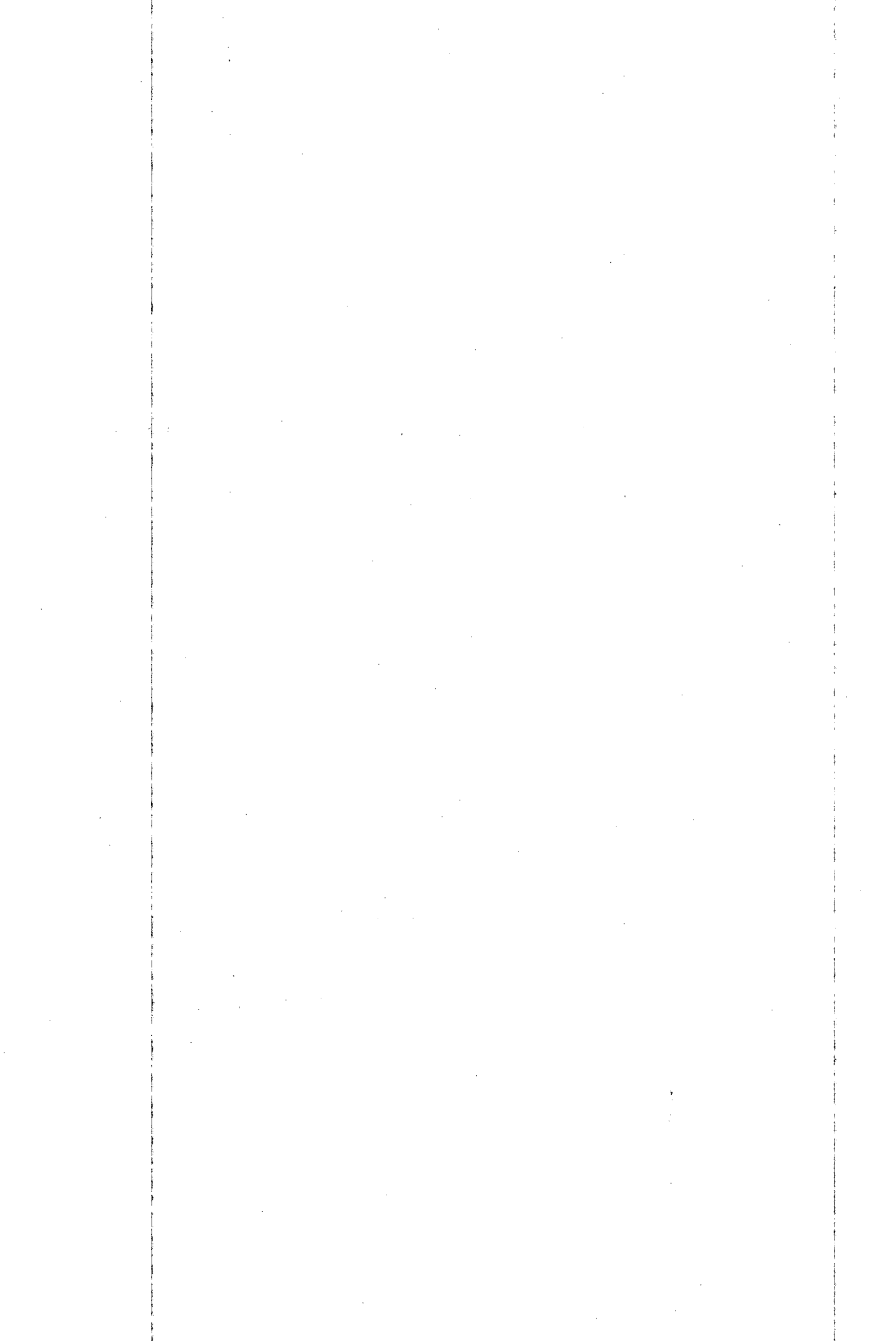
Amb l'objectiu d'evitar reaccions creuades amb treponemes sapròfits, els sèrums de conills positius a *Borrelia burgdorferi* van ésser adsorbits en un extracte liofilitzat de Treponemes de Reiter (Sorbente liofilizado para FTA-Abs Test, bioMérieux®) per a detectar possibles falsos positius (Bruckbauer et al. 1992). Aquests sèrums foren diluïts a 1:5 en el sorbent, deixant-los actuar durant 15 minuts; posteriorment es repetí la Immunofluorescència indirecta en front de *Borrelia burgdorferi*, seguint el protocol abans esmentat. Com a control negatiu s'emprà una dilució 1:5 BABS:sorbent, mentre que com



a control positiu s'emprà un sèrum comercial positiu a Lyme (Lyme spot-IF, R2, bioMérieux®) diluït a 1:5 en el sorbent.

** *Leptospira*

D'altra banda, els sèrums de guineus i gossos positius a *Borrelia burgdorferi* foren processats per a la detecció d'anticossos en front a *Leptospira* mitjançant una tècnica de macroaglutinació en porta utilitzant un antígen termoestable preparat a partir d'una soca de *Leptospira biflexa serovar patoc* (Antígeno TR Leptospira, Sanofi Diagnostics Pasteur®). Aquest antígen reacciona positivament enfront de qualsevol serotipus present al sèrum. Es preparà una dilució 1:2 en PBS dels sèrums problema per a barrejar-los posteriorment en l'antígen. Després de 4 minuts en agitació, es procedí a la lectura a la lupa sobre un fons fosc. Es consideraren positius aquells sèrums que presentaven acúmul més o menys densos, 2 a 3 minuts posteriors a l'agitació. Es varen desestimar aquells sèrums que aglutinaven més tard de cinc minuts, doncs es considerà reacció inespecífica. S'emprà un control positiu proporcionat en el mateix kit comercial. Com a control negatiu, s'utilitzà una gota de PBS barrejada en l'antígen i, d'altra banda, un sèrum comercial positiu a Lyme (Lyme spot-IF, R2, bioMérieux®).



II. ESTUDI DE LES PAPPARRES.

1. RECOLLIDA DE PAPPARRES

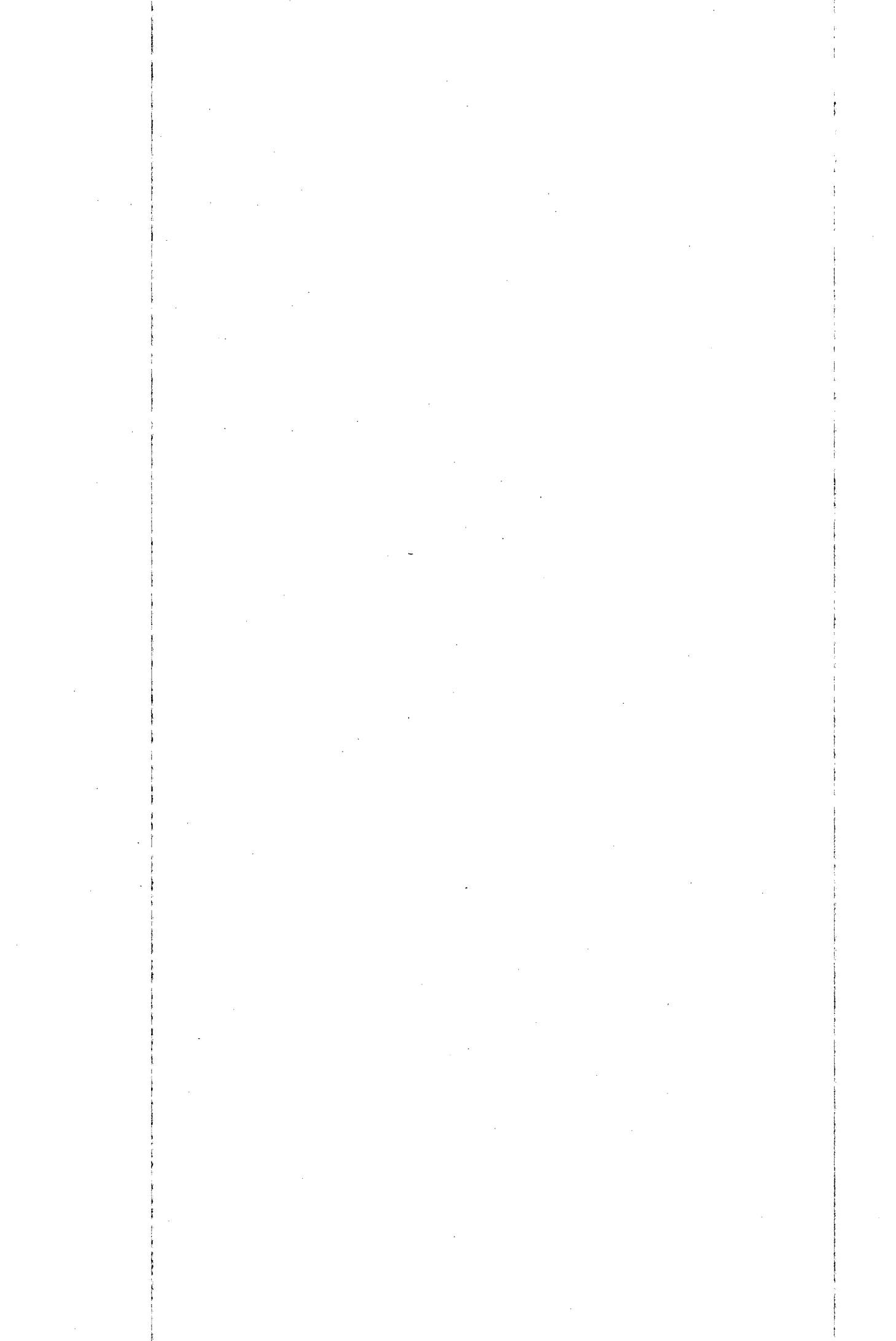
La recollida de paparres es va portar a terme mitjançant una combinació de captures en el medi ambient i captures sobre l'hoste.

Les captures en el medi ambient es realitzaren aplicant la tècnica d'arrossegament. Aquesta tècnica consisteix en mantejar la vegetació mitjançant una peça de cotó de 112 x 76 cm que hom fixa per un dels costats més amples a un bastó de 122 cm, que actua com a extensor del drap i alhora de suport per a una nansa de corda (Schulze i col., 1987) (Ginsberg i Ewing, 1989). Els ixòdids adherits a la roba eren recollits amb l'ajut d'unes pinces i dipositats en tubs degudament etiquetats.

Les captures sobre l'hoste consistien en la recollida de paparres en animals que actuen com a hostes d'alguna de les fases de la paparra que ens interessa.

Durant els estius de 1993 i 1994 es varen recollir paparres a diferents àrees de Catalunya (Girona - Sant Jordi Desvalls, Belcaire d'Empordà, Tortella i Sant Martí Sacalm-, Tarragona - Roquetes, Ports de Tortosa-Beceit- i Barcelona -serralada de Collserola-) capturades amb manta o sobre l'hoste. La recollida d'ixòdids sobre els hostes es realitzà fonamentalment sobre gossos.

D'altra banda, durant el mes de Juliol de 1995 es va procedir a fer captures de paparres a la comarca del Baix Llobregat, mostrejant les mateixes zones d'on es prengueren les mostres de sèrum dels gossos. Les captures al medi ambient es van portar a terme en àrees de vegetació de ribera, matolls i marges de camins, mentre que la captura sobre els hostes es realitzà exclusivament sobre gossos.



Tots els especímens recollits foren dipositats en tubs eppendorf anotant el lloc i la data de recollida. A l'interior de cada recipient hi havia paper de filtre humit o herba humida per a mantenir el grau d'humitat relativa indispensable per a les paparres. Un cop al laboratori, varen ser identificades seguint claus taxonòmiques (Nosek i Sik, 1972) (Gil Collado et al. 1979). Les paparres del gènere *Rhipicephalus*, *Dermacentor* i *Haemaphysalis* varen ésser processades per a la detecció de rickettsies del grup de les febres tacades (SFG). En aquest cas, es deixaven a 32°C -temperatura idònea per a les rickettsies- durant 24h. abans de ser processades.

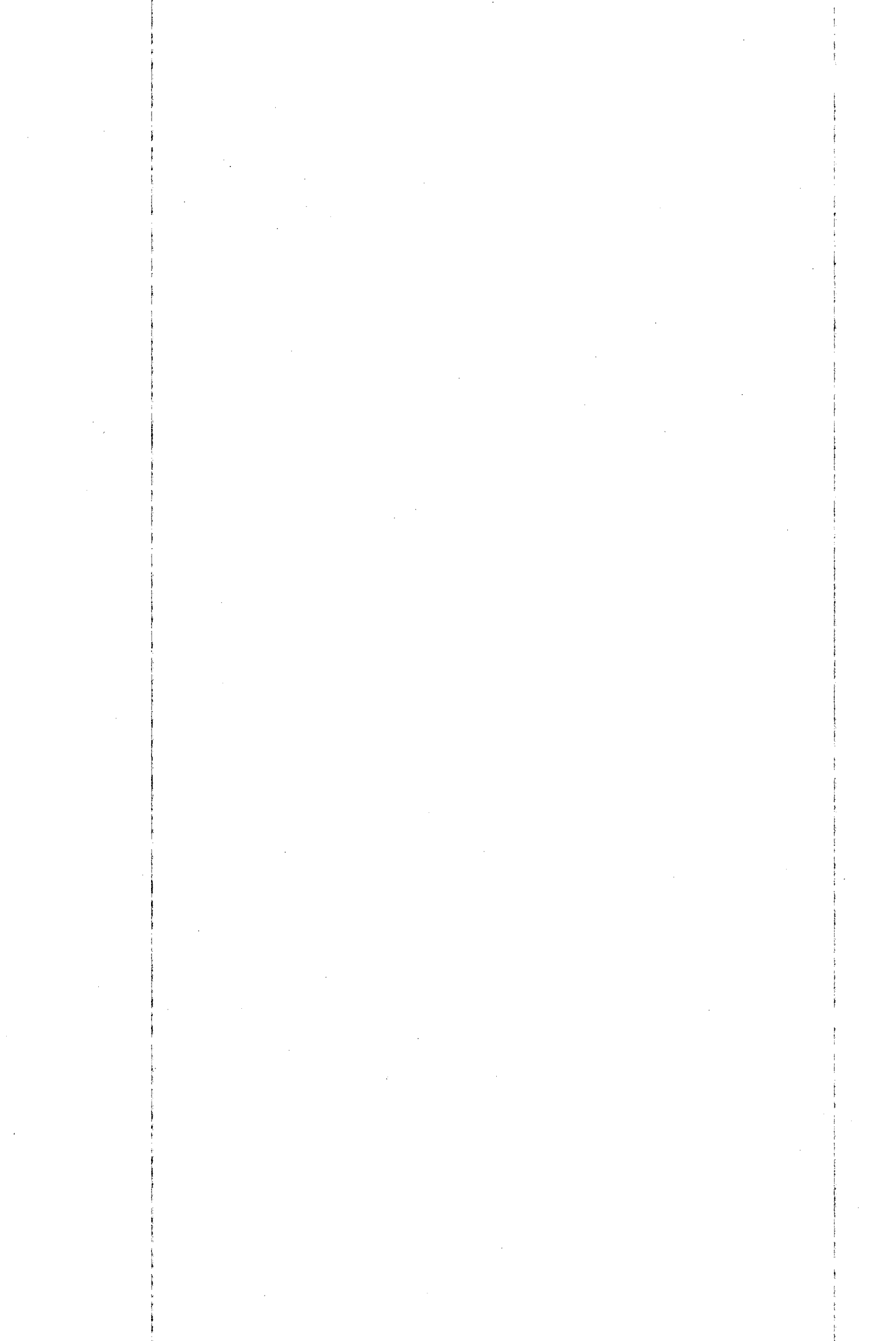
En l'estudi realitzat sobre guineus i conills, les captures d'ixòdids només es varen realitzar sobre els hostes. Els ixòdids foren amagatzemats en alcohol 70° per a col·lecció, la qual es troba dipositada a la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Veterinària de Saragossa.

2. DETECCIÓ DE RICKETTSIES EN PAPPARRES

a.- Detecció de rickettsies en les paparres

La detecció de rickettsies es va realitzar mitjançant el TEST DE L'HEMOLIMFA que consisteix en l'obtenció d'una gota d'hemolimfa a partir de l'amputació de l'extrem distal d'una pota de la paparra amb tisores de dissecció. Es procedí a l'empremta de l'hemolimfa exudada en portes. Atès que l'hemolimfa coagula ràpidament, després d'assecar-se a l'aire es fixà amb calor o bé en acetona depenent del processament a seguir: Tinció de Giménez o Immunofluorescència directa (IFD).

Si la quantitat d'hemolimfa exudada era suficient, es processaven les paparres per duplicat aplicant ambdues tècniques. Tanmateix, això no va ésser possible en tots els especímens.



* **Tinció de Gimenez:** Es tracta d'una tinció àcid alcohol resistant. Les rickettsies es localitzen al citoplasma dels hemòcits que, mitjançant aquesta tinció prenen un color verd-blavós, mentre que els organismes rickettsials adopten un color rosat i una morfologia variable, tot i que freqüentment apareixen com coc-bacils molt petits. Ocasionalment, les paparres poden presentar altres bacteris amb propietats tintorials i morfològiques similars als organismes rickettsials donant lloc a falsos positius.

* **Immunofluorescència directa (IFD):** Per verificar la presència de rickettsies de SFG, varem emprar un sèrum d'espècie humana positiu a *R. conorii* prèviament diagnosticat amb un títol de 1/640. Els anticossos que es fixaven sobre l'antigen es revelaren mitjançant una globulina de cabra anti-IgG totals humanes marcada amb fluoresceïna (Fluoline H, bioMérieux®). En cas de reacció positiva, les rickettsies presents adquirien fluorescència al visualitzar-les en microscopia ultravioleta. En tots els portes es deixà un dels pouets sense antigenar com a control negatiu.

De les paparres recollides a diferents àrees de Catalunya, es varen processar 464 de les que 249 es varen examinar per IFI i 227 per Giménez. Només 36 d'elles es varen poder examinar per duplicat. 24 especímens no es varen poder valorar per diferents causes: infeccions bacterianes massives, absència de cèl.lules etc.

Respecte a les paparres capturades al Baix Llobregat, es varen processar 137, de les quals 108 es varen processar per IFD, 51 per Giménez i 30 varen ésser processades per ambdues tècniques. Vuit no varen poder ser analitzades.

Degut a que no es varen trobar paparres del gènere *Ixodes*, no es va procedir a la detecció de borrelies. Tampoc es van portar a terme la detecció de borrelies ni de rickettsias en els ixòdids capturats en guineus i conills.



3. CAPACITAT VECTORIAL D'*Ixodes ricinus* EN LA TRANSMISSIÓ DE *Borrelia afzelii*

Es dissenyà un experiment que ens permetés establir la capacitat d'*I. ricinus* d'actuar com a vector de *B. afzeli*, utilitzant jerbus com a hoste vertebrat i dues soques diferents d'*I. ricinus*, de les que una d'elles s'havia infectat experimentalment amb *B. afzeli*.

a.- Soca de paparres:

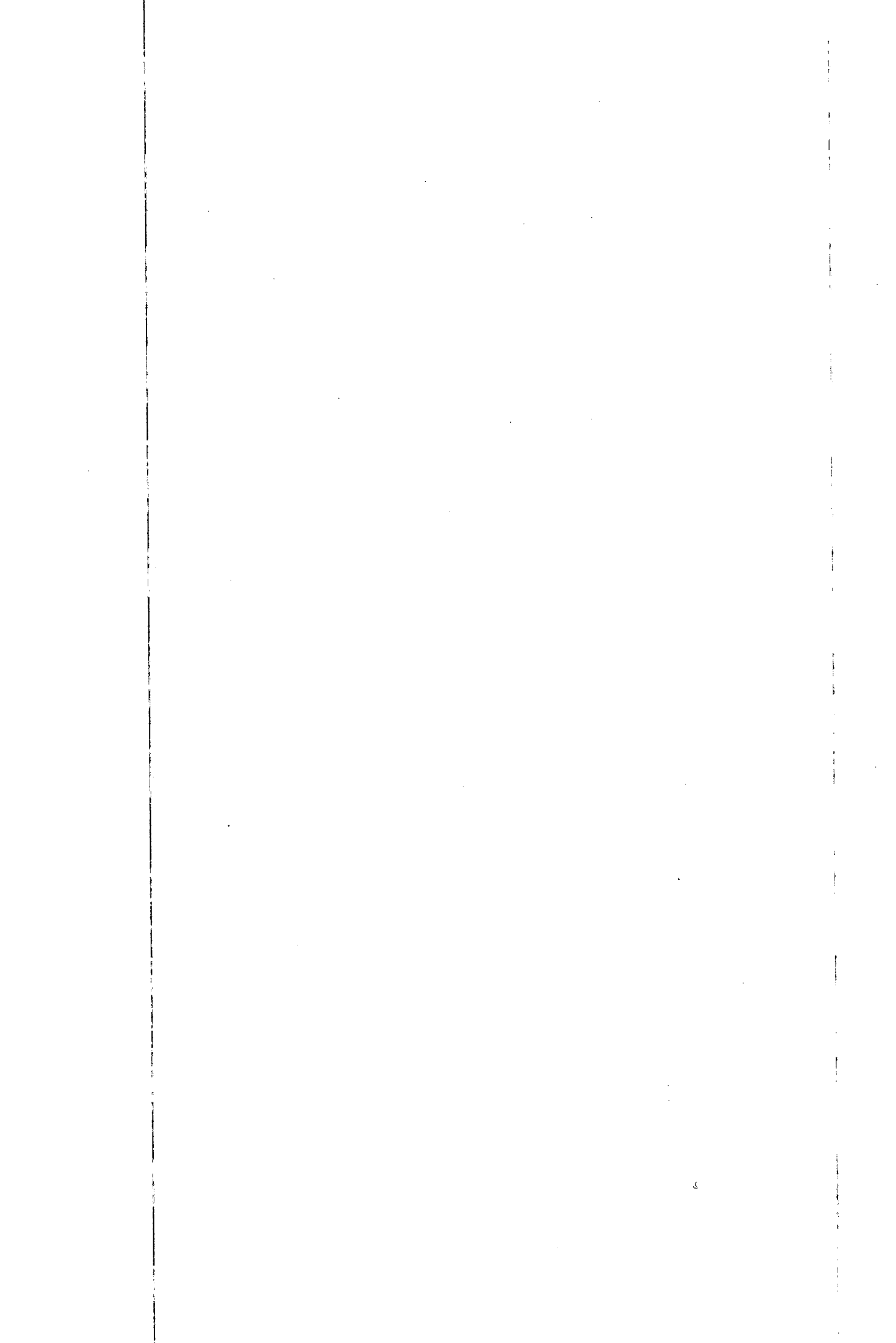
Per a dur a terme aquesta experiència es va treballar amb dues soques diferents de paparres.

Una d'elles va ser proporcionada pel ****Centre... Olaf, Berlin**** i va consistir en un lot de nimfes d'*Ixodes ricinus* infectades amb *Borrelia afzelii* amb les que es varen infectar els primers jerbus d'aquesta experiència. Més tard, i també d'aquesta mateixa soca, es varen enviar larves d'*I. ricinus* no infectades les quals es varen emprar pel xenodiagnòstic. Aquesta soca la vàrem anomenar soca Berlin.

La segona soca es va aconseguir a partir de femelles repletes d'*I. ricinus* capturades sobre vaques a Villoslada de Cameros (Logroño, La Rioja) durant el mes de maig de 1996. Un cop al laboratori, es varen col.locar en condicions de 18°C, 96% d'humitat relativa i un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 h. de fosc. En aquest cas, la soca fou anomenada soca Rioja.

b.- Soca de *Borrelia*:

Soca de *Borrelia afzelii* mantinguda en un cicle de paparra-jerbus, cedida pel Dr. Olaf, Berlin, Alemania.



c.- Hostes:

Per a valorar la capacitat vectorial de la soca Rioja d'*Ixodes ricinus* vàrem utilitzar el jerbus (*Meryones unguiculatus*) com a animal d'experimentació donat que és considerat com a model per aquest tipus d'estudis (Krampitz, 1986).

d.- Infestació de l'hoste:

La infestació amb nimfes infectades es va dur a terme anestesiant el jerbus amb una barreja de ketamina-Xilacina (ketolar-Rompún®), amb una dosi de 0.5 ml de ketamina 10 mgr/ml i 0.05 ml de Xilacina al 2%, procedint posteriorment a afaitar una petita àrea a la regió dorsal de l'animal on s'enganxà amb Tensoplast® una petita càpsula de plàstic on es varen introduir les nimfes.

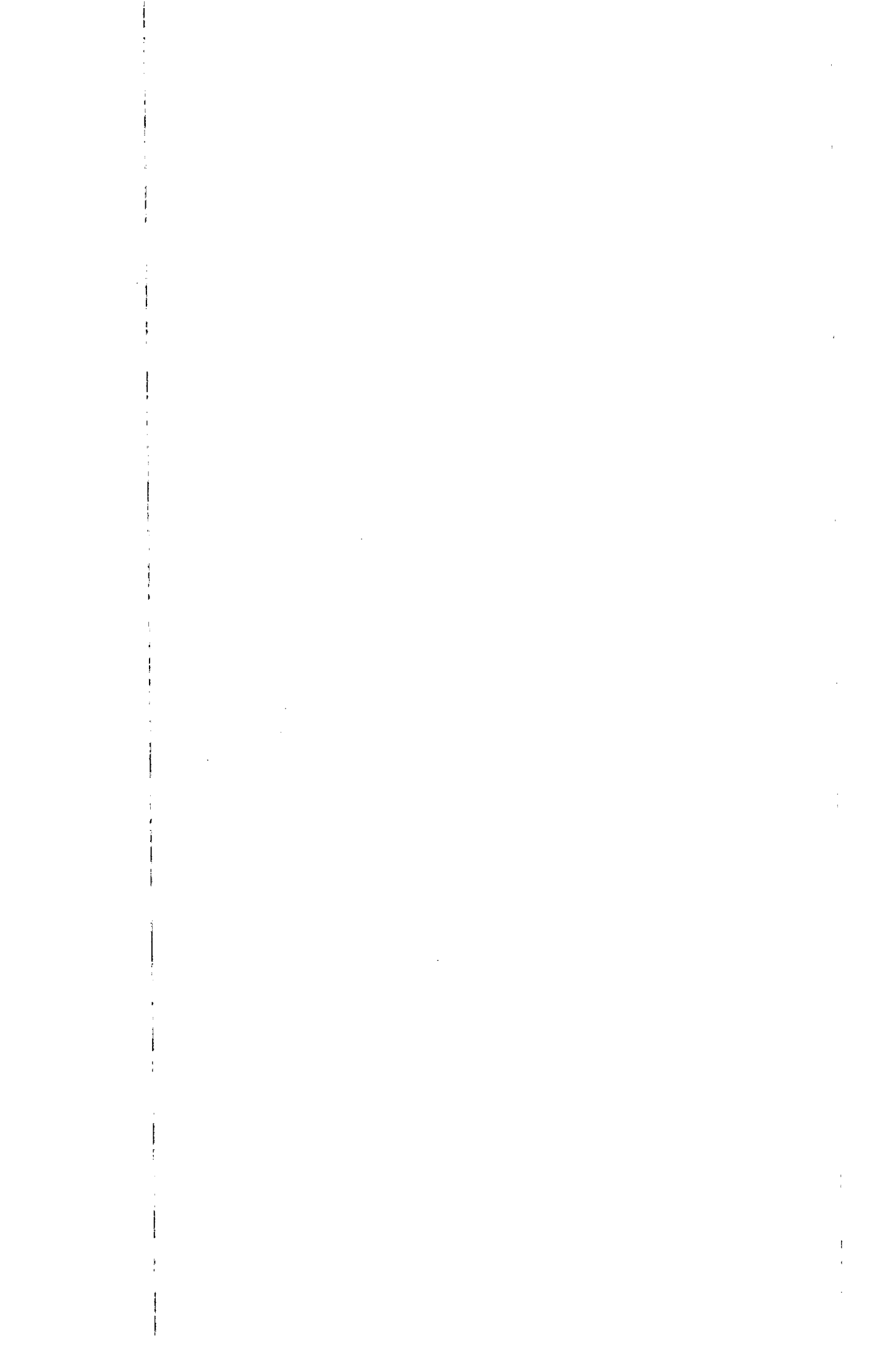
e.- Experiment:

El dia 0 es varen utilitzar quatre jerbus (Lot A) sobre els quals es varen col·locar cinc nimfes infectades de la soca Berlin per càpsula.

El dia 46 de l'experiència es van col·locar 60 larves de la soca Rioja /animal del Lot A. No es varen utilitzar càpsula per a la infestació. Una vegada varen mudar a nimfes en les condicions anteriorment assenyalades, aquestes es varen emprar per a parasitar un lot de 10 jerbus (lot B), cosa que succeí el dia 167; 2 d'aquests jerbus van ser infestats amb nimfes alimentades en animals control per a descartar la possibilitat de transmissió transovàrica d'algunes soques de *Borrelia* vehiculada per larves de la soca Rioja.

La nomenclatura que vàrem seguir per a cada jerbu fou: Ly1a, Ly1B, Ly2A, Ly2B, Ly3A, Ly3B, Ly3C, Ly3D, R1 i R2.

Per a comprovar si la soca Rioja era capaç de vehicular *B.afzelli* es va procedir al xenodiagnòstic (dia 182) utilitzant tant larves de la soca Rioja com larves de la soca Berlin, aquesta última amb una contrastada capacitat vectorial. Els jerbus Ly1A i Ly3D s'infestaren amb larves d'*Ixodes ricinus* soca Berlin, la resta foren infestats amb la soca Rioja.



Amb l'objectiu de determinar la variació del grau d'infecció respecte a la temperatura i el temps, aquestes larves alimentades van ser col·locades a dues temperatures diferents (18°C i 26°C) i examinades els dies 0, 7, 21, 42 i 80 a partir de la recollida com a larves alimentades

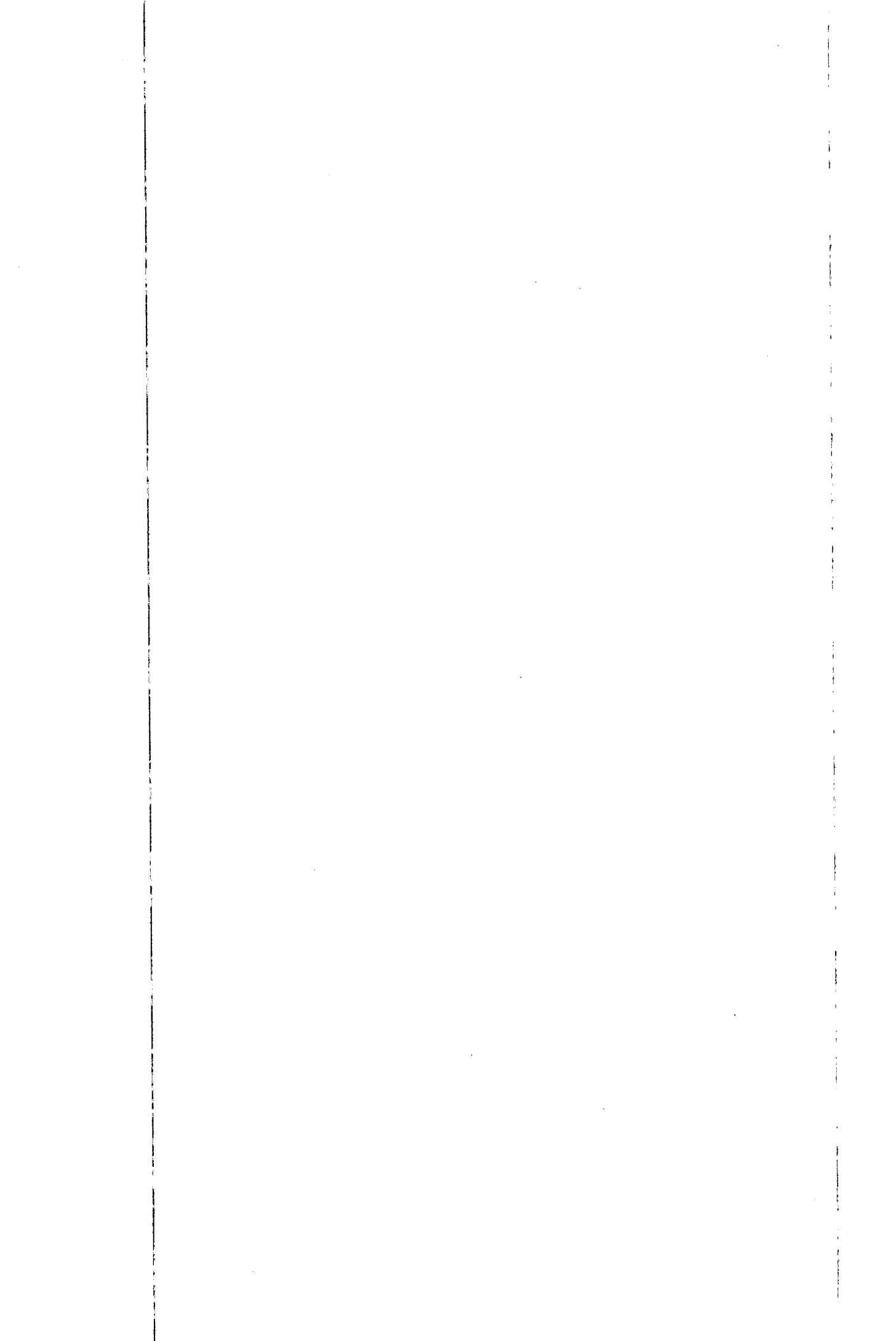
d.- Detecció de borrelies en les paparres:

La detecció es portà a terme mitjançant la dissecció de budell mig en els especimens adults, mentre que en el cas de larves i nimfes els especimens foren triturats sencers sobre el porta-objectes. A continuació es procedí a l'examen per IFD. Prèviament cada especímen fou rentat en alcohol 70°. El frotis de budell mig es realitzà sobre 10µl de BABS en portes d'immunofluorescència no antigenats resistents a l'acetona. La preparació es deixà assecar a l'aire i, posteriorment, es fixà en acetona durant 15 minuts. Es deixà incubar un sèrum comercial *anti-B.burgdorferi* (Lyme spot-IFI, R2, bioMérieux®) a la dilució de treball durant 45 minuts a 37°C en càmera humida. Després de rentar en PBS-Tween, s'incubà un conjugat marcat amb isothiocianat de fluoresceïna (Fluoline H, bioMérieux®) durant 30 minuts a la mateixes condicions que la incubació del sèrum. Es repetiren els rentats i quan els portes ja eren secs, es procedí a la lectura en microscopi de fluorescència.

