

Uso de la reacción en cadena de la polimerasa para *Borrelia burgdorferi* en lesiones de esclerodermia localizada (Morfea), en pacientes venezolanos.

Fabiola Espinoza-León¹, Francisco Arocha¹, Manzur Hassanhi² y Julio Arévalo³.

¹Cátedra de Bacteriología y Virología, ²Cátedra de Inmunología y

³Departamento de Clínica Quirúrgica. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: borreliosis de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, esclerodermia localizada, Venezuela.

Resumen. *Borrelia burgdorferi* es el agente causal de Borreliosis de Lyme, una enfermedad infecciosa multisistémica transmitida al humano por la picadura de garrapatas del género *Ixodes*. En los últimos años se ha postulado una posible asociación entre ésta espiroqueta y esclerodermia localizada (morfea). Sin embargo, los datos publicados no han proporcionado pruebas inequívocas de tal asociación. En Suramérica, incluida Venezuela (estado Zulia) se han detectado pruebas serológicas positivas en pacientes con morfea. El objetivo de este estudio fue buscar evidencia definitiva de la infección por *Borrelia burgdorferi* en pacientes con morfea, mediante la detección del ADN bacteriano en muestras de piel. En los 21 pacientes la PCR resultó negativa. La ausencia de amplificación de la secuencia blanco seleccionada en las muestras estudiadas no apoyan una asociación entre la infección por *Borrelia burgdorferi* y las lesiones escleróticas de morfea, pero tampoco descartan la posibilidad de una relación entre morfea y una genoespecie desconocida del complejo *Borrelia burgdorferi sensu lato*, entre morfea y una especie diferente de *Borrelia* o entre morfea y otra espiroqueta, como agente etiológico de la lesión en la localidad.

Using the polymerase chain reaction to *Borrelia burgdorferi* infection in localized scleroderma injure (morphea), in Venezuelan patients.

Invest Clin 2010; 51(3): 381 - 390

Key words: Lyme Borreliosis, *Borrelia burgdorferi*, localized scleroderma, Venezuela.

Abstract. *Borrelia burgdorferi* is the causative agent of Lyme Borreliosis, an infectious multisystemic disease transmitted to humans by the *Ixodes* ticks bite. A possible association of *Borrelia burgdorferi* with localized scleroderma has been postulated. However, published data do not provide unequivocal results. Previous serologic analysis of patients with localized scleroderma in South American countries (including Venezuela), have been reported as yielding some reactivity. The present study looked for evidence of *Borrelia burgdorferi* infection in Venezuelan patients with localized scleroderma, using the polymerase chain reaction to analyze 21 skin samples of patients with this skin condition. The results were negative in all the samples studied. Our data do not support an association of *Borrelia burgdorferi* infection and the sclerotic lesions of localized scleroderma; but do not rule out the possibility of a relationship between localized scleroderma and an unknown geno-specie of *Borrelia burgdorferi sensu lato complex*, a different *Borrelia* specie or a different spirochetal organism, as the etiological agents of the skin lesions in this area.

Recibido: 01-05-2008. Aceptado: 08-04-2010.

INTRODUCCIÓN

Borrelia burgdorferi es el agente causal de la Borreliosis de Lyme, una enfermedad infecciosa multisistémica transmitida al humano por la picadura de garrapatas del género *Ixodes*. Los primeros reportes de la enfermedad fueron publicados en Europa, a finales del siglo XIX, pero no fue sino hasta 1975 cuando todas estas tempranas descripciones cobraron importancia, con la epidemia de artritis ocurrida en Lyme, Connecticut, USA, de donde toma el nombre de enfermedad de Lyme, posteriormente cambiado a Borreliosis de Lyme, a partir del aislamiento de la bacteria *Borrelia burgdorferi* por William Burgdorfer, en 1982 (1, 2).

