

CESAR AUGUSTO BRANDÃO ARÃO

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-BORRELIA E  
ANTI-BABESIA EM SORO DE DOADORES DE SANGUE

CAMPO GRANDE-MS, 2007

CESAR AUGUSTO BRANDÃO ARÃO

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-BORRELIA E  
ANTI-BABESIA EM SORO DE DOADORES DE SANGUE

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA  
MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE REDE CENTRO-  
OESTE, CONVÊNIO UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS E UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO  
GROSSO DO SUL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Orientador: Prof. Dr. Izaías Pereira da Costa

Coordenador Geral: Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz

Coordenador Regional: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

CAMPO GRANDE-MS, 2007

**Arão, Cesar Augusto Brandão.**

Pesquisa de anticorpos anti-borrelia e anti-babesia em soro de doadores de sangue. – Campo Grande, 2007.  
xviii. 83 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa Multinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Rede Centro- Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

The Lyme diseases and babesiosis.....study in people.

1. Borrelia. 2. Babesia. 3. Doadores de Sangue.

A Monografia Intitulada Pesquisa de Anticorpos Anti-Borrelia e Anti-Babesia em Soro de Doadores de Sangue, apresentada pelo acadêmico Cesar Augusto Brandão Arão, como Exigência Parcial ao Programa Multinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Rede Centro- Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve o Conceito \_\_\_\_\_, para aprovação.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Izaías Pereira da Costa

---

Prof. Dr. Natalino H. Yoshinari

---

Prof. Dr. Tatsuya Sakuma

Campo Grande MS, de Junho 2007.

Dedico aos meus pais, esposa e filho, cujo amor e apoio foram essenciais para a produção desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primordialmente à Deus, pelas bênçãos derramadas durante toda minha vida;

Ao Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa pela dedicação, sugestões e valiosos ensinamentos laboratoriais que muito contribuíram para a realização desta tese;

À Dra. Érika Naka pelo constante apoio e incentivo na realização desse trabalho;

Ao Prof. Natalino H. Yoshinari, Professor Livre Docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, responsável pelo Laboratório de Imunologia (LIM17) da FMUSP, por gentilmente ter cedido a cepa G39/40 da *Borrelia burgdorferi* sensu stricto;

A todos do laboratório LIM-17, Virgínia, Elenice, Mariana e Guilherme pelo inestimável auxílio e paciência na execução das análises sorológicas.

Aos colegas Dr. Osnei Okumoto, diretor da Hemorede-MS e Dra. Marina Sawada, chefe do setor de laboratório do Hemosul-MS pela colaboração em permitir o acesso aos dados dos doadores pesquisados;

Ao Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares e Prof. Dr. Cláudio Roberto Madruga, pesquisadores da EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande-MS, por gentilmente ter cedido o antígeno da *Babesia bovis*. cujos valiosos ensinamentos laboratoriais e sugestões muito contribuíram para a realização desta tese;

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, Coordenador Regional do Programa de Pós-Graduação, pela seriedade, dedicação e competência na condução do programa;

À diretoria da EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande-MS por colocar à disposição o Laboratório de Sanidade Animal para a capacitação em imunodiagnóstico;

À FUNDECT- Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelos recursos financeiros liberados para a viabilização e realização deste projeto, conforme processo nº405/02;

À minha amada Carla pelo amor, paciência e apoio em todos os momentos de angústia e ansiedade.

Ao meu filho João Pedro, cuja alegria e sorriso não me deixam desistir de sonhar;

A meus pais pela educação ministrada e por todo amor demonstrado nos momentos onde não parecia haver mais esperança;

Aos meus irmãos Adalberto, Simone e Renata pelo amor e apoio recebido durante todo esse período;

Aos meus tios Lenine e Irene pela demonstração de amor e carinho em todos os momentos dessa jornada;

À minha tia Lenice pelo amor, orações e conselhos nas horas de ansiedade e desânimo;

Aos Tenentes e Oficiais superiores farmacêuticos do LAC do HGeCG pela amizade, estímulo e substituição das atividades para o cumprimento dos créditos do mestrado e realização da pesquisa;

Às residentes Cláudia e Tulia pela colaboração na seleção dos pacientes para a pesquisa;

À Vera, secretária do Programa de Pós-Graduação pela colaboração e atenção prestadas;

*O que sabemos é a gota.  
O que ignoramos é o oceano.*

**Isaac Newton**



## RESUMO

A doença de Lyme e a babesiose são zoonoses emergentes de importância sócio-econômica para o país, sendo necessária a caracterização epidemiológica e laboratorial. Este trabalho tem como objetivo reconhecer indivíduos portadores assintomáticos através da pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelos métodos de ELISA e Western blotting e anti-*Babesia bovis* pelo método de ELISA em soro de cento e quinze doadores de sangue sadios do banco de sangue do Hemosul em Campo Grande-MS. Utilizaram-se como substratos antigênicos, sonicados totais da *B. burgdorferi* sensu stricto (cepa americana G39/40) e da *B. bovis*. Positividade para anticorpos anti-*B. burgdorferi* ocorreu em 7,8% das amostras analisadas pelo ELISA. Todos os resultados positivos identificados por esta técnica foram confirmados pelo Western blotting. Para anticorpos anti-*Babesia bovis* uma prevalência de 10,4% foi verificada. Concomitância dos anticorpos foi observada em dois (1,73%) dos cento e quinze doadores pesquisados. Os resultados obtidos neste estudo são um indicativo da ampla distribuição desses agentes em nossa região e da possibilidade de haver casos humanos sem sintomatologia. Assim, ressaltamos a importância de se realizarem mais estudos clínico-laboratoriais e epidemiológicos em nosso estado, o que possibilitará uma maior compreensão da interação entre essas duas zoonoses em nosso ambiente.

