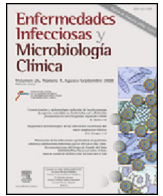




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Seroprevalencia de enfermedad de Lyme en el suroccidente de Asturias



Lucía Barreiro-Hurlé^{a,*}, Santiago Melón-García^b, Carolina Seco-Bernal^c, Carmen Muñoz-Turrillas^c y Mercedes Rodríguez-Pérez^b

^a Servicio de Microbiología, Hospital Carmen y Severo Ochoa, Cangas del Narcea, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España

^c Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, Oviedo, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de marzo de 2019

Aceptado el 28 de junio de 2019

On-line el 2 de septiembre de 2019

Palabras clave:

Seroprevalencia

Borrelia burgdorferi

Enfermedad de Lyme

R E S U M E N

Introducción: Para la correcta interpretación de los marcadores serológicos de la enfermedad de Lyme es muy importante conocer la tasa de infección en el entorno. El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de anticuerpos específicos frente a *Borrelia burgdorferi* en una comarca rural del norte de España.

Metodos: Se investigó la presencia de anticuerpos IgG frente a *B. burgdorferi* mediante un método inmunoenzimático cualitativo en el suero de 1.432 personas divididas en 3 grupos: 316 donantes de sangre, 432 individuos que acudieron al hospital sin causa infecciosa y 684 a los que se solicitó una serología de Lyme como parte del diagnóstico diferencial. En estos últimos se registró la presencia o ausencia de factor de riesgo ocupacional.

Resultados: Se detectaron anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en 189 (13,2%) individuos: 16 (5,1%) donantes de sangre, 62 (14,4%) personas que acudían al hospital sin causa infecciosa y 111 (16,2%) personas con diagnóstico diferencial de enfermedad de Lyme ($p < 0,0001$). En las personas con factor de riesgo ocupacional, la prevalencia fue del 23,5%, cifra que llegó al 45,8% en hombres mayores de 65 años.

Conclusiones: La prevalencia en este estudio es alta y superior a zonas con características similares de nuestro país, pero está en la media de lo publicado en otras regiones europeas. La prevalencia en donantes de sangre es menor que en los otros grupos estudiados. La edad avanzada, el sexo masculino y las prácticas de riesgo ocupacional se relacionan con una mayor prevalencia de enfermedad de Lyme.

© 2019 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Seroprevalence of Lyme disease in southwest Asturias

A B S T R A C T

Keywords:

Seroprevalence

Borrelia burgdorferi

Lyme disease

Introduction: To correctly interpret the serological markers of Lyme disease, it is very important to determine the region's infection rate. The aim of this study was to ascertain the prevalence of specific antibodies against *Borrelia burgdorferi* in a rural district in northern Spain.

Methods: The presence of IgG antibodies against *B. burgdorferi* was determined by qualitative enzyme immunoassay in the serum of 1,432 people divided into 3 groups: 316 blood donors, 432 individuals who attended the hospital without infection and 684 for whom Lyme serology testing was specifically requested as part of a differential diagnosis. In the latter group, the presence or absence of an occupational risk factor was recorded.

Results: Antibodies against *B. burgdorferi* were detected in 189 individuals (13.2%): 16 (5.1%) in the blood donors group, 62 (14.4%) in subjects who attended hospital without infection and 111 (16.2%) in subjects in whom a differential diagnosis of Lyme disease was requested ($p < 0.0001$). In subjects with an occupational risk factor, the prevalence was 23.5%, peaking at 45.8% in men over 65 years.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: tandeslucia@hotmail.com (L. Barreiro-Hurlé).

Conclusion: Our study showed a high prevalence of antibodies against *B. burgdorferi* and higher than that seen in other areas with similar characteristics in Spain. However, our results are similar to those published from other European regions. The prevalence in the blood donors group was lower than that observed in the other groups. Older age, the male gender and occupational risks were associated with a higher prevalence of Lyme disease.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Lyme está causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi sensu lato*, que se transmite al ser humano por la picadura de garrapatas, principalmente del género *Ixodes*. La manifestación clínica más característica de la enfermedad de Lyme es el eritema migratorio, una lesión cutánea que se produce normalmente en el lugar de la inoculación y que se resuelve espontáneamente. Sin tratamiento antibiótico la bacteria puede alcanzar otros tejidos y órganos como corazón, articulaciones, sistema nervioso y piel, y provocar manifestaciones clínicas graves¹. La diseminación de la bacteria a estos lugares se produce principalmente por vía hematológica. Algunos estudios han demostrado la presencia de espiroquetas en sangre en pacientes con eritema migratorio².

