

Una composición específica de polifenoles, compuestos con ácidos grasos como enfoque para ayudar a reducir la carga de espiroquetas en la enfermedad de Lyme: estudio en vivo y estudio observacional en humanos.

Ther Adv Chronic Dis

2020, Vol. 11: 1–13

DOI: 10.1177/

2040622320922005

© The Author(s), 2020.
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Anna Goc , Gebhard Gehring, Hartmut Baltin, Aleksandra Niedzwiecki and Matthias Rath

Resumen

Antecedentes: La enfermedad de Lyme (LD) es una infección transmitida por las garrapatas y causada, por la *Borrelia burgdorferi sensu lato*. El enfoque terapéutico actual de esta enfermedad se limita a los antibióticos. Sin embargo, tras su administración, alrededor del 20% de los pacientes experimentan un retraso en la aparición de la enfermedad manifestando síntomas persistentes.

Métodos: Para determinar un enfoque adecuado que ayude a reducir esta cifra, hemos examinado la eficacia de una composición de compuestos polifenólicos (baicaleína, luteolina y ácido rosmarínico) con ácidos grasos (monolaurina y ácido cis-2-decenoico), y yodo/algas en un modelo animal con enfermedad de Lyme y en voluntarios.

Resultados: Los resultados mostraron que 4 semanas de ingesta dietética de esta composición redujeron la carga de espiroquetas en los tejidos de los animales en aproximadamente un 75%. Los parámetros sanguíneos básicos y diferenciales no mostraron diferencias significativas entre los animales de control y los alimentados con esta composición. Asimismo, los marcadores de toxicidad hepática y renal no se modificaron y la apoptosis no se observó. Las citoquinas inflamatorias relevantes, como la IL-6, la IL-17, el TNF- α y el INF- γ estaban elevadas en los animales infectados pero se normalizaron en los animales infectados y tratados. Un pequeño estudio observacional reveló que tras la administración de esta composición a 17 voluntarios tres veces al día durante 6 meses, el 67,4% de los voluntarios con LD tardía o persistente, y no receptivos a la aplicación previa de antibióticos, respondieron positivamente, en términos de estado energético así como en el bienestar físico y psicológico a la suplementación con esta composición, mientras que el 17,7% tuvo una ligera mejoría y el 17,7% no respondió.

Conclusión: Llegamos a la conclusión de que esta composición específica reveló beneficios factibles en la gestión de la LD tardía o persistente, aunque se justifica la realización de ensayos clínicos controlados a doble ciego.

Palabras claves: ácidos grasos, inflamación, enfermedad de Lyme, polifenoles, espiroquetas

Received: 19 August 2019; revised manuscript accepted: 13 March 2020.

Introducción

La enfermedad de Lyme (LD) es una zoonosis sistémica prevalente en todo el mundo.^{1,2} Se propaga por medio de garrapatas que transmiten bacterias del género *Borrelia* mientras se alimentan en animales y humanos.^{3,4} El número de casos de LD notificados ha crecido sistemáticamente durante los últimos 20 años y las últimas estimaciones alcanzan los 300.000 casos anuales sólo en Estados Unidos.⁵ Su patógeno causante, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, es prevalente

en las costas este y oeste de los EE.UU., así como en el centro y el este de Europa. La LD afecta a personas de todas las edades y de ambos géneros, aunque las tasas más altas se han documentado en niños de 10 a 14 años y en adultos mayores de 45 años.⁵⁻⁷ Las manifestaciones clínicas de la LD varían, aunque se han identificado síntomas comunes han sido identificados. Los primeros signos de la LD consisten en una lesión cutánea denominada eritema migratorio (EM) y/o síntomas similares a los de la gripe, mientras que

Correspondence to:

Anna Goc
Department of Infectious
Diseases, Dr. Rath
Research Institute BV,
5941 Optical Ct, San Jose,
CA 95138, USA
a.goc@drath.com

Aleksandra Niedzwiecki
Department of Infectious
Diseases, Dr. Rath
Research Institute BV,
5941 Optical Ct, San Jose,
CA, USA
a.niedz@drath.com

Gebhard Gehring
Hartmut Baltin
Private Praxisklinik H.
Baltin, Aschau/Chiemsee,
Bavaria, Germany

Matthias Rath
Department of Infectious
Diseases, Dr. Rath
Research Institute BV, San
Jose, CA, USA



síntomas incluyen artritis, problemas neurológicos, y anomalías cardíacas que pueden aparecer aproximadamente 4-6 semanas después de la picadura de garrapata. La fatiga y los dolores persistentes pueden desarrollarse en aproximadamente el 20% de los individuos que siguieron el tratamiento antibiótico recomendado y pueden durar más de 6 meses. Este fenómeno se ha descrito como Síndrome de la enfermedad de Lyme posterior al tratamiento (PTLDS).5,8-10

Varios antibióticos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), se utilizan como terapéuticos en pacientes con LD. La primera opción para las primeras fases de la LD suele ser una administración de 2 a 4 semanas de doxiciclina para los adultos y de amoxicilina para los niños. Para la LD en fase tardía, la ceftriaxona o la cefotaxima se recomiendan durante el mismo período de tratamiento. Aunque algunos ensayos clínicos han aportado resultados contradictorios, en general se de acuerdo en que el tratamiento antibiótico prolongado no es recomendado para los pacientes con PTLDS.5,11,12

La eficacia de las sustancias naturales y sustancias biológicamente activas como agentes antiborreliae aún no está bien explorada, aunque el número de investigaciones con dichos agentes ha ido creciendo.13-16 Nuestro anterior estudio in vitro demostró que una combinación específica de polifenoles con ácidos grasos y yodo tiene un efecto bactericida significativo contra dos especies de *Borrelia* que han sido reconocidas como un factor patógeno de la LD en Estados Unidos y Europa. Además, esta composición definida de fitoquímicos funcionó de forma sinérgica y se demostró que afectaba a la membrana pero no el ADN de la bacteria, demostrando importantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias al mismo tiempo.17

En este estudio, informamos de la eficacia de esta composición de compuestos derivados de plantas contra *Borrelia burgdorferi* en un modelo animal de LD y en pacientes voluntarios con una forma tardía o persistente de LD. Intentamos aquí proporcionar una evaluación de esta composición como una potencial alternativa o tal vez un enfoque adjunto para LD, que debe ser validada en mayor medida mediante grandes ensayos clínicos controlados a doble ciego.

Materiales y métodos

Compuestos como la baicaleína, la luteolina, el ácido rosmarínico y el ácido cis-2-decenoico (10-HAD), con una pureza entre el 90% y el 95% según el fabricante, se obtuvieron de Baoji GuoKangBio-Technology Co.