Es considerà positiva tota aquella paparra amb presència d'una o més borrelies.

e.- Determinació de la prevalença d'infecció:

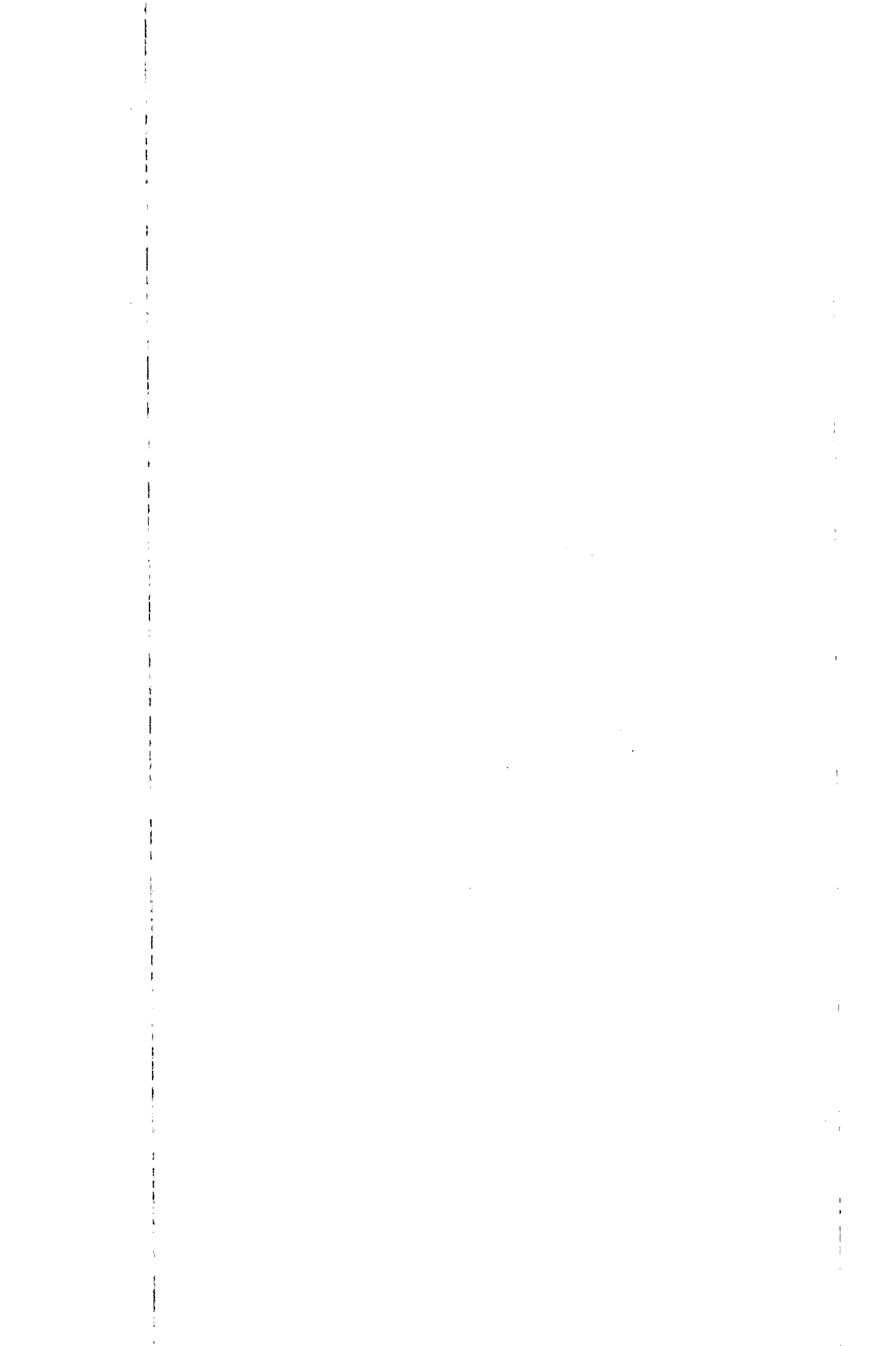
La prevalença d'infecció es calculà comptant el nombre de borrelies per paparra. Per aquest motiu, es procedí a realitzar una extensió de la preparació que abarqués tota la superfície del pou de la forma més homogènia possible. De cada pou, es varen comptar el nombre de borrelies en 10 camps. En un microscopi de fluorescència BH2 OLYMPUS d'òptica plana de 100 augments i amb un ocular CWHK 18L de 10 augments, es calculà l'àrea del camp (0.04 mm²), amb la qual cosa cada camp expressava el nombre de borrelies en 0.04 mm². A partir del diàmetre dels pouets (0.800 cm i 0.600 cm) es calculà la superfície total en mm². Coneixent la superfície del camp (0.04 mm²) i extrapolant la mitjana de borrelies detectada per camp a la superfície total s'obtingué el nombre total de borrelies per paparra. Degut a que vàrem emprar porta-objectes amb



diferents mides de pouets, les mitjanes obtingudes en els pous de 0.600 cm. es varen multiplicar per 1.78, valor resultant de la relació de l'àrea entre els dos pous amb l'objectiu de fer comparables els resultats.

III. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística es portà a terme aplicant el sistema Epi-Info versió 6.0. Per a l'estudi de la variació estacional d'anticossos es treballà, a més a més, amb el full de càlcul Lotus 123. L'estudi estadístic de la capacitat vectorial es realitzà mitjançant el paquet estadístic Spss per a Windows.



RESULTATS

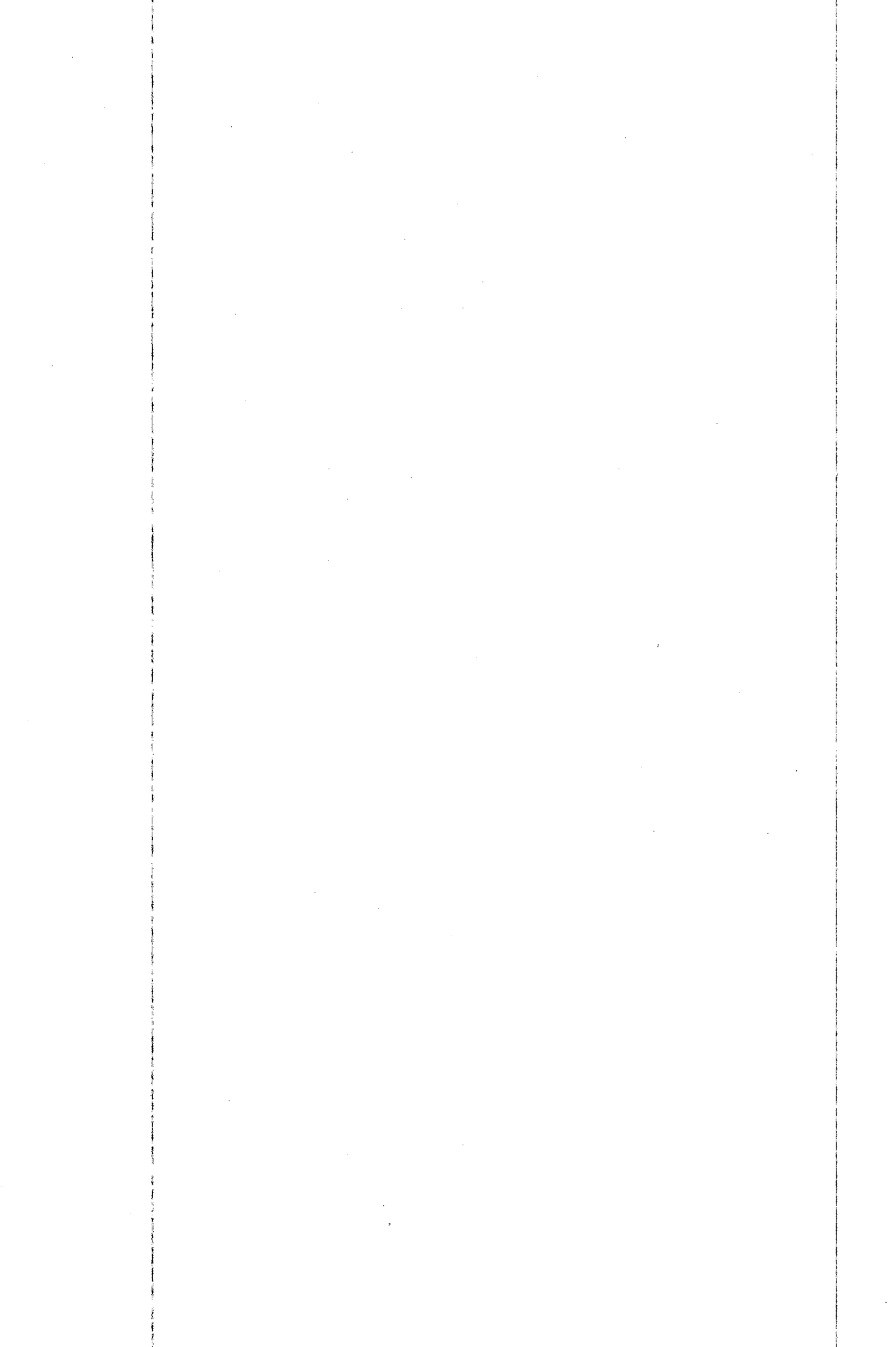
I. CICLE SALVATGE

1. GUINEUS

De les 122 guineus, 62 presentaven parasitació per paparres. Les espècies de paparres que s'han identificat són *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus pusillus* i *Ixodes hexagonus*. La tabla xx indica els percentatges trobats:

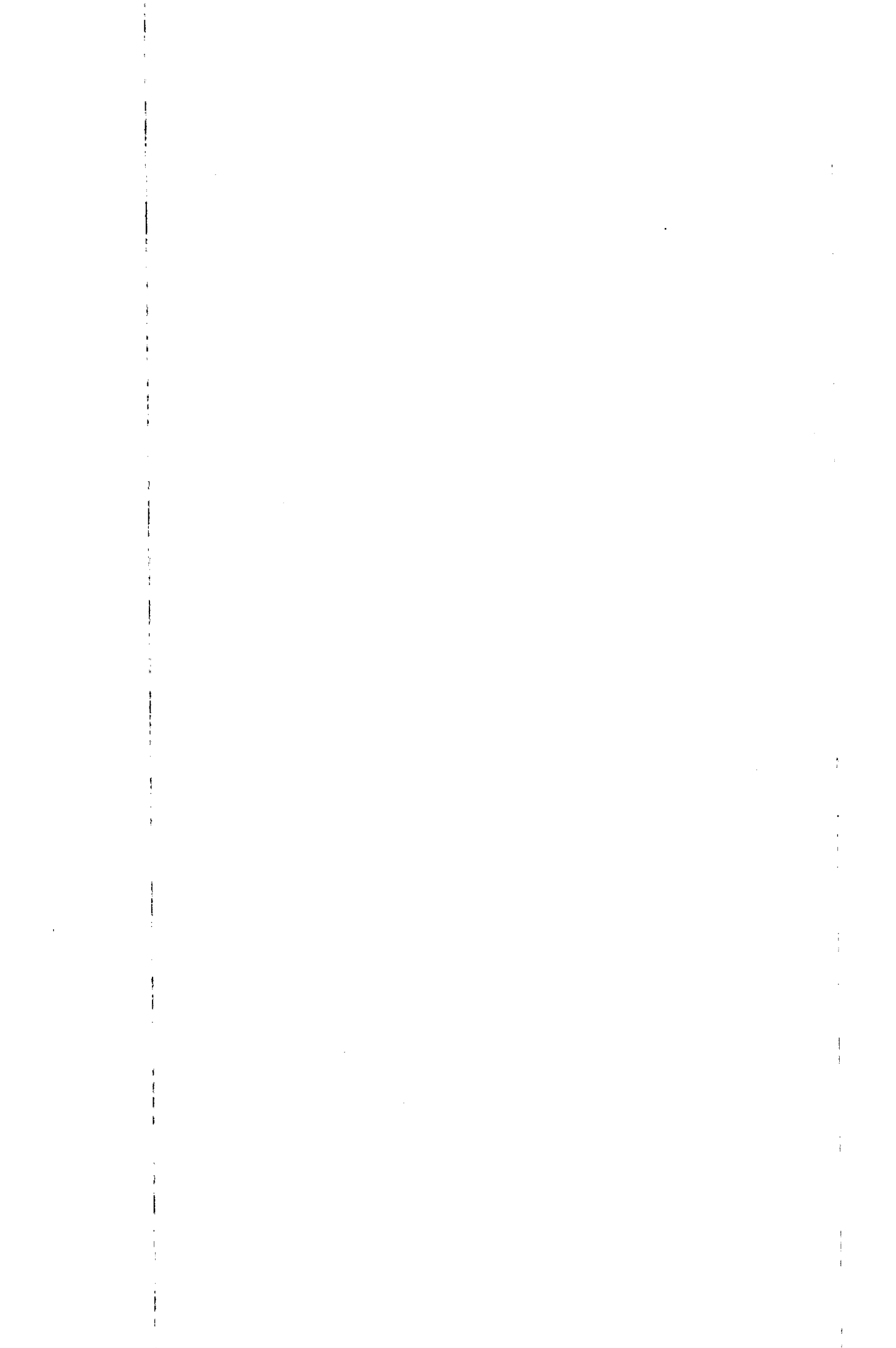
PAPARRA	FREQ.	PERCENTATGE
<i>I. hexagonus</i>	3	4.8%
<i>I. hexagonus</i> i <i>R. pusillus</i>	1	1.6%
<i>I. hexagonus</i> i <i>R. sanguineus</i>	1	1.6%
<i>R. sanguineus</i>	52	83.9%
<i>R. sanguineus</i> i <i>R. pusillus</i>	5	8.1%

Tabla xx: Freqüència i percentages de les espècies de paparres trobades en guineus.



El 46.7% (57/122) de les guineus van mostrar títols positius enfront de *R.conorii*. L'extrapolació a la població general, amb un nivell de confiança del 95%, oscil.la entre el 37.6% i el 56%. La distribució dels títols es mostra en la Figura xxx.

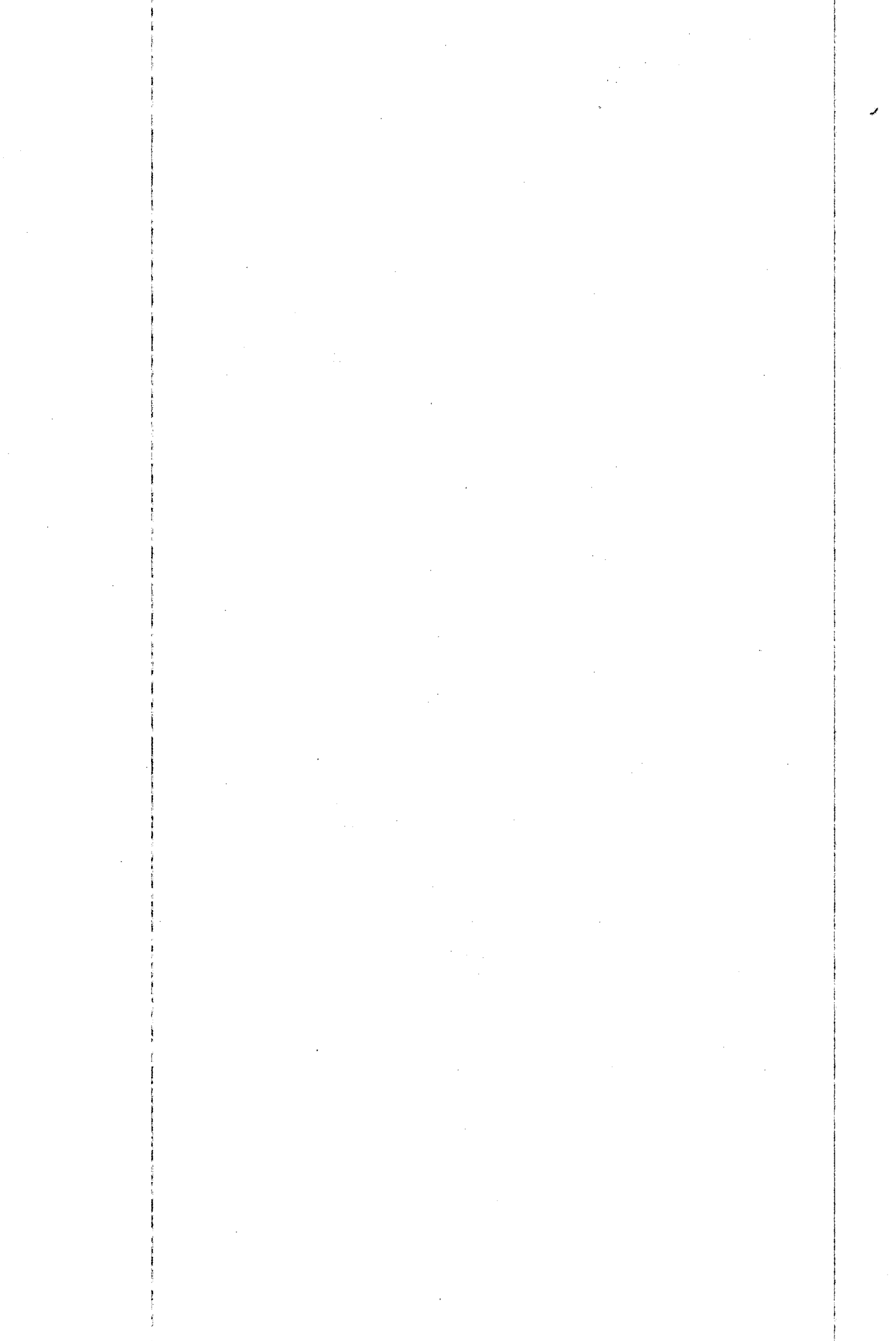
Figura xxx: Distribució dels títols d'anticossos enfront de *R.conorii*



Un 13.1% (16/122) dels sèrums estudiats fou positiu a *B.burgdorferi* en la població general això representaria una prevalença que oscil.laria entre el 7.6% i el 20.4% per un 95% de nivell de confiança. Els sèrums positius mostraren una fluorescència clara però menys intensa que el control positiu. La distribució dels títols es representa a la Figura j.

Figura j: Distribució dels títols d'anticossos enfront de *B.burgdorferi*

En l'estudi de reaccions creuades enfront de *Leptospira*, dels 16 sèrums positius a *B.burgdorferi*, 2 varen presentar aglutinació en la prova de *Leptospira*. Tots dos foren positius tant a *R.conorii* - amb títols de 1/40 i 1/80, respectivament- com a *B.burgdorferi* - ambdós amb títol de 1/64-. En referència a les reaccions creuades enfront de *Treponema*, dels sèrums positius que foren adsorbits en sorbent de *Treponema*, dos sèrums que sense ésser processats pel sorbent mostraren un títol de 1/128, passaren a ser negatius un cop adsorbits.



En cap cas es varen detectar diferències significatives entre la positivitat a cap de les dues infeccions i altres variables com el sexe, edat, localització geogràfica, presència de paparres, espècies de paparres.

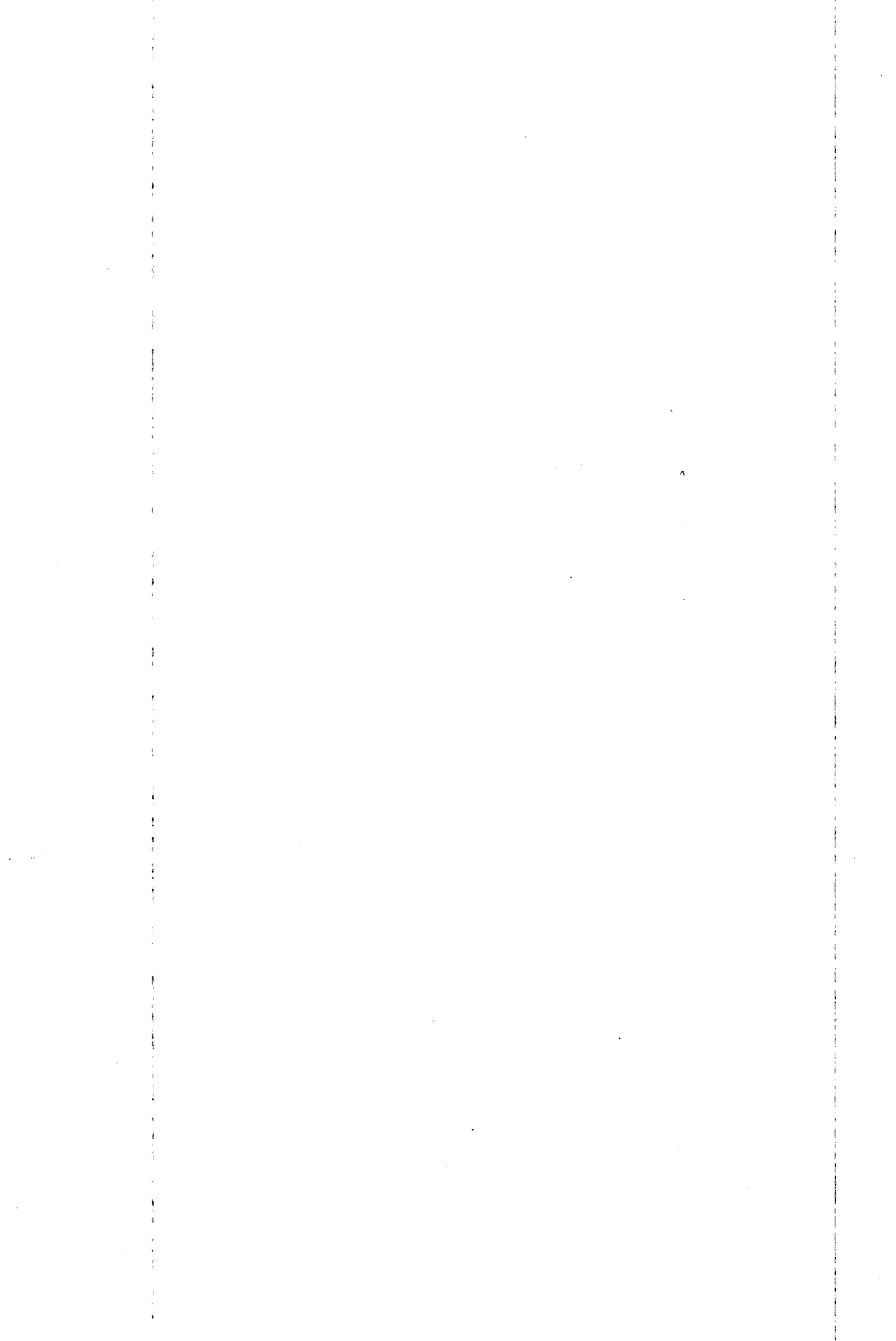
No fou així al comparar les taxes de parasitació amb l'edat, on s'observaren diferències estadísticament significatives ($p=0.001$) amb un Risc Relatiu $=0.46$ ($0.26 < RR < 0.79$), detectant-se una relació inversa entre els individus d'edat superior als 12 mesos i presència de paparres. Aquesta relació de la infestació amb l'edat no influeix, però, en que els animals joves (< 12 mesos d'edat) presentin majors prevalences.

Si bé en el cas de Lyme no es varen detectar variacions estacionals en la seropositivitat, aquestes sí que s'observaren en el cas de *R. conorii* on es produeix una concentració de la positivitat entre el mesos de març i setembre ($p < 0.05$).

La confrontació dels resultats entre els animals positius a *R. conorii* i els positius a *B. burgdorferi*, mostrà que els primers tenien una menor probabilitat de seropositivitat enfront de *B. burgdorferi*. Aquesta diferència es mesurà en un Risc Relatiu de 0.26 (0.08-0.88 éssent $p=0.01$). En la taula de contingència jjj, s'observa la distribució dels resultats (tabla jj)

<i>R. conorii/B. burgdorferi</i>	POSITIUS	NEGATIUS	TOTAL
POSITIUS	3	54	57
NEGATIUS	13	52	65
TOTAL	16	106	122

Tabla jjj: Distribució dels resultats segons la infecció.



2. CONILLS

Les espècies de paparres capturades sobre conills foren: *Rhipicephalus pusillus* (65.3%), *Haemaphysalis hispanica* (21.4%), *Ixodes ventalloi* (13%) i *R.sanguineus* (0.3%). De les 349 paparres capturades, el 60.1% de les paparres es varen recollir a la zona d' Arpal i la resta 39.9% a Almudevar. La distribució de les espècies de paparres trobades respecte a la localitat s'indica a la figura q:

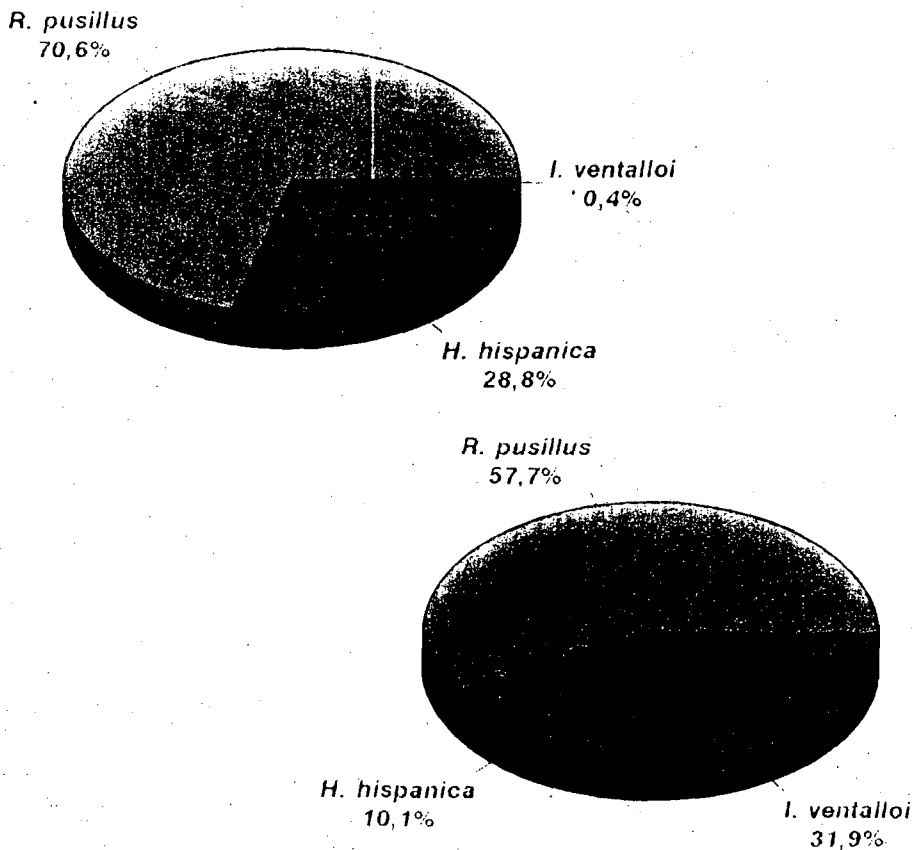


Figura q: distribució de les espècies de paparres capturades per localitats

El percentatge de les espècies de paparres capturades a Almudevar foren 57.2% *R.pusillus*, 31.9% *I.ventalloi*, 10.1% *H.hispanica* i 0.7% *R.sanguineus*. Respecte a Arpal es varen capturar 70.7% *R.pusillus*, 0.5% *I.ventalloi* i 28.8% *H.hispanica*. (Figura)

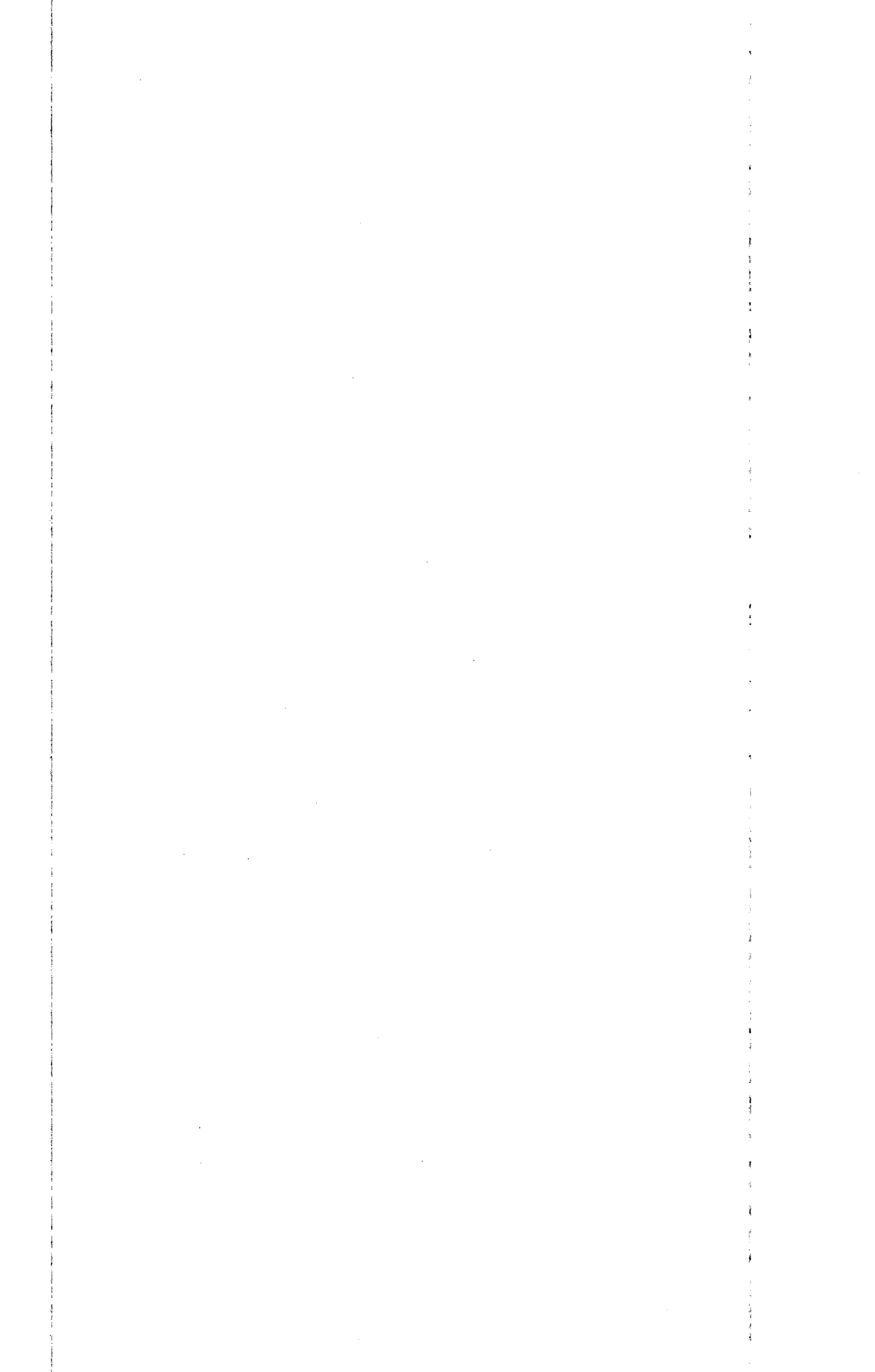


Els estadis adults tant de *R.pusillus* com *H.hispanica* foren presents al llarg de tot l'any. Les fases adultes de *I.ventalloi*, en canvi, varen presentar el seu màxim durant els mesos d'hivern, desapareixent a partir del mes de març; larves i nimfes es detectaren al setembre i octubre solapant, en el cas de les nimfes, la seva vida paràsita amb la dels adults. A diferència de *R.pusillus* i d'*H.hispanica*, en el cas de *I.ventalloi* es detectaren més especimens femelles que mascles. La distribució mensual de les paparres capturades es representa a la figura qq.

	<i>R. pusillus</i>			<i>H. hispanica</i>			<i>I. ventalloi</i>		
	L	N	A	L	N	A	L	N	A
I									
II									
III									
IV									
V									
VI									
VII									
VIII									
IX									
X									
XI									
XII									

Figura qq: Distribució mensual de les espècies de paparres capturades.

S'observaren diferències significatives entre la tasa de parasitació i l'espècie de paparra ($p=0.002$), observant que la proporció de conills amb més de 10 paparres fou superior en el cas de *R.pusillus*.

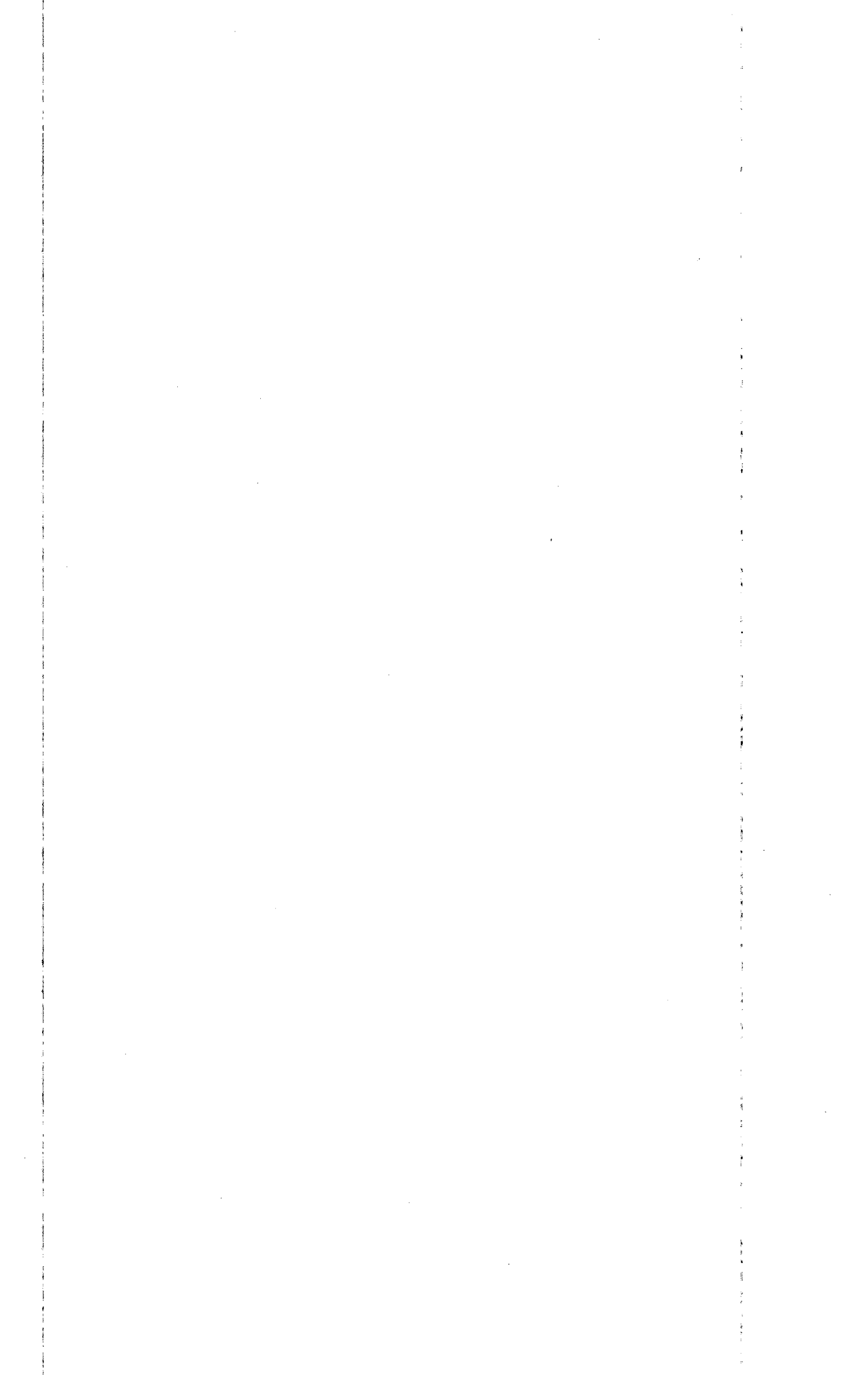


Igualment, existien diferències estadísticament significatives entre el sexe de l'hoste i l'espècie de paparra ($p=0.0002$); així es detectà una presència 3 vegades superior d'*I.ventaloi* en mascles que en femelles .

Respecte a l'estudi serològic, dels 90 sèrums de conills, el 85.6% procedia d'Arpal i el 8.9% d'Almudevar.

La seroprevalença en conill de *R.conorii* fou del 45.6% (41/90). Extrapolant aquest valor sobre la població general, la prevalença esperada per un nivell de confiança del 95% oscil.la entre 35% i el 56.4%.

Tabla www: Distribució dels títols d'anticossos enfront de *R.conorii*.