A pesar de que ésta patología ocurre en todo el mundo, la incidencia real y la distribución es todavía incierta, ya que la mayoría de los reportes provienen de países desarrollados (2,3). Sólo en ellos se ha aislado el agente etiológico a partir de muestras humanas, de los reservorios y de las garrapatas. En Norteamérica y en Europa, la infección transmitida por la picadura de artrópodos es la más frecuente. China, Japón, Australia, África y Sudamérica también la reportan (3); sin embargo, la presencia de anticuerpos para esta espiroqueta sólo ha sido demostrada mediante cultivo en el hemisferio norte.

Desde su aislamiento inicial en 1982, se han identificado cientos de cepas de *B.*

burgdorferi. Los análisis moleculares de dichas cepas indican la existencia de diferencias genéticas y fenotípicas entre las mismas. Por esta razón se definió un grupo o complejo que comprende las distintas especies o grupos genómicos de *Borrelia* asociados con la Borreliosis de Lyme, el cual ha sido denominado complejo *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Dentro de ese complejo existen 10 especies, de las cuales hasta la fecha, solo tres se consideran patógenas para los humanos: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* y *B. afzelii* (3).

Las distintas especies de *Borrelia* están distribuidas en diferentes áreas geográficas; *B. sensu stricto* se distribuye en Norteamérica y Europa Occidental, *B. afzelii* se encuentra en Europa Occidental, Central y en Rusia y *B. garinii* se localiza en Europa, Rusia y Norte de Asia (4).

Diversos estudios demuestran que las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar de acuerdo a la geno especie infectante de *B. burgdorferi sensu lato*: en pacientes con artritis, las cepas más comúnmente aisladas pertenecen a *B. burgdorferi sensu stricto*; mientras que *B. garinii* está más involucrada en casos donde predominan las manifestaciones neurológicas y las cepas de *B. afzelii* son más prevalentes en las formas cutáneas de la enfermedad, como son la acrodermatitis crónica atrófica (ACA) (5).

Por otra parte, las manifestaciones clínicas varían entre los pacientes de Norteamérica y los de Europa y Asia. Por ejemplo, la encefalomiелitis severa y la ACA son más comunes en Europa, en contraste con la artritis que es más frecuente en Norteamérica. Este hecho es explicado, en parte, por las diferentes geno especies de *Borrelia* responsables de la enfermedad en las distintas regiones geográficas que pueden tener variados tropismos tisulares, posiblemente por diferencias genéticas entre las poblaciones afectadas (3, 4).

Las garrapatas del género *Ixodes* son los vectores o transmisores de la enfermedad; se han descrito diferentes especies transmisoras: *Ixodes ricinus* en Europa; *Ixodes persulcatus* en Asia y en el este de Europa; *Ixodes pacificus* e *Ixodes scapularis* (antes llamado *Ixodes dammini*) en Norteamérica (1). En Venezuela se han encontrado garrapatas del género *Ixodes*: *Ixodes iatraellei*, *Ixodes ioricatus* e *Ixodes venezuelensis*, que pudieran representar vectores potenciales de la enfermedad en la región (6).

La Borreliosis de Lyme es una enfermedad infecciosa compleja, que ataca piel, articulaciones, corazón y sistema nervioso. Las manifestaciones clínicas son variadas y solapadas, debido a la múltiple afectación de órganos en las diferentes etapas, simulando enfermedades infecciosas y no infecciosas (2).

La esclerodermia localizada o morfea, es un desorden caracterizado por engrosamiento e induración de la piel y del tejido celular subcutáneo debido a un depósito excesivo de colágeno (7). Morfea tiene una incidencia de 27 nuevos casos anuales por millón de habitantes. La incidencia real puede ser mayor, ya que muchos pacientes no buscan atención médica debido a la naturaleza benigna de la condición (8). La etiología de la esclerodermia localizada se ha asociado a la infección por *B. burgdorferi*, sin embargo la información publicada hasta la fecha no provee resultados definitivos (9).