Palavras-Chave: *Borrelia*, *Babesia* e Doadores de Sangue.

## ABSTRACT

The Lyme diseases and babesiosis are emerging zoonosis with socio-economic importance to the country, and it is necessary the laboratorial and epidemiological characterization. This study has the aim of recognizing asymptomatic individuals through the research of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies using the method of ELISA and Western blotting and anti-*Babesia bovis* by ELISA in the serum of one hundred and fifteen blood donors of Hemosul in Campo Grande-MS. It has been used as antigen, whole sonicated of *B. burgdorferi* sensu stricto (american strain G39/40) and from *B. bovis*. Positivity was observed for the antibodies to *Borrelia burgdorferi* in 7,8% of the samples analyzed by ELISA. All the positive results identified by this technique were confirmed by Western blotting. For anti-*Babesia bovis* antibodies a prevalence of 10,4% was verified. Concomitance of the two antibodies was observed in two (1,73%) of the one hundred and fifteen donors researched. The results observed in this study indicate the widespread distribution of these agents in our region and the possibility of existing human cases without symptoms. This way, we stand out the importance of carrying out more clinico-laboratorial and epidemiological studies in our State, which will make possible a better understanding of the interaction between these two zoonosis in our environment.

Key words: borrelia, babesia and blood donors

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Ixodes</i> spp. – fêmea adulta .....	08
Figura 2: <i>Amblyomma cajennense</i> encontrado na Reserva Biológica da FUFMS, em Campo Grande- MS (Foto gentilmente cedida pelo Prof.Dr. Izaias Pereira da Costa).....	09
Figura 3: Ciclo biológico do carrapato com os quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto.	10
Figura 4: <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	13
Figura 5: Eritema migratório crônico .....	19
Figura 6: <i>Babesia microti</i> - coloração Giemsa .....	40
Figura 7: <i>Babesia</i> spp. - forma em tétrede .....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado do ELISA para <i>Borrelia burgdorferi</i> em doadores de sangue .....	54
Tabela 2- Títulos detectados para <i>Borrelia burgdorferi</i> – IgM pelo ELISA .....	55
Tabela 3- Títulos detectados para <i>Borrelia burgdorferi</i> – IgG pelo ELISA.....	55
Tabela 4- Frequência de anticorpos da classe IgM e IgG para <i>B. burgdorferi</i> (ELISA) em pacientes doadores de sangue .....	55
Tabela 5- ELISA e Western blotting para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	56
Tabela 6 - Resultado do ELISA para <i>Babesia bovis</i> em doadores de sangue .....	56
Tabela 7 - Títulos detectados para <i>Babesia bovis</i> – IgM pelo ELISA .....	57
Tabela 8 - Títulos detectados para <i>Babesia bovis</i> – IgG pelo ELISA .....	57
Tabela 9 - Frequência de anticorpos da classe IgG e IgM para <i>B. bovis</i> (ELISA) em pacientes doadores de sangue .....	57
Tabela 10 - Resultado do ELISA para coexistência de anticorpos contra <i>Borrelia burgdorferi</i> e <i>Babesia bovis</i> em doadores de sangue .....	58
Tabela 11 - Soros reagentes pelo ELISA para <i>Borrelia burgdorferi</i> e <i>Babesia bovis</i> .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

ACA	<i>Acrodermatite Crônica Atrófica</i>
Acs	<i>Anticorpos</i>
Ag	<i>Antígeno</i>
BH	<i>Babesiose Humana</i>
BL	<i>Borreliose de Lyme</i>
BSK	<i>Barbour-Stoenner-Kelly</i>
CDC	<i>Centers For Disease Control And Prevention</i>
DEET	<i>Dietil Toluamida</i>
DL	<i>Doença de Lyme</i>
DLS	<i>Doença de Lyme Símile</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DO	<i>Densidade Óptica</i>
ELISA	<i>Enyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	<i>Eritema Migratório</i>
EMBRAPA	<i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</i>
EMC	<i>Eritema Migratório Crônico</i>
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FR	<i>Fator Reumatóide</i>
HC-FMUSP	<i>Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo</i>
HEMOSUL	<i>Centro de Hematologia e Hemoterapia de Mato Grosso do Sul</i>
IFI	<i>Imunofluorescência Indireta</i>
IgG	<i>Imunoglobulina G</i>
IgM	<i>Imunoglobulina M</i>
IL-1 $\beta$	<i>Interleucina -1 beta</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>