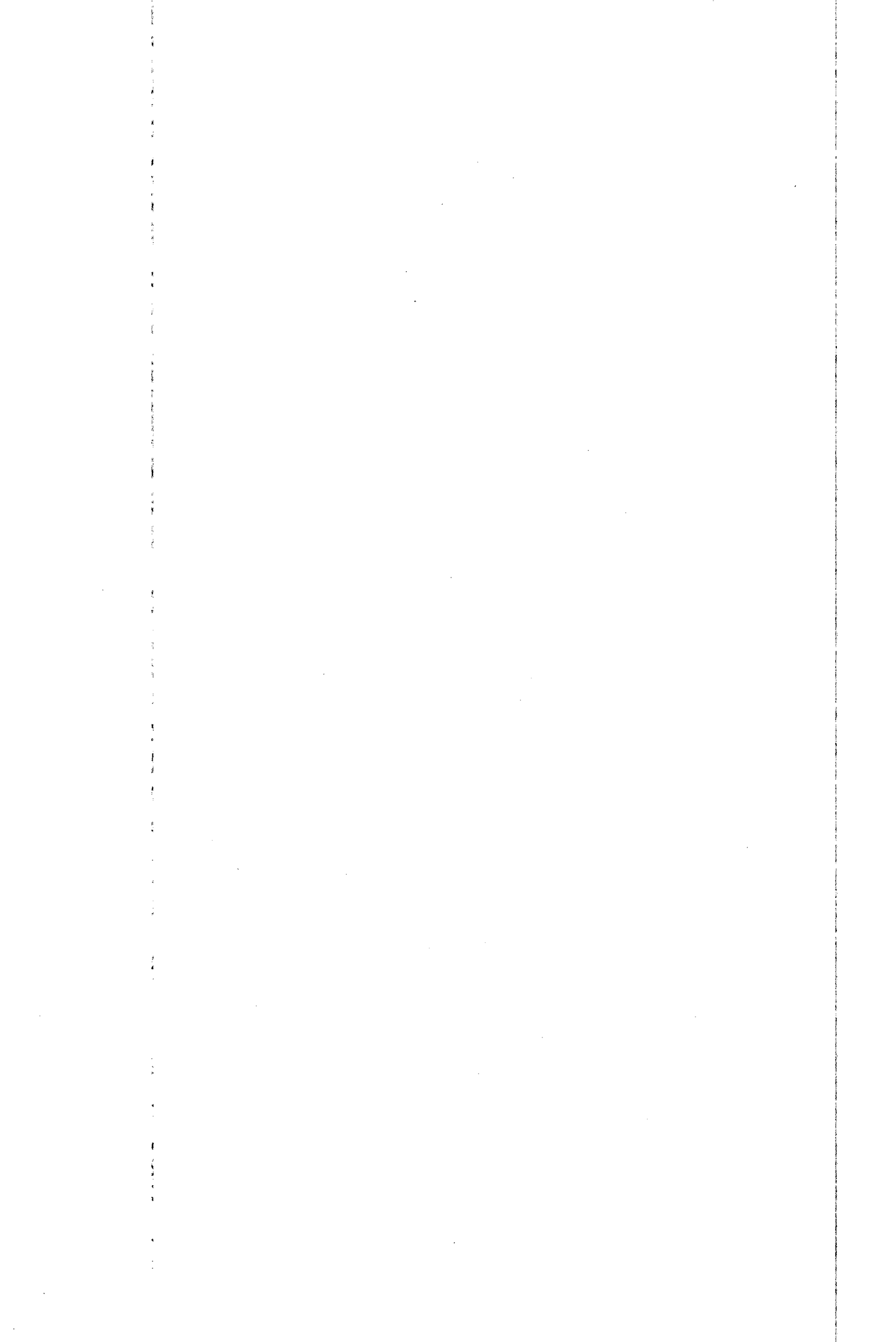


Pel que fa referència a la Malaltia de Lyme, la prevalença obtinguda fou del 14.4% (13/90), oscil.lant entre el 7.9% i el 23.4% en la població general. Si bé es detectà una major prevalença de Lyme a Almudevar (37.5% n=3/8), no existien diferències significatives donat que la mostra fou molt petita. La distribució dels títols d'anticossos es mostra a la tabla qqq.

Tabla qqq: distribució dels títols d'anticossos enfront de *B.burgdorferi*

No s'han observat diferències estadísticament significatives entre les infeccions i l'edat o el sexe de l'hoste. Vuit individus varen resultar positius a totes dues infeccions (n.s.). Tampoc existia relació estadísticament significativa entre les dues infeccions.

Respecte a les possibles reaccions creuades, tots els sèrums positius mostraren la mateixa positivitats enfront de *B.burgdorferi* després d'ésser adsorbits en el sorbent amb treponemes de Reiter.



II. CICLE DOMÈSTIC

1. POBLACIÓ DE GOSSOS DE CATALUNYA

Dels 155 sèrums de gossos procedents de diferents clíniques veterinàries de Catalunya, el 57.4% (n=89) procedien de la província de Barcelona, 12.9% (n=20) de la província de Girona, 11% (n=17) de Lleida i 18.7% (n=29) de Tarragona.

El 69.1% dels animals tenien una aptitud de companyia, 14% caçadors, 14% guarda, 2.2% s'utilitzaven tant com de companyia com de cacera i 1 animal (0.7%) era semental.

L'edat dels animals oscil.lava des de l'any fins als 15 anys.

El 40.4% dels animals vivia en pis (n=57), 42.6% (n=60) en jardí, i la resta (17%) vivia en granges (7.8%), refugis (3.5%) o criadors (5%).

Malauradament no vàrem poder disposar de dades sobre la parasitació per paparres.

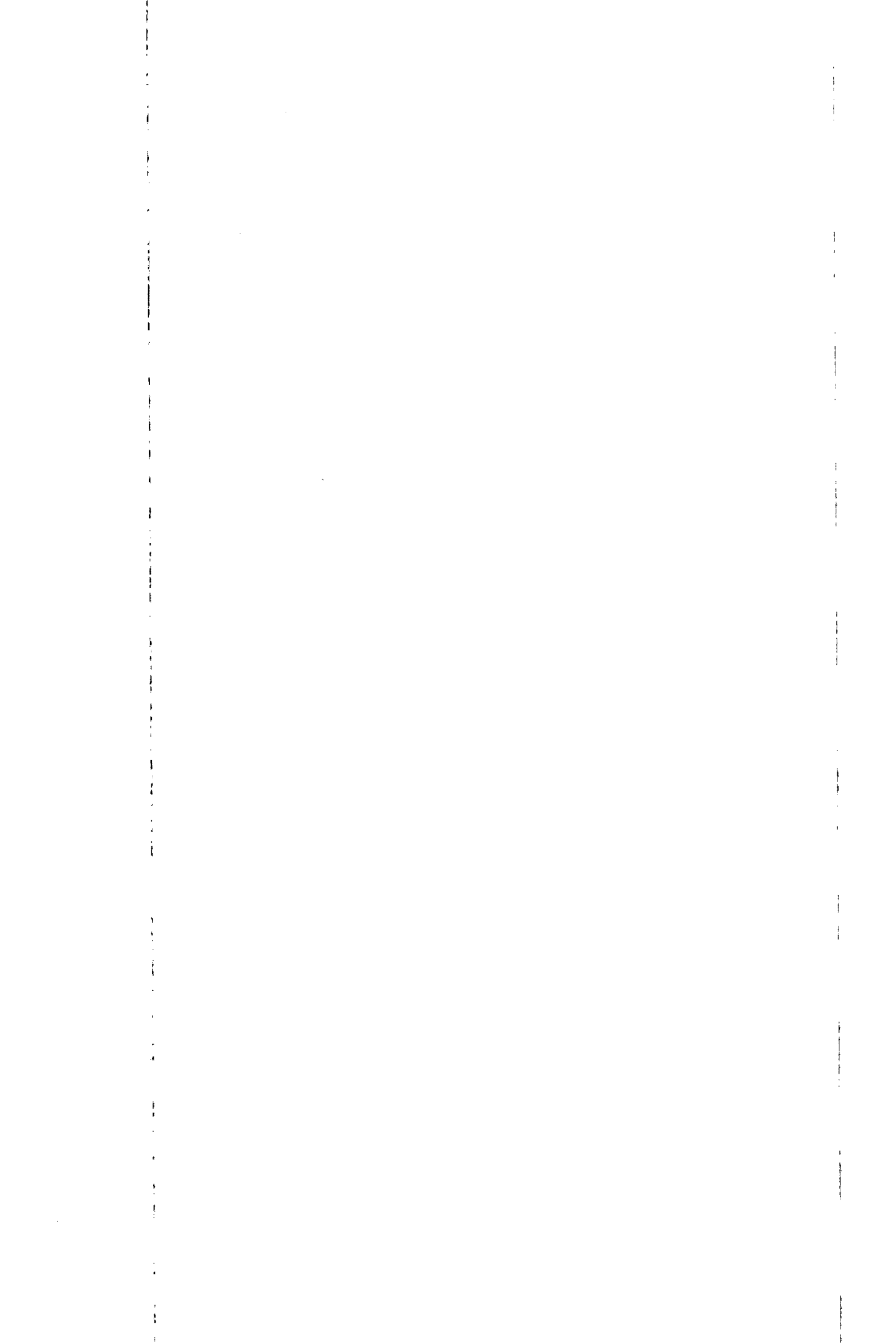
Estudi serològic enfront de *R. conorii*:

La seroprevalença enfront de *R. conorii* fou del 23.1% (30/130). Extrapolant aquesta valor a la població general obtenim una prevalença amb un nivell de confiança del 95% que oscil.la entre 16.1% i el 31.2%. La distribució dels títols d'anticossos es presenta a la tabla ccc:

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Biblioteca General
EXEMPLE A
08193 Bellaterra (Barcelona) Espanya

Tabla ccc: Distribució dels títols d'anticossos enfront de *R. conorii*



No s'han observat diferències estadísticament significatives entre la positivitat i variables com el sexe, la raça, el tipus de capa, l'aptitud o el lloc de residència.

Degut a que les mostres es recolliren durant uns mesos concrets, no es varen poder detectar diferències estacionals respecte a la positivitat.

Respecte a l'edat, es detectaren diferències estadísticament significatives ($p=0.001$) al comparar animals joves (menys de 3 anys) i positivitat, observant una relació inversa (Risc Relatiu =0.11-0.72), és a dir, que els animals adults (a partir de 3 anys) tenen més risc de infectar-se per *R. conorii* i, per tant, de seroconvertir.

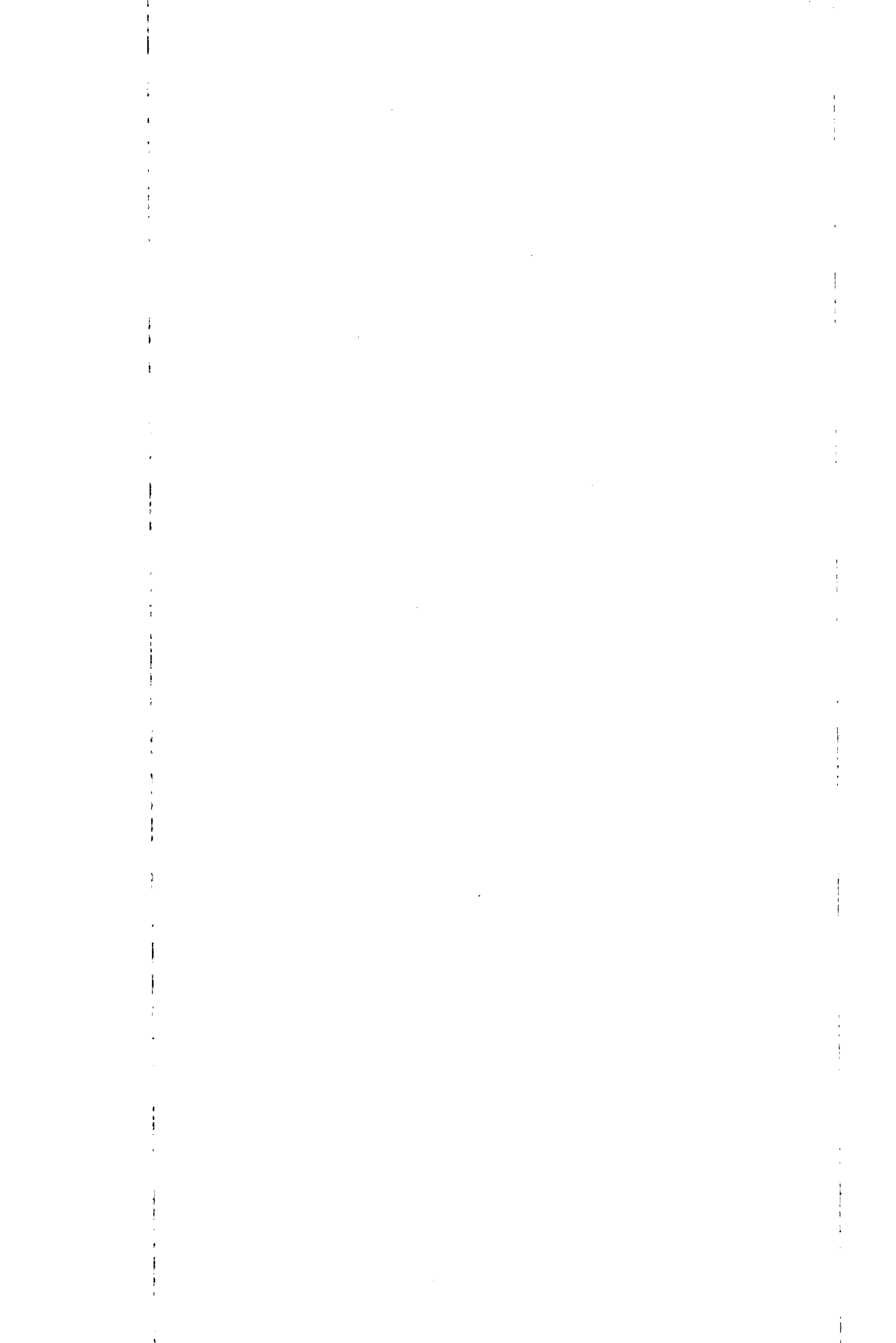
Dels 30 animals positius, el 68% eren de companyia ($n=17$), 4% ($n=1$) caçadors, 4% ($n=1$) companyia i guarda, 24% ($n=6$) guarda.

El 36.7% dels gossos positius vivia en pis mentre que el 63.3% restant a l'exterior. No s'observaren diferències significatives entre la positivitat i el *modus vivendi*, entenent com a tal viure a l'exterior (jardí, pati etc.) o no (pis, casa).

Estudi serològic de *B.burgdorferi*

Respecte a la Malaltia de Lyme, obtinguérem una prevalença del 3.2% (5/155), dels quals 3 presentaren un títol de 1/64, 1 de 1/128 i 1 de 1/256. De cap d'ells es va fer referència de cap procés clínic i acudiren a la consulta per vacunacions i/o desparasitacions. L'extrapolació de la seroprevalença a la població general oscil·là entre 1% i un 7.3% (95% n.c.)

Tots cinc, vivien a Barcelona (3) o rodalies (Molins de Rei -1- i Vilanova-1-). Tots eren de companyia. Les races: 2 Cocker, 1 Canitx, 1 Samoyedo i 1 Pastor Alemany. Tots d'edat superior als 3 anys. Igualment tots cinc vivien en pis, detectant-se diferències significatives ($p=0.006$).



Els cinc sèrums positius foren analitzats per la prova d'aglutinació enfront de *Leptospira*. D'ells 4 foren positius a la prova d'aglutinació a *Leptospira*. L'únic que fou negatiu a la prova de la *Leptospira* mostrà un títol enfront de *B.burgdorferi* de 1/64.

Títols Lyme/Leptospira	Positius	Negatius
1:64	2	1
1:128	1	0
1:256	1	0

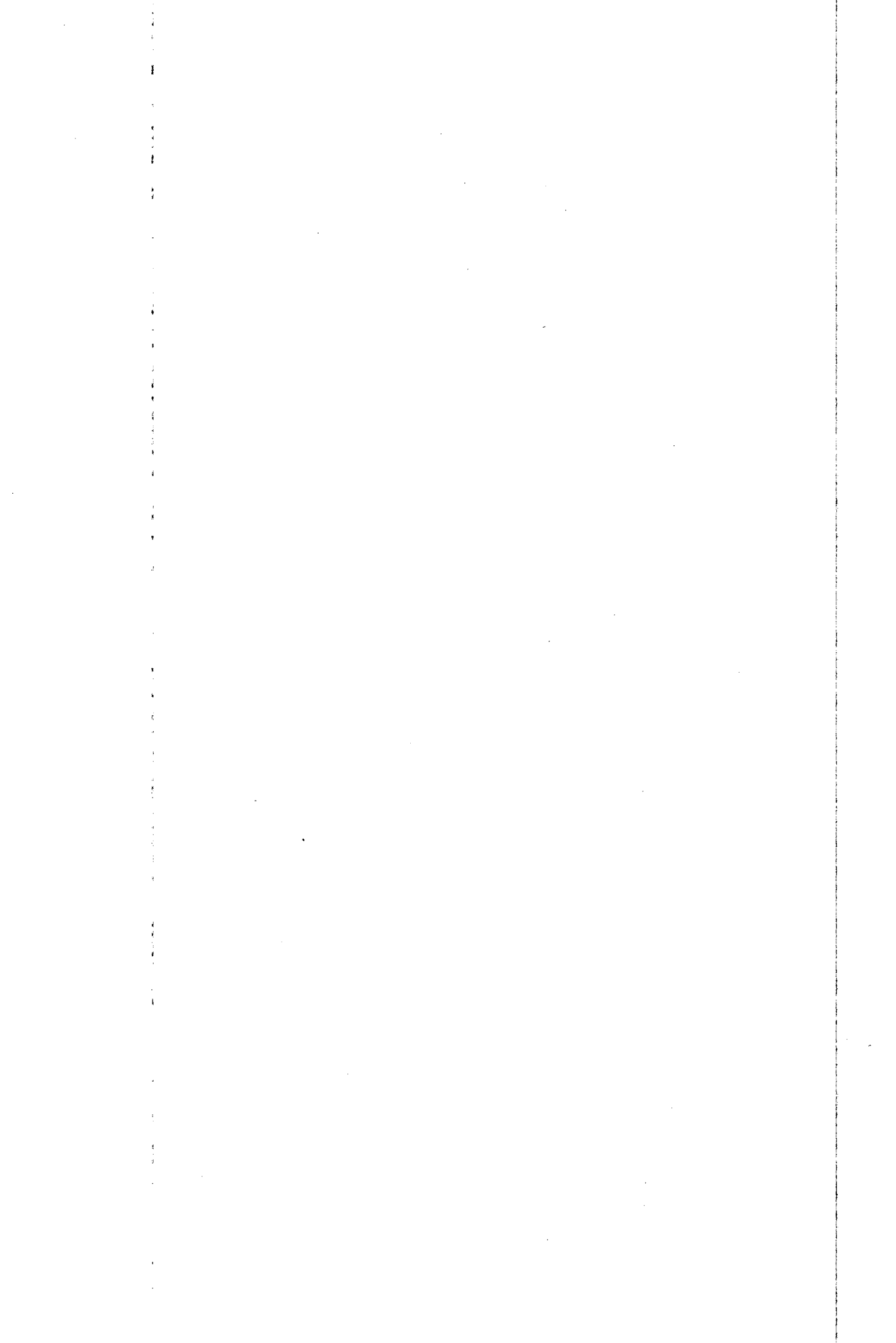
Tabla www: Relació entre els positius a *B.burgdorferi* i els positius a *Leptospira*.

2. POBLACIÓ DE GOSSOS DE LA COMARCA DEL BAIX LLOBREGAT

Els gossos vivien en àrees rurals o peri-urbanes del Delta del Llobregat. Respecte a les races, el 60% dels gossos eren creuats, 25% Pastors Alemanys i la resta altres races. L'edat oscil.lava entre els 6 mesos i els 16 anys. El 60% dels gossos mostrejats eren mascles i el 40% femelles.

El 75% (n=98) dels gossos eren guardians de camps de conreu o masies, 12.3% (n=16) animals de companyia, 9% (n=12) caçadors i 3% (n=4) pastors.

El 77% vivia fora, 16% a l'interior de magatzems o palleres. Només el 1.55% dels animals vivia en pisos.



Estudi serològic enfront de *R. conorii*:

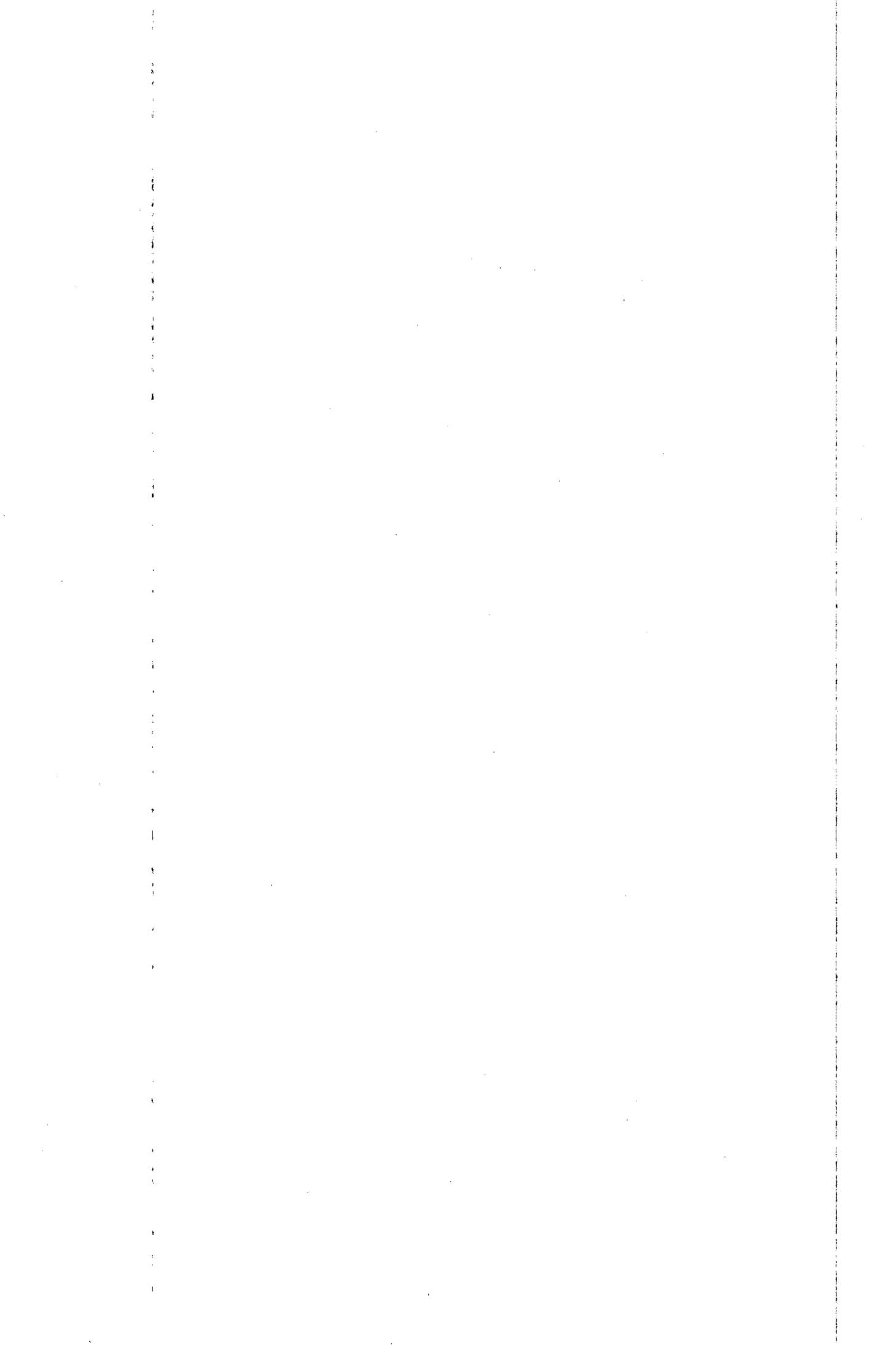
Es detectà una seroprevalença enfront de *R. conorii* del 53% (70/130). Aquesta prevalença oscil·là entre el 44.8% i el 62.6% al extrapolar aquest valor en la població general amb un nivell de confiança del 95%. La distribució dels títols d'anticossos es mostra en la taula ***.

Taula***: Distribució dels títols d'anticossos enfront de *R. conorii*

Observem diferències estadísticament significatives entre l'aptitud i la positivitat ($p=0.0002$), detectant que els gossos amb aptitud de guarda presenten més infecció. També observem que els animals que viuen a l'exterior tenen una major positivitat ($RR= 1.86$ $p=0.01$).

També existeixen diferències significatives al comparar la positivitat i l'edat ($p=0.0018$), detectant un $RR = 0.29-0.79$ per gossos de menys de tres anys.

Dels gossos positius, el 71% viuen amb altres gossos, però no s'han trobat diferències significatives al comparar la positivitat amb els gossos que viuen en grup. Tampoc si comparem el títols d'anticossos amb els que viuen junts.



Existeixen diferències estadísticament significatives entre la seroprevalença detectada en gossos procedents de diferents llocs de Catalunya i la detectada en els gossos del Delta del Llobregat ($p < 0.001$). La relació observada figura a la taula jjj.

	Positiu	Negatiu	Total
Catalunya	30	100	130
Baix Llobregat	70	60	130

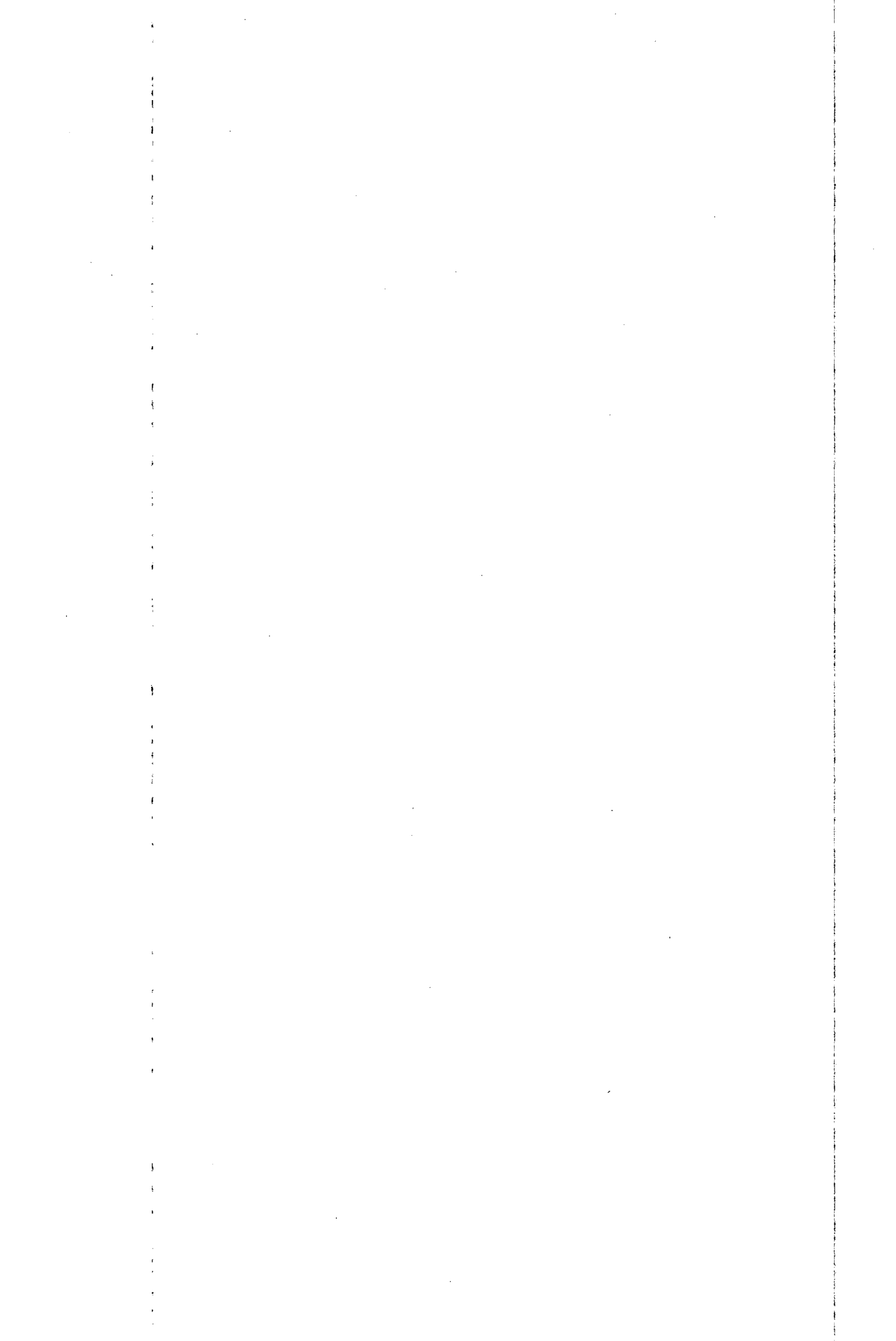
Taula jjj: Relació de les prevalences observades en els diferents zones mostrejades

3. VARIACIÓ ESTACIONAL

Nou dels 18 gossos varen presentar seroconversió al llarg dels 16 mesos que va durar l'estudi.

S'observaren diferències respecte a cadascun dels grups de gossos estudiats. Així el lot format per 8 gossos que viuen al llatzaret (F1 a F8) foren sempre negatius. El lot constituït per cinc gossos que viuen a la gossera de la Facultat (C1 a C5) presentaren seroconversions a diferents títols, excepte un dels gossos (C4) que va romandre sempre negatiu; un dels que va presentar seroconversió (C2) va morir el mes de març del 96, per la qual cosa no es va poder fer el seguiment en els darrers 6 mesos. El tercer lot format per cinc gossos que viuen en semi-llibertat, tots presentaren seroconversió però tres mantingueren uns títols base de 1:20 a partir de la primavera del segon any. La figura (estació2.prs) mostra la variació d'anticossos a partir de títol 1:20 respecte als mesos.

Durant els mesos de gener i febrer tots els gossos foren negatius. El mes de desembre un animal (1/9) mantingué un títol positiu de 1:40 per a esdevenir negatiu al gener i recuperar el mateix títol al mes de març.



La figura (estació.prs) mostra el percentatge de positivitat respecte als mesos.

Els títols màxims (1:160) es detectaren durant els mesos de juny, juliol i agost.

Considerant positius els gossos amb títols superiors o iguals a 1/40, vàrem observar que durant el segon any la positivitat disminuí dràsticament. Així si durant el període comprès entre juny i desembre de 1995 es detectaren 7 animals positius, del mes de gener fins a setembre de 1996 només 4 gossos presentaren en algun moment un títol positiu.

4. PAPPARRES

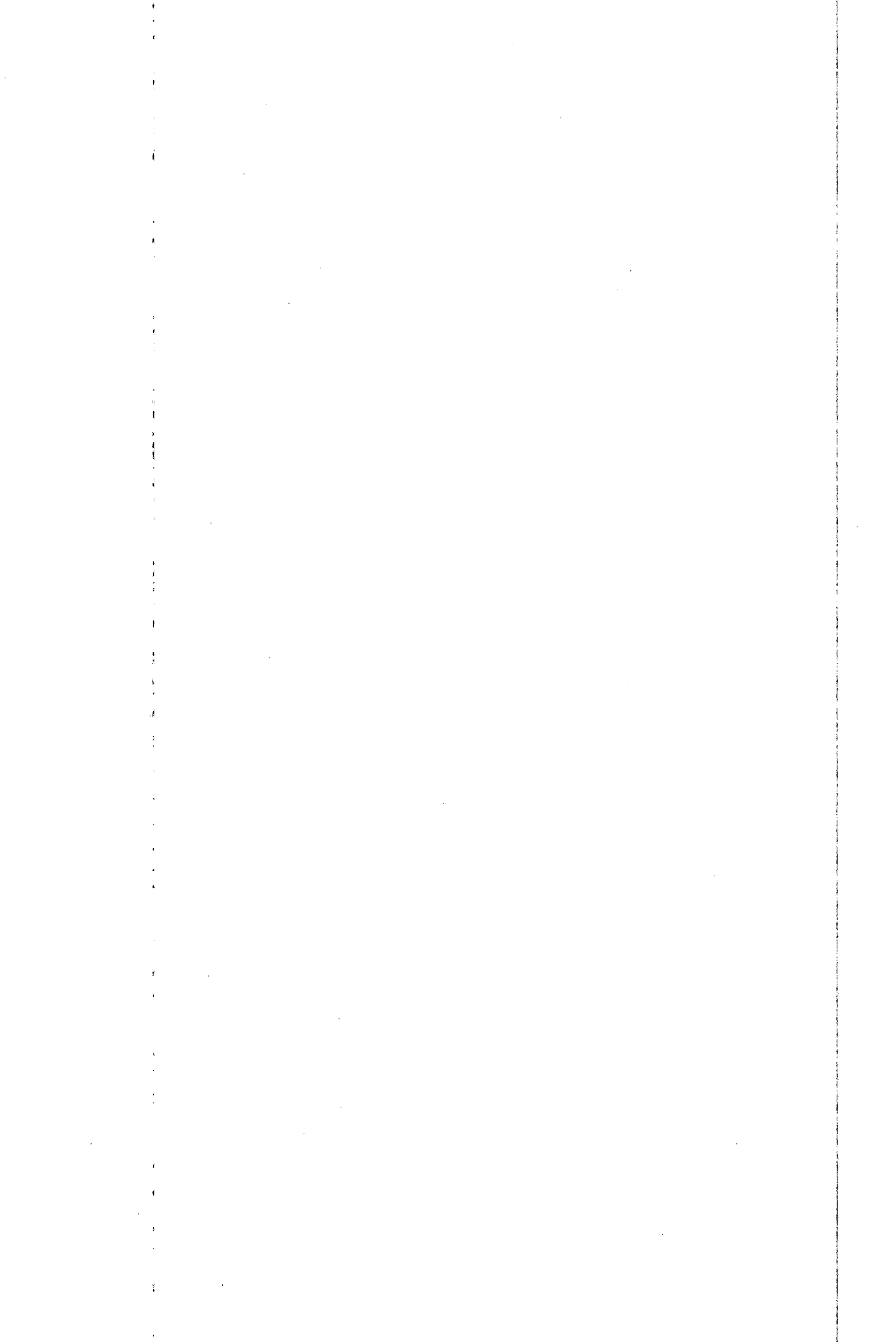
En el mostreig realitzat a Catalunya, es varen capturar un total de 464 paparres en gossos, éssent totes *Rhipicephalus sanguineus*.

De les 464, 249 foren processades per IFD, 227 per Tinció de Giménez, 36 exemplars varen poder ser processats per ambdues tècniques i 24 paparres no es varen poder analitzar.

Dels especímens processat epr IFD (n=249) 27 resultaren positives i 222 negatives. De les 227 que foren analitzades per la tinció de Giménez, 25 varen donar un resultat positiu i 202 negatiu.

Vàrem considerar positives aquelles mostres on es detectaren tres o més partícules intracitoplasmàtiques, amb morfologia compatible a rickettsia.

Pel que fa referència a les paparres recollides al Delta del Llobregat, es varen capturar un total de 137. El 28.4% foren capturades mantejant la vegetació mentre que la resta 71.5% es capturaren parasitant gossos. Les espècies capturades foren: 84.7% *R.sanguineus* (n= 116) de les que 96 foren capturades sobre gos i 20 en manta, 10.2% *R.bursa* (n=14) totes en manta i 5.1% *R.turanicus* (n=7), 5 en manta i 2 sobre gos.



108 paparres foren analitzades mitjançant una IFD, de les que 31 foren positives i 77 negatives. 51 foren processades per Tinció de Giménez observant positivitat en 19 dels especímens éssent la resta (n=32) negatius. 30 especímens foren processats per ambdues tècniques. Vuit paparres no varen poder ser processades.

De les paparres que foren positives al Delta del Llobregat per Giménez o per IFD, el 74.46% (35/47) foren *R.sanguineus*, 19.1% (9/47) *R.bursa* i 6.4% (3/47) *R.turanicus*.