En Sudamérica se han detectado anticuerpos frente a *B. burgdorferi* en pacientes con morfea, en Venezuela (estado Zulia) (6) y en Colombia (10). En cuanto a la epidemiología de los casos positivos en el estado Zulia la mayoría de los casos provenían de zonas rurales boscosas y montañosas como la Sierra de Perijá y el contacto con animales de granja usualmente fue positivo.

En la actualidad se disponen de diferentes métodos de laboratorio, los cuales en combinación con los antecedentes epi-

demiológicos y los hallazgos clínicos, permiten confirmar el diagnóstico de la infección por *B. burgdorferi* (2, 11). Dos de estos métodos se considera que proporcionan evidencia definitiva de la infección espiroquetal: el cultivo y la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo el primero de ellos el "gold standard" del diagnóstico, pero pocos laboratorios cuentan con el medio de cultivo específico (Barbour-Stoenner-Kelley (BSK-I))

El método más sensible disponible para hacer diagnóstico de laboratorio son las pruebas serológicas, las cuales, representan el medio más práctico para confirmar la enfermedad, debido a su menor costo y fácil realización. Presentan una moderada especificidad (72-89%), debido a su falta de estandarización responsable de variaciones interlaboratorios y a la existencia de reacciones cruzadas con otros microorganismos (*Treponema pallidum*, *Borrelia recurrentis*, *Helicobacter pylori*, *Ehrlichia*, *Babesia*), enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico) y síndromes virales (virus Epstein-Barr) (12).

La amplificación de secuencias específicas del ADN de la espiroqueta usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR), a partir de muestras de biopsias de piel, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido sinovial, proporciona evidencia definitiva de la infección en fluidos corporales y es particularmente útil en individuos que se encuentran en las etapas temprana diseminada y tardía (13, 14). Esta prueba se utiliza como marcador definitivo de enfermedad en los países donde previamente se haya cultivado previamente la bacteria de muestras como sangre, LCR o líquido articular.

En vista de la localización en el estado Zulia de regiones rurales con características ecológicas propias para el desarrollo de las garrapatas y de animales que pueden ser reservorios potenciales; la evidencia previa de anticuerpos específicos en la población

regional y la existencia de pacientes con manifestaciones clínicas de tipo dermatológico asociadas con la enfermedad, quienes reciben tratamiento sin tener un diagnóstico etiológico preciso, se hace necesario el diagnóstico de la infección por *Borrelia burgdorferi* en dichos pacientes mediante la utilización de una técnica que proporcione evidencia definitiva de la infección como lo es la reacción en cadena de la polimerasa.

El objetivo de este estudio fue buscar evidencia definitiva de la infección por *Borrelia burgdorferi* en pacientes con morfea, mediante la detección del ADN bacteriano en muestras de piel de pacientes con el diagnóstico clínico e histológico de morfea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó una investigación descriptiva, prospectiva, transversal que pretendió establecer si las manifestaciones dermatológicas (morfea) de los pacientes correspondían o no a la infección por *B. burgdorferi*, a través de la realización de la prueba de biología molecular reacción en cadena de la polimerasa, en muestras de piel que fueron recolectadas en un solo momento durante la visita del paciente al laboratorio de investigación.

Población de estudio

Se estudiaron 21 sujetos de diferentes edades y sexo quienes acudieron entre marzo del 2004 y agosto del 2005, al Laboratorio HLA y Biología Molecular del Banco de Sangre de Maracaibo, Venezuela, quienes fueron seleccionados mediante la técnica de muestreo intencionado a partir de las consultas de infectología y dermatología de los hospitales públicos y privados del estado Zulia. Los criterios de inclusión fueron: presencia de esclerodermia localizada (morfea) y una prueba de anticuerpos mediante la técnica de ELISA positiva para *B. burgdorferi*. Se excluyeron todas aquellas personas

que presentaban manifestaciones clínicas diferentes a la ante mencionada.