<b>LB</b>	<i>Linfocitoma Borreliano</i>
<b>LFA-1</b>	<i>Lymphocyte Function Associated Antigen-1</i>
<b>mg</b>	<i>Miligrama</i>
<b>OMS</b>	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
<b>Osp</b>	<i>Outer Surface Protein</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PBST</b>	<i>Phosphate Buffered Saline Tween</i>
<b>PCR</b>	<i>Protein Chain Reaction</i>
<b>PNPP</b>	<i>Para-Nitro-Fenil-Fosfato</i>
<b>SIRLS</b>	<i>Síndrome Infecto Reacional Lyme Símile</i>
<b>SNC</b>	<i>Sistema Nervoso Central</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Fator de Necrose Tumoral alfa</i>
<b>TRIS</b>	<i>Hydroxymethyl aminomethane hydrochloride</i>
<b>UFMS</b>	<i>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul</i>
<b>WB</b>	<i>Western-blotting</i>
<b>°C</b>	<i>Graus centígrados</i>
<b><math>\mu</math>m</b>	<i>Micrômetro</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 BORRELIOSE DE LYME.....	04
2.1.1 Histórico da doença .....	04
2.1.2 Epidemiologia e distribuição mundial .....	07
2.1.3 Transmissão e vetores.....	08
2.1.4 Hospedeiros/reservatórios.....	11
2.1.5 Sobre a borrelia .....	13
2.1.5.1 Biologia da borrelia.....	13
2.1.5.2 Caracterização antigênica e genética .....	14
2.1.6 Patogenia .....	15
2.1.6.1 Transmissão da <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	15
2.1.6.2 Infecção localizada.....	16
2.1.6.3 Infecção disseminada .....	16
2.1.7 Quadro clínico .....	18
2.1.7.1 Fase primária .....	19
2.1.7.2 Fase secundária.....	20
2.1.7.3 Fase terciária (infecção tardia).....	23
2.1.7.4 Outras manifestações .....	25
2.1.8 Diagnóstico laboratorial.....	25
2.1.8.1 Métodos diretos .....	26
2.1.8.1.1 Cultura .....	26
2.1.8.1.2 Coloração e imunohistoquímica.....	27
2.1.8.1.3 PCR (“Polymerase Chain Reaction”).....	27
2.1.8.2 Método indiretos.....	28
2.1.8.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI) .....	29
2.1.8.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	30
2.1.8.2.3 Western blotting (WB) .....	31
2.1.8.3 Critério diagnóstico DL no Brasil.....	32
2.1.9 Tratamento .....	34
2.1.10 Prevenção .....	35
2.2 BABESIOSE.....	36
2.2.1 Vetores e hospedeiros .....	36
2.2.2 Babesiose humana .....	38
2.2.3 Diagnóstico laboratorial.....	40
2.2.4 Tratamento .....	42
2.3 CO-INFECÇÃO.....	43

3 OBJETIVOS.....	45
3.1 GERAL.....	45
3.2 ESPECÍFICOS.....	45
4 SUJEITOS E MÉTODOS.....	46
4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES.....	46
4.1.1 Critérios de inclusão.....	46
4.1.2 Critérios de exclusão.....	46
4.2 COLETA DE AMOSTRAS E EXAMES COMPLEMENTARES.....	47
4.3 TIPO DE PESQUISA E PERÍODO.....	47
4.4 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> IgG E IgM PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA).....	48
4.4.1 Antígeno utilizado.....	48
4.4.2 Execução do ELISA indireto.....	48
4.5 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> IgG E IgM PELO WESTERN BLOTTING.....	50
4.5.1 Execução da eletroforese.....	50
4.5.2 Execução do Western blotting.....	50
4.6 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>BABESIA BOVIS</i> IgG E IgM PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA).....	51
4.6.1 Antígeno utilizado.....	51
4.6.2 Execução do ELISA indireto.....	52
5 RESULTADOS.....	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES.....	54
5.2 RESULTADOS DOS EXAMES SOROLÓGICOS.....	54
5.2.1 ELISA para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	54
5.2.2 Western blotting para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	55
5.2.3 ELISA para <i>Babesia bovis</i> .....	56
5.2.4 Coexistência de anticorpos anti- <i>Borrelia</i> e anti- <i>Babesia</i> em doadores de sangue pelo ELISA.....	58
5.2.5 Implantação do serviço de diagnóstico laboratorial da borreliose de Lyme e outras enfermidades emergentes intercorrentes e transmitidas por carrapatos, como a babesiose, no Hospital Universitário da UFMS.....	60
6 DISCUSSÃO.....	61
6.1 RESULTADOS DA SOROLOGIA PARA <i>BORRELIA BURGENDORFERI</i> .....	61
6.2 RESULTADOS DA SOROLOGIA PARA <i>BABESIA BOVIS</i> .....	63
6.3 CO-INFECÇÃO <i>BORRELIA</i> E <i>BABESIA</i> .....	66
6.4 ESTABELEÇER O SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA BORRELIOSE DE LYME E OUTRAS ENFERMIDADES EMERGENTES INTERCORRENTES E TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS, COMO A BABESIOSE, NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFMS.....	67
7 CONCLUSÃO.....	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70



# 1. INTRODUÇÃO

A Borreliose de Lyme (BL) é uma doença de caráter multissistêmico, com ampla distribuição geográfica<sup>11</sup>, transmitida aos humanos, animais silvestres e domésticos, primariamente através da picada de carrapatos do gênero *Ixodes*, cujos agentes etiológicos são diferentes espécies do gênero *Borrelia*, denominadas de *Borrelia burgdorferi sensu lato*<sup>1,56</sup>.