Ltd (Ciudad de Baoji, China). Algas ecológicas con contenido estandarizado de yodo (es decir 150 µg/ml como el 100% de la cantidad diaria recomendada y 60 minerales, vitaminas, proteínas, grasas, carbohidratos y fibras dietéticas como aproximadamente el 25% de los valores diarios) se compró a Thorvin Inc. (New Castle, VA, EE.UU.), y la monolaurina como sn-1 monolaurina (monolaurato de glicerol) fue de Purem Biological (Xi'an, China). Adicional análisis de pureza de los compuestos para excluir potencialmente la presencia de antibióticos, todos los cuales fueron adquiridos de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.), como la doxiciclina y la amoxicilina y el fármaco antiinflamatorio metotrexato utilizado en el tratamiento de la LD1,9 se realizó en el laboratorio de espectroscopia de masas laboratorio de la Universidad Estatal de Oregón y se analizó en el laboratorio de espectroscopia de masas de Universidad de Stanford (Figuras suplementarias 1Sa-c y Figuras 2Sa-d).

Microorganismos de prueba

Un derivado clonal de *Borrelia burgdorferi* B31 MSK5, que contiene todos los plásmidos, se utilizó en este estudio.18 Se cultivó en las condiciones más habituales, es decir, medio Barbour-Stoenner-Kelly H (BSK-H) complementado con un 6% de suero de conejo (Sigma, St. Louis, MO, USA) sin antibióticos a 33°C con 5% de CO₂, en tubos de ensayo de poliestireno de 15 ml.

Dieta de prueba

La dieta estándar para roedores se compró a LabDiet Inc. (St. Louis, MO, USA). La dieta de prueba fue preparada por LabDiet Inc. y estaba compuesta de dieta estándar enriquecida con baicaleína (650 mg/kg de dieta), luteolina (300 mg/kg de dieta) ácido rosmarínico (500 mg/kg de dieta), monolaurina (500 mg/kg dieta), 10-HAD (500 mg/kg dieta), y yodo 1 mg/kg de dieta.

Estudio en animales

Un total de 32 ratones hembras de raza C3H/HeN que pesaban aproximadamente 20 g se obtuvieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA, EE.UU.). Los ratones de 4 semanas de edad fueron alojados en la instalación de animales ubicadas en el Instituto de Investigación Dr. Rath a una temperatura ambiente de 21°C. La comida y el agua se suministraron ad libitum durante un ciclo de luz y oscuridad de 12 h. El protocolo experimental para animales n° 01/B052014 fue revisado y aprobado en 2014 por el Comité de Cuidado y Uso de Animales en el Instituto de Investigación Dr. Rath. Los ratones fueron divididos al azar

en cuatro grupos experimentales (ocho animales por grupo): WT (animales no infectados alimentados con la dieta estándar), LD (animales infectados alimentados con la dieta estándar), WT + T (animales no infectados alimentados con la dieta de prueba), y LD + T (animales infectados alimentados con la dieta de prueba). El bajo paso de la virulenta *Borrelia burgdorferi*, cultivada a 33°C en un medio BSK-H hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 1×10^7 espiroquetas/ml, se inocularon por vía intradérmica (10^4 espiroquetas/ratón) en animales de dos grupos experimentales, LD y LD + T, como se informó anteriormente.¹⁹ Los ratones de grupos WT y WT + T recibieron inyecciones simuladas de $1 \times$ solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Después de tres semanas fueron transferidos de la dieta estándar a la dieta de prueba y se alimentaron durante las 4 semanas siguientes. El resto de los animales se mantuvieron con la dieta estándar. Al final del estudio se sacrificaron todos los animales y se recogieron muestras de tejido, incluida la sangre, para las pruebas posteriores. Los animales de control fueron ratones alimentados con la dieta estándar y no infectados (WT), así como ratones alimentados con la dieta estándar e infectados con *Borrelia burgdorferi* (LD). La sangre se obtuvo asépticamente de todos los ratones experimentales mediante una punción intracardiaca con una jeringa de tuberculina de 1 ml con una aguja de 27 G y se separó en dos muestras. Una muestra de la sangre recogida se utilizó para la hematología básica y diferencial hematología, y la segunda muestra se utilizó para preparar el suero para el análisis bioquímico. Muestras de tejidos, las orejas, la base del corazón, las articulaciones tibiotarsianas hígado, riñones y bazo se recogieron, inmediatamente congeladas a presión en nitrógeno líquido, y sometidas a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y/o al análisis de inmunohistoquímica. Además, la sangre y los tejidos (de la oreja, la base del corazón, el bazo y las articulaciones) fueron procesados y calificados para el crecimiento de espiroquetas en el medio BSK-H después de 3 a 5 semanas como se ha descrito.¹⁹

Análisis cuantitativo de *Borrelia burgdorferi* ADN

Para confirmar la presencia de la infección y cuantificar cargas tisulares de espiroquetas, todas las muestras se analizaron por qPCR como se informó anteriormente.^{18,19} Brevemente se extrajo el ADN genómico completo de los tejidos muestras (orejas, base del corazón, bazo y articulaciones tibiotarsianas articulaciones) utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Antes de la extracción de ADN, todas las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido,

se pesaron, y homogeneizaron utilizando una trituradora QIA kit (Qiagen). Los conjuntos de cebadores optimizados de *Borrelia burgdorferi* flagellin (flaB, bb0147) (F-5' TCTTTTCTGGTGAGGGAGCT; R-5' TCCTTCCTGTTGAACCCT) y el gen de la β -actina (ACTB) (F-5' CAAGTCATCACTATTGGCAACGA; R-5' CCAAGAAGGAAGGCTGGAAAA) de secuencias publicadas.¹⁹ Todos los reactivos de la qPCR se adquirieron en Qiagen. Las plantillas de ADN [es decir, $1 \times 10^5/\mu\text{l}$ de equivalentes de *B. burgdorferi* de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, EE.UU.) y de ratón de Promega (Madison, WI, EE.UU.)] sirvieron como cantidades de ADN genómico de espiroqueta y de ratón], se incluyeron en cada experimento de qPCR, y se utilizaron para elaborar las curvas estándar y para determinar el número total de espiroquetas (número de copias de flaB) en las muestras de tejido de ratón recogidas. Además, se incluyó un de reacción se incluyó. QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) se utilizó para determinar el gen diana flaB borrelial, expresado por 1 mg de peso de tejido. Contenía Tampón de PCR QuantiTect SYBR Green, pH = 8,7, como fuente de 2,5 mM de Mg²⁺, desoxinucleótidos y ADN polimerasa HotStarTaq, además de cada cebador utilizado a una concentración de 0,3 μM en una 50 μl de mezcla de qPCR. Las condiciones del ciclador qPCR (BioRad CFX96) se programaron según las las recomendaciones del fabricante y fueron las siguientes un paso de activación a 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 15 s, recocido a 59°C durante 30 s, y extensión a 72°C durante 30 s. Para verificar la especificidad e identidad del producto de la qPCR, se realizaron análisis de la curva de fusión. Se realizó una validación adicional sometiendo las muestras de tejido a un análisis de qPCR independiente realizado por un laboratorio certificado (IDEXX BioResearch, Sacramento, CA, EE.UU.). Cada muestra se analizó por triplicado.

Hematología sanguínea

Las muestras de sangre obtenidas de todos los ratones se enviaron a un laboratorio analítico certificado (IDEXX BioResearch) donde se analizaron las (RBC, Red Blood Cells; WBC, White Blood Células; HGB, Hemoglobina; HCT, Hematocrito; MCV, Volumen Corpuscular Medio; MCH, Hemoglobina Corpuscular Media; y MCHC, Concentración Concentración de hemoglobina corpuscular) y diferencial (neutrófilos, monocitos, linfocitos y niveles de plaquetas) hematológicos. Se realizó un análisis hematológico apoyado por una evaluación patológica. Cada muestra se analizó por triplicado.