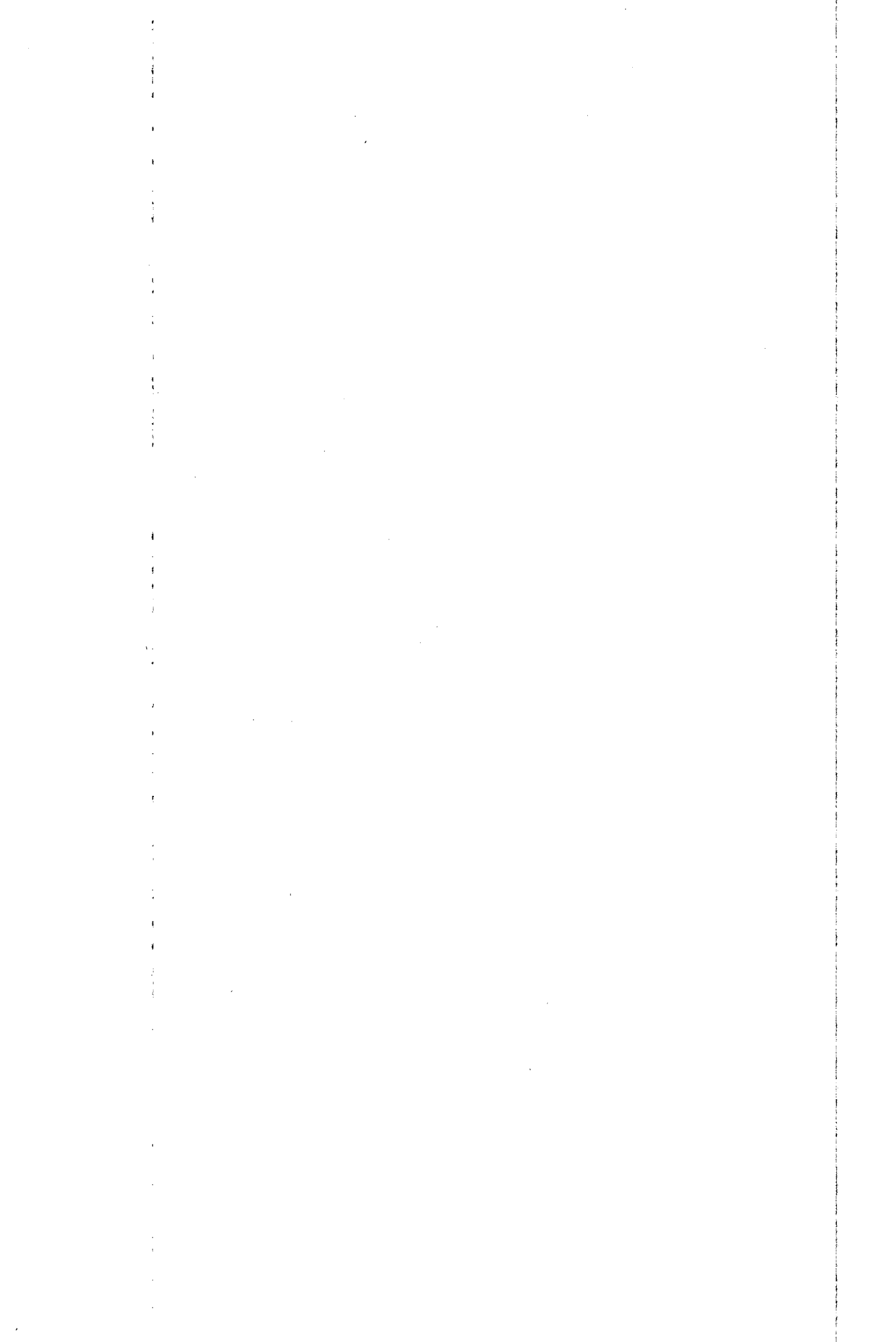
Els motius pels quals 32 especímens (24 procedents de paparres capturades a tota Catalunya i 8 procedents del Delta del Llobregat) no es varen poder analitzar foren: manca de cèl.lules (n=11), presència en el frotis de fongs habituals de l'escut (n=15) i manca d'obtenció d'hemolimfa en el frotis (n=2) i paparres mortes (n=4).

D'altra banda, cal destacar els diferents factors que han dificultat la interpretació dels resultats. Presència d'altres infeccions bacterianes (61.9%), pocs hemòcits en el frotis (23.1%), *background* o soroll de fons (15%).

La comparació dels resultats obtinguts per IFD i per Tinció de Giménez en els especímens que es varen poder processar per ambdues tècniques es mostra en la taula xxx:

	IFD +	IFD -	TOTAL
GIM +	7	19	26
GIM -	6	34	40
TOTAL	13	53	66

Tabla xxx: Comparació dels resultats per IFD i per Giménez.

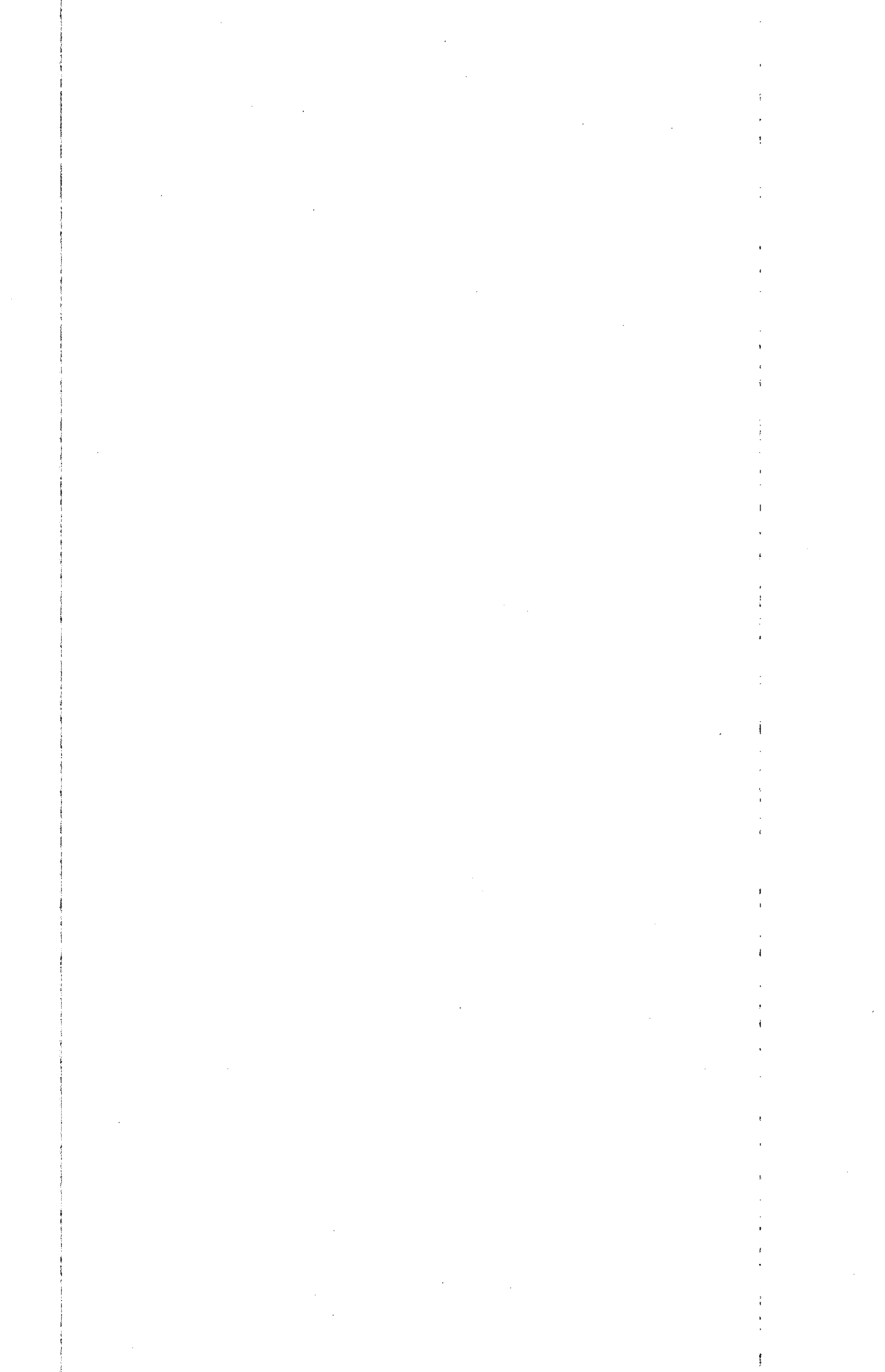


La comparació de les prevalences d'infecció obtingudes en les paparres de Catalunya amb la dels gossos de Catalunya, així com els resultats detectats a la comarca del Baix Llobregat es mostra en la tabla ggg, detectant-se diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$).

	Paparres	Gossos
Catalunya	10.8%	23.1%
Baix Llobregat	28.7%	53.8%

Taula ggg. Comparació dels percentatges de positivitat obtinguts en gossos i paparres en les diferents àrees mostrejades.

També es detecten diferències significatives al comparar les prevalences d'infecció entre les paparres capturades al Baix Llobregat i les capturades a diferents àrees de Catalunya ($p < 0.0001$).



III. ESTANDARITZACIÓ D'UNA IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA

a.- Dilució d'antígen

La dilució d'antígen es calculà en funció de la màxima dilució que permetés discernir clarament entre sèrums positius i negatius. Aquesta dilució fou del 5%.

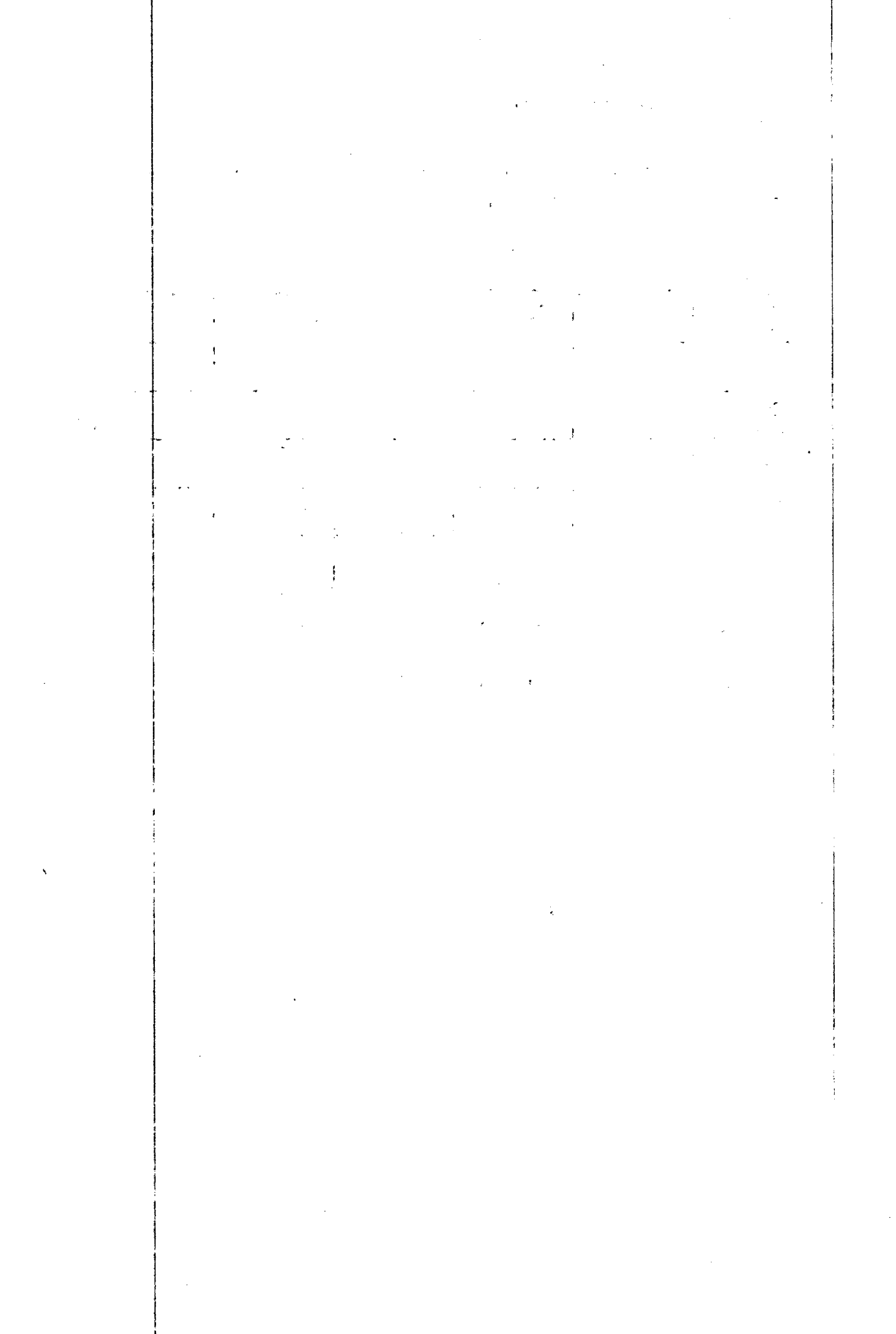
En tots els casos, i amb la finalitat de comprovar que els diferents lots presentaven una concentració similar de rickettsia purificada, es procedí al contacte tal i com s'ha especificat anteriorment. El nombre de rickettsies per camp corresponent a la dilució del 5% oscil.lava entre 1500 i 1800, aproximadament. Només en un dels lots es va haver de realitzar una dilució superior (7%) per a obtenir un nombre addient de rickettsies per camp.

b.- Comparació de dues proves.

Dels 18 sèrums de gossos analitzats mensualment al llarg de 16 mesos, el 22.8% varen ésser positius a totes dues proves, el 71.2 % van ésser negatius a ambdues, resultant el 6% restant negatius per una prova i positius per l'altre. La comparació dels resultats obtinguts per la IFI de bioMérieux i la IFI desenvolupada per nosaltres es realitzà calculant la concordança entre ambdues a partir dels valor kappa. La distribució dels resultats es mostren a la tabla xxx. Es consideraren positius aquells sèrums amb títol superior o igual a 1:40.

b/O	+	-
+	35 (a)	3 (b)
-	6 (c)	109 (d)

Tabla xxx: Comparació dels resultats obtinguts per a cada una de les IFI.



IV. CAPACITAT VECTORIAL D'*Ixodes ricinus* PER A TRANSMETRE *B.afzelii*

El grup de gerbus A infestats amb nimfes d'*I.ricinus* (soca Berlin) infectades experimentalment amb *B.afzelii* transmeteren la infecció a les larves procedents de La Rioja, ja que aquestes foren totes positives al IFI. Un cop aquestes larves varen mudar a nimfes continuaven éssent positives tot i que a l'observació visual el nivell d'infecció va ser inferior.

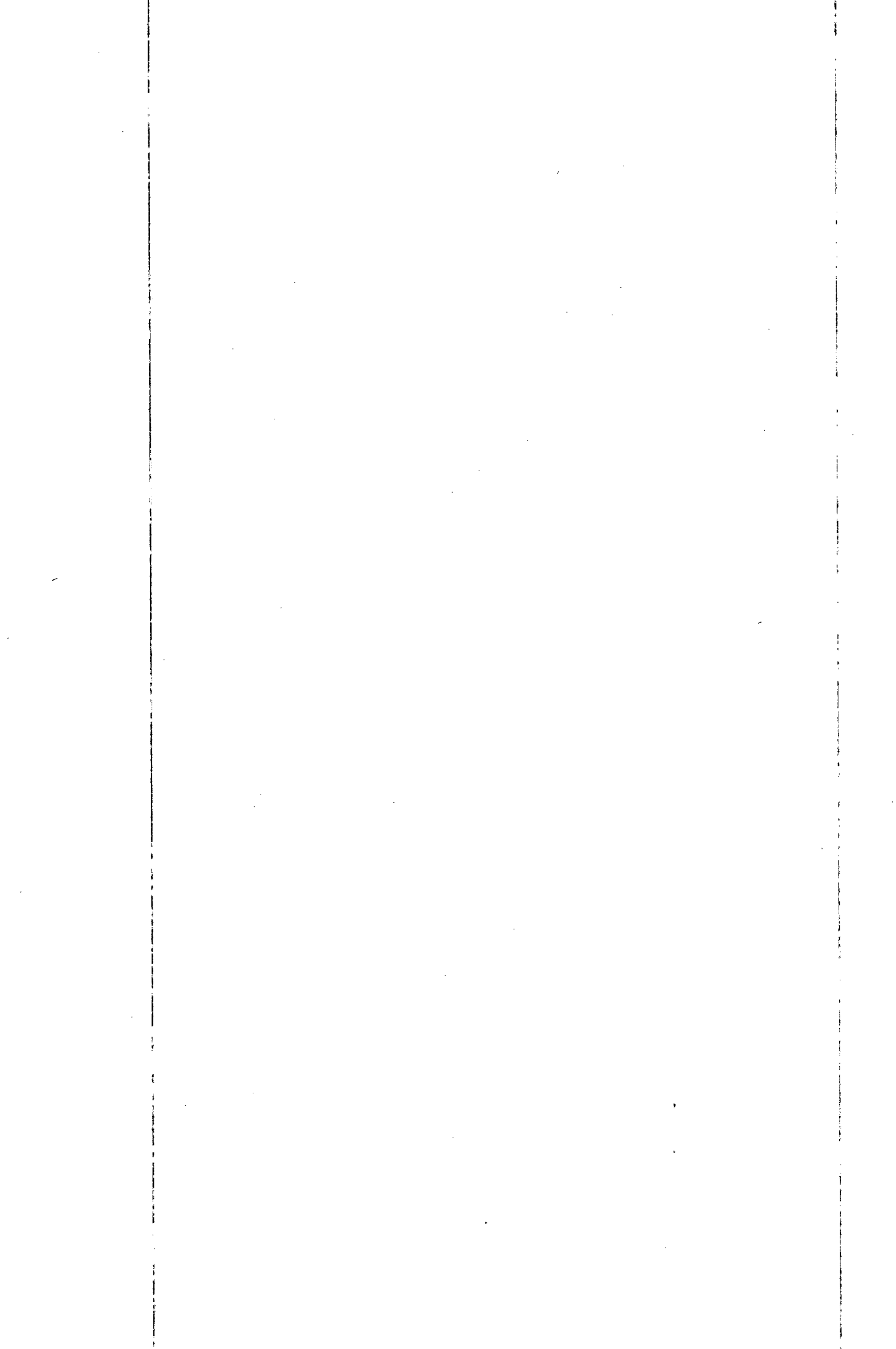
D'igual manera, les larves repletes obtingudes de la infestació del grup de gerbus B mostraren positivitat, tot i que el nivell d'infecció inicial -expressat com a nombre de d'espироquetes per paparra al dia 0- fou molt divers presentant oscil.lacions entre els diferents lots de paparres que anaven des de 75 fins a 16.629. A la taula fff es mostra la variació detectada del nombre total d'espироquetes per jerbus calculada a partir de la mitjana obtinguda del lot de cinc paparres procedents de cada jerbus al llarg dels diferents dies de l'experiment i a les diferents temperatures. Cal assenyalar que no consta el jerbus Ly3A perquè totes les paparres procedents d'aquest es varen perdre.

Tal i com hem pogut observar a la taula fff, sembla ser que el grau d'infecció inicial marcarà l'evolució posterior de la infecció. A partir d'aquí vàrem definir una nova variable producte de la relació entre el nombre d'espироquetes per jerbus als dies 7, 21, 42 i 80 respecte al nombre d'espироquetes en el moment inicial (dia=0).

Taxa = N° espироquetes per jerbus al dia ₇₋₈₀ / N° d'espироquetes per jerbus dia 0.

L'estudi estadístic es realitzà a partir d'un ANOVA considerant aquesta nova variable com a dependent i definint com a variables independents el temps, els dies i els jerbus. Vàrem realitzar diferents combinacions entre dia-temperatura. temperatura-jerbus i dia-jerbus, totes elles aplicades sobre la taxa i en cap cas vàrem observar diferències estadísticament significatives.

Tampoc es detectaren diferències significatives en l'evolució de la infecció entre les dues soques de paparres utilitzades (soca Berlin i soca Rioja).

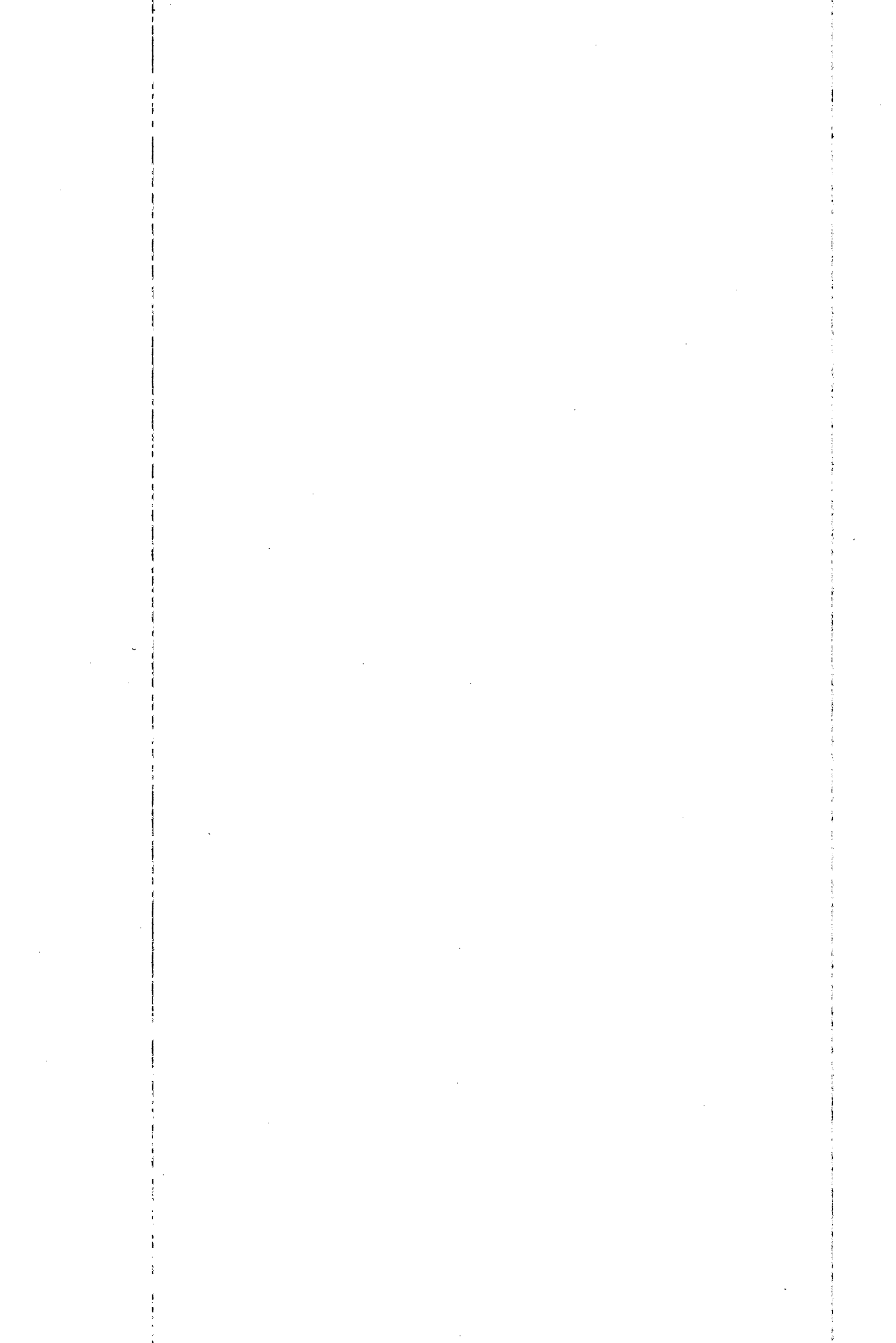


Per últim, valorant tots els resultats en global observem que independentment del nombre d'espiroquetes per jerbus inicial, aquest valor tendeix a convergir al arribar al final de l'experiment (dia 80), moment en el que les larves ja havien mudat a nimfes (tabla vvv,bbb i nnn).

Els controls foren sempre negatius.

Jerbu	Dia 0	Dia 7		Dia 21		Dia 42		Dia 80	
		18°C	26 °C	18°C	26 °C	18°C	26 °C	18°C	26 °C
LY1A	9068	8315 (0,91)	5652 (0,62)	12654 (1,40)	6528 (0,72)	10642 (1,17)	8630 (0,95)	6316 (0,70)	2906 (0,32)
LY1B	179	126 (0,70)	50 (0,28)	0	0	223 (1,25)	0	224 (1,25)	1043 (5,83)
LY2A	2459	1181 (0,48)	126 (0,05)	581 (0,24)	2996 (1,22)	1520 (0,62)	760 (0,31)	596 (0,24)	754 (0,31)
LY2B	6255	4597 (0,74)	4723 (0,76)	13638 (1,18)	4784 (0,76)	2728 (0,44)	11357 (1,82)	4918 (0,79)	3204 (0,51)
LY3B	13188	2738 (0,21)	3818 (0,29)	939 (0,07)	2683 (0,20)	2146 (0,16)	1207 (0,09)	1207 (0,09)	1565 (0,12)
LY3C	754	728 (0,97)	1005 (1,33)	2683 (3,56)	1252 (1,66)	268 (0,36)	715 (0,95)	671 (0,89)	820 (1,09)
LY3D	13439	1733 (0,13)	3944 (0,29)	5723 (0,43)	2683 (0,20)	3443 (0,26)	1341 (0,10)	1230 (0,09)	4695 (0,35)
R1	75	0	0	0	0	0	0	75 (1,00)	373 (4,97)
R2	16629	6305 (0,38)	2085 (0,13)	5231 (0,31)	9166 (0,55)	6260 (0,38)	4918 (0,30)	671 (0,04)	3726 (0,22)

Taula fff. N° d'espiroquetes per jerbus al llarg dels dies i a les diferents temperatures. Expressada entre parèntesi la taxa.



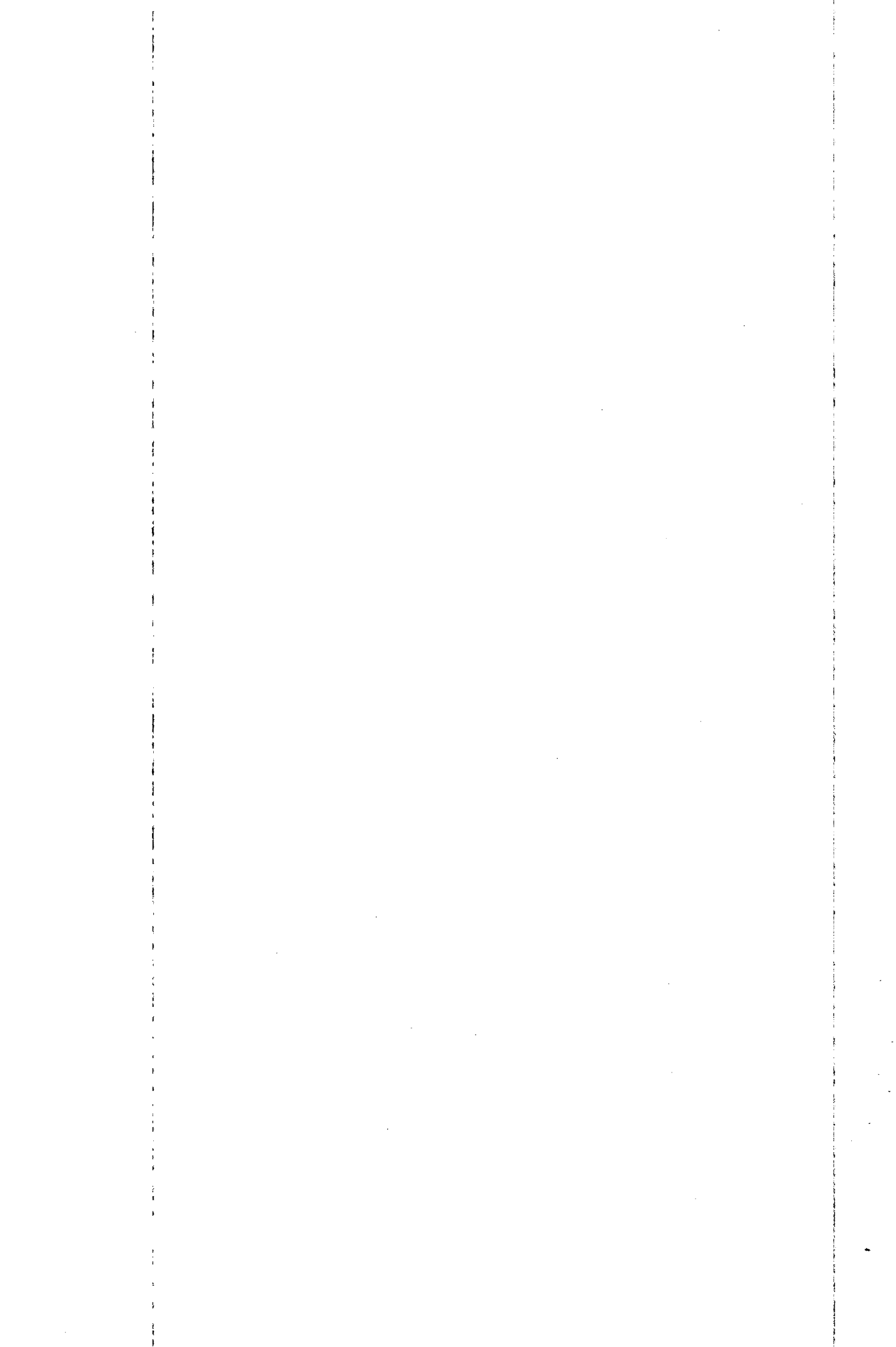
DISCUSSIÓ

I. CICLE SALVATGE

* GUINEUS

L'elevada seroprevalença detectada en les guineus enfront de *R. conorii* és un indicador de la circulació d'aquest patògen en la natura, involucrant les paparres que parasiten aquesta espècie. De fet, l'espècie de paparra més freqüent ha estat *R. sanguineus* (83.9%), principal vectora de la Febre Botonosa Mediterrània. Aquests resultats, juntament amb la capacitat de les paparres de transmetre *R. conorii* tant via transovàrica com transestadial, fan pensar en l'existència d'una població estable de paparres infectades.

El comportament tròfic de la guineu és molt variat. Els seus hàbits alimenticis inclouen, entre d'altres, micromamífers i conills. Aquestes dues espècies intervenen, sia com a reservoris sia com a suport tròfic de paparres infectades, en l'epidemiologia de la FBM. Les paparres infectades d'aquestes preses l'abandonaran en el moment en el que detectin la hipotèrmia en el seu hoste original i es dirigiran a la guineu, parasitant-la. Així *R. pusillus*, paparra pròpia del conill, és compartida per la guineu a partir de la predació o per ocupació de caus abandonats. En els casos en els que s'ha detectat *R. pusillus* sempre es tractava d'infestacions mixtes. *R. sanguineus*, en canvi, té com a principal hoste al gos i, per extensió, als cànids. Gilot i Aubert (1985) classifiquen *R. sanguineus* com una paparra poc freqüent en la guineu als Alps Francesos, no observem el mateix en aquest estudi on aquesta ha estat l'espècie més freqüent. Els mateixos autors apunten que el parasitisme per *R. sanguineus* afecta gairebé exclusivament als adults o animals d'edat superior als 10 mesos, mentre que en els animals més joves la parasitació es produeix principalment a l'interior dels caus on són presents espècies endòfiles com *I. hexagonus* i *R. pusillus*. L'elevat percentatge de *R. sanguineus* capturades sobre la guineus pot ser degut a diversos factors: al moment de recollida de les mostres, la majoria de les quals es recolliren durant els mesos de març, abril i juliol, època de màxima activitat de *R. sanguineus*, i d'altra banda, sospitem d'un cert comportament "nidícola" per part de *R. sanguineus*, comportament força comú en les soques "domèstiques" de *R. sanguineus*.

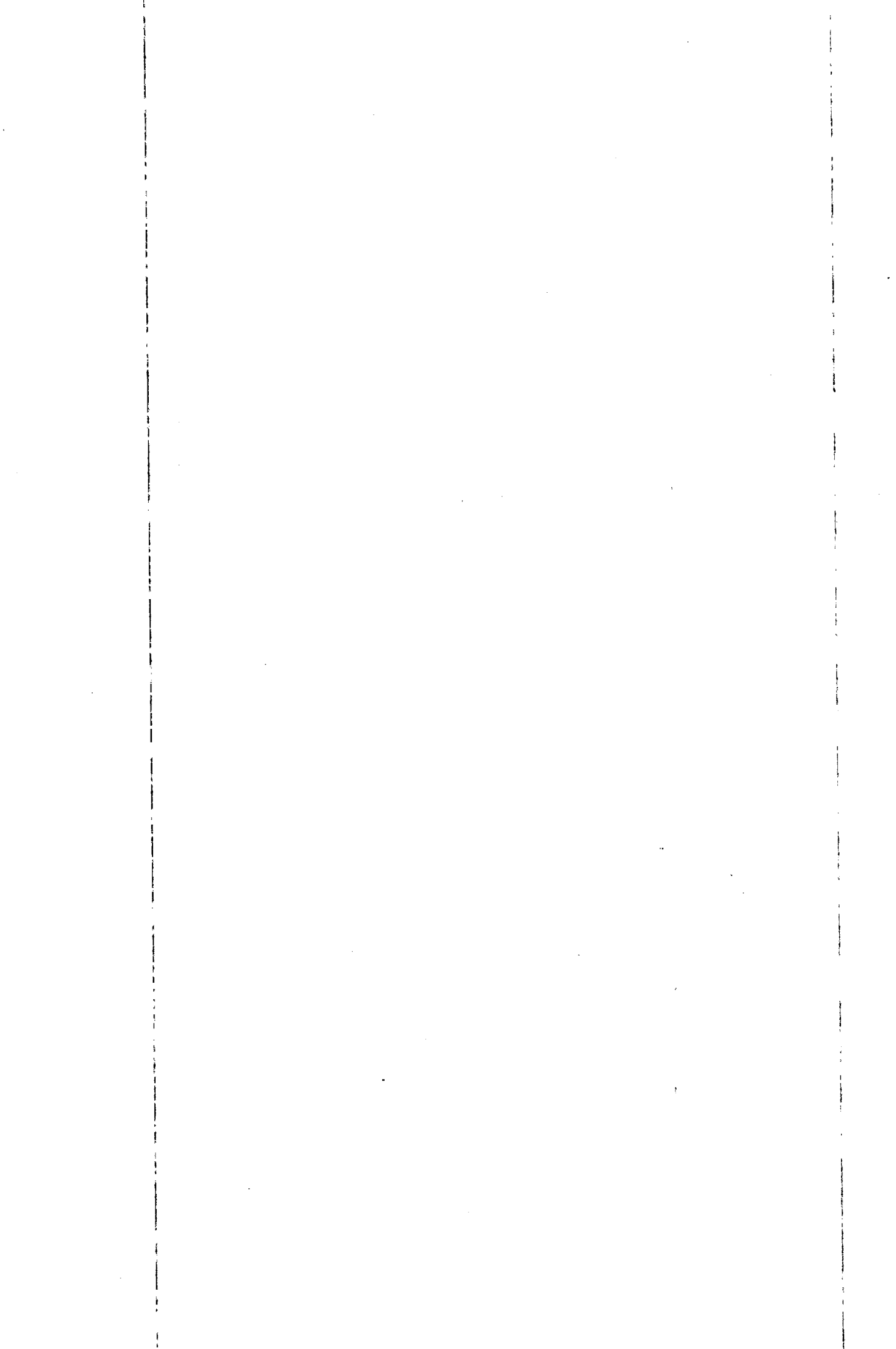


(Estrada 1995). Possiblement aquest elevat percentatge respecte a les altres espècies ha estat el motiu pel qual no hem observat diferències entre l'edat dels animals i l'espècie de paparra i tampoc ens ha permès evaluar l'estacionalitat de les altres espècies de paparres capturades sobre la guineu.

Observem que els animals joves estaven més parasitats que els individus adults. Els hostes adquireixen resistència a les paparres, la qual cosa es tradueix en una disminució del nombre de paparres infestants, disminució d'ous viables i un augment en la durada de la presa de sang (Wikel SK. 1996). Això fa pensar que els individus més joves encara no han desenvolupat una immunitat de suficient magnitud com la que poden haver desenvolupat els adults. A més a més, els cadells romanen més temps al cau i, un cop deslletats, s'alimenten de conills i micromamífers per la qual cosa l'exposició a paparres és major.

Existeix una circulació de paparres infectades en poblacions de guineus (cadells i adults) i encara que els animals més joves (sia per comportament tròfic sia per immunitat enfront de paparres) presentin una tasa de parasitació superior a la dels adults no s'observa el mateix respecte a la positivitat enfront de qualsevol de les dues malalties. Existeixen evidències de que la immunitat enfront de les paparres dificulta la transmissió de patògens (Wikel SK, 1996). Seria d'esperar, doncs, que els individus joves i, per tant, més parasitats, presentessin majors prevalències. En canvi, no hem detectat diferències estadísticament significatives al comparar l'edat amb la positivitat creiem que, possiblement, això sigui degut a que els adults desenvolupin una certa resposta immunitària de record conseqüència de reexposicions al patògen.