É uma enfermidade infecciosa emergente de distribuição mundial, e pelo menos três genoespécies podem causar doença no homem: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*. Nos Estados Unidos da América (EUA), a *Borrelia burgdorferi sensu stricto* é o principal agente etiológico. Na Europa, embora todas as três espécies sejam encontradas, a maioria dos casos é relacionada à *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*, e somente essas duas espécies parecem ser as responsáveis pela doença na Ásia.<sup>2,3</sup> Apesar da distribuição dessa zoonose ser universal, a bactéria ainda não foi isolada na América do Sul, África e Austrália.

A diversidade etiológica e antigênica das borrelias explica o organotropismo e a distribuição geográfica específica para cada espécie condicionando o aparecimento de quadros clínicos distintos em diferentes áreas do globo, como o predomínio de queixas articulares e cutâneas nos EUA, e das neurológicas na Europa e Ásia.<sup>4,15,52,61</sup>

Das diversas borrelios descritas, a BL constitui-se na principal zoonose (antropozoonose). Sua importância tem se tornado cada vez maior pelo fato de ser uma zoonose emergente e também, devido à associação com outros hemopatógenos como *Babesia spp.*, *Ehrlichia spp.* e alguns arbovírus.<sup>5,6,7,8,80,129,143</sup>

Além dos animais silvestres (roedores, marsupiais, canídeos, aves, murídeos, cervídeos e outros), sabe-se que animais domésticos (cachorros, cavalos e ovelhas) e bovinos, constituem os principais reservatórios da borrelia e que, além de desenvolverem a infecção, transportam os carrapatos até o homem.<sup>80</sup>

Do ponto de vista clínico a BL pode ser distribuída por três fases evolutivas com a abrangência de um largo espectro de manifestações clínicas, fundamentalmente

dermatológicas, neurológicas, reumatológicas e cardíacas.<sup>15,52,83</sup> Caracterizada por extremo polimorfismo clínico, a BL tem sido freqüentemente comparada a outras doenças causadas por espiroquetas, como a sífilis, que também evolui em fases, acometendo a pele, articulações, coração e sistema nervoso central (SNC) e periférico.<sup>36</sup>

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no seu relatório do Workshop sobre a Doença de Lyme (DL) -1993,<sup>11</sup> o diagnóstico desta borreliose deve ser baseado no quadro clínico, nos dados epidemiológicos e no estudo sorológico para a confirmação da doença. No Brasil, recentemente, desenvolveram-se técnicas para a confirmação laboratorial<sup>12</sup> e também foram estabelecidos os critérios diagnósticos,<sup>45</sup> o que tem permitido um melhor conhecimento da DL em nosso país, facilitando a identificação de pacientes com manifestações clínicas.

O diagnóstico laboratorial da BL consiste na presença de anticorpos (Acs) específicos presentes no soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR), identificados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto ou Western blotting (WB). A técnica da IFI não confere bons resultados devido a reações cruzadas altas;<sup>13</sup> o ELISA e o WB são as técnicas mais utilizadas por serem as mais sensíveis e específicas.<sup>9,40,89</sup>

A Babesiose é uma zoonose com ampla distribuição mundial causada por hemoprotozoários do gênero *Babesia*. É transmitida por picada de carrapatos e acomete animais silvestres, domésticos e ocasionalmente o homem. Já foram descritas mais de setenta espécies de babesia em animais: *Babesia bovis*, *Babesia divergens* e *Babesia bigemina* em gado; *Babesia caballi* em cavalos; *Babesia canis* em cães; *Babesia microti* em roedores.<sup>16,123,124,126</sup>

Várias espécies de *Babesia* spp. têm sido descritas infectando humanos (*B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*) e a infecção ocorre acidentalmente por picada de carrapato ou por transfusão sanguínea.<sup>16,128</sup>

Para o diagnóstico de *Babesia* spp., o ELISA possui as melhores características de sensibilidade e especificidade; no entanto, em casos de dúvida, a confirmação pode ser realizada por WB.<sup>19</sup>

A co-infecção em humanos de borrelias e babesias pode resultar em várias complicações por um longo período de tempo. As principais manifestações clínicas incluem fadiga, dor de cabeça, anorexia, conjuntivite e esplenomegalia.<sup>16</sup>

Coexistência de anticorpos para babesiose humana (BH), ehrlichiose e borreliose tem sido observada em soros de pacientes de áreas de risco para essas enfermidades sem, contudo, haver necessariamente reações cruzadas. Este fenômeno é pertinente, pois roedores e grandes mamíferos são reservatórios dos agentes dessas enfermidades que, muitas das vezes, possuem o mesmo vetor.<sup>5,6,7,8,79,80,129,143</sup>

O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta todas as condições favoráveis de clima, fauna e flora para a presença e disseminação dessas zoonoses. A intensa atividade agropecuária, o convívio do homem com animais domésticos e a valorização de atividades ao ar livre favorecem a disseminação de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, propiciando o surgimento e ressurgimento de diferentes agentes etiológicos.

Diante disso, e percebendo que as zoonoses ocupam cada vez mais um lugar de destaque na saúde coletiva, este trabalho se mostra como uma importante ferramenta para o melhor entendimento, caracterização e diagnóstico dessas zoonoses em nosso Estado.