Los pacientes se diagnosticaron como esclerodermia localizada (morfea) mediante criterios clínicos: lesiones localizadas inflamatorias con borde violáceo, con bordes bien delimitados, alopecia y anhidrosis, hiperpigmentadas o hipopigmentadas, con fibrosis y atróficas e histopatológicos: atrofia epidérmica y un engrosamiento e induración de la dermis, dado por excesivo depósito de colágeno (15).

Se realizó una entrevista personal a todos los sujetos de la población de estudio con la finalidad de llenar una historia clínica, para investigar antecedentes de picadura de garrapatas, visita a regiones rurales o boscosas, signos y síntomas compatibles con la patología, tiempo de evolución y tratamiento médico recibido.

Obtención de las muestras

Muestra de piel (biopsia): Previa asepsia y antisepsia del área donde se encontró la lesión de morfea, se aplicó anestesia local subcutánea (cifarcaina al 1%) y se realizó biopsia en saca bocados de 2 mm de diámetro del borde de la lesión; posteriormente se suturó el área y se cubrió con gasa estéril. La biopsia fue colocada en un tubo de ensayo con 1 mL de buffer TE (0,5 mL M Tris-HCL, pH 9,0; 0,02 M EDTA; 0,01 M NaCl) y llevada al laboratorio para proceder a la extracción del ADN.

Lisis celular y extracción del ADN de piel

Las biopsias de piel fueron retiradas de los tubos de ensayo y luego cortadas con tije-

ras quirúrgicas para dividir las en pequeños fragmentos. Estos últimos se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL y se procedió a la extracción del ADN mediante el protocolo de extracción con fenol-cloroformo recomendado por 12° Taller Internacional de Histocompatibilidad (16).

Prueba diagnóstica reacción en cadena de la Polimerasa

Se realizó una “nested PCR” a partir de biopsias de piel, con primers específicos para el gen de la flagelina de *B. burgdorferi* (17). Las secuencias de los “primers” utilizados y los subfragmentos amplificados se muestran en la Tabla I.

En estudios previos se demostró que los “primers” utilizados no hibridan con el gen de la flagelina de otras bacterias como *Treponema pallidum*, *Treponema denticola*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* (17). La especificidad de las secuencias de estos “primers” fue comprobada mediante revisión en el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Los parámetros utilizados en el ensayo de PCR fueron: 40 ciclos en la PCR externa y 30 ciclos en la PCR interna. Las temperaturas y tiempos que se utilizaron en los ciclos fueron: desnaturalización: 94°C por 30 segundos, hibridación: 48°C por 1 minuto y elongación: 72°C por 2 minutos (17).

Procedimiento de la nested PCR

La mezcla de reacción de 25 μ l usada en la PCR externa contenía: 1) 12,5 μ l PCR master mix (Promega®): Taq ADN Polyme-

TABLA I
SECUENCIAS DE LOS “PRIMERS” UTILIZADOS Y SUBFRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Gen blanco	Primer	Secuencia	Subfragmento amplificado
Flagelina	Primer externo A1	5´-CTGCTGGCATGGGAGTTTCT-3´	730 bp
	Primer externo A2	5´-TCAATTGCATACTCAGTACT-3´	
	Primer interno B1	5´-AAGGAATTGGCAGTTCAATC-3´	290 pb
	Primer interno B2	5´-ACAGCAATAGCTTCATCTTG-3´	

rasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción (Promega®, 2004), 2) 5 µL. ADN extraído y 3) 25 picomoles de cada uno de Set de “primers” externos (A1A2).

La mezcla de reacción de 25 µL usada en la PCR interna contenía: 1) 12,5 µL. PCR master mix (Promega®), 2) 5 µL del Producto amplificado y 3) 25 picomoles de cada uno de Set de primers internos (B1B2).