De les espècies de paparres capturades, la que mostra més especificitat pels carnívors silvestres és *I.hexagonus*, tot i que aquesta en el cas de les guineus ha estat detectada en un nombre baix d'individus (5/62). Aquesta espècie pot desenvolupar un cert rol en l'epidemiologia de *B.burgdorferi*. Segons Estrada et al.(1995) en aquells ecosistemes on són absents *I.ricinus*, es detecta una elevada tasa d'infecció per *B.burgdorferi* en *I.canisuga* i *I.hexagonus*. De la mateixa manera, Doby et al.(1991 (a)) assenyalen que si bé *I.hexagonus* té poca importància com a vector per l'home -ja que el contacte amb aquesta és ocasional i sempre conseqüència d'activitats a risc com la cacera o la manipulació de guineus mortes o recentment abatudes (Doby et al, 1991 (a))- pot intervenir



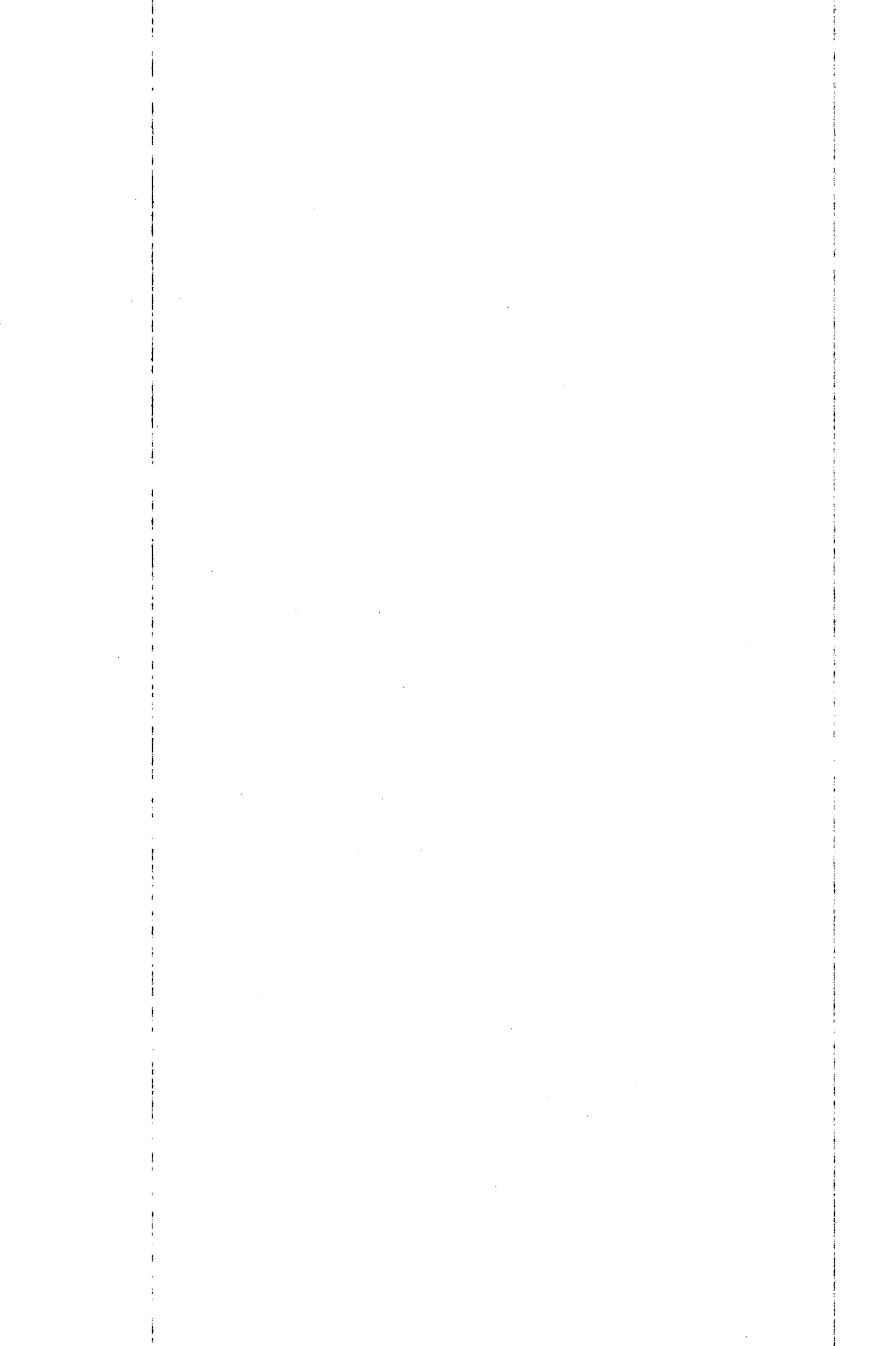
en el manteniment de *B.burgdorferi* a la natura.

La seroprevalença enfront de *B.burgdorferi* que hem detectat (13.1%) és similar a la detectada per altres autors usant la mateixa tècnica (IFI) i el mateix *cut-off* (1:64). Kazmierczak et al.(1989) detecta una seroprevalença del 8% en una mostra de 93 guineus (*Vulpes vulpes*) capturades a Wisconsin (EEUU). En un estudi realitzat a França per Doby et al. (1991 (b)) en 372 guineus es detectà una seroprevalença del 15.8% utilitzant una hemaglutinació passiva i considerant com a títol d'anticossos significatius d'infecció les dilucions superiors o iguals a 1:200.

Els títols baixos (1:64) podrien ser indicadors d'infecció recent o bé anticossos residuals. Però ens qüestionem el *cut-off* establert per l'IFI pel diagnòstic de la malaltia de Lyme en àrees no endèmiques degut a les reaccions creuades enfront a altres espiroquetes o altres borrelies. Russell et al (1984) estableixen el *cut off* a dilucions superiors o igual a 1/256 en el cas de la IFI per a evitar reaccions creuades.

La baixa intensitat de la fluorescència observada en les serologies de Lyme ens suggereix que possiblement estem davant d'un altra soca diferent de *B.burgdorferi sensu stricto*. La identificació d'altres soques o genoespècies del complex *B.burgdorferi* a Europa (Bruckbauer et al., 1992) (Baranton et al. 1992) ens fa pensar que possiblement les guineus positives havien tingut contacte o havien estat exposades a *Borrelia burgdorferi sensu lato* i per tant creiem que aquesta menor intensitat sigui el resultat de reaccions creuades.

La guineu apareix com a reservori d'alguns serovars de *Leptospira* (Shotts, 1981) i això podria provocar l'aparició de reaccions serològiques creuades. Dos dels setze sèrums positius a Lyme a títols de 1:64, varen aglutinar en la prova de la leptospira, això suggereix que aquestes dues podrien constituir dos falsos positius. Malauradament no es processaren els sèrums negatius a Lyme i, per tant, només podem concloure que fora necessari l'aplicació d'altres tècniques diagnòstiques més específiques com podria ser el Westernblot (Shin et al.1993) per a confirmar si es tracta d'una reacció serològica creuada o bé ambdues guineus eren positives tant a *Leptospira* com a *B.burgdorferi*.



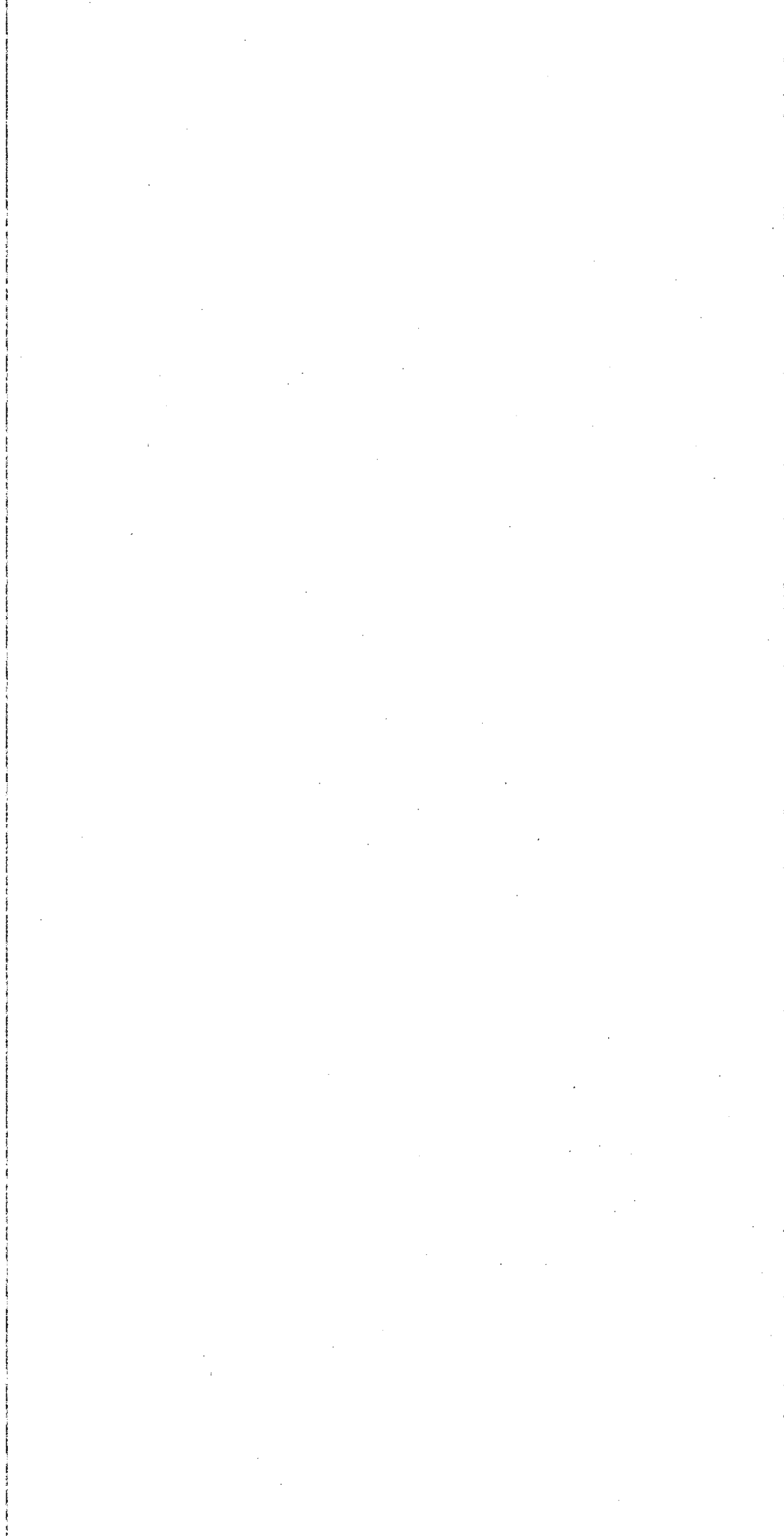
Un altra espiroqueta que pot donar lloc a reaccions serològiques creuades és *Treponema*, microorganisme sapròfit de les mucoses dels mamífers. Dos sèrums positius a Lyme passaren a ser negatius després de l'absorció per *Treponema*, la qual cosa ens suggereix que es tracta d'una reacció creuada. Tots dos foren negatius a *Leptospira*.

Dels estudis de seroprevalença realitzats en guineus enfront de *B.burgdorferi* portats a terme fins al moment, només alguns han valorat la possibilitat de reaccions creuades amb *Leptospira* (Isogai et al. 1994), però cap d'ells enfront de *Treponema*.

La patogenicitat de *B.burgdorferi* en els cànids salvatges és desconeguda. En una infecció experimental portada a terme en llops s'observà limfadenopatia com a únic signe (Kazmierczak et al. 1988). La major part de la mostra estudiada està constituïda per guineus sanes (Gortázar, 1993).

La positivitat enfront de *R.conorii* es concentra als mesos de Març i Setembre, moment de màxima activitat de la espècie vectora. En el cas de Lyme no hem observat cap estacionalitat de la malaltia possiblement degut al baix nombre de positius i a que -si passa el mateix que en els gossos- els anticossos enfront de *B.burgdorferi* poden persistir durant llargs períodes de temps, amb la qual cosa si bé la incidència es presentaria de forma estacional en el moment en el que l'hoste és picat per paparres infectades, la prevalença d'anticossos no mantindria un patró estacional.

Els diferents requeriments climatològics i ecològics de *R. sanguineus* i *Ixodes hexagonus* fan que, en general, en les àrees on és present una de les espècies no hi sigui present l'altre. Els animals infectats amb *R.conorii* tenen un menor risc d'infectar-se per *Borrelia burgdorferi*. Aquest resultat no s'ha d'interpretar com que la infecció per *R.conorii* "protegeix" enfront de *B.burgdorferi* sinó que els hàbitats on hi són presents les paparres vectoras de cada una de les malalties són diferents i, per tant, els animals positius a *R.conorii* procedeixen d'una zona adequada per a *R.sanguineus*, però no per a *I.hexagonus*. Tanmateix, hem detectat infestacions mixtes produïdes per *I.hexagonus* i *R.pusillus* o *R.sanguineus* però en percentatges molt baixos. Possiblement no sigui degut a distribució geogràfica sinó a les diferents èpoques de l'any en el que presenten activitat cadascuna de les espècies. O bé, potser *I.hexagonus* és una espècie de baixa presència en la zona estudiada. Cal tenir en compte, però, que es desconeix la dinàmica estacional



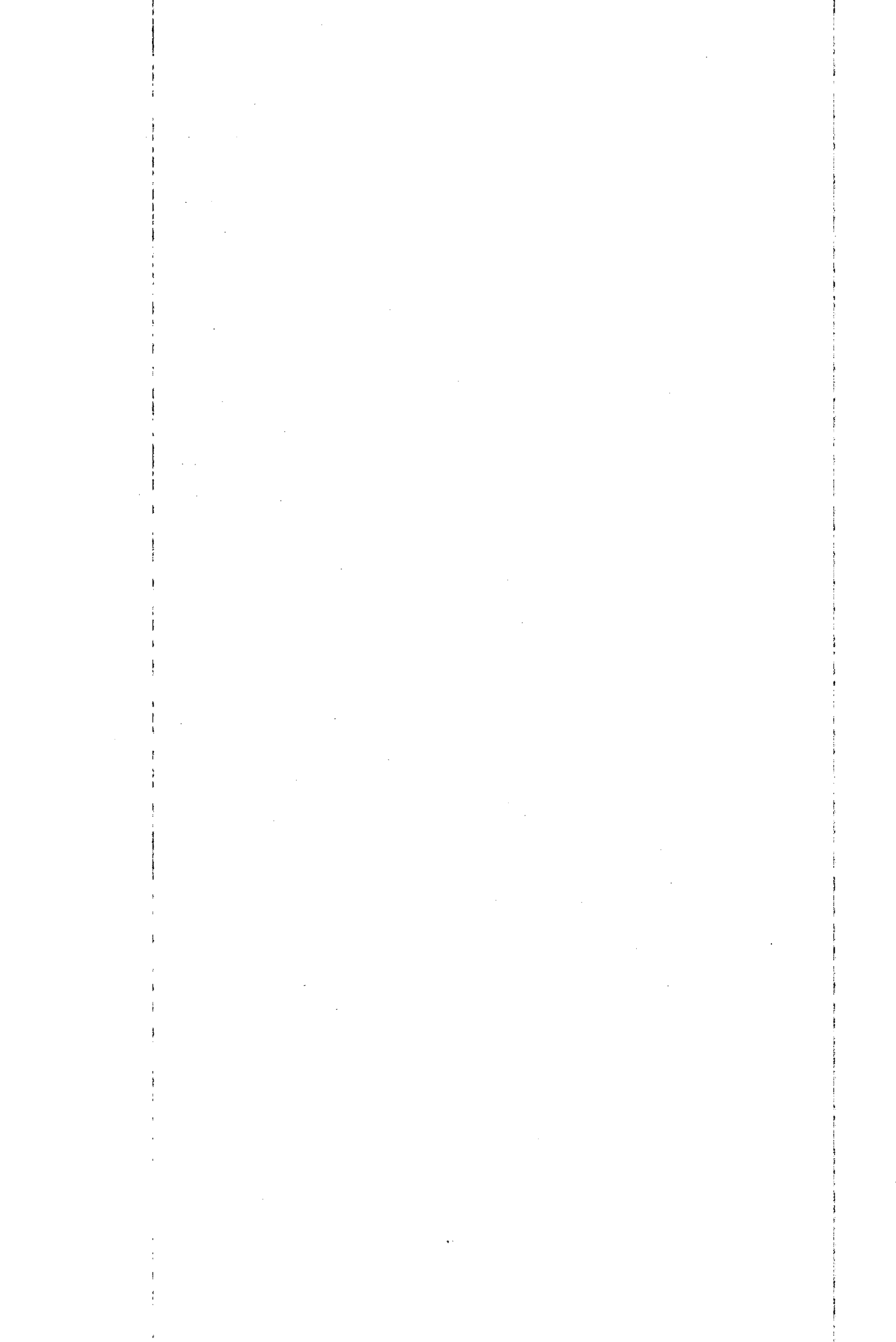
d'*Ixodes hexagonus* a Espanya, igualment se sap ben poc sobre la biologia d'aquesta espècie, per la qual cosa és difícil extrapolar els nostres resultats amb els observats per Gilot i Aubert (1985) als Alps Francesos on detecten una marcad presència d'aquesta espècie.

La guineu té una gran capacitat d'adaptabilitat a diferents biotops. Es desconeix quin paper pot jugar la guineu en l'epidemiologia de la FBM i la malaltia de Lyme. Existeixen molts pocs treballs respecte al rol que pot desenvolupar la guineu en l'epidemiologia de la FBM i la Malaltia de Lyme, i els que hi ha estan dedicats a aquesta última malaltia. Ara bé, si bé es desconeix si poden actuar com a reservoris, es sospita que la guineu pot jugar un paper en l'epidemiologia d'ambdues malalties actuant com a portadora de paparres infectades a altres biotops, podent establir nous focus endèmics d'espiroquetes (Karmierczak i Burgess, 1989).

* CONILLS

L'elevada seroprevalença enfront de *R. conorii* detectada en la població de conills (45.6%) evidencia la presència d'un focus natural d'aquest microrganisme en la zona mostrejada. Aquesta prevalença és marcadament inferior a la detectada per Ruiz-Beltrán i col (1992) on el 76.5% dels conills capturats a la província de Salamanca presentaren títols positius. En tots dos casos, les mostres foren recollides principalment durant els mesos d'hivern. Si bé, fora d'esperar que durant l'hivern la positivitat enfront de *R. conorii* fou inferior -com passaria en el cas del gos- no ha estat així en el cas dels conills. Això és degut a les espècies de paparres que el parasiten:

La positivitat en el cas del gos es concentra durant els mesos de primavera-estiu, coincidint amb l'època de màxima activitat de *R. sanguineus*, en el cas del conill les tres espècies que el parasiten -*Ixodes ventalloi*, *Haemaphysalis hispanica* i *Rhipicephalus pusillus*- presenten un caràcter marcadament endòfil, fet que produeix que no presentin un ritme estacional (Gilot et al., 1985), excepte en el cas d'*I. ventalloi* on observem que els adults presenten un caràcter marcadament hivernal, mentre que larves i nimfes són presents al llarg de tot l'any (Castellà et al. 1996), i així mentre que els adults presenten un període d'activitat restringit, observem que les nimfes es solapen amb la vida paràsita dels adults.

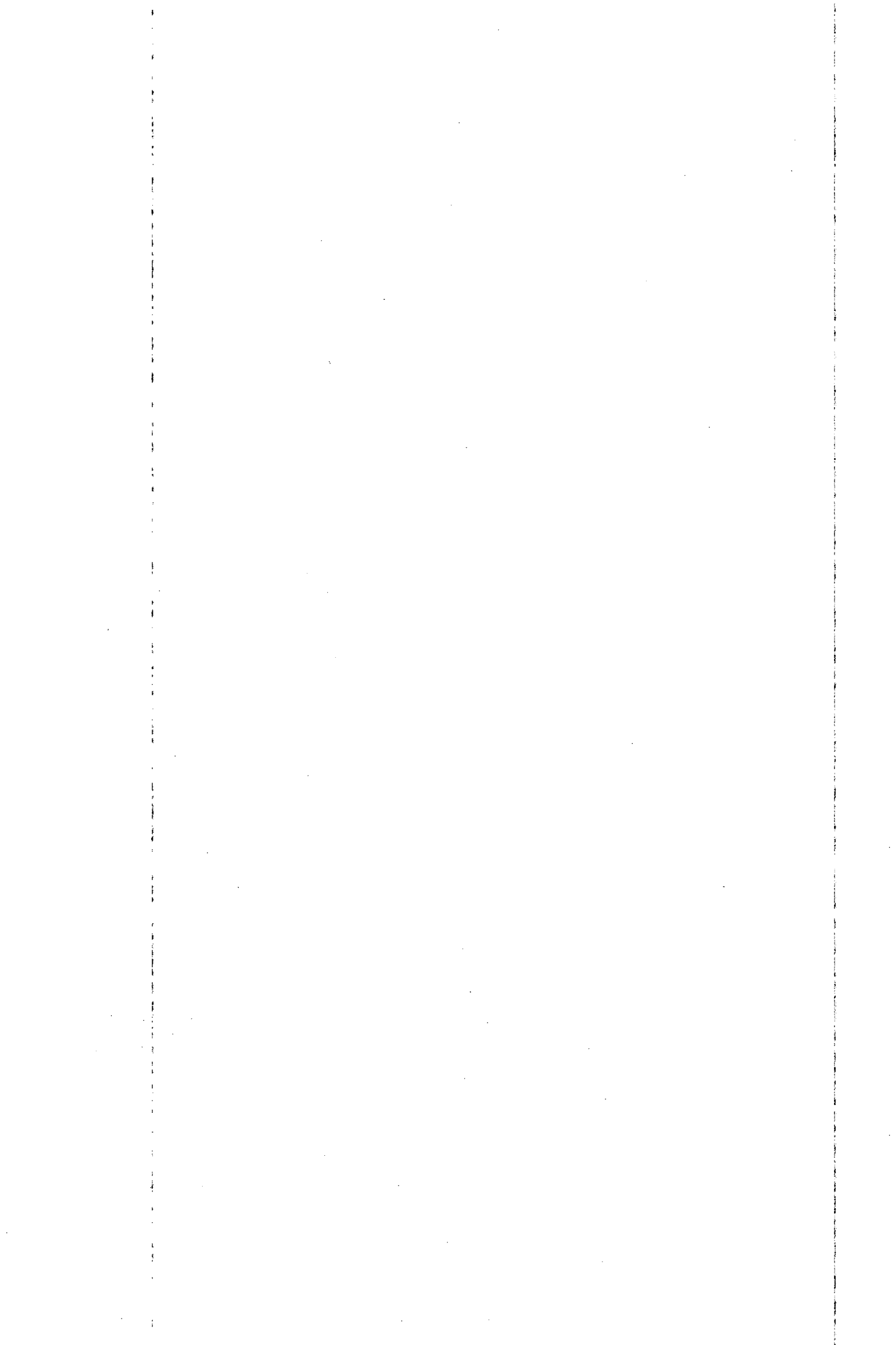


Aquests resultats difereixen dels observats per Gilot i col. (1985) als Alps francesos on les condicions climatològiques afavoreixen la presència d'aquesta espècie al llarg de l'any. D'altra banda, l'activitat de *R.pusillus* es produeix al llarg de tot l'any però, depenent de les estacions la tasa de parasitació és diferent (Gilot et al., 1985); disminuint la seva activitat a l'estiu-principis de tardor per a tornar a augmentar al novembre, a partir del mes de juny és molt rar detectar adults sobre l'hoste.

Tant *I.ventalloi* com *H.hispanica* en vida lliure es troben estrictament a l'interior dels caus, mentre que *R.pusillus*, en canvi, manté un comportament intermig entre l'endofília i l'exofília i és freqüent trobar especímens adults a l'entrada dels caus (Gilot et al. 1985). La parasitació per *R. sanguineus* ha estat molt baixa (0.3%). Segons Gilot i col (1985) la parasitació per aquesta espècie es produeix normalment en conills que viuen sota unes condicions de semi-llibertat, que permeten entrar en contacte amb els biotops favorables al desenvolupament de l'espècie.

La parasitació del conill en funció del sexe és difícil d'explicar. Segons Gilot i col. (1985) sembla ser que s'estableix un tropisme lligat a qüestions purament hormonals i etològiques per part de l'hoste. Durant l'hivern els conills mascles tendeixen a cubrir llargues distàncies i inspeccionar caus, els mascles entren en activitat sexual abans que les femelles manifestant, aleshores, una intensa activitat exploradora. Així, Gilot i col. (1985) detecten durant el mes de gener un nombre d'*I.ventalloi* molt superior en conills mascles que en femelles, les quals presenten més *H.hispanica* i *R.pusillus*. Aquesta observació coincideix amb els nostres resultats, on veiem que el nombre d'*I.ventalloi* capturats sobre conills mascles és tres vegades superior al nombre d'especímens capturats sobre femelles.

Respecte a la tasa de parasitació, observem que és menor per a *I.ventalloi* i *H.hispanica* que no per a *R.pusillus*. Gilot i col. (1985) també apunten que el nombre de *H.hispanica* i *I.ventalloi* capturats sobre conills no és mai un valor elevat, no passant el mateix per a *R.pusillus* on el nombre d'individus pot ser particularment elevat en els conills parasitats. *I.ventalloi* produeix importants reaccions inflamatòries i immunitàries en el conill, per la qual cosa les poblacions de *I.ventalloi* es veuen obligades a mantenir una baixa tasa d'infestació com a mecanisme de prevenció (Marquez, 1990). D'altra banda, l'index de parasitisme dels estadis adults d'*Haemaphysalis hispanica* també és molt baix. Segons Marquez (1992) presenta una mitjana de 2 exemplars pels mascles i 1 per les



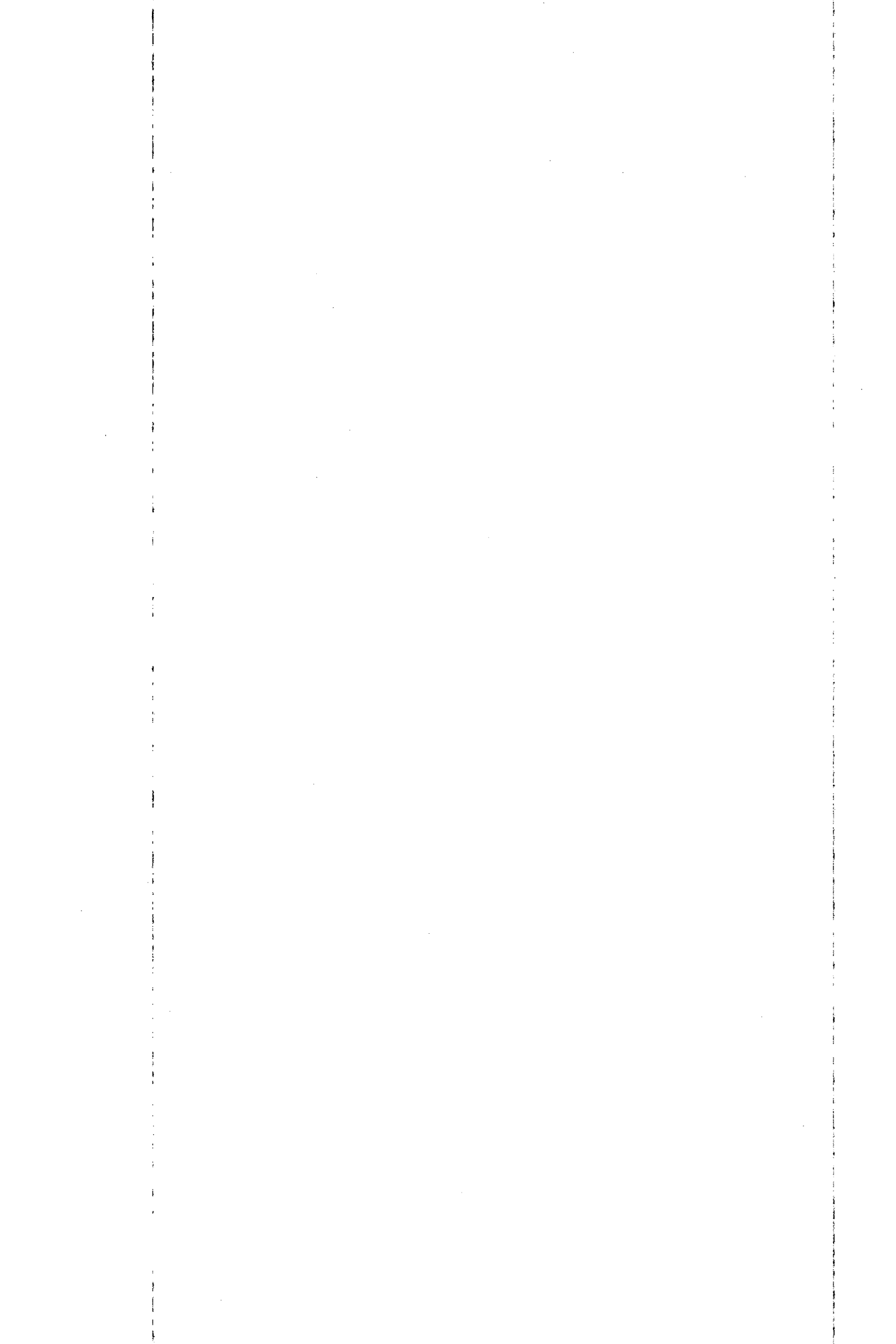
femelles, depenent de l'època.

Les dues zones de mostreig on s'han capturat paparres de conill han estat Arpal, situada a la província de Saragossa a 250-300 m. sobre el nivell del mar, amb una pluviometria anual de 275 mm i unes temperatures que arriben als 27C a l'estiu i baixen al 3C a l'hivern. Almudevar, en canvi, presenta una climatologia ben diferent. Situada a la província d'Osca, la pluviometria anual és de 450mm i les temperatures són, generalment, inferiors en 1.5C a les d'Arpal.

Aquestes diferències són responsables dels distints percentatges de paparres capturats en ambdues zones. Així a Almudevar, amb una pluviometria més elevada, el 31.9% de les paparres capturades eren *I.ventalloi* mentre a que a Arpal només es varen detectar en un 0.5%. *I.ventalloi* requereix una Humitat relativa elevada, condició que es compleix a Almudevar però no pas a Arpal. *H.hispanica* requereix una vegetació mediterrània, més pròpia d'Arpal mentre que *R.pusillus* colonitza una àmplia gama de biotops més diversificats. Respecte als requeriments climatològics de cadascuna de les espècies, és important assenyalar que la humitat relativa (HR) externa no es correlaciona directament amb la HR de l'interior del cau on , generalment, és més elevada.

La seroprevalença enfront de *B.burgdorferi* obtinguda (14.4%) és similar a la detectada per Virga i col. (1992) detecta una seroprevalença del 15% amb títols que oscil·len de 1:64 a 1:256.

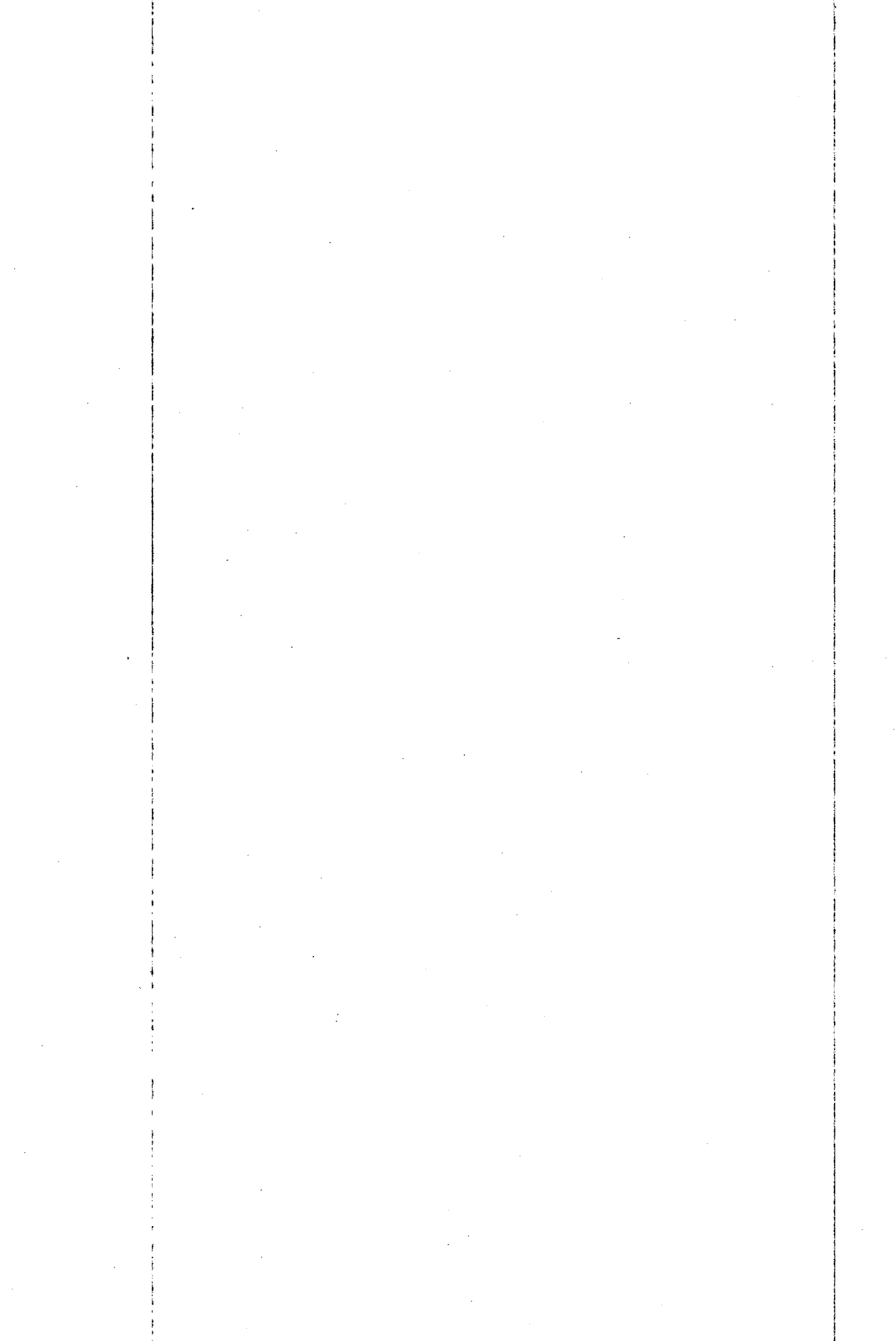
L'existència d'antígens compartits entre espiroquetes del gènere *Borrelia* i *Treponema* poden ocasionar falsos positius (Magnarelli et al. 1990). L'absorció dels sèrums amb *Treponema phagedenis* per a eliminar anticossos enfront a *Treponema spp* permet validar els resultats. Virga i col (1992) detecten una reducció del 3% en la positivitat després de fer l'absorció en *Treponema*; els sèrums que passaren a ser negatius havien presentat uns títols de 1:64 i 1:128, amb la qual cosa ens tornem a plantejar si possiblement en àrees no endèmiques el *cut-off* establert per al diagnòstic de Lyme hauria de ser més alt per tal d'evitar reaccions creuades.



La prova del FTA-Test (Fluorescent-treponemal-antibody absorption test) s'utilitza de forma rutinària per al diagnòstic de la sífilis humana, causada per *T.pallidum*. El conill no pateix la infecció per *T.pallidum*, però sí per altres espècies de *Treponema* com *T.paraluiscuniculi*, agent etiològic de la sífilis del conill (Okerman, 1994). En el nostre estudi no vàrem detectar cap conill que posteriorment a l'absorció del sèrum passés a ser negatiu a la prova de IFI enfront de *B.burgdorferi*. Sembla ser que la prevalença enfront de *T.paraluiscuniculi* a Espanya és molt baixa (A.Pagès, comunicació personal), tot i que no existeixen dades per a contrastar-ho. Ens qüestionem, però, que si la prova del FTA-test és prou sensible com per a eliminar tots aquells anticossos inespecífics enfront de *Treponema spp*, excepte *T.pallidum*, no deixi "passar" també anticossos enfrontats a d'altres treponemes que no són propis de l'home però sí de determinades espècies animals com és el cas del conill.

Els resultats serològics obtinguts en els conills involucren de forma indirecta *R.pusillus* per a la transmissió de *R.conorii* i *I.ventalloi* per a la transmissió de *B.burgdorferi sensu lato*, tot i que en aquest darrer cas no existeixin estudis que demostrin la capacitat vectorial d'aquesta espècie en la transmissió de borrelia. Tampoc hem trobat cap estudi sobre la possible participació d'*Haemaphysalis hispanica* en la transmissió de *R.conorii* o *B.burgdorferi*.

Cal assenyalar que si bé la recollida de paparres fou més important durant els mesos de març, juny, juliol i octubre, les mostres de sèrum es varen recollir principalment durant els mesos de setembre, novembre i desembre.