Trata-se de um estudo aplicado para o Estado, bem como para outras regiões do globo (regiões de clima tropical e subtropical) sendo, portanto, um estudo que permitirá o conhecimento da soroprevalência da BL em sangue de humanos sadios em nossa região, sua correlação com a babesiose e estabelecer medidas preventivas. Outro aspecto importante é o de estabelecer um serviço de diagnóstico laboratorial especializado em Doença de Lyme-símile no Hospital Universitário da UFMS uma vez que atualmente, as amostras para testes sorológicos são enviadas para o laboratório de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 BORRELIOSE DE LYME

#### 2.1.1 Histórico da doença

Antes mesmo da identificação do agente etiológico da BL, as diferentes manifestações clínicas da doença já haviam sido descritas desde o início do século passado. Em 1883, Buchwald descreveu uma atrofia difusa de pele com caráter idiopático, que em 1902, Harxheimer e Hartman denominaram acrodermatite atrófica crônica (ACA).<sup>20</sup> Afzelius, em 1910, correlacionou a picada de carrapatos com lesões eritematosas migratórias na pele; mas coube a Lipschutz, em 1913, introduzir o termo eritema migratório crônico (EMC), pela lesão manifestar-se durante mais de sete meses.<sup>21,22</sup>

Em 1922, Garin e Bujadoux,<sup>23</sup> e mais tarde Bannwarth,<sup>23</sup> descreveram um quadro de meningopolirradiculonevrite, posteriormente conhecido por síndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth,<sup>23</sup> hoje considerada uma forma típica de neuroborreliose recente.

O primeiro caso de EMC registrado nos EUA foi no ano de 1969, em um médico que havia sido picado por carrapatos em Wisconsin. Posteriormente, quatro novos casos foram relatados em Connecticut em 1975, mas os pacientes não recordavam terem sido picados por artrópodes.<sup>51</sup>

Mas foi Allen C. Steere, em 1977, quem descreveu a doença ao observar um grupo de crianças residentes em Lyme, Connecticut-EUA, com sintomas similares à artrite reumatóide juvenil. A doença, caracterizada por *rash* cutâneo e artrite, foi denominada de “artrite de Lyme”.<sup>24,25</sup>

O modo de transmissão da doença foi confirmado em 1982, quando Burgdorfer et al., identificaram espiroquetas em carrapatos da espécie *Ixodes dammini* e associaram a descoberta com a “artrite de Lyme” descrita por Steere em 1977. Logo depois, as mesmas bactérias foram isoladas em meio Barbour–Stoenner–Kelly (BSK) a partir de sangue, líquido e pele de pacientes com “artrite de Lyme”.<sup>26</sup> Posteriormente, Russel Johnson et al. incluíram essa espiroqueta no gênero *Borrelia*<sup>27</sup> e o microorganismo isolado recebeu a designação de *Borrelia burgdorferi*.

Na década de 90, estabeleceram-se as diferenças de manifestações clínicas da doença nos diversos continentes.<sup>28,29</sup> Os sinais, predominantemente neurológicos, em pacientes europeus foram relacionados com a *B. garinii*<sup>28</sup> e, ainda na Europa, *B. afzelii*<sup>30</sup> foi implicada nos casos de ACA.<sup>15</sup> Nos EUA, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, é a responsável pela predominância de quadros articulares.<sup>4,56,90</sup>

Na América do Sul, manifestações clínicas similares à DL e associadas com picadas de carrapatos têm sido relatadas na Argentina, Bolívia e Brasil.<sup>31</sup>

No Brasil, suposições clínicas foram realizadas inicialmente por Tahari et al.<sup>31</sup> e Filgueira.<sup>32</sup> Posteriormente, Azulay et al.<sup>33</sup> também relataram casos da doença associada a manifestações cutâneas.

Em 1989, Yoshinari et al.,<sup>34</sup> sugeriram a possibilidade de ocorrência da DL no país, dada a presença de carrapatos Ixodídeos na natureza, e iniciaram pesquisa com a formação de uma equipe multidisciplinar para a realização de estudos epidemiológicos de campo e estudos clínico ambulatorial. Essa equipe também realizou estudos sorológicos e padronizou o diagnóstico laboratorial empregando, como substrato, a *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana.

Em 1993, Yoshinari et al.,<sup>35</sup> identificaram os dois primeiros casos da DL no Brasil, confirmados por sorologia, em duas crianças que apresentaram ECM e foram picados por carrapato na cidade de Itapevi-SP.

A partir de 1993, Yoshinari e Barros<sup>36</sup> relataram novos casos de DL no Brasil, reconheceram a primeira área de risco para a doença em nosso país (Cotia-SP), preconizaram ser a técnica de WB a de melhor auxílio para o diagnóstico, utilizando a *B. burgdorferi* como substrato, apesar de não ter sido possíveis, ainda, o isolamento e a caracterização do agente etiológico.<sup>41,66</sup>

No ano de 1996, foram relatados os três primeiros casos clínicos da DL no Mato Grosso do Sul, incluindo a primeira ocorrência de meningite de Lyme no Brasil,<sup>37</sup> cuja amostra de líquido do paciente apresentou reatividade à imunoglobulina da classe IgM contra a proteína 66 kDa da *Borrelia burgdorferi* pelo WB. No mesmo ano, Pirana et al.,<sup>38</sup> em São Paulo, descreveram a associação da DL com paralisia facial e surdez súbita.