Se procesaron además como control positivo, ADN genómico de la cepa B31 de *B. burgdorferi* obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC 35210) y como control interno, se realizó la amplificación del gen de la Beta-globina humana. Los primers utilizados para la amplificación del gen de la Beta-globina humana fueron: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' y 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'. El subfragmento amplificado del gen de la Beta-globina humana tiene un tamaño de 268 pb (18). En la fase de estandarización de la PCR se incluyó el estudio de pacientes aparentemente sanos (n=10) y con otras patologías, dermatológicas o no, como sífilis (n=5), acrodermatitis crónica atrófica (n=3), fascitis eosinofílica (n=1), artritis reumatoide (n= 4), ehrlichiosis (n=2), tuberculosis (n=7) y hemiatrofia facial (n=2) (19).

Electroforesis en gel

La verificación de los productos de amplificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% de la siguiente manera:

Se cargaron los pozos del gel con marcador de peso molecular pGEM (Promega®) (5 µL), 1 pozo, ADN control (5 µL), 1 pozo, producto amplificado (4 µL) resto de los pozos. A cada pozo se añadió 1 µL de buffer de carga (loading dye blue/orange 6x) (Promega®) y se corrió a 100 mv y 60 miliamperios durante 1 hora y 30 minutos.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron en valores absolutos y porcentajes.

RESULTADOS

Todos los pacientes en estudio se encontraban en la etapa tardía o crónica de la enfermedad, es decir, presentaban más de un año de evolución. Así mismo todos los sujetos refirieron el antecedente de la visita o permanencia en áreas rurales.

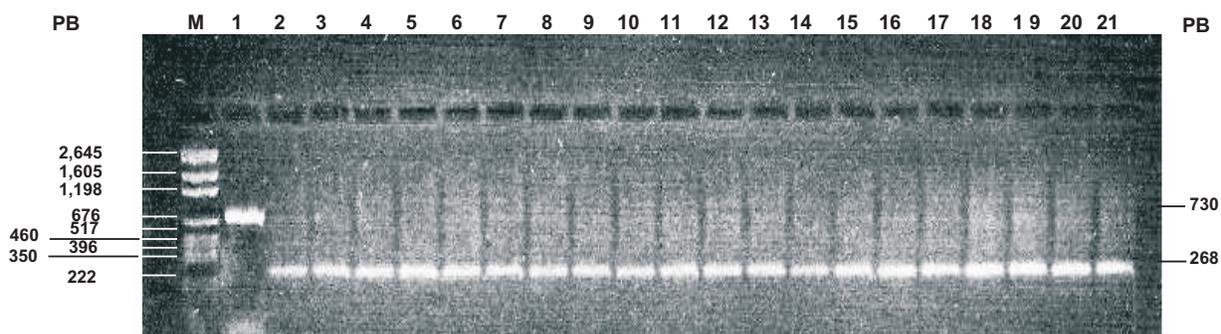
En relación con la picadura de garrapatas, dos de los individuos estudiados refirieron dicho antecedente (9,52%).

En cuanto a la administración de tratamiento antibiótico se encontró que 14 sujetos (66,66%) recibieron antibióticos antes de empezar el estudio y 7 (33,33%) no los recibieron. Los antibióticos recibidos fueron doxiciclina (tetraciclina) y ceftriaxone, ambos con actividad contra Borrelias. En estudios serológicos previos el uso de antibióticos no modificó los resultados de las pruebas inmunológicas y no tenemos evidencias si estos podrían negativizar una prueba de PCR, porque aunque los antibióticos destruyen la bacteria, todavía fragmentos de ADN pueden persistir en los tejidos (20).

El ensayo nested PCR de las biopsias de piel de pacientes con morfea no mostró amplificación de las secuencias seleccionadas del gen de la flagelina: subfragmentos de 730 bp (PCR Externa) y 290 bp (PCR interna); como se muestra en la Fig. 1. En los carriles correspondientes a las muestras de ADN de los pacientes solo puede apreciarse la banda de 268 pb correspondiente al gen de la Beta-globina humana, usada como control interno de amplificación.