Análisis bioquímicos

Los sueros de todos los animales experimentales fueron analizados por un laboratorio analítico certificado (IDEXX BioResearch) para la fosfatasa alcalina (ALP) alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamyl transferasa (GGT), creatinina, colesterol, glucosa, nitrógeno ureico (BUN), bilirrubina, haptoglobina y niveles de la molécula de lesión renal-1 (KIM-1). La KIM-1 una proteína de membrana de 30 KDa, tipo 1, ha sido considerado como un biomarcador potencial de la lesión renal, ya que está muy regulada en el túbulo proximal del riñón lesionado, pero existe en niveles muy bajos en los riñones normales no lesionados.²⁰ Además 50 µl de suero de cada ratón fueron sometidos a citoquinas proinflamatorias y quimiocinas mediante el análisis Analyte Profiler ELISArray assay kit (SA Biosciences, Germantown, MD, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. Cada muestra se analizó por triplicado.

Inmunohistoquímica

Las muestras de riñón, hígado y articulaciones, recogidas al final del experimento, se fijaron en formalina neutra al 10% y se tamponan neutro durante 24-48 horas y se sometieron a una evaluación inmunohistoquímica realizada por un laboratorio certificado independiente (HistoTox Labs, Boulder, CO, EE.UU.). Las secciones de 5 µm, colocadas en portaobjetos de vidrio, se tiñeron con hematoxilina y eosina, anti-F4/80 (marcador de macrófagos) y antiACS3 (caspasa-3 activada, marcador apoptótico). La caspasa-3 es activada por la caspasa-8 y la caspasa-9, sirviendo de punto de convergencia para las vías de señalización apoptótica intrínseca y extrínseca. Así, la activación de la vía de la caspasa-3 es un sello distintivo de la apoptosis y puede utilizarse en ensayos celulares para cuantificar los activadores e inhibidores de la "cascada de la muerte".²¹ El F4/80, también conocido como módulo similar al EGF que contiene receptor hormonal similar a la mucina 1 (Epidermal Growth Factor-like module-containing mucinlike hormone receptor-like 1) es un miembro de la familia del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) de adhesión. El antígeno F4/80 es una glicoproteína de superficie celular de ratones envejecidos que se expresa en altos niveles en varios macrófagos, incluyendo: Las células de Kupffer, los macrófagos de la pulpa roja del bazo, la microglía, la lámina propia del intestino y células de Langerhans en la piel.

El antígeno F4/80 también se expresa en los macrófagos de el tejido conectivo, el corazón, el riñón y los sistemas reproductivo y neuroendocrinos, por lo que es un marcador bien conocido y ampliamente utilizado de las poblaciones de macrófagos murinos poblaciones de macrófagos.²² Las secciones se codificaron codificadas y un examen histopatológico adicional e imparcial examen histopatológico imparcial por un patólogo certificado en el lugar.

Un estudio observacional en humanos

Entre 2014 y 2015, los pacientes adultos elegibles (n = 17) fueron reclutados a través de remisiones de médicos en Alemania, donde el estudio se llevó a cabo en la Praxisklinik privada H. Baltin, Baviera, Alemania. El estudio siguió el protocolo adherido a la normativa de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el Comité de Ética (n° DRRI/2014) del centro participante centro (Private Praxisklinik H. Baltin, Baviera, Alemania), y con el apoyo de un consentimiento informado de cada paciente. Los pacientes fueron clasificados como elegibles para el estudio si tenían al menos al menos 18 años, con un historial de LD aguda adquirida en Alemania, y con al menos uno de lo siguiente: una historia de EM única o múltiple síntomas neurológicos atribuidos a la LD, o a la artritis. Documentación médica adicional que demuestre que los pacientes padecen actualmente LD tardía o crónica (que se manifiesta en forma de fatiga, dolor musculoesquelético, artritis, arritmia cardíaca arritmia, neuropatías, disfunción cognitiva/ parálisis) y que se habían sometido previamente a tratamientos con un régimen de antibióticos recomendado era obligatorio.^{5,23} En el momento de la inscripción todos los pacientes tenían los siguientes síntomas que interferían con su funcionamiento habitual y su capacidad para trabajar: dolor musculoesquelético generalizado y/o deterioro cognitivo con acompañamiento de profunda fatiga. Los síntomas crónicos tenían que haber comenzado en los 6 meses siguientes a la aplicación inicial del régimen de antibióticos recomendado y tenían haber persistido más allá de los 6 meses.²³ Los pacientes recibieron la composición de prueba en forma de cápsulas que contenían baicaleína 250 mg/día, luteolina 75 mg/día, ácido rosmarínico 100 mg/día, monolaurina 250 mg/día, 10-HAD 100 mg/día, y yodo 0,15 mg/día (en forma de algas), tres veces al día durante 6 meses. Durante la fase de tratamiento oral se supervisó el cumplimiento y la seguridad mediante visitas mensuales de los pacientes en la clínica del médico. La clínica y de laboratorio se realizaron en día 90 y el día 180 e incluyeron una historia clínica completa historia clínica, un examen físico detallado, pruebas neuropsicológicas y toma de muestras de sangre periférica, si se consideraba necesario.

Table 1. Resumen de los parámetros fisiológicos de los ratones tras 4 semanas de tratamiento.

Parameters	WT (n=8)	LD (n=8)	WT + T (n=8)	LD + T (n=8)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3 \pm \text{SD}$)	8.11 \pm 2.2	7.48 \pm 2.6	8.56 \pm 2.8	8.78 \pm 2.5
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3 \pm \text{SD}$)	6.3 \pm 1.9	6.8 \pm 2.3	6.1 \pm 2.4	6.4 \pm 2.2
HGB (g/L \pm SD)	142 \pm 23	146 \pm 27	147 \pm 35	134 \pm 39
HTC (% \pm SD)	41.4 \pm 6.5	43.2 \pm 5.6	41.8 \pm 5.8	41.9 \pm 7.6
MCV (fL \pm SD)	49.3 \pm 7.5	49.3 \pm 5.9	46.0 \pm 6.7	49.4 \pm 6.9
MCH (pg \pm SD)	14.8 \pm 5.9	13.4 \pm 7.1	14.9 \pm 5.8	14.6 \pm 5.6
MCHC (mmol/L \pm SD)	18.9 \pm 4.2	18.9 \pm 4.2	20.6 \pm 4.3	20.0 \pm 4.7
Neutrophils (% \pm SD)	25.8 \pm 6.8	29.6 \pm 7.5	24.4 \pm 6.7	24.5 \pm 7.9
Monocytes (% \pm SD)	1.9 \pm 0.6	4.1 \pm 0.5*	1.6 \pm 0.2	2.7 \pm 0.3
Lymphocytes (% \pm SD)	66.3 \pm 8.6	84.9 \pm 7.5	74.7 \pm 9.1	75.8 \pm 8.2
Platelets	Adequate	Adequate	Adequate	Adequate

* $p < 0.01$; HGB, hemoglobin; HTC, hematocrit; LD, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10^4 spirochetes/mouse); LD + T, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10^4 spirochetes/mouse) and fed with plant-based diet for 4 weeks; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume, RBC, red blood cells; SD, standard deviation; WBC, white blood cells; WT, control mice; WT + T, control mice fed with plant-based diet for 4 weeks.

Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como medias \pm desviación estándar desviación (SD) ($n = 8$ para el estudio en animales, y $n = 17$ para el estudio en humanos). La prueba de la t de Student de dos colas t se utilizó para determinar las diferencias estadísticamente significativas diferencias a niveles de 0,05. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad.

Resultados

Efecto de la composición de la prueba in vivo

Tras completar 4 semanas de tratamiento con la dieta de prueba, no hubo variaciones significativas en el peso, así como en el consumo de comida y agua entre todos los grupos experimentales (Tabla 1). La evaluación de la sangre no reveló alteraciones en los parámetros hematológicos entre los grupos experimentales grupos, excepto que hubo un nivel significativamente mayor nivel de monocitos en los animales infectados con *Borrelia burgdorferi* (LD) (Tabla 2). También en el mismo grupo de animales se observó un mayor nivel de neutrófilos

se observó, pero no alcanzó la significación estadística significación ($p = 0,053$). El análisis patológico además reveló que no había signos de hemólisis ni de lipemia ni anisocitosis o poiquilocitosis. Además, el nivel de (meta/pro)-mielocitos se clasificó como "indetectable". Además, el análisis bioquímico de los sueros de todos los animales experimentales no mostró cambios en los niveles de las enzimas hepáticas y de los marcadores metabólicos clínicos como el colesterol, la glucosa bilirrubina, BUN y creatinina. El grupo LD mostró un mayor nivel de ALP, sin embargo no fue estadísticamente significativo ($p = 0,055$) (Tabla 3). Además, los niveles de haptoglobina y KIM-1 no mostraron cambios, y la evaluación patológica informó de que no había toxicidad en los tejidos (Figura 1).

Las citoquinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-17 INT- γ , y TNF- α , estaban elevadas en el grupo LD, sin embargo sus niveles se normalizaron en el grupo LD + T (Figura 2). Ninguno de los grupos de control grupos (WT y WT + T) sometidos a pruebas de ADN de *Borrelia burgdorferi* mostró niveles detectables. En el grupo de ratones LD, el ADN borrelial se detectado en las orejas, la base del corazón, el bazo y las articulaciones de todos los ratones. En el grupo LD + T el ADN borrelial se

Table 2. Basic and differential blood parameters of mice after 4 weeks of treatment.

Parameters	WT (n=8)	LD (n=8)	WT + T (n=8)	LD + T (n=8)
Weight (g/mouse ± SD)	25.3 ± 3.1	24.3 ± 2.9	25.2 ± 3.1	25.1 ± 3.1
Food (g/mouse/day ± SD)	3.3 ± 0.6	3.2 ± 1.1	3.1 ± 1.0	3.4 ± 0.8
Water (ml/mouse/day ± SD)	2.4 ± 0.3	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.8	2.5 ± 0.4

LD, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10⁴ spirochetes/mouse); LD + T, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10⁴ spirochetes/mouse) and fed with plant-based diet for 4 weeks; SD, standard deviation; WT, control mice; WT + T, control mice fed with plant-based diet for 4 weeks.

Table 3. Biochemical parameters of mice sera after 4 weeks of treatment.

Parameters	WT (n=8)	LD (n=8)	WT + T (n=8)	LD + T (n=8)
ALP (U/L ± SD)	83.1 ± 8.7	100.9 ± 7.6	89.1 ± 7.3	70.9 ± 7.9
ALT (U/L ± SD)	40.3 ± 5.5	35.7 ± 4.9	31.3 ± 5.9	36.9 ± 7.6
AST (U/L ± SD)	182.5 ± 10.2	257.8 ± 14.3	162.7 ± 11.5	141.9 ± 9.9
GGT (U/L)	<3	<3	<3	<3
Total bilirubin (µmol/L)	<3.4	<3.4	<3.4	<3.4
Cholesterol (mmol/L ± SD)	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3	3.3 ± 0.2
Glucose (mmol/L ± SD)	6.3 ± 0.6	6.5 ± 0.8	5.9 ± 0.7	5.8 ± 0.8
BUN (mmol/L ± SD)	8.6 ± 1.1	8.2 ± 0.8	7.9 ± 0.9	9.5 ± 1.1
Creatinine (µmol/L)	<26.5	<26.5	<26.5	<26.5

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; GGT, gamma-glutamyl transferase; LD, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10⁴ spirochetes/mouse); LD + T, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10⁴ spirochetes/mouse) and fed with plant-based diet for 4 weeks; SD, standard deviation; WT, control mice; WT + T, control mice fed with plant-based diet for 4 weeks.

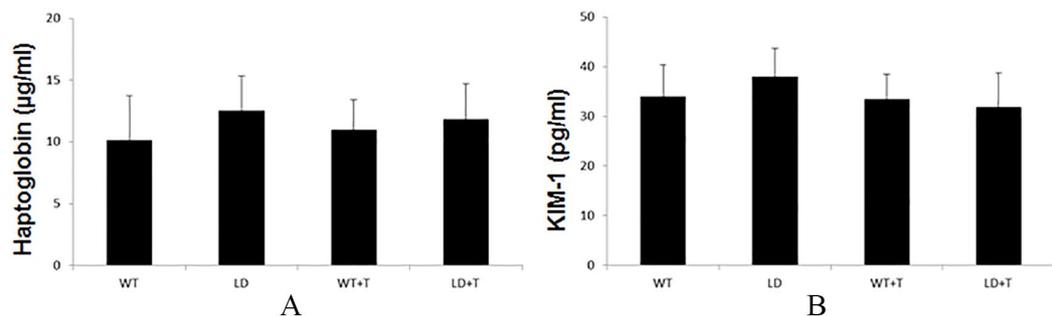


Figure 1. Levels of haptoglobin (a) and KIM-1 (b) in mice sera after completion of 4 weeks of treatment. n=8. KIM-1, kidney injury molecule-1; LD, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10⁴ spirochetes/mouse); LD + T, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10⁴ spirochetes/mouse) and fed with plant-based diet for 4 weeks; WT, control mice; WT + T, control mice fed with plant-based diet for 4 weeks.