Em 1997, Yoshinari et al.,<sup>12</sup> traçaram o perfil clínico e laboratorial da DL no Brasil. Em uma análise prospectiva de 25 pacientes, constatou-se que na fase aguda da doença (n=15) o acometimento cutâneo ocorreu em 92% dos casos, o acometimento neurológico em 72,2% e as manifestações articulares em 55,5% dos pacientes. A sorologia na fase aguda foi positiva em apenas 38,8% dos pacientes pelo método de ELISA; 33,33% para IgM e 5,55% para IgG. Todos os casos positivos pelo ELISA foram confirmados pelo WB.

Em 1998, em Mato Grosso do Sul, foram identificados possíveis reservatórios e vetores dessa borreliose na região, com a visualização de espiroquetídeos semelhantes ao gênero *Borrelia* spp. em cultura de amostras de sangue de animais silvestres (marsupiais e roedores) e de macerado de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp.. Nesse mesmo estudo, 16 pacientes com manifestações clínicas típicas da DL apresentaram positividade para anticorpos contra a *Borrelia burgdorferi* sensu lato através de ELISA e WB.<sup>40,41</sup>

A partir de 1999, a DL no Brasil é denominada DL Símile, em decorrência de particularidades epidemiológicas, microbiológicas e clínicas em relação a DL descrita nos EUA.<sup>42</sup>

Barros<sup>43</sup> em 2000, em tese de doutorado, demonstrou que pacientes com DL no Brasil apresentam um padrão de resposta diferente para produção de Acs IgM e IgG anti-*Borrelia*. Esse perfil sorológico difere do padrão de reatividade do WB postulado pelo CDC (*Center for Diseases Control* - Atlanta) para a DL nos EUA,<sup>44</sup> sugerindo a existência de um agente etiológico diferente no país.

Atualmente, Yoshinari et al.<sup>45</sup> propuseram a denominação de Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (SIRLS), uma vez que, em nosso país, a enfermidade é distinta e com característica de síndrome, devido possivelmente a presença de agentes etiológicos diferentes - microorganismos “latentes” constituídos de *Mycoplasmas*, *Chlamydias* e espiroquetídeos não definidos - observados laboratorialmente, causando manifestações clínicas semelhantes a DL clássica. A apresentação clínica da doença é multiforme e, embora a etiologia inicial seja

infecciosa, existem evidências de manifestações clínico-laboratoriais de ordem alérgica e auto-imune.

## 2.1.2 Epidemiologia e distribuição mundial

A crescente distribuição mundial dessa doença que há pouco mais de duas décadas atrás era ainda desconhecida, tornou essa enfermidade numa das infecções emergentes mais preocupantes da atualidade. Atualmente, desconhece-se o verdadeiro número de casos de BL no mundo.<sup>46</sup>

Nos EUA, a DL é a doença mais comum transmitida por vetores e sua distribuição corresponde à dos carrapatos do gênero *Ixodes*. Em áreas endêmicas, a incidência excede 100 casos por 100.000 habitantes.<sup>47</sup>

Em 1992, mais de 90% das doenças transmitidas por vetores nos EUA eram casos de BL,<sup>47</sup> declarados em quarenta e cinco Estados com base nos critérios diagnósticos estabelecidos pelo programa de vigilância do CDC. As regiões do nordeste (Massachusetts a Maryland), do interior norte (Wisconsin e Minnesota) e a costa oeste (Califórnia e Oregon) mantêm-se as mais afetadas.<sup>48,49</sup>

Desde que o CDC, em 1982, começou a monitorar os casos de BL nos EUA, o número de casos registrados tem aumentado regularmente naquele país. Nos anos recentes, mais de 20.000 casos tem sido registrados anualmente.<sup>50</sup>

Na Europa a doença é referida na maioria dos países, com uma incidência de vários milhares de casos por ano.<sup>52</sup> A maioria dos casos ocorre nos países Escandinavos e nos da Europa Central – particularmente Alemanha, Áustria, Eslovênia e Suécia.<sup>53</sup> Em um workshop da WHO de 1995, a incidência da doença foi estimada em 120 casos por 100.000 habitantes na Eslovênia e 130 casos por 100.000 residentes na Áustria,<sup>53</sup> frequência similar a de Connecticut-EUA.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a atividade alimentícia do carrapato determina um claro padrão sazonal da doença no hemisfério norte, em geral de maio a novembro. Essa distribuição sazonal se relaciona com o período de aparecimento das manifestações clínicas mais comuns da BL, o EMC e as desordens neurológicas.<sup>47</sup>

Pessoas de qualquer faixa etária e de ambos os sexos podem ser afetadas, mas uma incidência um pouco maior em crianças em relação aos adultos foi encontrada em alguns estudos.<sup>54</sup>

Diversos grupos de risco têm sido identificados, abrangendo os indivíduos mais expostos a picada por carrapatos, particularmente em áreas endêmicas. Incluem-se nesses grupos: trabalhadores rurais e pessoas que realizam atividades ao ar-livre nas imediações de matas e florestas.<sup>55</sup>

### 2.1.3 Transmissão e vetores

BL é uma zoonose e o homem adquire a infecção pela transmissão de espiroquetas do gênero *Borrelia* através da picada de carrapatos infectados da família *Ixodidae* (Figura 1). As espécies identificadas como principais vetores da DL são os *Ixodes scapularis* (*I. dammini*) e *Ixodes pacificus* nos EUA, *Ixodes ricinus* na Europa e *Ixodes persulcatus* no oeste da Europa e Ásia.<sup>56</sup>