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme se realiza en la mayoría de los laboratorios mediante la detección de anticuerpos específicos. La elevada seroprevalencia en algunas regiones geográficas complica la interpretación de los resultados microbiológicos, ya que los individuos pueden presentar anticuerpos IgG que no discriminan entre infección activa o infección resuelta. Por otra parte, la detección de IgM solo es de utilidad en los primeros meses tras la infección y puede ser causa de confusión por los numerosos falsos positivos y las reacciones cruzadas.

Por lo tanto, para el correcto diagnóstico de enfermedad de Lyme es de gran interés conocer la tasa de infección por este microorganismo en cada comunidad.

El objetivo de este trabajo fue conocer la prevalencia de anticuerpos específicos frente a *B. burgdorferi* en una comarca rural del norte de España en 3 poblaciones con distintas exposiciones al vector transmisor de la bacteria.

Metodos

Durante el año 2014 se realizó un estudio de detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en el área sanitaria II del Principado de Asturias, una zona rural situada en el suroccidente, con una población de 25.851 personas mayores de 16 años³ distribuidas en 5 concejos.

Se incluyó en el estudio a 1.432 individuos, con un rango de edad entre 16 y 93 años (edad media $52,8 \pm 6,5$ años), de los que 656 eran mujeres (edad media $52 \pm 16,7$ años) y 776 hombres (edad media $54 \pm 16,3$ años).

La población estudiada se clasificó en 3 grupos:

Grupo 1 (donantes de sangre): 316 personas que acudieron a donar sangre a alguna de las unidades móviles de donación situadas en la zona, que aceptaron voluntariamente participar en el estudio.

Grupo 2: 432 pacientes que acudieron a alguno de los centros de salud del área sanitaria con un proceso no relacionado con causa infecciosa y que tenían solicitada una muestra de suero para estudios de bioquímica.

Grupo 3: 684 pacientes que acudieron al Hospital Carmen y Severo Ochoa o a alguno de los centros de salud del área sanitaria y a los que se les solicitó serología de Lyme como parte del

diagnóstico diferencial de su enfermedad. En este grupo 3 se registró la presencia o ausencia de factor de riesgo ocupacional y se clasificó a los individuos en 2 grupos: 3a aquellos sin factor de riesgo y 3b los que presentaban dicho factor de riesgo.

Las características epidemiológicas de las personas incluidas en el estudio se muestran en la [tabla 1](#).

Los individuos estudiados se estratificaron en 3 intervalos de edad: 16–45, 45–65 y mayores de 65 años, para el mejor análisis de los datos.

Las muestras de sangre fueron extraídas mediante punción venosa y procesadas según los protocolos habituales. El suero fue separado por centrifugación y almacenado a 4 °C hasta su procesamiento. La determinación de anticuerpos IgG frente a *B. burgdorferi* se realizó mediante el uso de un ensayo cualitativo automatizado (Vidas, bioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante para el desarrollo de la técnica y la interpretación de los resultados.

Las muestras con resultado positivo o dudoso se confirmaron mediante inmunoblot (Borrelia IgG IgM EcoLine, Sekisui Diagnostics).

El análisis estadístico de los datos obtenidos se elaboró utilizando el programa para ordenador GraphPadInStat (versión V2.04a). Se utilizó la *t* de Student para las variables continuas y la χ^2 o el test exacto de Fischer para las variables discretas. Se consideró un resultado significativo cuando la $p < 0,05$.

Resultados

Se detectaron anticuerpos IgG frente a *B. burgdorferi* en 189 (13,2%) de los individuos, 16 (5,1%) donantes, 62 (14,4%) del grupo 2 y 111 (16,2%) del grupo 3 ($p < 0,0001$). Los resultados más relevantes del estudio se muestran en la [tabla 2](#).

En el grupo de los donantes, se detectaron anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en 4 mujeres (3,1%) y en 12 hombres (6,5%) ($p = 0,17$); por el contrario, en el grupo 2 la prevalencia fue del 9,5% en mujeres y 19,5% en hombres ($p = 0,044$) y en el grupo 3 de 10,9% en mujeres y 20,5% en hombres ($p = 0,0007$).