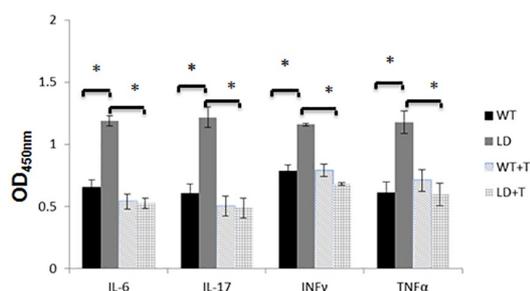


Figure 2. OD readings of mice serum cytokines after completion of the 4-week treatment. $n=8$, $*p < 0.001$. IL, interleukin; INT- γ , interferon gamma; LD, mice intradermally infected with 10^4 spirochetes/mouse and not fed with plant-based diet; LD + T, mice infected intradermally with 10^4 spirochetes/mouse and fed for 4 weeks with plant-based diet; OD, optical density; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; WT, mice not infected and not fed with plant-based diet; WT + T, mice not infected and fed for 4 weeks with plant-based diet.

encontró sólo en las articulaciones de 2/8 animales (25%) y a un nivel significativamente menor en comparación con el grupo LD (Tabla 4 y Figura 3). Los resultados fueron confirmados por un examen independiente de qPCR realizado por un laboratorio externo certificado. El análisis inmunohistoquímico apoyado por la evaluación patológica no reveló signos de apoptosis en el hígado y los riñones de los animales de ninguno de los grupos experimentales (Figura 4). Sin embargo, un notable aumento de la tinción con anticuerpos anti-F4/80 se detectó en las articulaciones de ratones del grupo LD, así como en dos animales del grupo LD + T en los que se detectó ADN borrelial se detectó, aunque con una intensidad notablemente reducida intensidad (Figura 5).

Efecto de la composición de la prueba en el sujeto humano

Evaluación de la suplementación dietética con los seis agentes de origen vegetal en 17 pacientes afectados por la LD reveló que tres (3/17) pacientes quedaron completamente libres de síntomas después de 6 meses. Los pacientes informaron de una mejora física y psicológica mejoras de sus síntomas y fueron capaces de reanudar su trabajo. Ocho pacientes (8/17) también experimentaron una mejora física y psicológica significativa mejoría y pudieron volver a trabajar; sin embargo se programó una nueva evaluación para hacer un seguimiento para comprobar si las mejoras cambiarían tras la interrupción del tratamiento. Dos pacientes (2/17) sólo experimentaron ligeras mejoras mientras que cuatro pacientes (4/17) no mostraron

Table 4. Comparison of culture and *flaB* DNA qPCR for individual infected mice tissue samples collected after 4 weeks of treatment.

LD culture*	Ear	Heart base	Spleen	Joints
	LD qPCR			
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
LD + T culture*	LD + T qPCR			
-	-	-	-	-
-	-	-	-	+
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	+
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

qPCR, quantitative polymerase chain reaction; LD, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10^4 spirochetes/mouse); LD + T, mice infected with *Borrelia burgdorferi* (intradermal injection with 10^4 spirochetes/mouse) and fed with plant-based diet for 4 weeks, $n=8$. *Culture of ear, heart base, spleen, and joints tissue. (-), *flaB* DNA-negative result in all subjected tissues; (+), *flaB* DNA-positive result in all subjected tissues.

ninguna mejora e informaron de cansancio anormal, dolor en las extremidades, dolor de cabeza y alteraciones visuales. Tras interrumpir la suplementación durante 2 semanas, estos síntomas remitieron. Uno de estos cuatro pacientes (1/4) hizo un nuevo intento y reanudó la suplementación comenzando con una dosis más baja de una cápsula al

día aumentando gradualmente hasta tres cápsulas al día, lo que resultó en ningún efecto negativo observado con una ligera mejora de la condición física. Además diagnósticos de coinfecciones a menudo asociadas con LD, así como problemas neurológicos con un cambio de enfoque terapéutico fueron necesarios para los pacientes con ninguna mejora, y eso tuvo lugar fuera de este estudio de observación (Tabla 5).

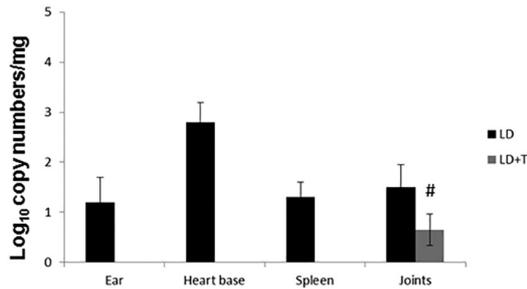


Figure 3. Estimation of spirochete burden by quantitative polymerase chain reaction in mice per mg of tissue after completion of 4 weeks of treatment. $n=8$, $\#p < 0.05$ compared with LD group. C_T values < 40 were considered positive. LD, mice infected intradermally with 10^4 spirochetes/mouse and not fed with plant-based diet; LD + T, mice infected intradermally with 10^4 spirochetes/mouse and fed for 4 weeks with plant-based diet.

Discusión

Aquí demostramos los resultados de los estudios de observación en animales y estudios observacionales en humanos tras la aplicación de la composición de prueba formada por seis compuestos como la baicaleína, la luteolina, el ácido rosmarínico monolaurina, 10-HAD y algas/yodo. La presente investigación amplía los hallazgos de nuestro anterior estudio que demuestra una eficacia significativa in vitro de esta composición contra las formas pleomórficas de *Borrelia burgdorferi* s.s. y *B. garinii*.¹⁷ Encontramos allí que el efecto de esta combinación era comparable a la eficacia in vitro de la triple combinación de antibióticos (es decir, doxiciclina con daptomicina y cefoperazona), y demostró antioxidativo y antiinflamatorio efectos al mismo tiempo.^{17,24} Los resultados del estudio en animales estudio coincidieron con las observaciones en sujetos humanos sujetos que demuestran la seguridad general de esta composición cuando se aplica en una dieta. Revelaron que no hay cambios significativos en la hematología. Sólo los ratones infectados, pero no tratados ratones (grupo LD), tenían un nivel aumentado de monocitos y neutrófilos ligeramente elevados, sin embargo estos parámetros se normalizaron en los animales infectados y alimentados con la composición de prueba (LD + T). También los parámetros clínicos fisiológicos y bioquímicos parámetros en los sueros de los grupos de animales no mostraron una variabilidad significativa.

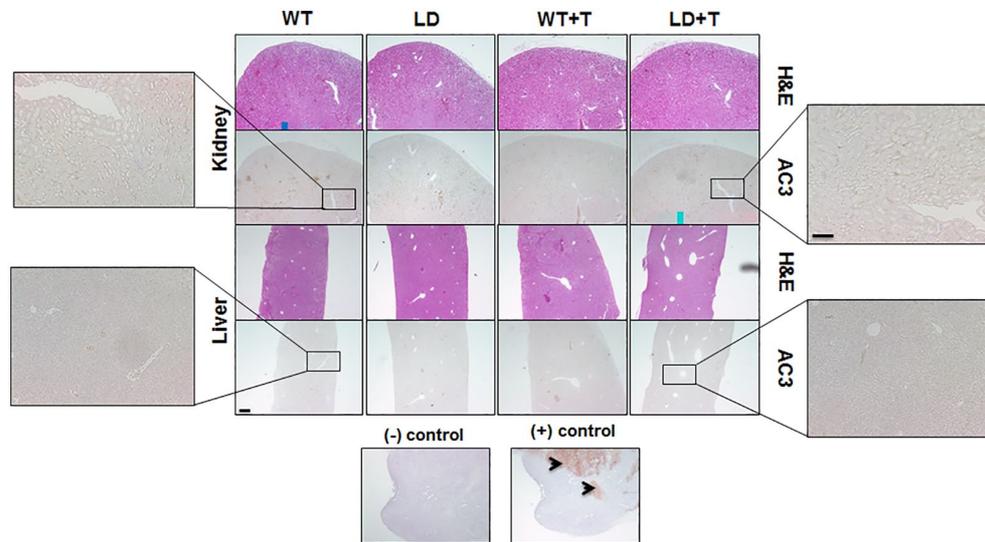


Figure 4. Representative images of AC3 detection in mouse kidney and liver tissues by immunohistochemistry using rabbit polyclonal antibody. Magnifications 4 \times , 10 \times for inserts; (-) negative and (+) positive control of mouse tumor. AC3, active caspase-3; H&E, hematoxylin and eosin staining; LD, mice infected intradermally with 10^4 spirochetes/mouse and not fed with plant-based diet; LD + T, mice infected intradermally with 10^4 spirochetes/mouse and fed for 4 weeks with plant-based diet; WT, mice not infected and not fed with plant-based diet; WT + T, mice not infected and fed for 4 weeks with plant-based diet.