Figura 1: *Ixodes* spp. - fêmea adulta

Outra espécie de carrapatos da família *Ixodidae*, denominada *Amblyomma americanum*, foi citada como potencial vetor da *Borrelia lonestari*, agente etiológico da Doença de Lyme-símile (DLS) no sul dos EUA.<sup>57</sup>



Carrapatos das espécies *Ixodes loricatus*, *Ixodes didelphidis* e *Amblyomma cajennense* são os vetores habitualmente coletados em animais silvestres provenientes de áreas de ocorrência da doença no Brasil. Acredita-se que os carrapatos do gênero *Ixodes* sejam os responsáveis pela perpetuação da infecção nos reservatórios, pois não costumam picar o homem e que os do gênero *Amblyomma* seriam os potenciais transmissores da doença aos humanos, uma vez que realiza repasto sanguíneo em vários hospedeiros, incluindo o homem.<sup>12,40,58,59</sup>

Na região Centro-Oeste, em estudo realizado em Mato Grosso do Sul, foram identificados espiroquetídeos semelhantes ao gênero *Borrelia* spp. em cultura de amostras de animais silvestres e de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp..<sup>40,41</sup> Nesse mesmo estudo, verificou-se a ausência de carrapatos do gênero *Ixodes* naquela região, fortalecendo a idéia de que carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* (Figura 2), coletados sobre os animais silvestres daquela localidade, seja o principal vetor transmissor da SIRLS.



Figura 2: *Amblyomma cajennense* encontrado na Reserva Biológica da FUFMS, em Campo Grande-MS (Foto gentilmente cedida pelo Prof.Dr. Izaias Pereira da Costa)

A transmissão das espiroquetas parece se dar por intermédio da regurgitação da saliva pelo carrapato durante o contato com o hospedeiro. No momento da transmissão, a saliva do carrapato exerce ainda ações farmacológicas, como o bloqueio de células fagocitárias e inflamatórias, facilitando a penetração e disseminação do patógeno.<sup>60</sup> A picada desses carrapatos é frequentemente indolor, em parte devido à secreção de enzimas, que destroem os mediadores da inflamação.<sup>62</sup>

Vários fatores têm sido associados com o risco de transmissão das borrelias aos humanos; como a concentração de vetores presentes no local, do estágio dos mesmos e da concentração e biodisponibilidade dos reservatórios naturais em cada localidade.<sup>62</sup>

A probabilidade de infecção depende diretamente do tempo de alimentação do carrapato no hospedeiro, assim em um período menor que 24 horas de alimentação, a transmissão é incomum, sendo necessário cerca de 48 horas para transmissão da bactéria. Portanto, a pronta remoção do carrapato logo após o seu attachment, diminui o risco de infecção.<sup>62</sup> Além disso, o risco da transmissão da doença mesmo quando o homem é picado pelo carrapato contaminado é inferior a 5%, explicando o fato da BL ocorrer em surtos endêmicos.

Outro fator relacionado à transmissão de borrelias é a temperatura ambiente em que vive o carrapato. A temperatura elevada é deletéria para muitas espécies de espiroquetas, dada sua influência no metabolismo, no balanço hídrico e no processo digestivo do vetor.<sup>63,64</sup> A atividade alimentícia do carrapato não ocorre, a menos que a umidade esteja suficientemente alta e a temperatura entre 23° e 27°C.

Todas as espécies de *Ixodes* têm um ciclo biológico semelhante, com passagem por quatro fases distintas: ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 3). A duração média deste ciclo é de três anos. Durante a sua vida os carrapatos fazem apenas três refeições em três hospedeiros que podem, ou não, ser da mesma espécie.<sup>64,65,67</sup>