Además, en el grupo de los donantes, la edad media de las mujeres con anticuerpos fue de $59,5 \pm 9,3$ años y en hombres de $52 \pm 9,1$ años ($p < 0,0001$). En el grupo 2 la edad de las mujeres con anticuerpos fue de $65,4 \pm 16,2$ y en los hombres de $66,3 \pm 16,2$ años ($p = 0,83$) y en el grupo 3 de $63,8 \pm 14,1$ en mujeres y $66,5 \pm 12,8$ en hombres ($p = 0,009$).

En el grupo 3a, la prevalencia en mujeres fue del 9% y en hombres del 13,6% ($p = 0,15$) y la edad media de los positivos era de 60,6 años en las primeras y de 65 en los segundos ($p = 0,0005$). En el grupo 3b, la prevalencia en mujeres fue del 13,5% y en hombres del 32,6% ($p = 0,00048$). La edad media de los positivos era de 66,9 y 67,5 años, respectivamente ($p = 0,71$).

Cabe destacar la prevalencia del 9,1% en hombres jóvenes (16–45 años) en el grupo 3b.

La [tabla 3](#) muestra los datos de los individuos del grupo 3 según el riesgo de contacto con el vector por su labor ocupacional (3b) o la falta de riesgo (3a).

Tabla 1

Características de la población estudiada

Grupo	n	EM ± DE [Rango]	Mujeres	EM ± DE [Rango]	Hombres	EM ± DE [Rango]
Grupo 1	316	46 ± 8,5 [18-70]	131	45 ± 11,8 [22-69]	185	46 ± 10,3 [18-70]
Grupo 2	432	54 ± 14,1 [16-90]	222	52 ± 18,6 [16-90]	210	55 ± 16,6 [16-88]
Grupo 3	684	55 ± 16,9 [16-93]	303	56 ± 16,3 [16-93]	381	56 ± 17,2 [16-93]
3a (no FRO)	420	52 ± 17 [16-91]	177	50 ± 17 [16-91]	243	54 ± 16,8 [16-90]
3b (FRO)	264	59 ± 15,8 [22-93]	126	58 ± 14 [31-91]	138	60 ± 17,3 [22-93]

DE: desviación estándar; EM: edad media; FRO: factor de riesgo ocupacional.

Tabla 2Tasa de individuos con anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* según edad y sexo en cada grupo de estudio

Grupo	Sexo	n	Positivos (%)	EM ± DEPositivos	Rango de edad (años)			p
					16-45 P/N (%)	45-65 P/N (%)	> 65 P/N (%)	
Grupo 1		316	16 (5,1)	53,8 ± 9,4	2/147 (1,3)	12/147 (7,5)	2/6 (-) ^a	0,0090
	Mujeres	131	4 (3,1)	59,5 ± 9,3	0/64 (0)	3/60 (4,8)	1/3 (-) ^a	
Grupo 2	Hombres	185	12 (6,5)	52,0 ± 9,1	2/83 (2,3)	9/87 (9,4)	1/3 (-) ^a	< 0,0001
		432	62 (14,4)	65,9 ± 16,3	2/131 (1,5)	23/153 (13,1)	37/86 (30,1)	
Grupo 3	Mujeres	222	21 (9,5)	65,4 ± 16,2	2/80 (2,4)	7/73 (8,8)	12/48 (20,0)	< 0,0001
	Hombres	210	41 (19,5)	66,3 ± 16,2	0/51 (0,0)	16/80 (16,7)	25/38 (39,7)	
Grupo 3		684	111 (16,2)	65,7 ± 13,2	5/184 (2,6)	50/250 (16,7)	56/139 (28,7)	< 0,0001
	Mujeres	303	33 (10,9)	63,8 ± 14,1	2/84 (2,3)	17/128 (11,7)	14/58 (19,4)	
	Hombres	381	78 (20,5)	66,5 ± 12,8	3/100 (2,9)	33/122 (21,3)	42/81 (34,1)	

DE: desviación estándar; EM: edad media; P/N: positivos/negativos.