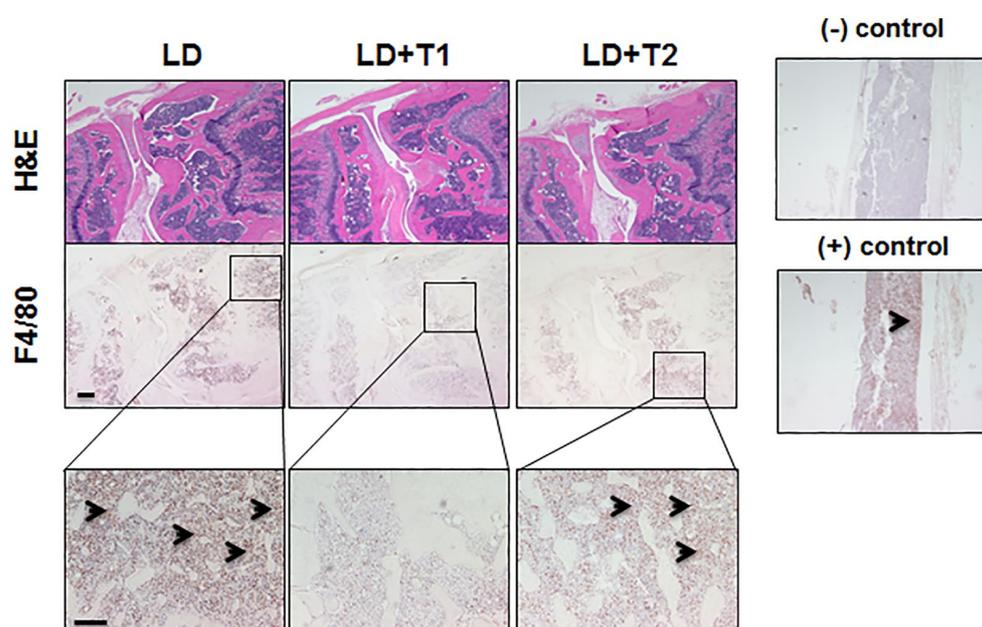


Figure 5. Representative images of anti-F4/80 antibody detection in mice joints tissues by immunohistochemistry using rabbit polyclonal antibody. Magnifications 4 \times , 10 \times for inserts; (-) negative and (+) positive control of mouse bone. H&E, hematoxylin and eosin staining; LD, mice intradermally with 10⁴ spirochetes/mouse and not fed with plant-based diet; LD + T1, mouse no. 2 infected intradermally with 10⁴ spirochetes/mouse and fed for 4 weeks with plant-based diet with increased staining with anti-F4/80; LD + T2, mouse no. 1 infected intradermally with 10⁴ spirochetes/mouse and fed for 4 weeks with plant-based diet with no increased staining with anti-F4/80.

Table 5. Summary of the observational study of 17 patients with late or chronic LD after 6 months of supplementation with the test composition.

No. patient	MS	SS	PSY/US	No improvement	Slight improvement	Marked improvement	Complete improvement
1	+++	+++	+	-	x	-	-
2	+++	+++	-	x	-	-	-
3	-	+	+++	-	-	-	x
4	+++	+	+++	-	x	-	-
5	++	++	++	-	-	x	-
6	+++	+++	++	x	-	-	-
7	+++	+++	++	x	-	-	-
8	+	+	+++	-	-	x	-
9	+++	++	+	x	-	-	-
10	+++	+++	++	-	-	-	x

(Continued)

Table 5. (Continued)

No. patient	MS	SS	PSY/US	No improvement	Slight improvement	Marked improvement	Complete improvement
11	+++	++	-	-	-	-	x
12	+++	+	+++	-	-	x	-
13	+++	++	+	-	-	x	-
14	+++	+++	++	-	-	x	-
15	+++	+	+	-	-	x	-
16	+++	-	+	-	-	x	-
17	+++	++	+++	-	-	x	-

Score: + + +, severe symptoms, unable to work; + +, less severe symptoms, ability to work not permanently restricted; +, intermittent slight symptoms.

LD, Lyme disease; MS, main symptoms: lack of energy/tiredness/low stamina/fatigue/ musculoskeletal pain/forgetfulness/ concentration disorder; PSY/US, psychological symptoms/unusual symptoms: depression/irritability/panic and anxiety attacks/aggression/neuropathies/paralysis; SS, subsidiary symptoms: vertigo/visual disorders/cardiac arrhythmia.

Se observó un aumento de los niveles de niveles de citoquinas como la IL-6, IL-17, INT- γ y TNF- α , en el grupo LD, lo que corrobora otros informes y apunta a una inflamación crónica en curso y podría señalar procesos fisiopatológicos en curso procesos fisiológicos en curso.²⁵ Sin embargo, los niveles de citoquinas se normalizados en el grupo de ratones LD + T que consumieron la dieta de prueba. El consumo de la dieta enriquecida con la composición de prueba tampoco causó efectos tóxicos en los tejidos de los ratones, ya que los marcadores de lesión hepática y los marcadores de lesión renal no se elevaron en el animales de control (WT + T) y los infectados (LD + T). Esto se confirmó mediante la activación de la caspasa-3 y la evaluación patológica de los resultados.