DISCUSIÓN

Desde que la relación entre *B. burgdorferi* y morfea fue sugerida por primera vez



M: Marcador pGEM (Promega®).

Carril 1: Control positivo ADN genómico *B. Burgdorferi*, cepa B31 (PCR Externa) banda de 730 pb.

Carril 2-21: Pacientes con morfea banda de 268 pb

Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa de ADN de piel de pacientes con esclerodermia localizada (morfea).

en 1985 por Aberer y col. (21), muchas investigaciones han sido conducidas para establecer una posible asociación entre ambas patologías. Algunos estudios, la mayoría europeos, usando diferentes técnicas como inmunohistoquímica (22), cultivo (23-25), serología (23, 25-28) y reacción en cadena de la polimerasa (17, 24, 29) han demostrado dicha asociación. Por el contrario, los estudios realizados en Norteamérica (10, 29, 30, 31) han fallado en ese propósito (30-32). La asociación entre las diferentes manifestaciones clínicas de Borreliosis de Lyme y las distintas géoespecies de *B. burgdorferi* puede parcialmente explicar estos resultados controversiales. Balmetti y Pifferetti (5) reportaron asociación entre síntomas cutáneos (EM, ACA) y la géoespecie *B. afzelii*, Fujiwara y col. (31), detectaron *B. afzelii* y *B. garinii* (géoespecies Europeas), pero no *B. burgdorferi sensu stricto*, en biopsias de pacientes de Alemania y Japón con morfea, usando reacción en cadena de la polimerasa. Es importante señalar que la géoespecie predominante en Norteamérica, *B. burgdorferi sensu stricto*, no ha sido relacionada hasta la fecha, con manifestaciones cutáneas de la enfermedad (32).

Aunque ninguna de las especies de *B. burgdorferi* ha sido aislada en Suramérica,

se han obtenido pruebas serológicas positivas en pacientes venezolanos y colombianos con manifestaciones dermatológicas asociadas a Borreliosis de Lyme. Arocha y col. (6), detectaron anticuerpos frente a la bacteria en 6 de 14 pacientes venezolanos con morfea usando la técnica ELISA. Sánchez y col. (datos no publicados), reportaron el caso de un infante proveniente del estado Táchira con eritema migrans crónico (lesión patognomónica de la enfermedad) y anticuerpos frente a la espiroqueta. Pocos casos de eritema migrans crónico han sido detectados en el estado Zulia pero una asociación entre esta condición y la infección por *B. burgdorferi* no ha sido demostrada todavía. En Colombia, Palacios y col. (32), detectaron muestras positivas mediante IgG Western Blot, en 2 de 9 pacientes con morfea.

Burkot y col. (33) reportan que la interpretación de las serologías positivas en países tropicales, donde no se ha aislado ninguna especie de *Borrelia burgdorferi* o el agente transmisor, se debe hacer con cuidado, debido a la posibilidad de falsos positivos, por reactividad cruzada. Los niveles elevados de inmunoglobulinas y anticuerpos de reacción cruzada frente a otros patógenos (*Treponema pallidum*, *Borrelia recurrentis*, *Helicobacter pylori*, *Ehrlichia*, *Babesia*, virus Epstein-Barr) y enfermedades au-

toinmunes como lupus eritematoso sistémico, son causa de falsos positivos en pruebas serológicas de residentes de regiones tropicales.

El planteamiento anterior lleva a considerar la posibilidad de que los resultados positivos obtenidos en la localidad por el grupo de Arocha y col. (6), hayan sido falsos positivos debidos a reactividad cruzada, en especial porque en dicho trabajo las pruebas ELISA positivas no fueron confirmadas por otras técnicas de mayor especificidad como el Western Blot o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los resultados negativos obtenidos en el ensayo PCR realizado en esta investigación no soportan la evidencia de infección por *B. burgdorferi* en los pacientes estudiados, pero tampoco excluyen la posibilidad de la existencia de una génespecie distinta de *B. burgdorferi sensu stricto*, de una especie de *Borrelia* diferente del complejo *B. burgdorferi sensu lato* o de otro organismo espiroquetal, como el agente causal de *Borreliosis* de Lyme en Suramérica. Un estudio realizado en Colombia que usó la técnica Western blot, reportó reactividad parcial en el suero de pacientes con sífilis y esclerodermia localizada, aportando evidencia de una posible asociación entre las lesiones escleróticas y un organismo espiroquetal (33). Otra posibilidad es que la esclerodermia localizada no sea una enfermedad infecciosa y que tenga un origen inmunológico (autoinmune) o traumático (34).