^a No realizado.**Tabla 3**

Resultados de la población del grupo 3 en función del factor de riesgo ocupacional (3b) o sin riesgo (3a)

Grupo	Sexo	n	Positivos (prevalencia en %)	EM ± DEPositivos	Rango de edad (años)			p
					16-45 P/N (%)	45-65 P/N (%)	> 65 P/N (%)	
Grupo 3a		420	49 (11,7)	63,5 ± 12,1	2/133 (1,5)	27/161 (14,4)	20/77 (20,6)	< 0,0001
	Mujeres	177	16 (9,0)	60,6 ± 15,5	2/63 (3,1)	9/70 (11,4)	5/28 (15,1)	
Grupo 3b	Hombres	243	33 (13,6)	65,0 ± 10,1	0/70 (0)	18/91 (16,5)	15/49 (23,4)	< 0,0001
		264	62 (23,5)	67,4 ± 13,9	3/51 (5,5)	23/89 (20,5)	36/62 (36,7)	
Grupo 3b	Mujeres	126	17 (13,5)	66,9 ± 12,3	0/21 (0)	8/58 (12,1)	9/30 (23)	< 0,0001
	Hombres	138	45 (32,6)	67,5 ± 14,5	3/30 (9,1)	15/31 (32,6)	27/32 (45,8)	

DE: desviación estándar; EM: edad media; P/N: positivos/negativos.

Discusión

La parte suroccidental de Asturias es una zona boscosa y húmeda con una superficie forestal del 85% en la que abundan las garrapatas⁴. La mayoría de ellas son del género *Ixodes* y se ha demostrado que muchas son portadoras de la bacteria *B. burgdorferi*⁵. La comunidad autónoma del Principado de Asturias se considera zona endémica de borreliosis de Lyme⁶. En un estudio previo en esta zona de Asturias⁷ se describen tasas de incidencia de enfermedad de Lyme de 130 casos por 100.000 habitantes. Además, el área II es el área sanitaria asturiana con un mayor número de casos hospitalizados por borreliosis⁸. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la dimensión real de la infección. En el presente trabajo, se ha analizado un número importante de pacientes y se ha hecho un esfuerzo en definir distintos grupos que permitan una mejor evaluación de la situación de la infección por *B. burgdorferi*.

La seroprevalencia del 13,2% encontrada es similar a la que informan en Soria (13,1%)⁹ y supera a la encontrada en otras zonas del país como el 4,4% en Navarra¹⁰ o el 3,45% en Madrid¹¹.

Estos niveles bajos de infección son similares a los que se encuentran en el grupo de donantes de sangre (5,1%). En España no se han publicado estudios de seroprevalencia de infección por *B. burgdorferi* en donantes; estudios en otros países informan porcentajes similares: 4,2% en Escocia¹² y 4,3% en Rumanía¹³. Estos datos pueden variar dentro de un mismo país. Así, en el norte de Noruega se registra un 0,48% y en el sur el 9,25%¹⁴. En Bélgica no

encuentran diferencias entre donantes de zona rural y urbana, con prevalencias del 2,6 y del 2,9%¹⁵. A pesar de estos porcentajes y de que en las primeras etapas de la enfermedad de Lyme se produce una diseminación hematogénica de la bacteria, no se ha informado hasta la fecha ningún caso de transmisión de enfermedad de Lyme mediante transfusiones de sangre¹⁶. La baja seroprevalencia de *B. burgdorferi* encontrada en donantes en este estudio puede ser debida a la edad de estos, ya que solo 8 donantes eran mayores de 65 años (el grupo de edad con mayor prevalencia).

En el grupo de donantes no hay diferencias significativas por sexo, aunque sí se observa que las mujeres se infectan a edades más tardías.

En los otros grupos analizados (los que acudían al hospital sin causa infecciosa y el grupo de los que tenían clínica compatible con enfermedad de Lyme), la detección de anticuerpos frente a la bacteria supera el 14%. La elevada seroprevalencia de Lyme hace que la interpretación de los resultados de serología sea difícil, ya que nos encontramos con pacientes que presentan anticuerpos específicos frente a *B. burgdorferi* con clínica inespecífica en los que no podemos precisar si se trata de una infección resuelta o de una infección activa.