Los animales infectados (grupo LD) mostraron la presencia de ADN borrelial detectable en diferentes tejidos, lo que concuerda con los datos publicados anteriormente datos. Sin embargo, cabe mencionar que un estudio in vivo publicado por Pahl et al. y otros demostró que la diseminación de *Borrelia burgdorferi* no procede de manera uniforme y su distribución puede variar entre los tejidos de los animales infectados.²⁶⁻²⁹ Nuestros resultados de la qPCR indicaron que un número muy bajo de copias de ADN espiroquetario estaban presentes en los tejidos articulares tejidos de dos ratones infectados alimentados con la dieta; sin embargo, no pudieron cultivarse y estaban significativamente reducidos en comparación con el grupo LD grupo. La cuestión de la detección de la *Borrelia burgdorferi* tras el tratamiento con antibióticos in vitro e in vivo no es nuevo y se informó anteriormente.^{30,31} Curiosamente, se encontró un

mayor nivel del marcador F4/80 en el tejido articular en los mismos dos ratones, aunque, igualmente, a un nivel visiblemente reducido nivel en comparación con el grupo LD. Estos resultados no pueden excluir la posibilidad de que las espiroquetas pudieran conservar un nivel bajo de infectividad y ser una causa de la inflamación, pero su capacidad de replicación estuviera alterada. Potencialmente, la capacidad retenida de expresar lipoproteínas borrelianas podría contribuir, ya que se ha demostrado que pueden potenciar una plétora de respuestas proinflamatorias.³²⁻³⁶ Por tanto, el destino de la *Borrelia burgdorferi* y sus aspectos de infectividad en las articulaciones debe establecerse. Sin embargo, la presencia de zonas inflamatorias aumentadas en las secciones de tejido analizadas podría corresponder a la presencia de espiroquetas en la fase persistente, lo que debería confirmarse mediante un estudio más detallado. El tejido articular es rico en matriz extracelular (MEC) y, al igual que el hueso, es difícil de penetrar por los agentes antibacterianos agentes antibacterianos. Los informes sobre la existencia de espiroquetas vivas tras el tratamiento con antibióticos implican el colágeno como un factor clave de persistencia que contribuye al fracaso del tratamiento antibiótico han sido informado anteriormente.³⁷⁻⁴⁰

El tratamiento con diferentes antibióticos aprobados por la FDA en pequeños y grandes mamíferos también parece reducir la carga de *Borrelia burgdorferi* pero no consigue eliminar la infección, como también han documentado muchos otros grupos de investigación.⁴¹⁻⁵⁰ Estos informes in vivo fueron corroborados por los resultados de los ensayos clínicos. 5,11,12,46,49 También cabe destacar que se ha observado una disminución del título de anticuerpos se

ha observado después del tratamiento con antibióticos, a pesar de la presencia de bajos niveles de espiroquetas persistentes.^{41,50} Sin embargo, otros informaron de que tras la terapia con antibióticos en perros, los títulos de anticuerpos en algunos animales se mantuvieron en niveles constantes niveles, lo que abogaría por la persistencia del estímulo antigénico en lugar de la completa eliminación de los patógenos.⁵¹

Cada vez se acepta más que la terapia convencional con

terapia con antibióticos para la LD tardía y persistente da resultados limitados. Especialmente la monoterapia tiene un éxito mínimo a largo plazo y, aunque todavía se utilizada no hay pruebas sólidas que documenten su eficacia en los estadios tardíos y persistentes de la LD hasta la fecha.^{5,11,12} Nuestros resultados *in vitro* publicados anteriormente resultados mostraron que una composición de baicaleína luteolina, ácido rosmarínico, monolaurina, 10-HAD y el yodo a sus 1/8 de concentración mínima inhibitoria (MIC) tiene un efecto sinérgico significativo efecto contra la *Borrelia* spp. Esta composición reveló propiedades antioxidantes que afectan a la membrana de la *Borrelia* pero no a su ADN. También observamos su efecto inhibitor sobre la liberación de IL-1 α IL-1 β , e IL-6 por parte de los monocitos humanos CD14+ estimulados con *Borrelia* sp viva.¹⁷ Para validar estos resultados realizamos un pequeño estudio observacional limitado, sin embargo, al número de pacientes y a las evaluaciones clínicas y las evaluaciones de laboratorio. En nuestro estudio piloto de 17 pacientes con LD que habían sido sometidos previamente a varias rondas de tratamiento con antibióticos pero cuyo estado de salud no había mejorado tras finalizar la terapia, una ingesta de 6 meses de una combinación específica de compuestos fenólicos con ácidos grasos y kelp/yodo mejoró las condiciones de salud de 64,7% de los pacientes permitiéndoles realizar sus actividades diarias normales y reanudar su trabajo. No obstante, los resultados observados, aunque alentadores necesitan ser confirmados más a fondo en un estudio clínico controlado a doble ciego para garantizar que la mejora de las condiciones de salud de los pacientes es también significativas y consistentes en una población más amplia de pacientes con LD tardía o crónica, y corroborada por una evaluación clínica más profunda. Sólo entonces, se podrá llegar a una conclusión más segura sobre la eficacia de esta composición en humanos. Quizás se puedan observar más beneficios para la salud con un aumento de la dosis y un mayor tiempo de ingesta de la composición. Sin embargo, como indica el estudio el ajuste de la dosis debe hacerse de forma gradual. Este estudio también reveló que aquellos pacientes con poca o ninguna mejoría deben ser sometidos a un diagnóstico adicional para detectar infecciones acompañantes y disfunción neurológica para excluir la falta de respuesta como la razón.

En resumen, este estudio documentó la eficacia de la ingesta oral de una composición compuesta por seis agentes biológicamente activos derivados de plantas en un modelo animal de LD y en pacientes voluntarios con LD tardía o crónica. Otros estudios que investigan su eficacia como complemento del tratamiento con antibióticos así como en un entorno clínico controlado más amplio entorno clínico controlado, parece ser razonable y merece un mayor estudio. Además, cabe mencionar que los compuestos utilizados en nuestro estudio *in vivo* alcanzaron 90-95% de pureza, aunque las pruebas adicionales realizadas por nosotros mostraron una pureza similar o incluso mayor pureza y la ausencia de antibióticos y antiinflamatorios agentes relevantes en el tratamiento de la LD. Sin embargo la presencia de pequeñas cantidades de residuos podría ser influyente y afectar de forma limitada a los resultados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Cathy Flowers y a Waldemar Sumera por sus valiosas aportaciones durante la preparación del el manuscrito.

Contribuciones de los autores

AG concibió, diseñó y realizó los experimentos *in vivo*, analizó los datos, redactó el artículo y fue el principal responsable del contenido final; GG y HB diseñaron y realizaron el estudio en humanos, validaron y tuvieron la responsabilidad principal del contenido final; AN y MR validaron, escribieron el artículo y fueron los principales responsables del contenido final. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito.

Financiación

Los autores declararon haber recibido apoyo financiero para la investigación, la autoría y/o la publicación de este artículo: Los fondos fueron proporcionados por la fundación sin ánimo de lucro Dr. Rath Health Foundation, una entidad independiente del Instituto de Investigación Dr. Rath BV.

Declaración de conflicto de intereses

AN es miembro de la Dr. Rath Health Foundation y no recibe ingresos de la misma. Los patrocinadores fundadores no tuvieron ningún papel en el estudio diseño, la realización, la recogida y el análisis de datos la decisión de publicar, o la preparación/escritura del manuscrito. No se declara ningún conflicto de intereses

ORCID iD

Anna Goc  <https://orcid.org/0000-0001-8736-2941>

Material Complementario

El material complementario de este artículo está disponible en línea.