También es importante señalar que la población de pacientes estudiada fue pequeña, resultando pertinente llevar a cabo otro estudio con una mayor población, para obtener conclusiones definitivas. Es importante realizar cultivos en los pacientes con lesiones dermatológicas compatibles con *Borreliosis* de Lyme y en garrapatas provenientes de las regiones donde habitan estas personas, tratando de identificar una posible nueva génespecie del complejo *B. burgdorferi*.

REFERENCIAS

1. **Aberer E, Klade H, Stanek G, Gebhart W, Nocton J, Steere A.** 1995. *Borrelia burgdorferi* and different types of morphea. *Dermatology* 1992; 184(4): 286-288.
2. **Dickison F, Battle M.** Lyme Borreliosis. *Infect Dis Rev* 2000. 2(1):23-26.
3. **Wang G, van Dam A, Schwartz I, Dankert J.** Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):633-653.
4. **Reed K.** Laboratory testing for Lyme disease: Possibilities and Practicalities. Mini-review. *J Clin Microbiol* 2002; 34(2):319-324.
5. **Balmetti T, Pifferetti J.** Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Res Microbiol* 1995; 146:329-340.
6. **Arocha F, Amesty A, Urbina M, Durango A, Vargas H.** Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* en una muestra poblacional del Estado Zulia". *Invest Clín* 1994; 35(2):91-104.
7. **Sehgal VN, Srivastava G, Aggarwal AK, Behl PN, Choudhary M, Bajaj P.** Localized scleroderma/morphea. *Int J Dermatol* 2002; 41:467-475.
8. **Peterson LS, Nelson AM, Su WP, Mason T, O'Fallon WM, Gabriel SE.** The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. *J Rheumatol* 1997; 24:73-80.
9. **Weide B, Walz T, Garbe C.** Is morphoea caused by *Borrelia burgdorferi*? A review. *Br J Dermatol* 2000; 142:636-644.
10. **Palacios R, Osorio L, Giraldo L, Torres A, Philipp M, Ochoa M.** Positive IgG Western Blot for *Borrelia burgdorferi* in Colombia. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 1999; 94(4): 499-503.
11. **Steere A.** Lyme disease. *N Engl J Med* 2002; 345(2):115-125.
12. **Fritz L, Vugia D.** Clinical issues in Lyme borreliosis. A California perspective. *Infect Dis Rev* 2001; 3(3):111-122.
13. **Liebling M, Nishio M, Rodríguez A, Sigal L, Jin T, Louis J.** The polymerase Chain

- reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. *Arthritis Rheum* 1995; 36(5):665-675.
14. **Von Stedingk L, Olsson I, Hanson H, Asbrink E, Hovmark A.** Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Borreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14(1):1-5.
 15. **Romero BD, Zegpi TMS, Castillo AC, González S, Torres FS.** Morfea en niños: Revisión bibliográfica y puesta al día. *Rev Chil Pediatr* 75 (2); 166-172, 2004.
 16. **Charron D, Fauchet R.** Technical handbook. Twelfth international histocompatibility workshop". Paris. Francia. Editor HLA et medicine. 1996. 4-6.
 17. **Schempp C, Bocklage H, Lange R, Kolmel H, Orfanos C, Gollnick H.** Further evidence for *Borrelia burgdorferi* infection in morphea and lichen sclerosus et atrophicus confirmed by DNA amplification. *J Investigat Dermatol* 1993; 100(5): 717-720.
 18. **Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrila L.** Scanning of beta-globin gene for identification of beta-thalassemia mutation in Romanian population. *J Cell Mol Med* 2004; 8(2):232-240.
 19. **Pauluzzi P, Bonin S, Gonzalez-Inchaurra MA, Stanta G, Trevisan G.** Detection of spirochaetal DNA simultaneously in skin biopsies, peripheral blood and urine from patients with erythema migrans. *Acta Derm Venereol* 2004; 84: 106-110.
 20. **Abere E, Klade H, Stanek G, Gebhart W.** *Borrelia burgdorferi* and different types of morphea. *Dermatologic* 1991; 182(3): 145-154.
 21. **Aberer E, Neumann R, Stanek G.** Is localized scleroderma a borrelia infection? *Lancet* 1985; 2:278.
 22. **Aberer E, Stanek G.** Histological evidence for spirochetal origin of morphea and lichen sclerosus et atrophicans". *Am J Dermatopathol* 1987; 9:374-379.
 23. **Weber K, Preac-Mursic V, Reimers CD.** Spirochetes isolated from two patients with morphea. *Infection* 1988; 16:25-26.
 24. **Breier FH, Aberer E, Stanek G, Khanakaha G, Schlick A, Tappeiner G.** Isolation of *Borrelia afzelii* from circumscribed scleroderma. *Br J Dermatol* 1999; 140:925-930.
 25. **Aberer E, Stanek G, Ertl M, Neumann R.** Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). *Acta Derma Venereol* 1987; 67:225-231.
 26. **Nakashima T, Maeda M, Hayashi T, Kitamura K.** A case of generalized morphea with a high titer of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies. *J Dermatol* 1999; 26(12):821-824.
 27. **Wojas-Pele A, Wielowieyska-Szybinska D, Kieltyka A.** Presence of the antinuclear antibodies and antibodies to *Borrelia burgdorferi* among patients with morphea en plaque, deep linear scleroderma and atrophoderma Pasini-Pierini. *Przeegl Lek* 2002; 59:898-902.
 28. **Ozkan S, Atabey N, Fetil E, Erkizan V, Gunes A.** Evidence for *Borrelia burgdorferi* in morphea and lichen sclerosus. *Int J Dermatol* 2000; 39(4):278-283.
 29. **Dillon W, Saed G, Fivenson D.** *Borrelia burgdorferi* DNA is undetectable by PCR in skin lesions of morphea, scleroderma or lichen sclerosus et atrophicus of patients from North America". *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(4):617-620
 30. **De Vito J, Merogi A, Vo T, Boh E; Fung H, Freeman S, Cockerell C, Stewart K, Marrogi A.** Role of *Borrelia burgdorferi* in the pathogenesis of morphea/scleroderma and lichen sclerosus et atrophicus: a PCR study of thirty-five cases. *J Cutan Pathol* 1996; 23(4):350-358.
 31. **Fujiwara H, Fujiwara K, Hashimoto K, Mehregan AH, Schaumburg-Lever G, Lange R, Schempp C, Gollnick H.** Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garinii* or *B. afzelii*) in morphea and lichen sclerosus et atrophicus tissues of German and Japanese but not of US patients. *Arch Dermatol* 1997; 133:41-44.
 32. **Palacios R, Torres A, Trujillo R.** IgG antibody reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto* antigens in patients with morphea in Colombia". *Int J Dermatol* 2003; 42:882-886.

-
33. **Burkot T, Schriefer M, Larsen S.** Cross-reactivity to *Borrelia burgdorferi* proteins in serum samples from residents of a tropical country nonendemic for Lyme Disease. *J Infect Dis* 1997; 175:466-469.
34. **Birdi N, Laxer RM, Thorner P, Fritzier MJ, Silverman ED:** Localized scleroderma progressing to systemic disease. Case report and review of the literature. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 410-415.