Anteriormente se comentaba que esta prevalencia era superior a zonas con características similares de nuestro país, pero está en la media de lo publicado en otras regiones europeas. Así, en Alemania informan prevalencias del 9,40%, en Bélgica del orden del 21-23% y en Eslovaquia del 25,3%, si bien hay que tener en cuenta que este

último estudio fue realizado en personas de riesgo por su trabajo o actividad¹⁷⁻¹⁹.

Es lógico pensar que aquellas poblaciones con un contacto con zona forestal y con ocupaciones en ese ámbito presenten una mayor tasa de infección. Este es el caso de este estudio, ya que dentro del grupo 3 se pudo constatar que aquellas personas con mayor riesgo de sufrir picaduras por garrapatas por su ocupación laboral y, por tanto, con mayor riesgo de exposición al vector, llegaban a tasas de detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* de hasta el 45% en los individuos de mayor edad. Es más, en este grupo 3b, los más jóvenes ya alcanzaban tasas de anticuerpos del 9%. En España existen trabajos similares en los que se constata una mayor seroprevalencia en personas de riesgo por su profesión o zona geográfica de residencia con prevalencias que alcanzan hasta el 38% en ganaderos y guardas forestales en La Rioja²⁰.

El aumento de la tasa de infección está estrechamente relacionado con la mayor exposición al vector. En este punto, además del riesgo ocupacional, la edad puede ser otra variable que aumente esa exposición.

En este trabajo se observa un incremento significativo en la prevalencia de anticuerpos con la edad del paciente y se alcanzan porcentajes cercanos al 30% en personas mayores de 65 años. Esto contrasta con otros trabajos^{10,11,21} en los que no se encuentran diferencias significativas; sin embargo, los estudios europeos mencionados de Alemania y Bélgica también constatan un aumento de prevalencia con la edad, que por encima de los 65 años alcanza niveles del 30%.

Como en otros estudios, se observa una mayor seroprevalencia en varones, sobre todo en los mayores de 45 años¹⁷. Este dato parece relacionado con una mayor participación de los varones en actividades al aire libre.

Una gran parte de las solicitudes realizadas a los laboratorios de microbiología no cumplen definiciones de caso de enfermedad de Lyme. Así en un estudio en Holanda, solo el 9% de los pacientes estudiados tenían criterios clínicos²². El diagnóstico debe realizarse en presencia de un ambiente epidemiológico adecuado y con posibilidad de picadura de garrapata²³. Llama la atención que la prevalencia entre personas en las que el motivo de consulta no estaba relacionado con enfermedad infecciosa (grupo 2) sea similar a la prevalencia en aquellos con clínica compatible con enfermedad de Lyme (grupo 3). Esto puede explicarse por el amplio espectro de manifestaciones clínicas producidas por *B. burgdorferi*. Parece evidente que el factor que más peso tiene a la hora de decidir solicitar un estudio de enfermedad de Lyme es la presencia de factor de riesgo, sobre todo en individuos menores de 65 años.

En resumen, las prácticas de riesgo ocupacional en zonas forestales se relacionan con una mayor prevalencia de enfermedad de Lyme. Hasta la fecha los hombres eran los más afectados por dicha enfermedad por empezar primero con la actividad agrícola y en zonas más boscosas y más alejadas de las zonas urbanas. El cambio de actividad laboral, con una menor actividad agrícola, podría conducir a una disminución de esta prevalencia; sin embargo, el auge de las actividades recreativas al aire libre, en las que participan hombres y mujeres y en edades cada vez más jóvenes, puede contrarrestar ese descenso. Estudios en los próximos años indicarán si este cambio de actividad reduce o no la prevalencia.

Financiación

El estudio no cuenta con fuente de financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

A Sofie Bosma por su colaboración en la traducción del texto en inglés.