References

1. Shapiro ED. Lyme disease. *N Engl J Med* 2014; 370: 1724–1731.
2. Stricker RB and Johnson L. Lyme disease: the next decade. *Infect Drug Resist* 2011; 4: 1–9.
3. Anderson JF, Magnarelli LA, Burgdorfer W, et al. Spirochetes in *Ixodes dammini* and mammals from Connecticut. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 818–824.
4. Dryden MW and Hodgkins E. Vector-borne diseases in pets: the stealth health threat. *Compend Contin Educ Vet* 2010; 32: E1–E4.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease website, <http://www.cdc.gov/lyme/>. (2014, accessed 13 September 2014)
6. Robinson S. Lyme disease in Maine: a comparison of NEDSS surveillance data and Maine health data organization hospital discharge data. *Online J Public Health Inform* 2014; 5: e231.
7. Strle F, Wormser GP, Mead P, et al. Gender disparity between cutaneous and non-cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *PLoS One* 2013; 8: e64110.
8. Murray TS and Shapiro ED. Lyme disease. *Clin Lab Med* 2010; 30: 311–328.
9. Arvikar SA and Steere AC. Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29: 269–280.
10. Steere AC, Sikand VK, Schoen RT, et al. Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 528–532.
11. Klempner MS, Baker PJ, Shapiro ED, et al. Treatment trials for post-Lyme disease symptoms revisited. *Am J Med* 2013; 126: 665–669.
12. Fallon BA, Keilp JG, Corbera KM, et al. A randomized, placebo-controlled trial of repeated IV antibiotic therapy for Lyme encephalopathy. *Neurology* 2008; 70: 992–1003.
13. Brorson O and Brorson SH. Grapefruit seed extract is a powerful in vitro agent against motile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection* 2007; 35: 206–208.
14. Goc A, Niedzwiecki A and Rath M. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of phytochemicals and micronutrients against *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. *J Appl Microbiol* 2015; 119: 1561–1572.
15. Goc A and Rath M. The anti-borreliae efficacy of phytochemicals and micronutrients: an update. *Ther Adv Infect Dis* 2016; 3: 75–82.
16. Theophilus PA, Victoria MJ, Socarras KM, et al. Effectiveness of *Stevia Rebaudiana* whole leaf extract against the various morphological forms of *Borrelia burgdorferi* in vitro. *Eur J Microbiol Immunol* 2015; 5: 268–280.
17. Goc A, Niedzwiecki A and Rath M. Synergistic anti-borreliae efficacy of a composition of naturally-occurring compounds: an *in vitro* study. *J Nutr Biol* 2019; 5: 350–363.
18. Labandeira-Rey M and Skare JT. Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1. *Infect Immun* 2001; 69: 446–455.
19. Van Laar TA, Hole C, Rajasekhar Karna SL, et al. Statins reduce spirochetal burden and modulate immune responses in the C3H/HeN mouse model of Lyme disease. *Microbes Infect* 2016; 18: 430–435.
20. Han WK, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; 62: 237–244.
21. Lavrik IN, Golks A and Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115: 2665–2672.
22. Gordon S, Hamann J, Lin HH, et al. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2472–2476.
23. Stricker RB and Fesler MC. Chronic Lyme disease: a working case definition. *Am J Infect Dis* 2018; 14: 1–44.
24. Feng J, Auwaerter PG and Zhang Y. Drug combinations against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline. *PLoS One* 2015; 10: e0117207.
25. Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, et al. The outer surface proteins of Lyme disease borrelia spirochetes stimulate T cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 453–460.
26. Pahl A, Kühlbrandt U, Brune K, et al. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1958–1963.

27. Yang L, Weis JH, Eichwald E, *et al.* Heritable susceptibility to severe *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis is dominant and is associated with persistence of large numbers of spirochetes in tissues. *Infect Immun* 1994; 62: 492–500.
28. Wu Q, Liu Z, Wang J, *et al.* Pathogenic analysis of *Borrelia garinii* strain SZ isolated from northeastern China. *Parasit Vectors* 2013; 6: 177–183.
29. Strother KO, Hodzic E, Barthold SW, *et al.* Infection of mice with Lyme disease spirochetes constitutively producing outer surface proteins A and B. *Infect Immun* 2007; 75: 2786–2794.
30. Iyer R, Mukherjee P, Wang K, *et al.* Detection of *Borrelia burgdorferi* nucleic acids after antibiotic treatment does not confirm viability. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 857–862.
31. Hodzic E, Feng S, Holden K, *et al.* Persistence of *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1728–1736.
32. Bradley JF, Johnson RC and Goodman JL. The persistence of spirochetal nucleic acids in active Lyme arthritis. *Ann Int Med* 1994; 120: 487–489.
33. Giambartolomei GH, Dennis VA, Lasater BL, *et al.* Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14. *Infect Immun* 1999; 67: 140–147.
34. Yang LM, Ma Y, Schoenfeld R, *et al.* Evidence for lymphocyte-B mitogen activity in *Borrelia burgdorferi*-infected mice. *Infect Immun* 1992; 60: 3033–3041.
35. Tai KF, Ma Y and Weis JJ. Normal human B lymphocytes and mononuclear cells respond to the mitogenic and cytokine-stimulatory activities of *Borrelia burgdorferi* and its lipoprotein OspA. *Infect Immun* 1994; 62: 520–528.
36. Berende A, Oosting M, Kullberg BJ, *et al.* Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21: 7–18.
37. Liang FT, Brown EL, Wang T, *et al.* Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *Am J Pathol* 2004; 165: 977–985.
38. Priem S, Burmester GR, Kamradt T, *et al.* Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 118–121.
39. Kvasnicka HM, Thiele J and Ahmadi T. Bone marrow manifestation of Lyme disease (Lyme Borreliosis). *Br J Haematol* 2003; 120: e723.
40. Berndtson K. Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *Int J Gen Med* 2013; 6: 291–306.
41. Bockenstedt LK, Mao J, Hodzi E, *et al.* Detection of attenuated, non-infectious spirochetes after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi*-infected mice. *J Infect Dis* 2002; 186: 1430–1437.
42. Preac-Mursic V, Pfister HW, Wilske B, *et al.* Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibiotically treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 1989; 17: 355–359.
43. Schmidli J, Hunziker T, Moesli P, *et al.* Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. *J Infect Dis* 1988; 158: 905–906.
44. Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, *et al.* Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 111–116.
45. Embers ME, Barthold SW, Borda JT, *et al.* Persistence of *Borrelia burgdorferi* in rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection. *PloS One* 2012; 7: e29914.
46. Kadam P, Gregory NA, Zelger B, *et al.* Delayed onset of the Jarisch-Herxheimer reaction in doxycycline-treated disease: a case report and review of its histopathology and implications for pathogenesis. *Am J Dermatopathol* 2015; 37: e68–e74.
47. Marques A, Telford SR, Turk SP, *et al.* Xenodiagnosis to detect *Borrelia burgdorferi* infection: a first-in-human study. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 937–945.
48. Bockenstedt LK, Gonzalez DG, Haberman AM, *et al.* Spirochete antigens persist near cartilage after murine Lyme borreliosis therapy. *J Clin Invest* 2012; 122: 2652–2660.
49. Krupp LB, Hyman LG, Grimson R, *et al.* Study and treatment of post Lyme disease (STOP-LD): a randomized double masked clinical trial. *Neurology* 2003; 60: 1923–1930.
50. Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, *et al.* Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: an experimental study. *J Infect Dis* 2002; 181: 1069–1081.
51. Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day post-infection period. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2191–2199.