* CICLE SALVATGE

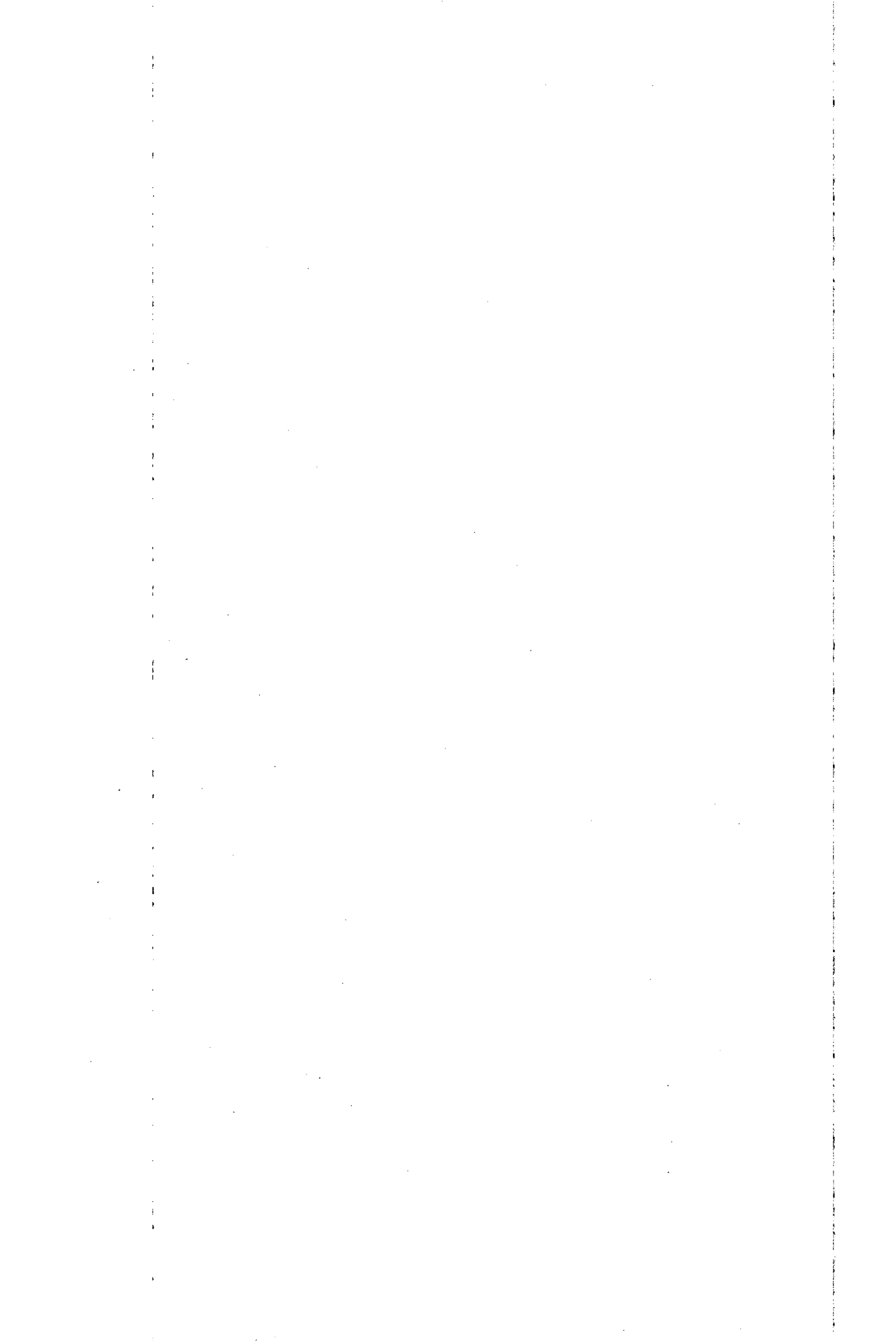
El conill es troba parasitat per paparres específiques d'ell. La guineu, en canvi, comparteix espècies de paparres amb altres hostes, en part, conseqüència dels seu comportament depredador i també per ocupació de caus abandonats. Excepte *H.hispanica* que no s'ha capturat mai en un altre hoste que el conill, els diferents estadis de *I.ventalloi* o *R.pusillus* s'han trobat parasitant altres hostes. Així, *R.pusillus* s'ha capturat sobre micromamífers (Gilot et al. 1995 (b)). Ramos i col.(1978) la descriuen en *Microtus arvalis* i *Apodemus sylvaticus* -ambdues espècies reservoris de *R.conorii* i *B.burgdorferi*- i també en petits carnívors com *Mustela nivalis* (Morel-Vasiliades, 1962). *I.ventalloi* parasita també carnívors salvatges, erissó i micromamífers. Segons Gilot (1985), els micromamífers podrien actuar més que com a hostes secundaris d'*I.ventalloi* ja que semblen indispensables per a tancar el seu cicle. Considerem, doncs, que el cicle salvatge de l'epidemiologia d'ambdues malalties es tancaria en aquest punt on les paparres vectoros es troben a la intersecció entre els animals que actuen com a reservoris clarament -els micromamífers- i altres espècies que comparteixen el mateix ecosistema com la guineu o el conill.

Aquesta teoria està recolzada per la similitud de prevalences detectada en guineus i conills tant per a *R.conorii* com per a *B.burgdorferi*.

Cal tenir en compte, però, les diferents èpoques de mostreig i recollida de sèrums realitzats en guineus i conills. Si bé, en ambdos casos s'ha realitzat al llarg de tot l'any, la majoria de les mostres en el cas dels conills es recolliren durant els mesos de setembre, octubre i desembre mentre que en les guineus fou durant els mesos de març, abril i juny quan es varen pendre la major part de les mostres.

Comparant els resultats obtinguts en la guineu i el conill respecte a la positivitat enfront a cadascuna de les malalties, si bé en el cas de les guineus varem observar una relació inversa entre els positius a *R. conorii* i els positius a *B.burgdorferi*, que ja hem comentat anteriorment, no s'observa cap relació en el cas dels conills ja que el caràcter endòfil de les espècies que el parasiten fa que no es pugui establir cap relació entre positius i negatius enfront de cadascuna de les infeccions.

La detecció d'anticossos enfront de *R. conorii* o *B.burgdorferi* en un ecosistema és un excel·lent indicador de la presència i difusió d'aquests agents en aquest ecosistema (Herreo et al. 1989).



II. CICLE DOMESTIC

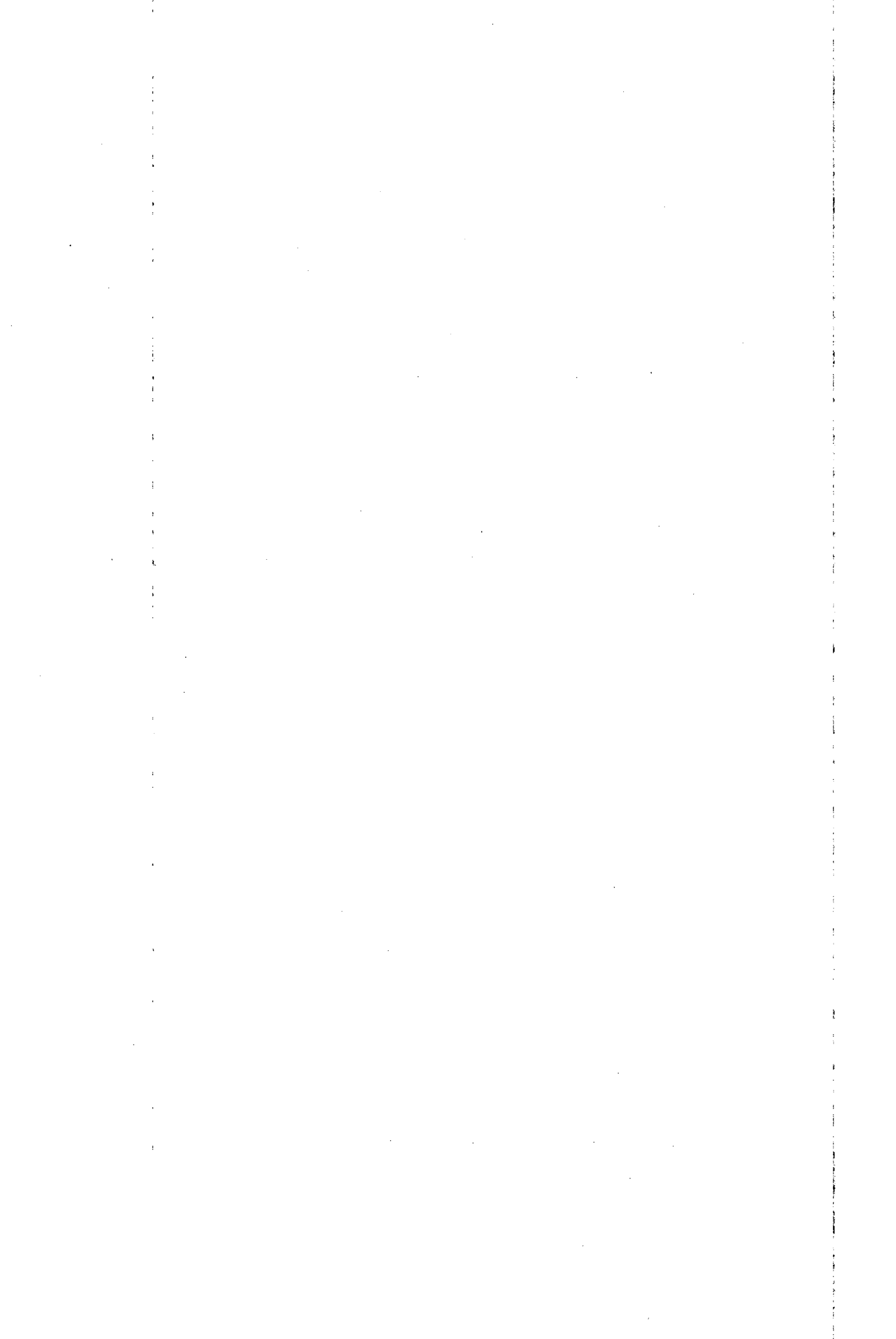
* GOSSOS

Les diferents prevalences obtingudes enfront de *R. conorii* en les mostres de sèrum de gossos procedents de diferents clíniques veterinàries de Catalunya (23.1%) i de sèrums canins del delta del Llobregat (53%) considerem que són degudes al diferents ambients en els que viuen els animals. Així, si en el cas de les mostres procedents de diferents municipis catalans, la població canina estudiada constitueix una mostra representativa del gos que freqüenta les clíniques veterinàries i constitueix l'animal de companyia per excel·lència, que viu en un ambient urbà i on el control d'ectoparàsits és força important per part del propietari, no és així en el cas de la població estudiada al Delta del Llobregat (Comarca del Baix Llobregat) on els gossos vivien en àrees peri-urbanes i rurals, romanien a l'exterior, lligats i en els que el control enfront d'ectoparàsits és, en la majoria dels casos, molt baix.

Revisant estudis seroepidemiològics anteriors enfront de *R. conorii*, observem que els diferents autors detecten unes prevalences similars a les observades per nosaltres. Delgado i Cármenes (1995) detecten una seroprevalença en gossos del 23.4% a Castilla-León, Nuvolini i col. (1989) detecen una seroprevalença del 26.5% a la Toscana italiana, Mandola i col. (1989) del 27.3% també a Itàlia, Segura i col., en un estudi realitzat al Vallès occidental l'any 1994, observen una prevalença del 26.1%.

Els estudis de seroprevalença realitzats en àrees rurals, en canvi, apunten unes prevalences força més superiors a les anteriors. Herreo i col. (1989), en un estudi realitzat a Salamanca detecta una positivitat del 93% en gossos, a Castilla-La Mancha i Madrid la positivitat arriba al 58.6% dels gossos (Herreo et al. 1992).

Aquest gradient en la seroprevalença entre animals procedents d'hàbitats urbans i animals que viuen en ambients rurals és conseqüència de que aquests últims tenen una major risc d'infestació per paparres i, per tant, d'entrar en contacte amb *R. conorii*. Aquesta observació coincideix amb l'apuntada per Delgado i Cármenes (1995).



Observem que els gossos adults tenen més risc de tenir anticossos enfront de *R. conorii*, detectant que a més edat hi ha més positivitat. Aquestes diferències entre la positivitat i l'edat també les observen Breitschwerdt i col (1987) i Punda-Polic i col (1995). Segons Punda-Polic i col. (1995) això és degut a l'exposició a diferents rickettsies del grup de les febres tacades i també a la circulació contínua de l'agent. Hem de considerar que existeixen mecanismes immunitaris enfront de les paparres que fa que els animals adults suportin una càrrega parasitària inferior a la d'un animal jove, d'altra banda la durada d'anticossos enfront de *R. conorii* en el gos - a diferència del que passa en l'espècie humana- és molt curta i, a més a més, existeix una variació estacional d'anticossos enfront de rickettsia que coincideix amb el moment d'activitat de la paparra vectora, *R. sanguineus*, i, per tant, la circulació contínua de rickettsies del grup de les febres tacades només serà contínua quan la paparra vectora hi sigui present. Podríem assumir però, l'establiment de mecanismes de memòria immunitària que provocarien que enfront de petites quantitats d'antigen l'animal desenvolupés una tasa d'anticossos superior a la que desenvoluparia un animal jove. Aquests resultats difereixen dels observats per Herreo i col. (1989) on detecten prevalences superiors en animals de menys de 5 anys.

Els gossos amb aptitud de guardians i que viuen a l'exterior afavoreixen l'establiment de poblacions de paparres que poden mantindre la rickettsia circulant. Observem, doncs, que els animals que viuen a l'exterior tene pràcticament el doble de risc a infectar-se per *R. conorii* (RR=1.86). Espejo i col. (1990) també detecten diferències estadístiques entre la positivitat i els gossos que viuen a l'exterior respecte als que no.

Les prevalences detectades donen evidència de la presència de *R. conorii* en les paparres circulant. Aquesta seroprevalença es considera un bon marcador epidemiològic de l'estatus de FBM en les àrees estudiades (Delgado i Cármenes, 1995). Sembla existir una correlació entre el nombre de gossos positius a *R. conorii* en una determinada zona i el nombre de casos de FBM en l'espècie humana en aquesta zona (Vitale et al. 1984)(Herreo et al. 1992). L'any 1993 en un estudi seroepidemiològic de la FBM realitzat sobre la població canina i humana al Vallès Occidental es detectà una seroprevalença en gossos del 26.1%, éssent aquesta del 8% en l'espècie humana (Segura et al. 1994 en fase de revisió). Un percentatge de gossos serològicament positius enfront de *R. conorii* superior al percentatge detectat en humana és d'esperar en tant que el gos té més risc d'exposició a les paparres. D'altra banda, s'ha de tenir en compte que existeixen reaccions creuades

amb altres rickettsies del grup de les febres tacades no associades a infecció en l'espècie humana.

Cal destacar que el gos pot actuar com a portador de paparres infectades a l'ambient humà i que aproximadament un 70% dels animals positius tenen una aptitud com a animals de companyia, vivint amb estret contacte amb el propietari, amb el conseqüent risc per a la salut pública.

Pel que fa referència als resultats obtinguts en l'estudi de la variació estacional d'anticossos, és evident que la resposta immunitària enfront de *R. conorii* és conseqüència de la presència de paparres. Tots 3 lots estudiats estan sotmesos a desparasitacions sistemàtiques. Ens sorprèn que un dels gossos del tercer lot -Facultat- sigui el que presenti els títols d'anticossos més elevats. Igualment, un dels gossos del segon lot -Gossera- es mantingui sempre negatiu (C4) tenint en compte que conviu -tot i que en gàvies separades- amb d'altres gossos que sí han presentat seroconversió en algun moment. És de destacar també que durant el segon any (gener-setembre 96) el tercer lot de gossos -Facultat- mantingui uns títols base de 1:20 constants durant la primavera i l'estiu. Aquesta persistència en els títols d'anticossos, tot i que molt baixa, podria suggerir l'existència de reinfeccions o reaccions creuades amb altres rickettsies del SFG.

Considerem que els resultats obtinguts no són totalment representatius ja que tots tres lots de gossos rebien desparasitacions quinzenals i sistemàtiques.

Les diferents taxes de positivitat entre els dos anys (juny-desembre 95 i gener-set 96) no les podem justificar. Assenyalar que la persona encarragada de la cura dels gossos i les instal·lacions fou substituïda per un altra durant el segon any o període.

Com ja va apuntar Espejo et al (1993), els nostres resultats confirmen la variació estacional d'anticossos enfront de *R. conorii* en el gos existint una correlació directa amb la presència de paparres, així com la curta durada dels anticossos que, a diferència de l'espècie humana, pot arribar a ser només d'un mes.

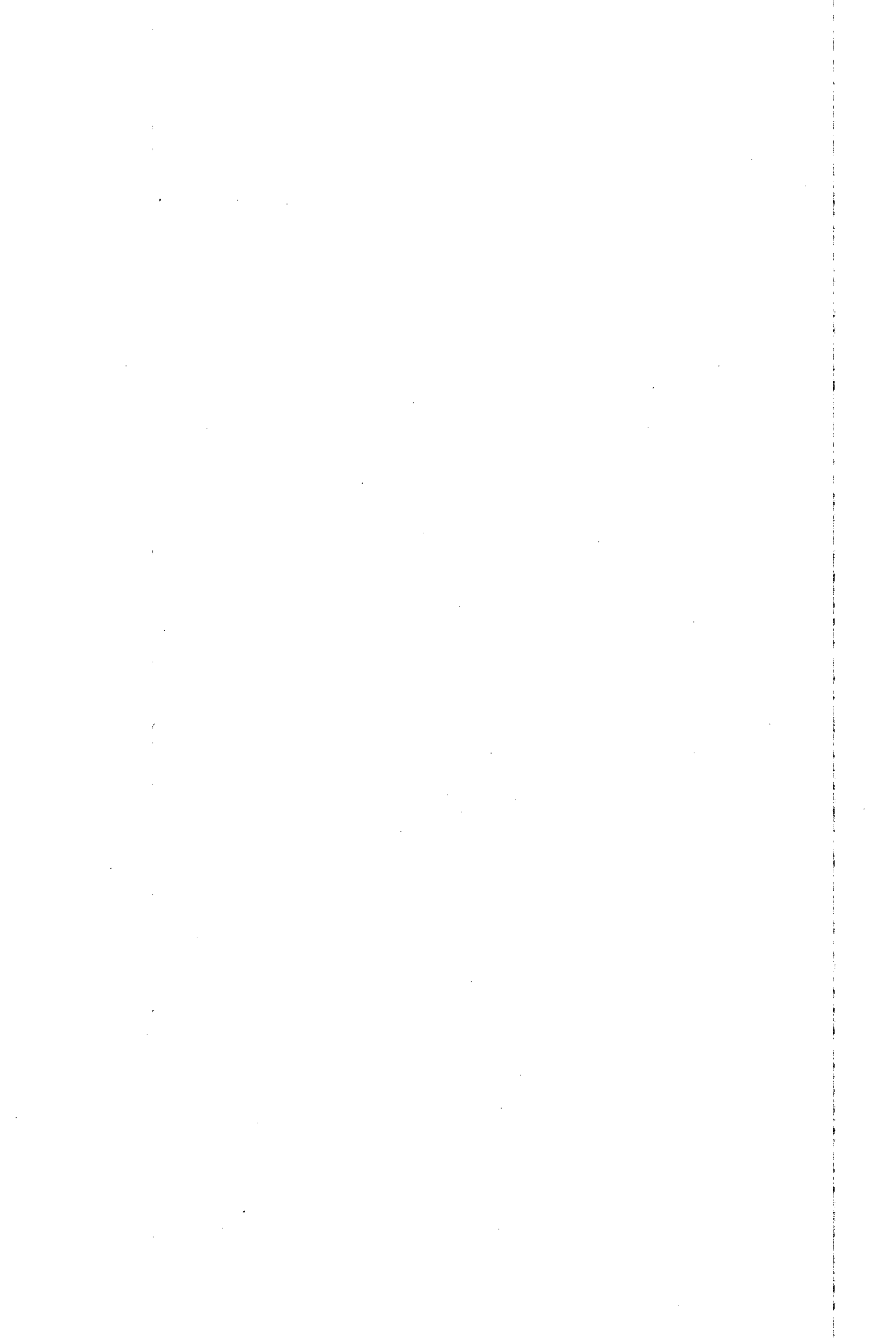
Respecte a l'estudi serològic enfront de *B.burgdorferi* aquests només es va portar a terme en les mostres de gossos procedents de tota Catalunya. En canvi, es decidí no processar els sèrums recollits al Delta del Llobregat -una zona de climatologia típicament mediterrània- ja que en la recollida de paparres que s'efectuà no vàrem detectar la presència de cap espècie de paparra vectora de la malaltia de Lyme.

La seroprevalença obtinguda ens indica la baixa presència d'aquests microrganisme a Catalunya, com és d'esperar en una zona on la paparra vectora es troba confinada en àrees molt limitades. En un estudi realitzat a la província de Girona, on es poden complir les condicions òptimes per a la presència de *I.ricinus* -la qual s'ha detectat a les comarques més septentrionals- en gossos durant 1996 es detectà una prevalença molt similar (2%) amb títols de 1/64 i 1/128 (Ortuño et al. 1996). Altres estudis seroepidemiològics en l'espècie canina realitzats a Espanya detectaren una prevalença del 12% a Castilla-León (Degado i Cármenes, 1995).

Cap dels animals positius presentava signes compatibles amb la malaltia de Lyme. De fet, un baix percentatge de gossos exposats a *B.burgdorferi* desenvolupa quadre clínic (Breitschwerdt 1993). La presència d'anticossos no és diagnòstica ni indicativa d'infecció activa. La seropositivitat d'animals aparentment sans no constitueix un valor predictiu per al desenvolupament posterior de simptomatologia clínica. Així doncs, la interpretació dels tests serològics, sense dades clíniques, és sovint confusa (Levy i Magnarelli, 1992).

La fluorescència era clara però poc intensa. Això juntament amb els baixos títols detectats, suggereixen la presència de reaccions creuades amb altres borrelies o espiroquetes.

La vacunació de la trivalent canina, composta pel virus de la Hepatitis canina, Brom i la Leptospirosi, és una vacuna comunment aplicada en les pautes vacunals habituals de la població canina. El fet de que quatre dels cinc sèrums positius a *B.burgdorferi* aglutinessin en presència d'antigen de *Leptospira* ens suggereix que, o bé, els animals són positius a tots dos patògens o bé que, considerant que es produeixen reaccions creuades entre *B.burgdorferi* i els diferents serovars de *Leptospira*, els sèrums positius a Lyme fossin falsos positius. En cap cas, però, es demostra l'evidència de reaccions creuades ja que, per això, hagués estat necessari la utilització de proves més sensibles i específiques



com podria ser el Westernblot per a confirmar els resultats (Burgess 51) (Shin et al., 1993).

També s'ha de tenir en compte la possibilitat de reaccions creuades amb altres soques o genoespècies de *B.burgdorferi sensu lato* àmpliament distribuïdes a Europa com *B. garinii* i *B.afzelii* (Baranton et al. 1992), de les que no s'ha comunicat cap cas clínic en el gos.

D'altra banda, tot i que a la literatura recomanen títols de 1:64 com a *cut-off*, nosaltres ens qüestionem que aquests títols siguin indicatius de positivitat. Considerem que en àrees no endèmiques fora necessari l'establiment de dintells de positivitat més elevats que permetrien evitar el màxim nombre de reaccions creuades. Donoghue et al (1989) assenyalen la manca de falsos positius quan estableixen com a dintell de positivitat títols superiors o iguals a 1:320. Oteo i col (1991) apunta que el títol que millor es relacionà amb la presència de clínica compatible amb la borreliosis de Lyme en l'espècie humana fou de 1:256. Caride i col. (1995) també consideren que títols d'anticossos en l'IFI ha de ser superior o igual a 1:256 paral·lelament a la instauració de manifestacions clíniques compatibles poden ser diagnòstics.

Per últim destacar que en el supòsit de que els animals positius a Lyme ho fossin realment, el fet de que tots ells visquin a Barcelona i siguin utilitzats merament com animals de companyia ens fa pensar que són animals amb estreta convivència amb el propietari qui sel's endur de vacances o cap de setmana visitant zones on, possiblement hi siguin presents les paparres vectoros.

* PAPPARRES

Hom emprà diferents mètodes per a la recollida d'ixòdids en el medi ambient. Nosaltres vàrem treballar principalment amb dos mètodes, el mètode d'arrossegament, mantejant la vegetació amb una peça de cotó fixada per un dels costats més amples a un bastó i la recollida sobre hostes domèstics, en concret sobre el gos. L'èxit de la captura per arrossegament depèn del nombre d'hostes en una àrea i del clima, així com de l'espècie i fase de la paparra. Les captures sobre hostes són, en canvi, molt més exitoses que les captures de paparres en el medi.

Les espècies de paparres que hem capturat amb major proporció ha estat sens dubte *R.sanguineus*, la paparra marró del gos i principal espècie involucrada en l'epidemiologia de la FBM. L'àmplia distribució geogràfica i la relativament baixa especificitat d'hoste d'aquesta espècie, fa que sigui l'espècie més abundant en les nostres contrades. *R.sanguineus*, pot parasitar tant al gos, que és el seu hoste principal, com a altres hostes encara que siguin hostes accidental, com és el cas de l'espècie humana. D'altra banda, també hem detectat presència de *R.turanicus* en el gos, tot i que en una proporció força inferior.

Per a la detecció preliminar de rickettsies, el test de l'hemolimfa és una tècnica adequada (Burgdorfer, 1970). A nivell laboratorial és ràpida, econòmica i el procediment és senzill, però no ho és tant la interpretació dels resultats que, sovint, presenta dificultats i requereix personal qualificat i experimentat, a més a més només pot ésser usada en paparres vives i amb un estat d'hidratació òptim (Beati et al. 1992). Si bé constiuex un mètode preliminar per a la detecció de rickettsies en paparres, considerem que no ha de ser el mètode definitiu per a l'estudi epidemiològic de rickettsies en paparres.

Pel que respecte a la tinció de Giménez, tot i que és útil per a una determinació preliminar de gran nombre de paparres, manca d'especificitat i no permet distingir entre espècies i serogrupos de rickettsia (Gage et al. 1992). La IFD, d'altra banda, és un tecnica sensible però l'especificitat depèn de l'anticòs usat per a la determinació de l'antígen rickettsial. Segons Gage i col (1992) és possible augmentar l'especificitat usant anticòssos monoclonals per a detectar organismes rickettsials. Així doncs, la Microimmunofluorescència (MIF), que consisteix en la immunització de ratolí amb

diferents serotipus de rickettsia seguint el metode descrit per Philip et al (1978) amb l'objectiu de produir un antisèrum específic, permet distingir entre espècies de rickettsia (Beati et al. 1992).

El procediment del test de la hemolimfa és molt important per al posterior processament de la mostra. La correcte manipulació de la paparra així com l'amputació de la extremitat distal d'una pota ens facilitarà la posterior interpretació dels resultats. Un prolapse del budell -freqüent en el processament de paparres deshidratades- o si es talla la pota molt arran del cos, dóna lloc a un vessament del contingut intestinal amb el consegüent seguit de reaccions inespecífiques que impedeixen la interpretació correcte dels resultats. L'obtenció de poca quantitat d'hemolimfa implica, explícitament, un menor, en alguns casos nul, nombre d'hemòcits. A més a més, hem de tenir en compte que no totes les cèl.lules estan infectades (Burgdorfer, 1970), la qual cosa dificultarà encara més la interpretació dels resultats. Aquesta circumstància és freqüent en paparres recollides en estat lliure, on el grau d'hidratació és baix sobretot quan han estat durant un cert temps sense parasitar a un hoste.

Els principals problemes amb els que ens hem trobat alhora d'interpretar els resultats han estat la presència d'altres infeccions i problemes en l'obtenció de l'hemolimfa.

La presència d'altres bacteris amb propietats tintorials i morfològiques similars a rickettsia han dificultat molt la interpretació dels resultats en la tinció de Giménez. Aquestes infeccions bacterianes han estat molt heterogènies i els bacteris s'han observat tant a nivell extracel.lular com intracitoplasmàtic.

En el cas de la IFD, la presència de fluorescència residual o fluorescència de fons possiblement ocasionada pel gran nombre d'artefactes i de reaccions inespecífiques que es produeixen entre el conjugat i altres components de la hemolimfa ha estat la principal causa de possibles errors en la interpretació.

Cal destacar que el fet de que s'hagi utilitzat sèrum positiu a *R. conorii*, no implica la presència de *R. conorii* en les hemolimfes positives. En aquests casos només es pot parlar de detecció de rickettsia pertanyent al grup de les febres botonoses (SFG) ja que

s'ha de tenir en compte l'elevada freqüència de reaccions creuades entre les rickettsies del grup de les febres botonoses. La detecció en els darrers anys de noves soques de rickettsies va fer que algunes de les paparres positives fossin enviades al Centre National de Référence pour les Rickettsioses (Marsella, França) per a l'aïllament i identificació de les rickettsies. En cap de les paparres enviades s'identificà *R. conorii*, sinó que fou una nova soca de rickettsia pertanyent al grup de les febres tacades i que provisionalment s'anomenà MTU-5, la soca identificada en sis exemplars (tres procedents de Tarragona, 2 de Barcelona i 1 de Girona) (Beati et al. 1996). Aquest fet ens suggerí una àmplia distribució d'aquesta nova soca així com es confirmà les importants reaccions serològiques creuades que s'estableixen entre les diferents soques del SFG.

La comparació d'ambdues proves evidencia una baixa concordança entre aquestes. Per tot l'esmentat anteriorment, considerem més específica la tècnica de la IFD que la de Giménez. Donat que obtenim un elevat nombre de falsos positius al comparar els resultats de la tinció de Giménez amb els obtinguts en la IFD, creiem interessant fer un primer screening per tinció de Giménez i els exemplars positius processar-los per IFD amb l'objectiu de confirmar els resultats. En qualsevol cas, i degut a que aquestes tècniques són insuficients per concloure quina soca de rickettsia és la causant de la infecció, creiem imperatiu conèixer si aquestes noves soques tenen poder patògen i, en el cas de que així, sigui aplicar tècniques de biologia molecular.

*** CICLE DOMÈSTIC**

La relació entre les prevalences enfront de *R. conorii* al gos i a les paparres es manté més o menys constant en els dos estudis que s'han fet. Això suggereix l'existència d'una correlació entre la infecció detectada en paparres i la detectada en gossos. A la vegada, s'observa que les prevalences canines en les dues poblacions estudiades són, aproximadament, 2.5 vegades superiors a les prevalences en les poblacions de paparres.

El nombre de paparres infectades i el fet de que aquestes poden parasitar a l'espècie humana són dos aspectes que suggereixen que el gos juga un important rol en l'epidemiologia de la FBM.

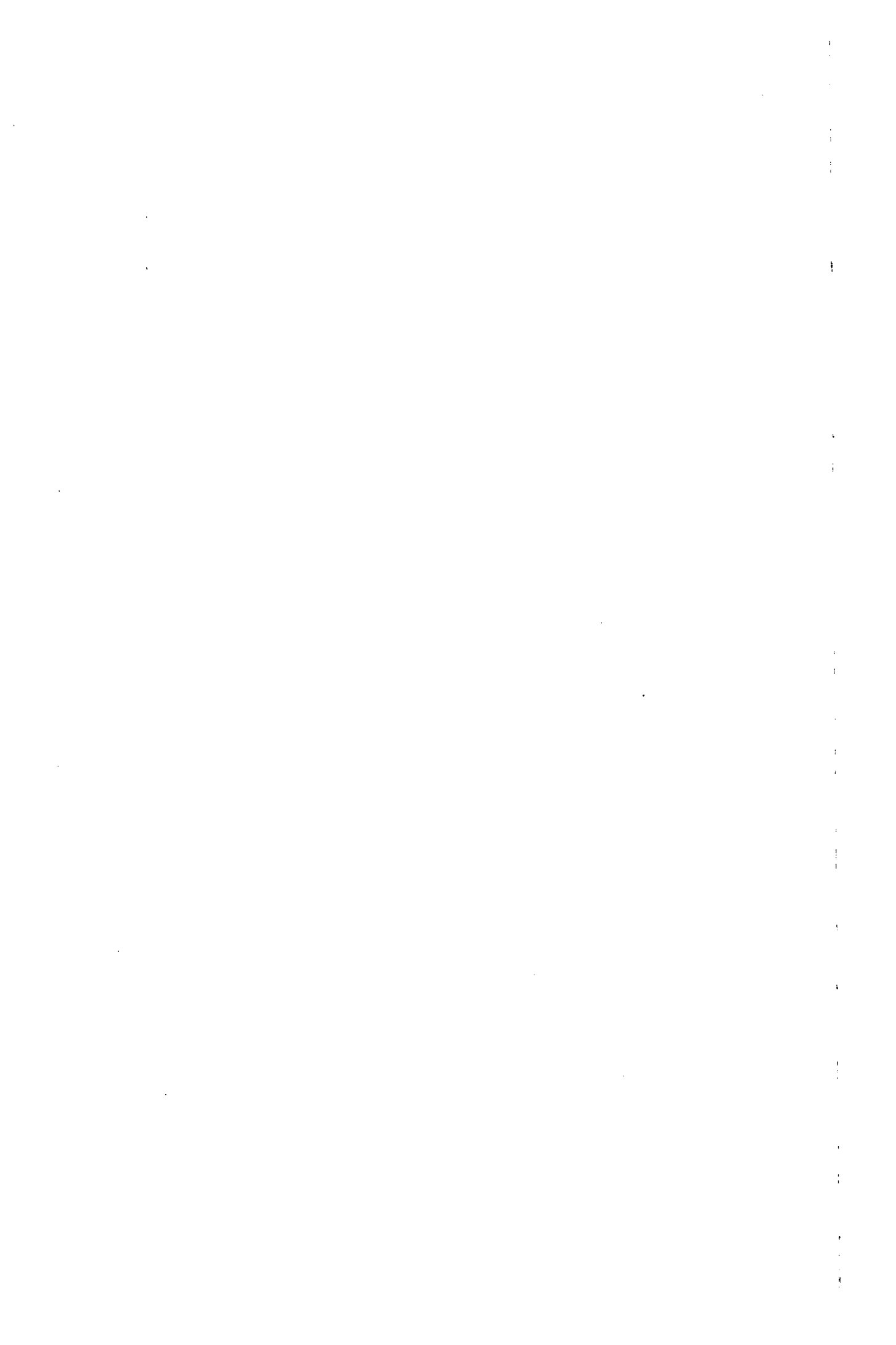
III. ESTANDARITZACIÓ D'UNA IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA

L'homogenització de l'antigen en el pouet ha estat bona, ja que no s'observen agregats la qual cosa ha permès obtenir una fluorescència nítida, intensa i ben distribuïda. D'altra banda, l'escassetat de cèl.lules i restes cel.lulars -conseqüència d'una acurada purificació- ha permès una disminució de falsos positius per *background* a l'utilitzar un conjugat policlonal, la qual cosa facilita la lectura, especialment pel que fa referència a la titolació dels sèrums.

Respecte a la dilució dels sèrums, la prova es va ajustar a la dilució de sèrums 1/40 que és l'acceptada generalment com a dintell de positivitat. El que es valorà fou la disminució gradual de la fluorescència a mida que la dilució del sèrum augmentava, per tal de poder titular-lo correctament. En el cas de l'estandarització de la tècnica la dilució inicial del sèrum fou de 1/20 per a comprovar la gradació de la fluorescència des de la més baixa dilució fins a la que posteriorment constituïria el títol en cas de ser positiva. Tanmateix, quan la prova s'aplicà al banc de sèrums canins la dilució inicial fou de 1/40 que és la que constitueix el *cut-off*.

La validesa d'un test vé avalada per la sensibilitat, l'especificitat i el valor kappa. Tanmateix, nosaltres no hem pogut calcular la sensibilitat i l'especificitat real donat que en el mercat només existeix un test serològic de IFI per al diagnòstic de *R.conorii*, que és l'únic comercial però no es tracta d'un test estàndard i, d'altra banda, el gos enfront de la infecció per *R.conorii* només desenvolupa una resposta immunitària sense manifestacions clíniques, amb la qual cosa no disposem de cap referència sobre el nombre real d'animals positius i negatius, valors necessaris per al càlcul d'aquests dos paràmetres.