Bibliografía

1. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012;379:461–73.
2. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:484–509.
3. Sistema de Información Demográfica [Internet] [consultado 30 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.ine.es/SID/InicioAccesibilidad.do>.
4. Planificación, ordenación y gestión forestal. Gobierno del Principado de Asturias [Internet] [consultado 30 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.asturias.es/portal/site/webasturias/menuitem.4b280f8214549ead3e2d6f77f2300030/?vgnextoid=b4d6faf6a0b59210VgnVCM10000097030a0aRCRD&vgnextchannel=11df7e1385dfe210VgnVCM10000097030a0aRCRD&i18n.http.lang=es>.
5. Espí A, del Cerro A. Enfermedad de Lyme en Asturias: ¿qué podemos aportar desde el SERIDA? Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario [Internet] [consultado 8 Jun 2018]. Disponible en: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=6702>.
6. Oteo JA, Guerrero A. A proposal to define the endemic zone of Lyme borreliosis. *Med Clin (Barc)*. 1998;110:438.
7. Barreiro L, Villa L, Carreño M, Avello M, Arbas N, Rodríguez M. Incidencia y manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Lyme en el Suroccidente asturiano. En: XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2013 [resumen en español].
8. Alonso P, Rodríguez L. Borreliosis de Lyme. Características clínico epidemiológicas de la infección en el Principado de Asturias. Servicio de Vigilancia y Alertas Epidemiológicas 2014 [Internet] [consultado 8 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.astursalud.es/documentos/31867/36150/Enfermedad+de+Lyme.pdf/2106a356-6b71-690e-7346-f08a6ca53a64?version=1.0> [disponible en español].
9. Saz JV, Nuncio S, Merino JF, Aquiste M, Medina J, Filipe A. Enfermedad de Lyme en la provincia de Soria: estudio clínico epidemiológico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1994;12:52–9.
10. Oteiza J, Tiberio G, Martínez V, Belzunegui T. Seroprevalencia de la enfermedad de Lyme en Navarra. *Med Clin (Barc)*. 2011;136:336–9.
11. Lledó L, Gegúndez MI, Saz JV, Beltrán M. Screening of the prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Madrid province, Spain. *Eur J Epidemiol*. 2004;19:471–2.
12. Munro H, Mavin S, Duffy K, Evans R, Jarvis LM. Seroprevalence of Lyme borreliosis in Scottish blood donors. *Transf Med (Oxford, England)*. 2015;25:284–6. <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12197>.
13. Hristea A, Hristescu S, Ciufecu C, Vasile A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Romania. *Eur J Epidemiol*. 2001;17:891–6.
14. Hvidsten D, Mortensen L, Straume B, Arsenovic MG, Pedersen AB, Lyngås G, et al. Blood donor *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalence and history of tick bites at a northern limit of the vector distribution. *APMIS*. 2017;125:717–24.
15. De Keukeleire M, Vanwambeke SO, Cochez C, Heyman P, Fretin D, Deney V, et al. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* *Anaplasma phagocytophilum*, and *Francisella tularensis* infections in Belgium: Results of three population-based samples. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017;17:108–15.
16. Ginzburg Y, Kessler D, Kang S, Shaz B, Wormser GP. Why has *Borrelia burgdorferi* not been transmitted by blood transfusion? *Transfusion*. 2013;53:2822–6. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.12116>.
17. Wilking H, Fingerle V, Klier C, Thamm M, Stark K. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato among adults Germany, 2008–2011. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:107–10. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140009>.
18. De Keukeleire M, Robert A, Luyasu V, Kabamba B, Vanwambeke SO. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Belgian forestry workers and associated risk factors. *Parasit Vectors*. 2018;11:1–10. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2860-2>.
19. Zákutná L, Dorko E, Rimárová K, Kizeková M. Pilot cross-sectional study of three zoonoses (Lyme disease, tularemia, leptospirosis) among healthy blood donors in eastern Slovakia. *Centr Eur J Pub Health*. 2015;23:100–6. <http://dx.doi.org/10.21101/cejph.a4052>.
20. Oteo JA, Martínez de Arto V, Fernández-Calvo JL, Casas JM, Rivero A, Grandival R. Prevalencia de anticuerpos frente a la *Borrelia burgdorferi* en población de riesgo. *Rev Clin Esp*. 1990;187:215–7.
21. Oteo JA, Martínez de Arto V, Casas J, Lozano A, Fernández-Calvo JL, Grandival R. Epidemiology and prevalence of seropositivity against *Borrelia burgdorferi* antigen in La Rioja, Spain. *Epidem Santé*. 1992;40:1–8.
22. Coumou J, Hovius JWR, van Dam AP. *Borrelia burgdorferi* sensu lato serology in the Netherlands: Guidelines versus daily practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:1803–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2129-4>.
23. Portillo A, Santibáñez S, Oteo JA. Enfermedad de Lyme. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32 Supl.1:37–42.