Per tant, la validació dels resultats l'hem feta calculant el valor kappa. El valor kappa expressa la concordança existent entre dues proves -en el nostre cas IFI comercial (bioMérieux) i el IFI desenvolupat per nosaltres, sense assumir que una sigui millor que l'altre. Aquest valor oscil.la de 0 a 1. Una kappa inferior a 0.6 indica que les proves presenten excessives discordàncies i, per tant, alguna de les dues o les dues no són acceptables. En el nostre cas, la comparació dels resultats obtinguts dels sèrums processats paral.lelament per l'IFI desenvolupat per nosaltres i l'IFI bioMérieux ha mostrat un valor



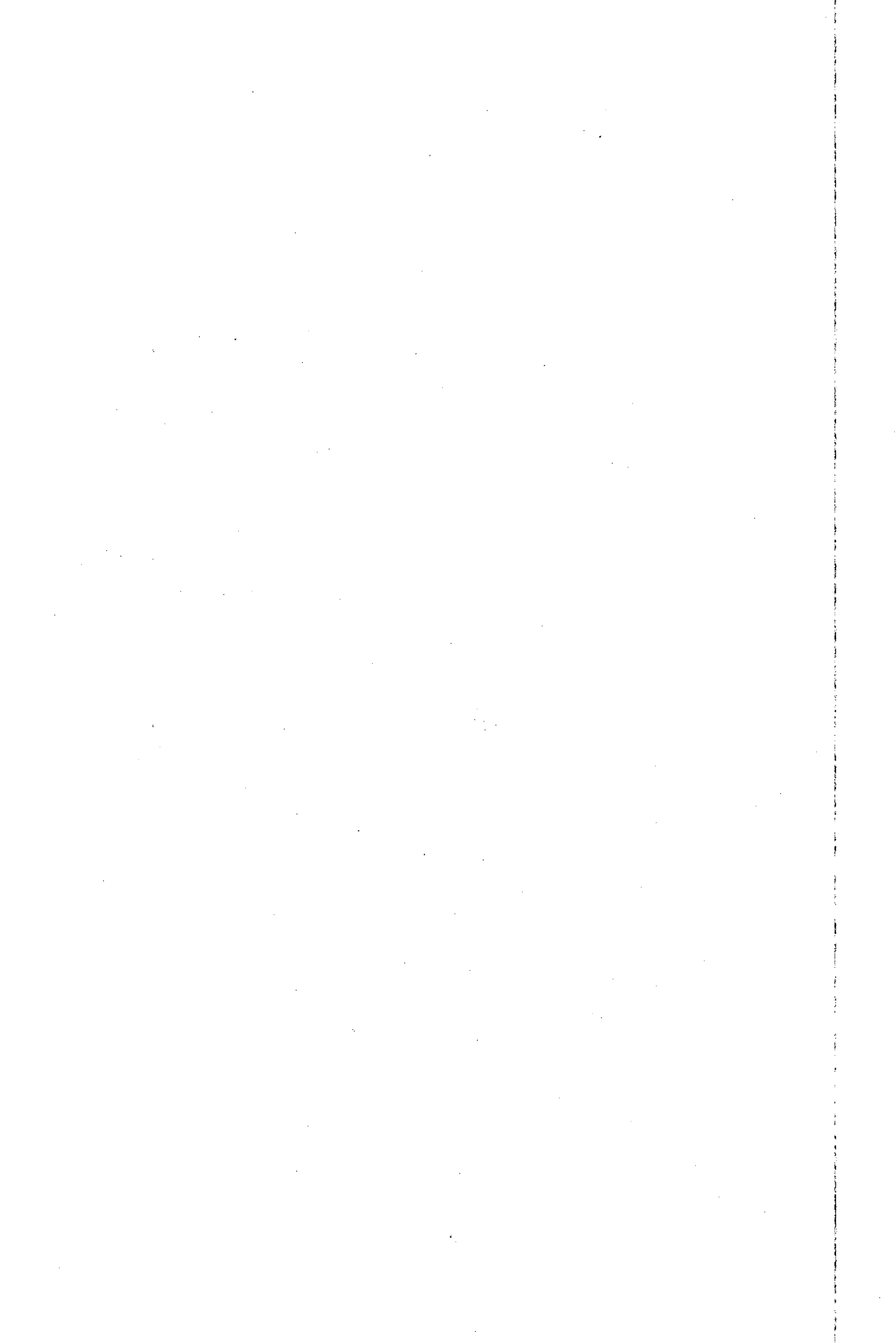
Kappa acceptable (0.84), la qual cosa vol dir que totes dues proves presenten una bona concordància. Quan hem calculat la concordància respecte a les titulacions que hem obtingut de cada sèrum per cada prova, el valor kappa, tot i que ha disminuït lleugerament, continua éssent un valor acceptable ($K=0.76$), indicatiu de que totes dues proves mesuren el mateix.

Les diferències detectades en els resultats han estat degudes principalment a diferències en una dilució i també a diferències en dilucions a 1/20. Considerem aquestes discrepàncies inapreciables ja que diferències d'una dilució en el títol d'un mateix sèrum no són significatives.

D'altra banda, i donat que no detectem anticossos durant els mesos d'hivern, suposem que els títols a 1:20 o inferiors podrien ser deguts a possibles reaccions creuades amb altres rickettsies del grup de les febres tacades o bé nivells d'anticossos residuals.

Per altre part, considerant l'evolució d'anticossos en el mes precedent i el mes posterior, podem hipotetitzar quin podria ser el valor esperat i observem que el kit desenvolupat per nosaltres sembla acostar-se més als resultats esperats.

Els resultats obtinguts foren òptims per aplicar la prova sobre un banc de sèrums canins, la qual cosa ens va permetre l'estudi de la prevalença en gossos de *R. conorii* a Catalunya, resultats i discussió de la que ja n'hem parlat anteriorment.



IV. CAPACITAT VECTORIAL D'*Ixodes ricinus* PER A LA TRANSMISSIÓ DE *B. afzelii*

La infecció de paparres via picada en hostes infectats és la condició que més s'apropa a les condicions de camp. Observem que la ratio d'infecció en les paparres alimentades en animals infectats varia ampliament, observació ja descrita per Piesman (1993). De fet, la gran heterogenicitat que hem detectat en el nombre d'espiroquetes que té cada paparra inicialment, és a dir, al dia 0 podria ser conseqüència de diferents factors.

Un d'ells, possiblement el més destacat, és la variabilitat individual de cada paparra. Sembla ser que cada especímen presenta una habilitat diferent per a adquirir, transmetre i mantenir l'espiroqueta (Piesman, 1993).

Un altra factor que sembla influir és el gerbus al qual han picat. El nombre inicial d'espiroquetes (dia=0) és diferent per a cadascun del gerbus que ha estat picat. Aquest valor sembla influir en la posterior evolució de la infecció en cada lot de paparres al llarg dels dies. Això sembla indicar que és el gerbus el que defineix l'evolució de la infecció al llarg dels dies.

Si bé en un principi ens havíem plantejat com a una altre possible factor, el lloc de picada al gerbus, ja que les larves foren dipositades sense càpsula, es desconeix quina influència pot tenir aquest factor sobre la taxa d'infecció.

S'utilitzaren larves d'*Ixodes ricinus* per a determinar la capacitat d'adquirir l'espiroqueta a partir del gerbus i mantenir-la al llarg dels dies a diferents temperatures. Aquestes larves les vàrem considerar teòricament lliures d'espiroquetes ja que *Borrelia* no es transmet via transovàrica i si ho fa el percentatge és molt baix (Schoeler i Lane, 1993). El fet de que els nostres controls hagin resultat negatius ens confirmen que no ha hagut transmissió transovàrica. Sí que es produeix, però, una transmissió transestadial i així ho hem pogut constatar amb la detecció d'espiroquetes al dia 80, moment en el que totes les larves ja han mudat a nimfes. Cal destacar que, independentment del nombre d'espiroquetes inicial al dia 0, els resultats tendeixen a estabilitzar-se al final de l'experiment (dia=80). Així les paparres amb nivells d'infecció més elevats mostren una



disminució de la infecció mentre que les que presenten uns nivells d'infecció baixos mantenen el mateix valor, àdhuc l'augmenten. Aquesta observació es detecta sobretot a 26°C. Possiblement es tracta d'un mecanisme de defensa de la paparra, ja que nivells d'infecció molt elevats podrien provocar una disminució en la viabilitat dels ous. Hem observat l'aglutinació de les espiroquetes al budell mig conseqüència de la producció de lectines. Segons Kuhn i col. (1996) les lectines podrien funcionar com a molècules de reconeixement i, per tant, formar part dels mecanismes de defensa. Aquest fet l'hem pogut observar en paparres molt infectades i ha dificultat el contacte, sotmetent-lo a error. En canvi, quan els nivells d'infecció són baixos, l'espiroqueta pot passar desapercebuda i es pot replicar. El fet de que aquestes observacions es produeixin sobretot a 26°C creiem que són degudes a que aquesta temperatura és òptima per a les borrelies i a més a més, temperatures superiors a 18C (temperatura d'*I. ricinus*) activen la paparra.

Segons Piesman (1993), des del moment en que s'han identificat noves soques de *Borrelia* en diferents espècies de paparres, caldria establir experimentalment la capacitat d'aquestes soques per a infectar diferents espècies de paparres. Els nostres resultats no han mostrat cap variació de comportament respecte a la infecció entre les dues soques de paparres emprades (soca Rioja i soca Berlin). I, tenint en compte que la soca Berlin té una contrastada capacitat vectorial, podríem pensar que la soca Rioja també la podria tenir.

Els jerbis són capaços de transmetre l'espiroqueta a noves paparres. No cal però que desenvolupin espiroquetèmia ja que *B. burgdorferi* pot romandre al lloc d'inoculació enlloc de disseminar-se immediatament, la qual cosa indica que les paparres poden adquirir l'espiroqueta quan s'alimenten simultàniament amb paparres infectades. Així ho constata Randolph i col (cofeeding) qui assenyala que en el cas dels rossegadors una paparra el temps necessari per a infectar una paparra és més curt per a la via no sistèmica -és a dir si la infecció es produeix a partir del lloc de picada- que per la via sistèmica. El mateix autor apunta que tots aquells hostes que suporten una gran nombre de paparres infectades alimentant-se en ells haurien d'ésser considerats com a "amplificadors" del patògen. Considerem que el jerbis constitueix un bon model animal a aplicar en els estudis de transmissió de *Borrelia*.



CONCLUSIONS

- 1.- Considerem que tant guineus com conills participen en l'epidemiologia de *R.conorii* i *B.burgdorferi* en el cicle salvatge: les prevalences detectades indiquen, si més no, el manteniment de poblacions de paparres infectades i, per tant, de focus d'infecció.
- 2.- El gos participa en el cicle de la transmissió de malalties rickettsials afavorint l'establiment de poblacions de paparres que poden mantenir la rickettsia circulant i com a portador de paparres infectades cap a l'ambient humà.
- 3.- El gos constiuéix un indicador de la presència de rickettsies en una determinada àrea.
- 4.- La tècnica de Immunofluorescència indirecta (IFI) desenvolupada en aquest treball té una elevada concordància amb la IFI comercial que s'empra de forma rutinària en el diagnòstic serològic de la Febre Botonosa Mediterrània.
- 5.- La seroprevalença enfront de la malaltia de Lyme en la població canina de Catalunya és molt baixa, éssent lleugerament superior en les mostres d'animals salvatges recollides a Aragó possiblement com a conseqüència de la presència de la paparra vectora.
- 6.- Considerem que el *cut off* establert per al diagnòstic serològic de la malaltia de Lyme hauria de ser superior en àrees no endèmiques, degut al risc de reaccions serològiques creuades amb altres espiroquetes.
- 7.- Els resultats obtinguts en l'estudi de la capacitat vectorial d'*Ixodes ricinus* per a transmetre *B.afzelii* mostren una gran variabilitat individual de cada paparra. Igualment sembla ser que és el grau d'infecció inicial el que marca l'evolució de la infecció, independentment dels dies i de la temperatura a la que s'ha sotmés cada paparra.



BIBLIOGRAFIA

Anacker R.L.; Gerloff R.K.; Thomas L.A.; Mann R.E.; Bickel W.D. 1975. "Immunological properties of *Rickettsia rickettsii* purified by zonal centrifugation". *Infect. Immunit.* 11: 1203-1209.

Anda P.; Rodriguez I.; De la Loma A.; Fernandez M.; Lozano A. 1993. "A serological survey and review of clinical Lyme borreliosis in Spain". *Clin.Infect.Dis.* 16(2): 310-319.

** Anònim. 1983. *Ticks of Veterinary importance*. Animal and Plant Health Inspection Service United States. Dep. of Agriculture. Handbook n°485.

Arthur R. 1963. *British ticks*. Ed. Butterworths. London.

Artursson K.; Mlamqvist M.; Olsson E.; Bjoersdorff A.; Eklund M.; Gunnarsson A. 1994. "Diagnosis of borreliosis and granulocytic ehrlichiosis of horses, dogs and cats in Sweden". *Svensk.Vet.* 46(7):331-336.

Arzouni J.P.; Laveran M.; Beytout J.; Ramousse O.; Raoult D. 1993. "Comparison of Westernblot and Microimmunofluorescence as tools for Lyme disease seroepidemiology". *Eur.J.Epidemiol.* 9(3): 269-273.

Asbrink E.; Hovmark A. 1985. "Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans". *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 93: 161-163.

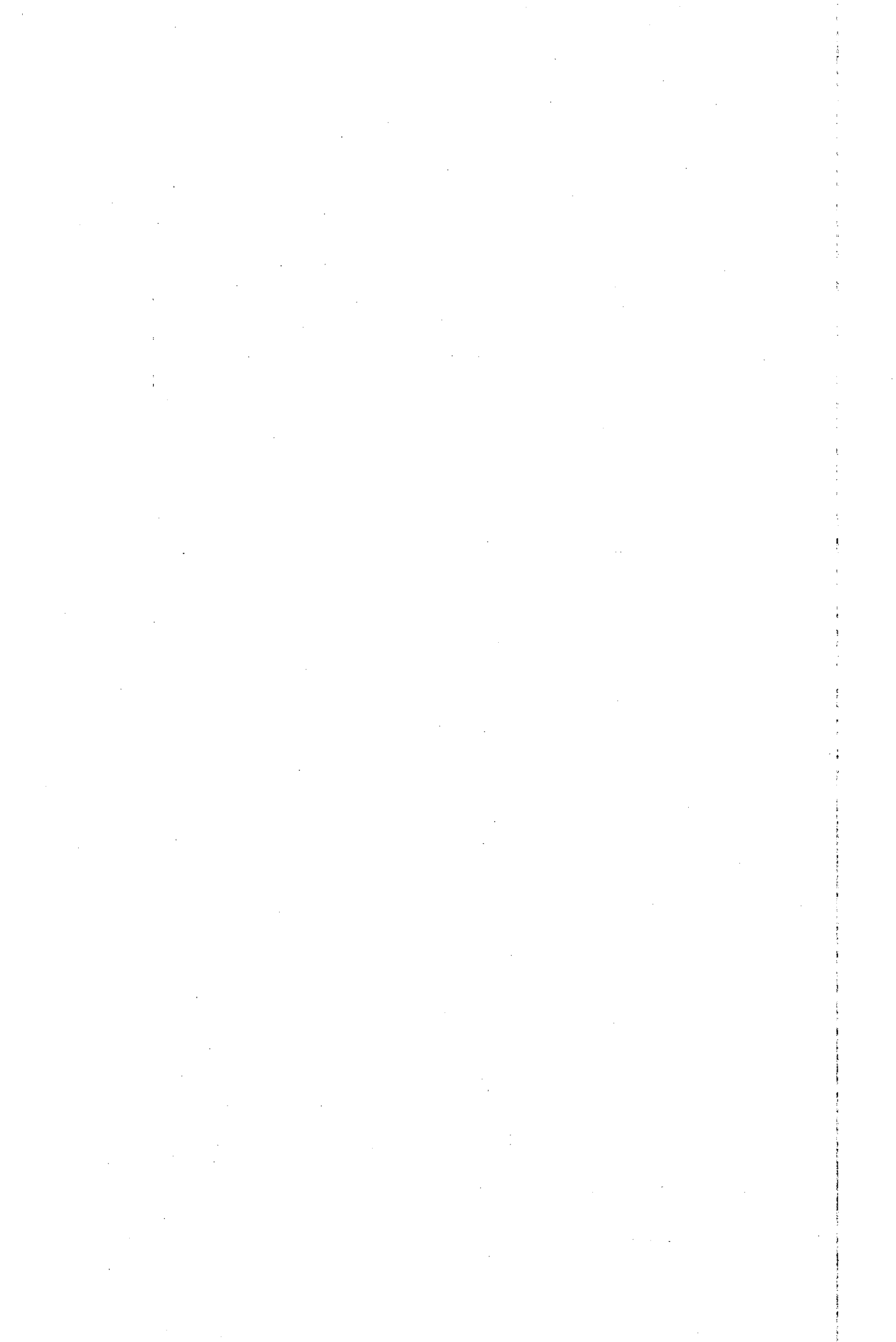
Aubert M.F.A. 1975. "Contribution a l'étude du parasitisme du renard (*Vulpes vulpes* L.) par les ixodidae dans le Nord-Est de la France. Interpretation de la dynamique saisonnière des parasites en relation avec la biologie de l'hote". *Acarologia* 17(3): 452-478.

Bacellar RF.; Regnery R.L.; Nuncio S.; Filipe A.R. 1995. "Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal". *Epidemiol. and Infect.* 114(1): 169-178.

Baranton G.; Postic D.; Saint Girons I.; Boerlin P.; Piffaretti J.C.; Assous M.; Grimony P. 1992. "Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp.nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis". *Int.J.Syst.Bacteriol.* 42(3): 378-383.

Barbour A.G. 1984. "Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes". *Yale.J.Biol.Med.* 57:521-525.

Barbour A.G. 1986. "Cultivation of *Borrelia*: A Historical Overview". *Zblt. Bakt. Hyg.* A263: 11-14.



Barbour A.G.; Heiland R.A.; Howe TR. 1985. "Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: A molecular analysis of North American and European isolates". *J.Inf.Dis.* 152: 478-484.

Bergey's. 1974. "Rickettsiales". A: *Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Edition. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore.

Beati L. i Raoult D. (a). 1993. "Nouvelles rickettsies du groupe boutonneux en France et dans le monde". *Méd.Mal.Infect.* 23: 491-498.

Beati L.; Raoult D. (b). 1993. "*Rickettsia massiliae* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia". *J.Syst.Bacteriol.* 43(4): 839-840.

Beati L; Finidori J.P.; Raoult D. 1993. "First Isolation of *Rickettsia slovaca* from *Dermacentor marginatus* in France". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 48(2): 257- 268.

Beati L.; Finidori J.P.; Gilot B.; Raoult D. 1992. "Comparison of Serologic Typing, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis protein Analysis, and Genetic Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Rickettsiae: Characterization of Two New Rickettsial Strains". *J.Clin.Microbiol.* 30: 1922-1930.

Beati L.; Humair P.F.; Aeschlimann A.; Raoult D. 1994. "Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae Isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 51(2): 138-148.

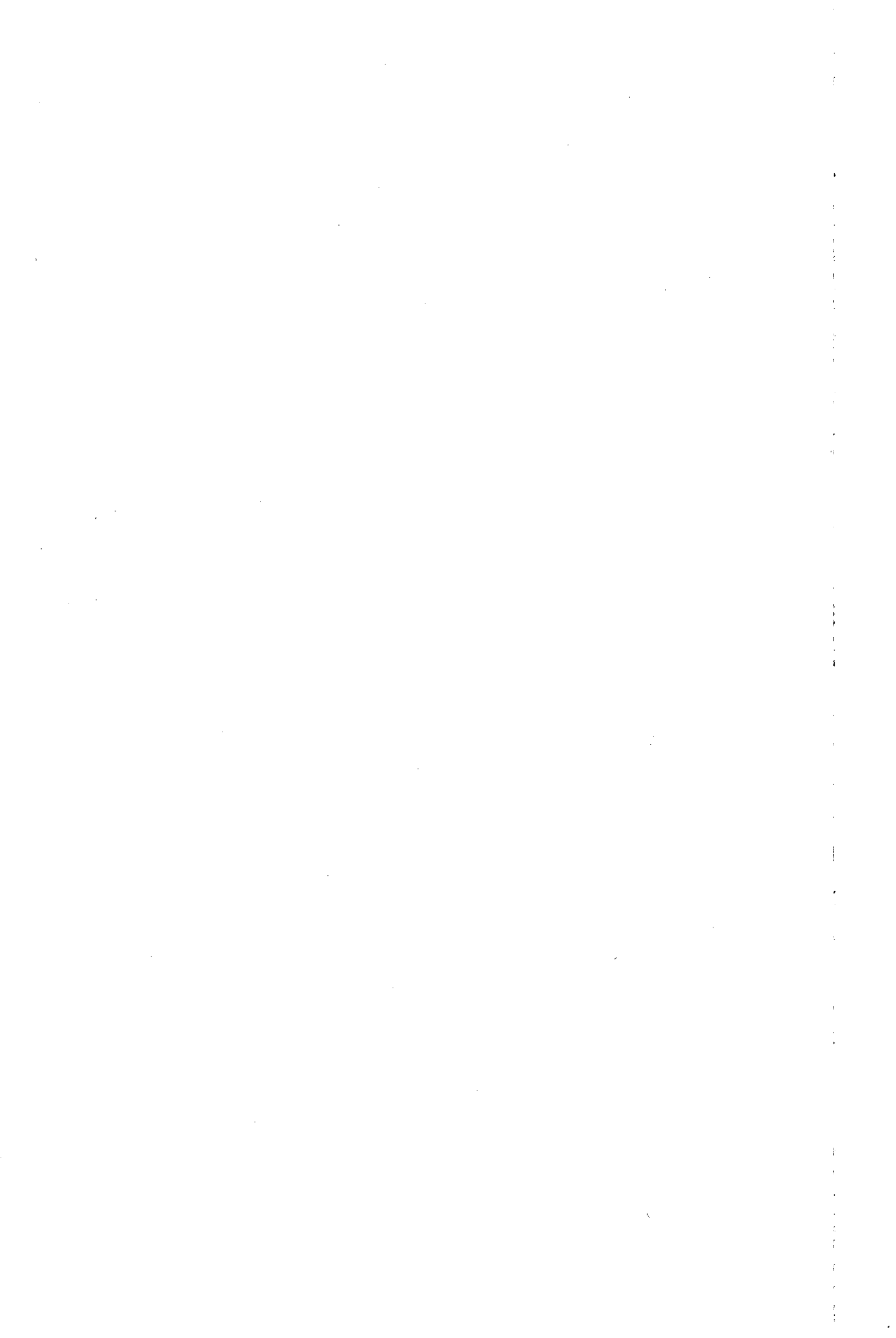
Beati L.; Roux V.; Ortuño A.; Castellà J.; Segura F.; Raoult D. 1996. "Phenotypic and Genotypic Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae Isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* Ticks". *J.Clin.Microbiol.* 34, 11: 2688-2694.

Benach J.L.; Bosler E.M.; Hanrahan J.P.; Coleman J.L.; Habicht G.S.; Bast T.F.; Cameron D.J.; Ziegler J.L.; Barbour A.G.; Burgdorfer W. 1983. "Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease". *N.Engl.J.Med.* 308(13): 740-742.

Benach J.L.; Coleman J.L.; Garcia-Moncó J.C.; Deponce P.C. 1988. "Biological activity of *Borrelia burgdorferi* antigens". *Ann. N.Y.Acad.Sci.*: 115-125.

Benerjee S.; Stephen C.; Fernando K.; Coffey S.; Dong M. 1996. "Evaluation of dogs as sero-indicators for the geographic distribution of Lyme borreliosis in British Columbia". *Can. Vet.J.* 37: 168-169.

Berger B.W.; Kaplan M.H.; Rothenberg I.R.; Barbour A.G. 1985. "Isolation and characterization of the Lyme disease spirochete from the skin of patients with *erythema chronicum migrans*". *J.Am.Acad.Dermatol.*



13(3): 444-449.

Bosler E.; Schulze T. 1986. "The prevalence and significance of *Borrelia burgdorferi* in the urine of feral reservoirs hosts". *Zbl.Bakt.Hyg.* A263: 40-44.

Breitschwerdt E.B. 1993. "Tick-borne disease of dogs". *Vet. Techn.* 14(5): 291-299.

Breitschwerdt E.B.; Levy M.G.; Davidson M.G.; Walker D.H.; Burgdorfer W.; Curtis B.; Babineau C.A. 1990. "Kinetics of IgG and IgM responses to experimental and naturally acquired *Rickettsia rickettsii* infection in dogs". *Am. J. Vet. Res.* 51(8): 1312-1316.

Breitschwerdt E.B.; Meuten D.J.; Walker D.H.; Levy M.; Kennedy K.; King M.; Curtis B. 1985. "Canine Rocky Mountain spotted fever: A kennel epizootic". *Am.J.Vet.Res.* 46(10): 2124-2128.

Breitschwerdt E.B.; Moncol D.J.; Corbett W.T.; MacCormak J.N.; Burgdorfer W.; Ford R.b.; Levy M.G. 1987. "Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina". *Am.J.Vet.Res.* 48(10): 1436-1440.

Bruckbauer H.R.; Preac-Mursic V.; Fuchs R.; Wilske B. 1992. "Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*". *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 11(3): 224-232.

Burgdorfer W. 1970. "Hemolymph Test: A Technique for detection of Rickettsiae in Ticks". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 19(6): 1010-1014.

Burgdorfer W. 1984. "The New Zealand white rabbit: An experimental host for infecting ticks with lyme disease spirochetes". *Y.J.Biol.Med.* 57: 609-612.

Burgdorfer W. 1992. "Transovarial transmission: An effective ecological means for the survival of tick-borne spotted fever group rickettsiae". First International Conference on Tick-borne pathogens at the host vector interface. St. Paul, Minnesota 15-18 Sept.

Burgdorfer W.; Barbour A.G.; Hayes S.F.; Peter O.; Aeschlimann A. 1983. "Erythema chronicum migrans - a tick-borne spirochetosis". *Acta Trop.* 40: 79-83.

Burgdorfer W.; Gage K.L. 1986. "Susceptibility of the black-legged tick *Ixodes scapularis* to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*". *Zbl.Bakt.Hyg.* A263: 15-20.

Burgdorfer W.; Hayes S.F.; Benach J.L. 1988. "Development of *Borrelia burgdorferi* in Ixodid tick vectors". *Ann.NY.Acad.Sc.* 172-179.

Burgdorfer W.; Lane R.S.; Barbour A.G.; Gresbrink R.A.; Anderson J.R. 1985. "The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 34(5): 925-930.

Burgess E.C. 1986. "Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*". *Zbl.Bakt.Hyg. A* 263: 49-54.

Burgess E.C. 1991. "The role of wild mammals in the transmission of *Borrelia burgdorferi*". *Bull.Soc. Vector Ecol.* 16(1): 50-58.

Burgess E.; Schneider E.; Bosler E. 1989. "Testing for *Borrelia burgdorferi*". *JAVMA* 195(7): 844-845.

Burgess ; Wachal; Cleven. 1993. "*Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents and birds from four Wisconsin dairy farms". *Vet. Microbiol.* 35: 61-77.

Canica M.M.; Nato F.; Du Merle L.; Mazie J.C.; Baranton G.; Postic D. 1993. "Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp.nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis". *Scand.J.Infect.Dis.* 25: 441-448.

Caride E.; Rodriguez J.A.; Martin M.C.; Olmeda A.S.; Solana A. 1995. "*Prevalencia de la borreliosis canina en Madrid*". III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas. 5-7 novembre, Alcalá de Henares.

Castellà J.; Ortuño A.; Estrada A.; Osacar J.; Calvete C. 1996. "Seasonal variation of Ixodoidea on wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) collected in Aragon (Northeastern of Spain)". *III Symposium of the European Association of Acarologists.* Amsterdam, 1-5 Juliol.

Cerri D.; Farina R.; Andreani E.; Nuvoloni R.; Pedrini A. 1994. "Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi*". *Res.Vet.Sci.* 57: 256-258.

Cowdry E.V. 1923. "The distribution of rickettsia in tissues of insects and arachnids". *J.Exp.Med.* 37: 431-455.

Cowdry E.V. 1925. "A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease" *J.Exp.Med.* 41: 817-830.

Delgado S.; Cármenes P. 1995. "Canine seroprevalence of *Rickettsia conorii* infection (Mediterranean Spotted Fever) in Castilla y León". *Eur. J.Epidemiol.* 11: 597-600.

Delgado S.; Cármenes P. 1995. "Seroepidemiological survey for *Borrelia burgdorferi* in dogs from northwestern of Spain". *Eur.J.Epidemiol.* 11(3): 321-324.

Doby J.M.; Betremieux C.; Barrat J.; Rolland C. 1991. "Spirochétose a tiques par *Borrelia burgdorferi* chez les carnivores sauvages en France. Résultats de l'examen sérologique de 372 renards". *Bull.Soc.Path.Ex.* 84: 46-53.

Doby J.M.; Betremieux C.; Degeilh B. 1992. "Intéret de l'utilisation d'antigènes préparés a partir de souches différentes de *Borrelia burgdorferi* pour le diagnostic de la Borréliose de Lyme chez l'animal". *Revue.Med.Vet.* 143(7): 617-622.

Doby J.M.; Betremieux C.; Lambert M.C.; Lorvelec O.; Rolland C.; Costil C. 1991. "Les micromammifères forestiers réservoirs de germes pour *Borrelia burgdorferi*, agent de la borreliose de Lyme?. *Revue Méd. Vét.* 142(10): 737-742.

Doby J.M.; Betremieux C.; Rolland C.; Barrat J. 1991. "Les grands mammifères forestiers, réservoirs de germe pour *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme?". *Rec.Med.Vet.* 167(1): 55-61.

Doby J.M.; Bigaignon G.; Aubert M.; Imbert G. 1991. "Ectoparasites du renard et borreliose de Lyme recherche de *Borrelia burgdorferi* chez les tiques Ixodidae et insectes siphonaptera". *Bul.Soc.Franc.Parasitol.* 9(2):279-288.

Donoghue A.R.; Schillhorn Van Veen T.W. 1989. "Investigating cross-reactions between *Leptospira* and *Borrelia*". *JAVMA* 195(11): 1460-1462.

Drancourt M.; Raoult D. 1992. "Les Rickettsioses (I): Les fièvre eruptives". *Rev.Practic.* 6: 71-77.

Espejo E.; Alegre M.D.; Font B.; Font A.; Segura F.; Bella F. 1993. "Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: Seasonal differences". *Eur. J.Epidemiol.* 9(3): 344-346.

Espejo E.; Font B.; Alegre M.D.; Segura F.; Bella F. 1990. "Seroepidemiological survey of Mediterranean Spotted Fever in an endemic area (Vallès Occidental, Barcelona, Spain)". 1990. *Trop.Geog.Med.* 42: 212-216.

Estrada Peña, A. 1994. Las garrapatas en España: Introducción. Edit.: Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

Estrada-Peña, A. 1997. "Epidemiological surveillance of tick populations: A model to predict the colonization success of *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae)". *Eur.J.Epidemiol.* 13: 573-580.

Estrada-Peña A.; Oteo J.A.; Estrada-Peña R.; Gortázar C.; Osácar J.J.; Moreno J.A.; Castellà J. 1995. "*Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks (Acari: Ixodidae) from two different foci in Spain". *Exp.Appl.Acarol.* 19:173-180.

Filipe A.R.; Rehacek J.; Bacellar F; Nuncio S. 1992. "Microbiologia e parasitologia da hemolinfa dos ixodídeos do distrito de Setúbal". *Rev. Portug. Cien. Vet.* 87(501): 46-52.

Font A.; Closa J.M.; Mascort J. 1992. "Lyme disease in dogs in Spain". *Vet. Rec.* 130: 227-228.

Freney; Renaud; Hansen; Bollet. 1992. "Rickettsiae". In: *Manuel de Bactériologie clinique*. Volum II. Ed. Elsevier.

Fridriksdóttir V.; Overnes G.; Stuen S. 1992. "Suspected Lyme borreliosis in sheep". *Vet. Rec.* 11: 323-324.

Gage K.L.; Gilmore R.D.; Karstens R.H.; Schwan T.G. 1992. "Detection of *Rickettsia rickettsii* in saliva, hemolymph and triturated tissues of infected *Dermacentor andersoni* ticks by polymerase chain reaction". *Molec. Cell. Probes.* 6: 333-341.

García-Moncó J.C.; Benach J.L.; Coleman J.L.; Galbe J.L.; Szczepanski A.; Fernandez B.; Norton Hughes C.A.; Johnson R.C. 1992. "Caracterización de una cepa española de *Borrelia burgdorferi*". *Med. Clin. (Barc)* 98: 89-93.

Gern L.; Zhu Z.; Aeschlimann A. 1990. "Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding". *Ann. Parasitol. hum. Comp.* 65(2): 89-93.

Gil Collado J.; Guillen Lera J.L.; Zapatero Ramos L.M. 1979. "Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos)". *Rev. Ib. Parasitol.* 39: 109-118.

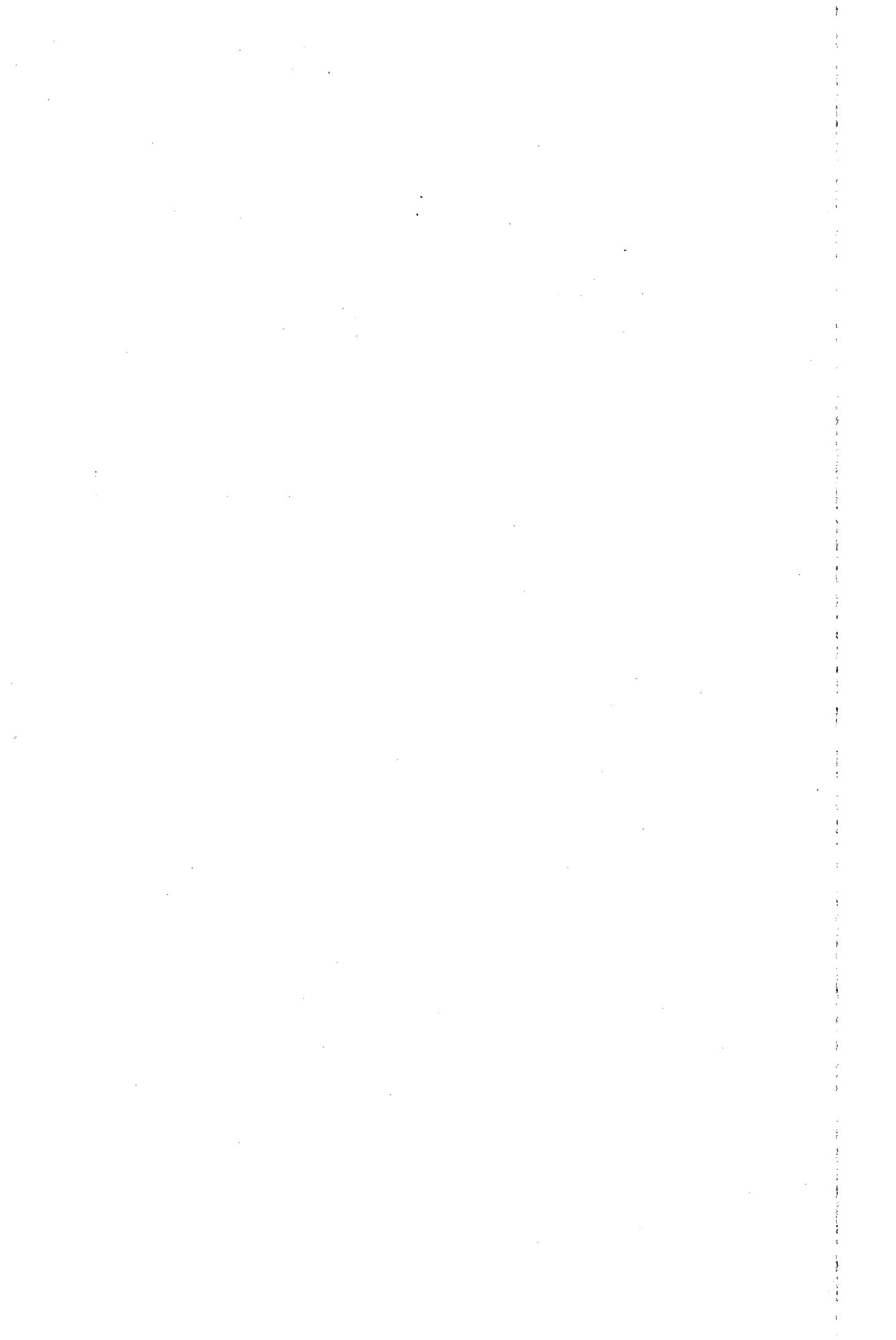
Gilot B.; Aubert M.F.A. (a). 1985. "Les *Ixodidae* (Acariens, *Ixodoidea*) parasites de carnivores sauvages dans les Alpes Françaises et leur avant-pays". *Acarologia* 26 (3): 215-233.

Gilot B.; Laforge M.L.; Pichot J.; Raoult D. 1990. "Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean Spotted Fever Epidemiology in France". *Eur. J. Epidemiol.* 6(4): 357-362.

Gilot B.; Rogers P.; Lachet B. (b). 1985. "Données biologiques et écologiques sur les tiques de lagomorphes (et plus spécialement celles du lapin de garenne, *Oryctolagus cuniculus* L.) dans les Alpes Françaises et leur avant-pays". *Acarologia* 26(4): 335-354.

Giménez D.F. 1964. "Staining rickettsiae in yolk-sac cultures". *Stain Technol.* 39: 135-140.

Ginsberg H.S.; Ewing C.P. 1989. "Comparison of flagging, walking, trapping and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini* and Lone star ticks, *Amblyomma americanum*". *Exp. Appl. Acarol.* 7: 313-322.



Giraud P.; Capponi M.; Dumas M.; Colos-Belcour J. 1963. "De la fièvre boutonneuse méditerranéenne au groupe boutonneux pourpré". *Bull.Soc.Pat. exot.* 56: 629-638.

**Gortázar C. 1993. Ecoepidemiología de las helmintiasis del zorro (*Vulpes vulpes* L.) en la Cuenca Media del Ebro. Tesina de Licenciatura. Facultat de Veterinària de Zaragoza.

Gosálbez J. 1987. *Insectívors i Rosegadors de Catalunya*. Ed. Ketres. Barcelona.

Graft J.E.; Grodzicki R.L.; Steere A. 1984. "Antibody response in Lyme disease: Evaluation of Diagnostic test". *J.Infect.Dis.* 149(5): 789-795.

Gray J. 1996. "Ecology of ticks transmitting Lyme disease". EURAAC.
III Symposium of the European Association of Acarologists. Amsterdam 1-5 Juliol.

Gray J.S.; Kahl O.; Janetzki-Mittman C.; Stein J.; Guy E. 1994. "Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog *Erinaceus europaeus* L". *Exp.Appl.Acarol.* 18: 485-491.

Green R.T. 1990. "Lyme borreliosis". A: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Ed. Saunders, Philadelphia.

Green R.T. 1989. "Lameness and asymptomatic *Borrelia burgdorferi* seropositivity in dogs". *J.Infect.Dis.* 160(2): 346.

Green R.T. 1991. "Canine Lyme borreliosis". *Vet.Clin.North Am.Sm.An.Pract.* 21(1): 51-64.

Green R.T.; Levine J.F.; Breitschwerdt E.B.; Walker R.L.; Berkhoff H.A.; Cullen J.; Nicholson W. (a) 1988. "Clinical and serologic evaluations of induced *Borrelia burgdorferi* infections in dogs". *Am.J.Vet.Res.* 49(6): 752-757.

Green R.T.; Walker R.L.; Burgess E.C.; Levine J.F. (b). 1988. "Heterogeneity in Immunoblot patterns obtained by using four strains of *Borrelia burgdorferi* and sera from naturally exposed dogs". *J.Clin.Microbiol.* 26(11): 2287-2291.

Grodzicki R.L.; Steere A. 1988. "Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using antigen preparations for diagnosing early Lyme disease". *J.Infect.Dis.* 157(4): 790-797.

Guberman D.; Mumcuoglu K.Y.; Keysary A.; Ioffe-Uspensky I.; Miller J.; Galun R. 1996. "Prevalence of spotted fever group rickettsiae in ticks from southern Israel". *J.Med.Entomol.* 33(6): 979-982.

** Guerrero A.; Serrano M.J.; García-Moncó C. 1988. "Borreliosis de Lyme en España". 90: 434 (extret

de 38)

Gustafson J.; Burgess E.; Wachal M.; Steinberg H. 1993. "Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs". *Am.J.Vet.Res.* 54(6): 882-889.

Habitch G.S.; Beck G.; Benach J.L. 1987. "La enfermedad de Lyme". *Inv. Cienc. Set:* 52-59.

Harris S.; Thompson G.B. 1978. Populations of the ticks *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus* and *Ixodes (Pholeoixodes) canisuga* infesting suburban foxes, *Vulpes vulpes*". *J.Zool.Lond.* 186: 83-93.

Harwood R.F.; James M.T. 1987. "Chinches". A: *Entomología Médica y Veterinaria*. Ed.Limusa. p.145-146.

Hayes S.F.; Burgdorfer W.; Barbour A.G. 1988. "Electron Microscope Characterization of cloned and uncloned strains of *Borrelia burgdorferi*". *Ann. N.Y. Acad.Scienc.:* 383-385.

Hechemy K.E.; Raoult D.; Eisemann C.; Han Y.S.; Fox J.A. 1986. "Detection of antibodies to *Rickettsia conorii* with a latex agglutination test in patients with Mediterranean spotted fever". *J.Infect.Dis.* 153: 132-135.

Hechemy K.E.; Raoult D.; Fox J.; Han Y.; Elliott L.B.; Rawlings J. 1989. "Cross-reaction of immune sera from patients with rickettsial diseases". *J. Med.Microbiol.* 29: 199-202.

Herrero-Herrero J.I.; Ruiz-Beltrán R. 1994. "La Fiebre Exantemática Mediterránea". Edit.: Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

Herrero C.; Pelaz C.; Martín-Bourgon C. 1992. "Isolation of an agent of the spotted fever group rickettsia from tick eggs in Madrid, Spain". *Epidemiol.Infect.* 108: 555-557.

Herrero C.; Pelaz C.; Alvar J.; Molina R.; Vázquez J.; Anda J.; Casal J.; Martín-Bourgnon C. 1992. "Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the Central provinces of Spain". *Eur.J.Epidemiol.* 8(4): 575-579.

Herrero-Herrero J.I.; Ruiz Beltrán R.; Martín-Sánchez M.; García E. 1989. "Mediterranean spotted fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population". *Act. Trop.* 46: 335-350.

Hovmark A.; Jaenson T.; Asbrink E.; Forsman A.; Jansson E. 1988. "First isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in Northern Europe". *A.P.M.I.S.* 96: 917-920.

Isogai E.; Isogai H.; Kawabat H.; Masuzawa T.; Yanagihara Y.; Kimura K.; Sakai T.; Azuma Y.; Fujii N.; Ohno S. 1994. "Lyme disease spirochetes in a wild fox (*Vulpes vulpes schrencki*) and in ticks". *J. Wild. Dis.* 30(3): 439-444.

Jaenson T.G.T.; Tälleklint L. 1992. "Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme disease borreliosis spirochete". *J. Med. Entomol.* 29(5): 813-817.

Joubert L.; Gilot B.; Goyon M. 1983. "Les Rickettsioses animales actuelles et leur impact humain en France". *Sci. Vét. Méd. Comp.* 85(6): 243-265.

Johnson R.C. 1977. "The spirochetes". *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 89-106.

Karlsson M.; Hoving-Hougen K.; Svenungsson B.; Stiernstedt G. 1990. "Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis". *J. Clin. Microbiol.* 28: 473-479.

Kaufman A.C.; Green C.E.; McGraw R.A. 1993. "Optimization of polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in biologic specimens". *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 548-554.

Kazmierczak J.J.; Burgess E. 1989. "Antibodies to *Borrelia spp.* in wild foxes and coyotes from Wisconsin and Minnesota". *J. Wild. Dis.* 25(1): 108-111.

Kazmierczak J.J.; Burgess E.C.; Amundson T.E. 1988. "Susceptibility of the gray wolf (*Canis lupus*) to infection with the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*". *J. Wild. Dis.* 24(3): 522-527.

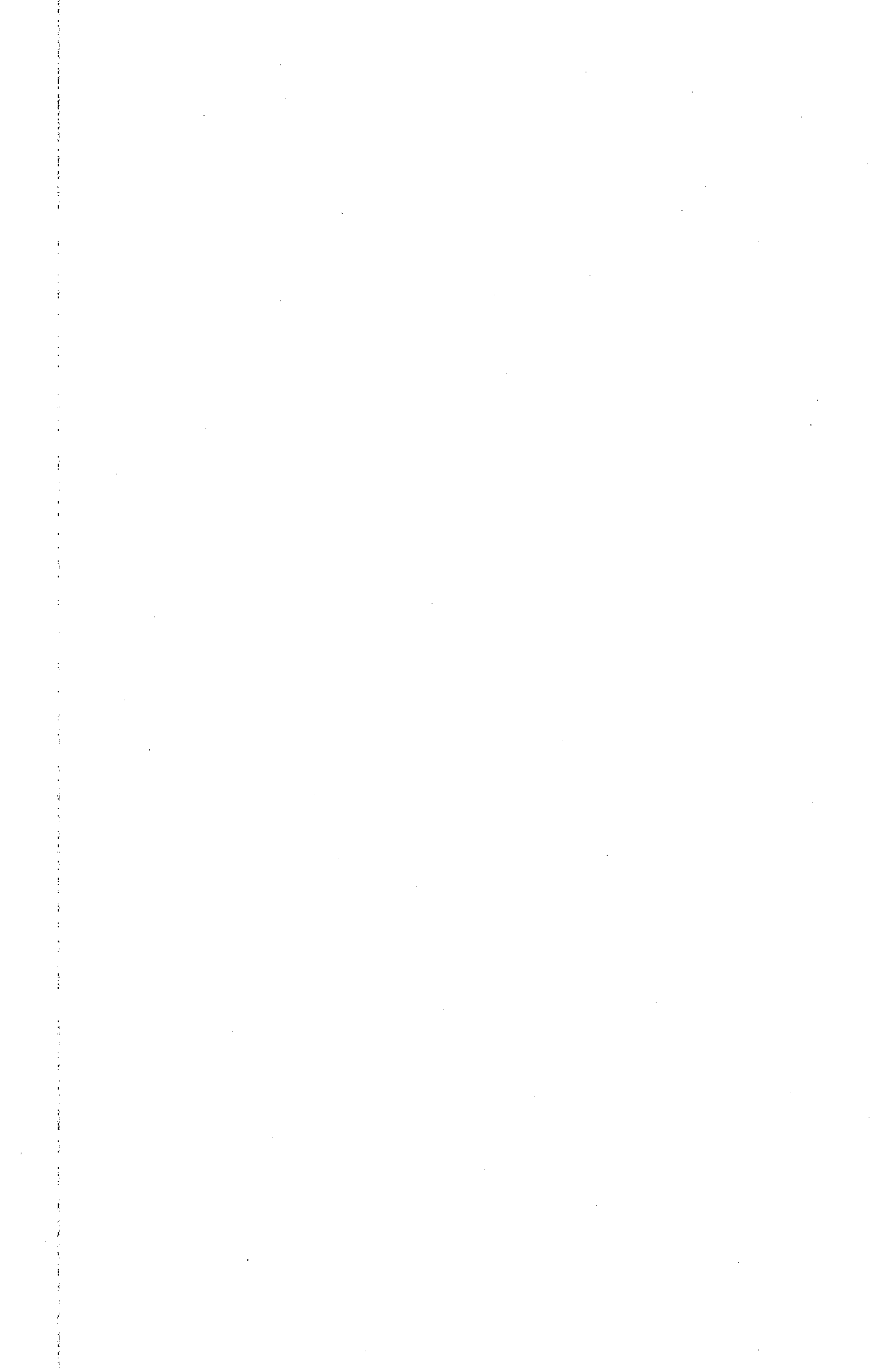
Keenan K.P.; Buhles W.C.; Huxsoll D.L.; Williams R.G.; Hildebrandt R.G.; Campbell J.M.; Stephenson E.H. 1977. "Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever". *J. Infect. Dis.* 135: 911-917.

Kelly P.J.; Manson P.R. 1991. "Tick-bite fever in Zimbabwe". *S.A.M.J.* 80: 233-236.

Kelly P.J.; Matthewman L.A.; Mason P.R.; Courtney S.; Katsande C.; Rukwava J. 1992. "Experimental infection of dogs with Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*". *J. Trop. Med. Hyg.* 95(5): 322-326.

Korenberg E.I.; Moskvitina G.G. 1996. "Interrelationships between different *Borrelia* genospecies and their principal vectors". *J. Vet. Ecol.* 21(2): 178-185.

Kornblatt A.N.; Steere A.; Browstein D. 1984. "Infection in rabbits with the Lyme disease spirochete". *Yale J. Biol. Med.* 57:613-614.



Kuhn K.H.; Uhler J.; Grubhoffer L. 1996. "Ultrastructural localization of a sialic acid-specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata)". *Parasitol.Res.* 82 (3): 215-221.

Krampitz H.E. 1986. "In vivo isolation and maintenance of some wild strains of European hard tick spirochetes in mammalian and arthropod hosts". *Zbt.Bakt.Hyg.* A263: 21-28.

Lane R.S.; Burgdorfer W. 1988. "Spirochetes in mammals and ticks (Acari: Ixodidae) from a focus of Lyme borreliosis in California". *J.Wild.Dis.* 24(1): 1-9.

Lefebvre J.C.; Favier G.; Dellamonica P.; Vanderkerkove M. 1979. "Diagnostic de la fièvre boutonneuse méditerranéenne par immunofluorescence indirecte". *Nov. Press. Med.* 8(17): 1431.

Levine J.; Wilson M.; Spielman A. 1985. "Mice as reservoirs of the Lyme disease spirochete". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 34(2): 355-360.

Levy S.A.; Dombach D.; Barthold S.W.; Wsamoen T. 1993. "Canine Lyme borreliosis". *The Compendium* 15(6): 833-846.

Levy S.A.; Dreesen D.W. 1992. "Lyme borreliosis in dogs". *Can.Pract.* 17(2): 5-14.

Levy S.A.; Magnarelli L.A. 1992. "Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis". *JAVMA* 200(3): 344-347.

Livesley M.A.; Carey D.; Gern L.; Nuttall P.A. 1994. "Problems of isolating *Borrelia burgdorferi* from ticks collected in United Kingdom foci of Lyme disease". *Med.Vet.Entomol.* 8: 172-178.

Madigan J.E. 1993. "Lyme borreliosis in Horses". *Vet.Clin.N.Am.* 9(2): 429-434.

Magnarelli L.A. 1988. "Serologic Diagnosis of Lyme disease". *Ann.N.Y.Acad.Sc.* 154-161.

Magnarelli L.A. 1991. "Pruebas serológicas diagnósticas en la enfermedad de Lyme". *JANO* 41(961): 43-45.

Magnarelli L.A.; Anderson J.F. 1988. "Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*". *J.Clin.Microbiol.* 26(8): 1482-1486.

Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Apperson C.S.; Fish D.; Johnson R.C.; Chappell W.A. 1986. "Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white tailed deer from Connecticut, New York State and North Carolina". *J.Wild.Dis.* 22: 178-88.

- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Burgdorfer W. 1979. "Rocky Mountain Spotted Fever in Connecticut: Human cases, spotted fever group rickettsiae in ticks and antibodies in mammals". *Am.J.Epidemiol.* 110(2): 148-155.
- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Fish D. 1987. "Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae)". *J.Infect.Dis.* 156 (1): 234-236.
- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Hyland K.E.; Fish D.; McAninch JB. 1988. "Serologic analyses of *Peromyscus leucopus*, a rodent reservoir for *Borrelia burgdorferi* in Northeastern United States". *J.Clin.Microbiol.* 26: 1138-1141.
- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Johnson R.C. 1987. "Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections". *J.Infect.Dis.* 156: 183-188.
- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Levine H.R.; Levy S.A. 1990. "Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats". *JAVMA.* 197(1): 63-66.
- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; McAninch J.B. 1990. "Serologic analyses of cottontail rabbits for antibodies to *Borrelia burgdorferi*". *J.Clin.Microbiol.* 28(5): 890-893.
- Magnarelli L.; Anderson J.F.; Philip R.N.; Burgdorfer W.; Casper E.A. 1981. "Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 30(3): 715-721.
- Magnarelli L.A.; Anderson J.F.; Schreier A.B. 1990. "Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut". *JAVMA* 196(7): 1064-1068.
- Magnarelli L.A.; Andreadis T.G.; Stafford III K.C.; Holland C.J. 1991. "Rickettsiae and *Borrelia burgdorferi* in Ixodid ticks". *J.Clin.Microbiol.* 29(12): 2798-2804.
- Magnarelli L.A.; Oliver J.H.; Hutchenson J.; Anderson J. 1991. "Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in deer and raccoons". *J.Wild.Dis.* 27(4): 562-568.
- Mandola M.L.; Masoero L.; Gerbi C. 1992. "Prevalenza di anticorpi anti-*Rickettsia conorii* nella popolazione canina dell'astigiano in seguito a casi di Febbre Bottonosa". *Progress.Vet.* 17: 534-536.
- Marquez F.J. 1990. "Dinámica de la población de *Ixodes ventalloi* Gil Collado, 1936 (Acarina, Ixodidae) durante 1986-1987 en el sureste de España". *Rev.Iber.Parsitol.* 50(1-2): 101-114.
- Marquez F.J. 1992. "Dynamique de la population de *Haemaphysalis hispanica* (Acarina, Ixodidae) dans le sud-est de l'Espagne". *Vie.Milieu* 42(1): 41-49.

Marquez F.J.; Constan M.C. 1990. "Infection d'*Ixodes ricinus* et *Haemaphysalis punctata* par *Borrelia burgdorferi* dans le nord de la Péninsule Iberique (Pays Basque Espagnol et Navarre)". *Bul.Soc.Franc.Parasitol.* 8(2): 323-330.

Marrero M.; Raoult D. 1989. "Centrifugation shell-vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture". *Am.J.Trop. Med.Hyg.* 40: 197-199.

Mather T.; Fish D.; Coughlin R. 1994. "Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*)". *JAVMA* 205(2): 186-188.

Mather T.N.; Wilson M.L.; Moore S.I.; Ribeiro J.M.C.; Spielman A. 1989. "Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am.J.Epidemiol.* 130: 143-150.

Matthewman L.; Kelly P.; Hayter D.; Downie S.; Wray K.; Bryson N.; Rycroft A.; Raoult D. 1997. "Domestic cats as indicators of the presence of spotted fever and typhus group rickettsiae". *Eur.J.Epidemiol.* 13(1): 109-111.

Matuschka F.R.; Fisher P.; Musgrave K.; Richter D.; Spielman A. 1991. "Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 44(1): 100-107.

May C.; Carter S.D.; Barnes A.; McLean C.; Bennett D.; Coutts A.; Grant C.K. 1994. "*Borrelia burgdorferi* infection in cats in the UK". *J.Sm.An.Pract.* 35: 517-520.

McKenna P.; Clement J.; Van Dijck D.; Lauwerys M.; Carey D.; Van den Bogaard T.; Bigaignon G. 1995. "Canine Lyme in Belgium". *Vet.Rec.* 136: 244-247.

Miyamoto K.; Nakao M.; Uchikawa K.; Fujita H. 1992. "Prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in Ixodid ticks of Japan, with special reference to a new potential vector, *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae)". *J.Med.Entomol.* 29(2): 216-220.

**Monin ; Gern ; Aeschlimann. 1989. "A Study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*". *Zbl.Bakt.Suppl.* 18: 14-21.

Morel P.C.; Vassiliades G. 1962. "Les Rhipicephalus du groupe sanguineus (Acariens: Ixodoidea)". *Rev.Elev.Med.Vet.* 15: 343-386.

Mumcoughlu K.Y.; Frish K.; Sarov B.; Manor E.; Gross E.; Gat Z.; Galun R. 1993. "Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Southern Israel and its relationship to spotted fever group rickettsiae". *J.Med.Entomol.* 30(1): 114-121.

Munger R. 1990. "Uveitis as a manifestation of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs". *JAVMA* "Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of Spotted Fever Group rickettsiae from ticks collected in France". *J.Clin.Microbiol.* 28(7): 1597-1599.

Pfister K.; Bigler B.; Neswadba J.; Gern L.; Aeschlimann A. 1989. "*Borrelia burgdorferi* infections of dogs in Switzerland". *Zbl.Bakt.Suppl.* 18: 26-31.

Philip R.N.; Casper E.A.; Burgdorfer W.; Gerloff R.K.; Hughes L.E.; Bell J. 1978. "Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by Microimmunofluorescence". *J.Immunol.* 121(5): 1961-1968.

Pickens E.G.; Belle J.; Lackman D.B.; Burgdorfer W. 1965. "Use of mouse serum in identification and serologic classification of *Rickettsia akari* and *Rickettsia australis*". *J.Immunol.* 94:883.

Piesman J.; Donahue J.G.; Mather T.N.; Spielman A. 1986. "Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field collected larval *Ixodes dammini*". *J.Med.Entomol.* 23: 291.

Powers N.R.; Mehr Z.A.; Calamaio C.A.; Topping E.; Longfield R.; Fournier P.V.; Rawlings J.A. 1994. "Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in feral cats (*Felis domesticus*) and their ectoparasites in Fort Sam Houston, Texas". *Bull.Soc.Vector.Ecol.* 19(2): 125-129.

Punda-Polic V.; Bradaric N.; Klismanic-Nuber Z.; Mrljak V.; Giljanovic M. 1995. "Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs in Croatia". *Eur.J.Epidemiol.* 11(4): 389-392.

Quenin P. and Savey A. 1992. "Rickettsia". A: *Manuel de Bactériologie Clinique*". Volume 2. Freney, Renaud, Hansen, Bollet. Elsevier.

Radulovic S.; Feng H.M.; Crocquet-Valdes P.; Morovic M.; Dzelalija B.; Walker D.H. 1994. "Antigen-capture enzyme immunoassay: a comparison with other methods for the detection of spotted fever group rickettsiae in ticks". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 50(3): 359-364.

**Raffi A.E. 1990. "Contribution a l'étude de la maladie de Lyme: Etude bibliographique et enquête serologique chez les chiens en midi-Pyrenees". Tesi de... Ecole nationale veterinaire de Toulous. N90-TOU3-4007.

Randolph S.E.; Gern L.; Nuttall P.A. 1996. "Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission". *Parasitol.Today.* 12(12): 472-479.

Raoult D. 1989. "Dasch Line blot and Western blot immunoassays for diagnosis of Mediterranean Spotted Fever". *J.Clin.Microbiol.* 27: 2073-2079.

Raoult D. 1989. "Antibiotic susceptibility of rickettsia and treatment of rickettsioses". *Eur.J.Epidemiol.* 5(4): 432-435.

Raoult D.; De Micco C.; Gallais H.; Toga M. 1984. "Laboratory diagnosis of Mediterranean Spotted Fever by Immunofluorescent demonstration of *Rickettsia conorii* in Cutaneous Lesions". *J.Infect.Dis.* 150(1): 145-148.

Raoult D.; Hechemy K.E.; Chaudet H. 1985. "Sérologie de la Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne. Cinétique des anticorps détectés par trois méthodes: L'Immunofluorescence Indirecte, l'Hémagglutination Indirecte, et l'Agglutination Latex". *Path. Biol.* 33(8): 839-841.

Raoult D.; Tissot Dupont H.; Chicheportiche C.; Peter O.; Gilot B.; Drancourt M. 1993. "Mediterranean spotted fever in Marseille, France: Correlation between prevalence and hospitalized patients. Seroepidemiology, and Prevalence of Infected ticks in three different areas". *Am.J.Trop. Med.Hyg.* 48(2): 249-256.

Raoult D.; Weiller P.J.; Chagnon A.; Chaudet H.; Gallais H.; Casanova P. 1986. "Mediterranean Spotted Fever: Clinical laboratory and epidemiological features of 199 cases". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 35(4): 845-850.

Regnery R.L.; Spruill C.L.; Plikaytis B.D. 1991. "Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes". *J.Bacteriol.* 173(5): 1576-1589.

Rehacek J. "Importance of ticks in the ecology of Rickettsiae". First International conference on tick-borne pathogens at the host-vector interface, St. Paul, Minnesota, 15-18 Sept. 1992.

Rehacek J.; Brezina R.; Kóvacova E.; Zupancicova M. 1971. "Haemocyte test - An easy, quick and reliable method for the detection of rickettsiae in ticks". *Acta virol.* 15: 237-240.

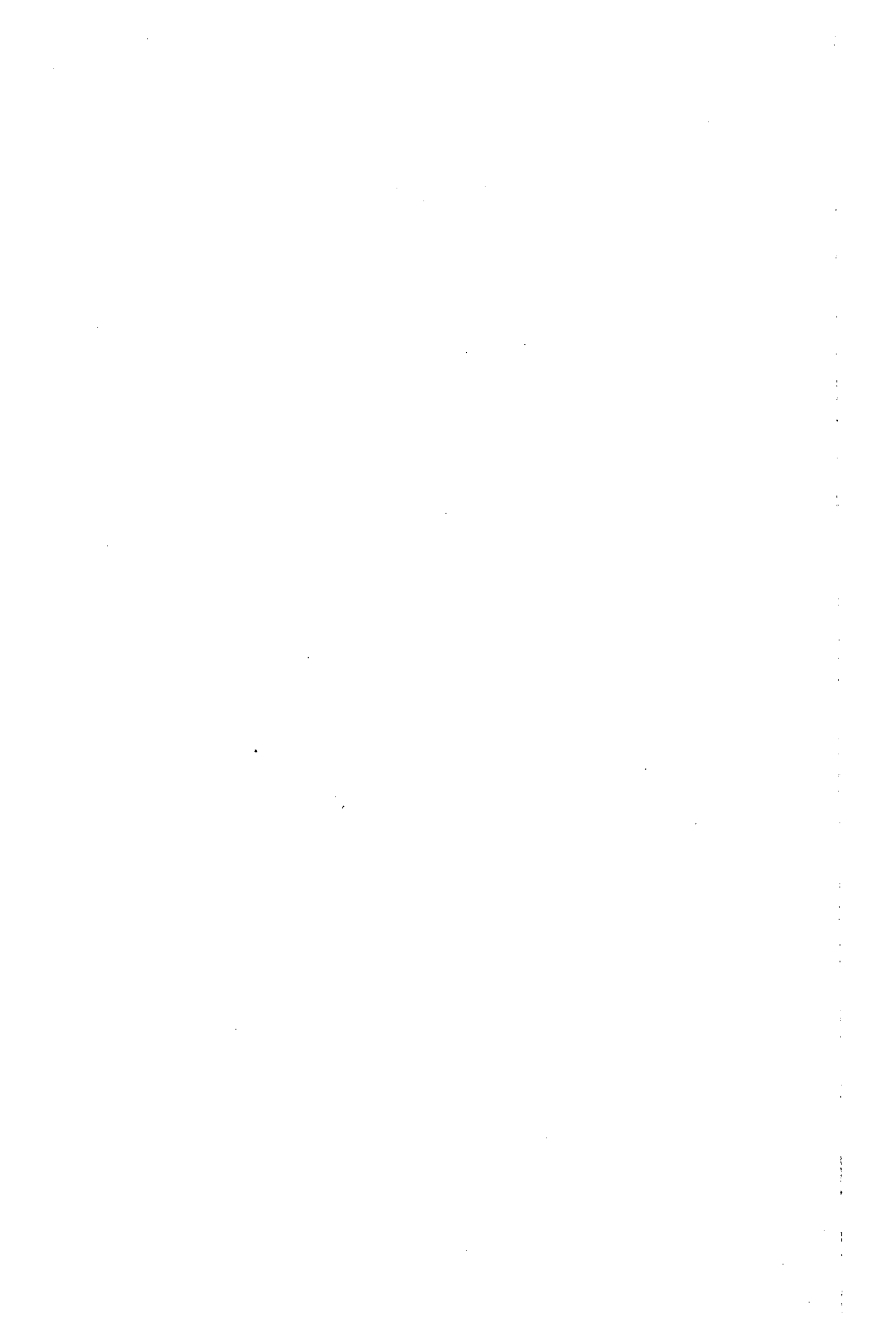
Rehacek J.; Tarasevich I.V. 1988. "Tick-borne rickettsioses". In: *Acari-borne Rickettsiae and Rickettsioses in Eurasia*. Ed. Veda. Bratislava.

Rehacek J.; Tarasevic I.V. 1991. "Ecological questions concerning rickettsiae". *Eur.J.Epidemiol.* 7(3): 229-236.

Rehacek J.; Urvolgyi J.; Kocianova E.; Jedlicka L. 1992. "Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae". *Fol.Parasitol.* 39: 265-284.

Richter P.J.; Kimsey R.B.; Madigan J.E.; Brooks D.L. 1996.

"Compatibility of two species of *Ixodes* ticks with murid hosts and its effect on transmission of Lyme disease spirochaetes". *Med.Vet.entomol.* 10: 291-294.



Rijpkema S.; Golubic D.; Molkenboer M.N.; Verbeek D.K.; Schellenkens J. 1996. "Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia". *Exp.App.Acarol.* 20: 23-30.

Rijpkema S.; Molkenboer M.; Schouls L.; Jongejan F.; Schellekens J. 1995. "Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic space region between 5S i 23S rRNA genes". *J.Clin.Microbiol.* 33: 3091-3095.

Ruiz-Beltrán R.; Herrero-Herrero J.I.; Martín-Sánchez A.M.; Criado-Gutierrez L.A. 1992. "Role of Lagomorpha in the wild cycle of *Rickettsia conorii* in Salamanca (Spain)". *Eur.J.Epidemiol.* 8(1): 136-139.

Russell H.; Sampson J.; Schmid G.P.; Wilkinson H.W.; Plikaytis B. 1984. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Immunofluorescence Assay for Lyme disease". *J.Infect.Dis.* 149(3): 465-470.

Schmidt B.L. 1997. "PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections". *Clin.Microbiol.Rev.* 10(1): 185-201.

Schoeleer G.; Lane R. 1993. "Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the Western Blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae)". *J.Med.Entomol.* 30(1): 80-86.

Segura F.; Diestre G.; Ortuño A.; Sanfeliu I.; Font B.; Muñoz T.; Mateu E.; Casal J. "Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of Mediterranean spotted fever in Catalonia (Spain)". *Trop.Geog.Med.* En premsa.

**Segura F. i Font B. 1985. *Febre Botonosa Mediterrània a Catalunya*. Edit...

Schillhorn Van Veen T.W.; Murphy A.J.; Colmery B. 1993. "False positive antibody titres associated with periodontal disease in dogs". *Vet.Rec.* 132: 512.

Schulze T.L.; Mcdevitt W.M.; Parkin W.E.; Shisler J.K. 1987. "Effectiveness of two insecticides in controlling *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) following an outbreak of Lyme disease in New Jersey". *J.Med.Entomol.* 24: 420-424.

Shin S.J.; Chang Y.F.; Jacobson R.H.; Shaw E.; Lauderdale T.L.; Appel M.J.; Lein D.H. 1993. "Cross-reactivity between *B.burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs". *Vet.Microbiol.* 36: 161-174.

Shotts E.B. 1981. "Leptospirosis". A: *Infectious diseases of wild mammals*. 2ª Ed. Iowa State University

Press, Iowa. Cap. 30: 323-331.

Sonenshine D.E. 1993 . *Biology of ticks*. Vol. 2. Oxford University Press.

Sonnesyn S.W.; Manivel J.C.; Johnson R.C.; Goodman J.L. 1993. "A guinea pig model for Lyme disease". *Inf.Imm.* 61(11): 4777-4784.

Spielman A. Development of Lyme disease spirochetes in vector ticks.No sé on s'ha publicat **

Spielman A. 1988. "Prospects for suppressing transmission of Lyme disease". *Ann.NY.Acad.Sci.* 212-220.

Stanek G.; O'Connell S.; Cimmino M.; Aberer E.; Kristoferitsch W.; Granström M.; Guy E.; Gray J. 1996. "European Union concerted action on rick assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis". *Wien.Klin.Wochenschr.* 108 (23): 741-747.

Stuen S.; Fridriksdóttir V. 1991. "Experimental inoculation of sheep with *Borrelia burgdorferi*". *Vet.Rec.* 129 (90): 315.

Sugiyama Y.; Sugiyama F.; Yagami K. 1993. "Comparative study on cross-reaction of leptospiral antibodies in several serological tests to detect antibodies to *B.burgdorferi* in dogs". *J.Vet.Med.Sci.* 55(1): 149-151.

Talleklint L.; Jaenson T.G.T. 1993. "Maintenance by hares of european *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents". *J.Med.Entomol.* 30(1): 273-276.

Tapia M. 1930. *Trabajos del Hospital del Rey*. Editorial Paracelso, Madrid. (citat a Herreo y Ruiz, La Fiebre exantemática Mediterránea).

Telford III S.R.; Mather T.N.; Moore S.; Wilson M.; Spielman A. 1988. "Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete". *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 39(1): 105-109.

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

Thieking A.; Goyal S.M.; Bey R.; Loken K.; Mech D.; Thiel R.P.; O'Connor T.P. 1992. "Seroprevalence of Lyme disease in gray wolves from Minnesota and Wisconsin". *J.Wild.Dis.* 28(2): 177-182.

Tzianabos T.; Anderson B.E.; McDade J.E. 1989. "Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens using polymerase chain reaction technology". *J.Clin.Microbil.* 27: 2866-2868.

Urbach H. i Schabinski G. 1960. "Recherche immunoélectrophorétique sur des souches de *R. prowazekii*, de *Coxiella burnetii* et du *Proteus OX*". *Zbl. Bakt.I. Abt.Orig.* 170: 433-441.

Uria D.F.; Calatayud M. et al. 1987. "Meningopolineuritis como manifestación de la enfermedad de Lyme". *Md.Clin.(Barc.)* 39: 381-383 (extret de 38).

Uruñuela S.; Díez D. 1977. "Eritema Crónico Migrans". *Acta Dermosiflogr.* 68: 100-110. (extret de 38).

Virga A.; Di Fiore M.; Demma I.; Mansueto S. 1992. "Malattia di Lyme in Sicilia: Indagine sieropidemiologica sur un campione di conogli selvatici". *Ob.Doc.Vet.* 13(1): 41-44.

**Virga A.; Di Fiore M.; Demma I.; Mansueto S. 1992. "Malattia di Lyme in Sicilia". *Ob.Doc.Vet.* 13(1): 41-44.

Vishwanath S.; McDonald G.A.; Watkins N.G. 1990. "A recombinant *Rickettsia conorii* vaccine protects guinea pigs from experimental boutonneuses fever and Rocky Mountain spotted fever". *Inf.Immunity.* 58 (3): 646-653.

Vitale G.; Tringali G.; Di Rosa S.; Mento C.; Indovina A.; Mansueto S. 1984. "Mappaggio geografico e monitoraggio sieropidemiologico della infezione da *R.conorii* nella popolazione canina della Sicilia Occidentale". *Riv.Parasitol.* 1(45): 187-191.

Vitoz N.; Humair P.F.; Siegenthaler M.; Aeschlimann A.; Gern L. 1990. "Mammalian and Avian Reservoirs for *Borrelia burgdorferi* in a Lyme borreliosis focus in Switzerland". *Zoologia.* 783

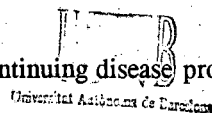
Yano Y.; Takada N.; Fujita H. 1993. "Ultrastructure of spotted fever rickettsia like microorganisms observed in tissues of *Dermacentor taiwanensis* (Acari: Ixodidae)". *J.Med.Entomol.* 30(3): 579-585.

Weil E.; Felix A. 1916. "Zur serologischen Diagnose des Fleckfiebers". *Wien. Klin. Wochenschr.* 29: 33-35.

Wikel S.K. 1996. "Immunologic control of vectors". A: *The Biology of Disease Vectors*. Ed. Beaty and MacQuardt. University Press of Colorado, Colorado (USA).

Wilske B.; Preac-Mursic V.; Schierz G.; Kühbeck R.; Barbour A.G.; Kramer M. 1988. "Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*". *Ann.N.Y.Acad.Scienc.*: 126-143.

Working Group on Rickettsial Diseases. 1992. "WHO: Rickettsioses: a continuing disease problem". *Bull WHO* 60: 157-164.



Biblioteca General
Edifici A
08193 Espinassa (Barcelona) Espanya



• **UAB**
Universitat Autònoma de Barcelona
Servei de Biblioteques
Reg. 1500493583