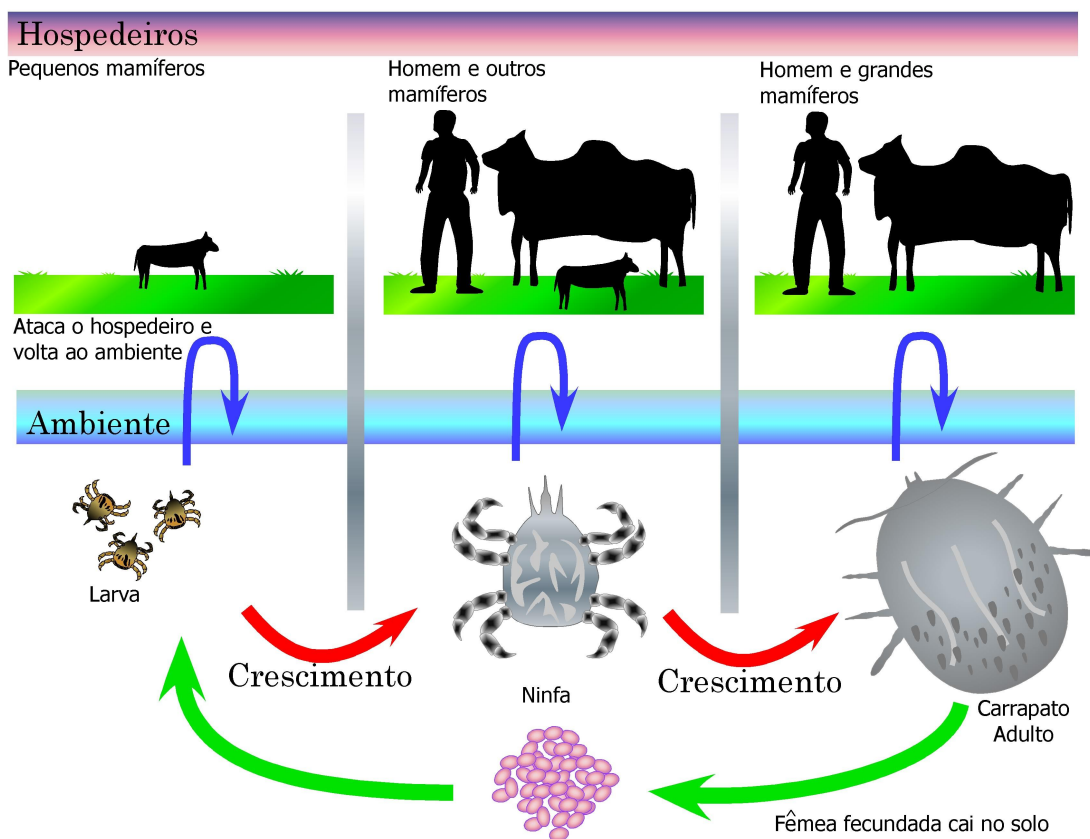


Figura 3: Ciclo biológico do carrapato com os quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto

Os ovos são depositados pelas fêmeas e evoluem para larvas em seis a oito semanas e, então realizam sua primeira alimentação, geralmente em pequenos mamíferos. Já no estágio de ninfa, que ocorre após aproximadamente um ano depois da alimentação da fase larval, é feita a segunda refeição em pequenos mamíferos, em outros animais de porte maior ou no homem. Após alguns meses, quando se tornam adultos buscam animais maiores para se alimentarem, e o homem é novamente um dos seus alvos, completando sua terceira refeição.<sup>65,66</sup>

A fêmea adulta, a seguir à última refeição, que é feita depois da cópula, efetua, em uma ou mais ovoposições, uma postura de várias centenas a vários milhares de ovos, cujo período de incubação varia de semanas a meses.<sup>67</sup>

Estudos realizados nos EUA demonstraram que os *Ixodídeos*, no estágio de ninfa, são responsáveis pela maioria dos casos de DL.<sup>1,63,66</sup>

A infestação humana é possível em todas as estações do ano e em todas as fases do carrapato, mas no desenvolvimento da infecção as ninfas têm um papel preponderante, pois devido ao seu tamanho reduzido (aproximadamente do tamanho de uma semente de papoula) não são notadas, não sendo por isso prontamente removidas antes de realizarem a transmissão das espiroquetas.<sup>65</sup>

Embora o principal modo de transmissão da borrelia seja por carrapatos, outras formas de aquisição da doença, como a transfusão sangüínea e transplacentária podem ser discutidas.<sup>1</sup>

#### 2.1.4 Hospedeiros/reservatórios

A *Borrelia burgdorferi* pode infectar animais silvestres e domésticos, os quais apresentam um risco maior em adquirir o agente etiológico porque são parasitados por um grande número de carrapatos. Em áreas endêmicas, a *B. burgdorferi* sensu lato tem sido encontrada em animais assintomáticos, servindo de reservatórios.<sup>68</sup>

Um hospedeiro, para atuar como bom reservatório deve, entre outros fatores, ser abundantemente infestado por carrapatos, além de ser capaz de permanecer infectado, não desenvolvendo imunidade contra os espiroquetídeos, fato que parece ser fundamental no ciclo de transmissão natural destas bactérias.<sup>70</sup>

No nordeste e região centro-norte dos EUA, os hospedeiros preferidos das fases larvais e de ninfa do *I. scapularis* são pequenos roedores, particularmente o rato-de-patas-brancas e o *Peromyscus leucopus*.<sup>69</sup>

Na Europa, ainda há debate sobre o hospedeiro animal preferido do *I. ricinus*.<sup>71</sup> Lá, várias espécies de pequenos mamíferos tais como ratos, camundongos, esquilos e mussaranhos, e um número grande de pássaros têm se mostrado competentes reservatórios para espécies de borrelia. Pequenos roedores são importantes reservatórios para *B. afzelii*, enquanto pássaros estão fortemente associados com *B. garinii*.<sup>53,71</sup>

As aves atuam como disseminadoras de carrapatos no meio ambiente. Estudos demonstraram que elas podem ser infectadas experimentalmente pela *B. burgdorferi* através da picada de carrapatos contaminados, sendo competentes reservatórios das espiroquetas.<sup>72</sup>

No Brasil, vários estudos demonstraram que os gambás (marsupiais) podem participar na epidemiologia da DL, pois espiroquetas com características morfológicas de *Borrelia* spp. foram observadas em sangue periférico desses animais.<sup>40,41,58,59,73</sup>

Nos animais silvestres, a infecção geralmente é assintomática, mas nos animais domésticos como caninos, eqüinos e bovinos pode causar a doença clínica. Animais domésticos, além de contraírem a infecção, atuam como transportadores de vetores para o ambiente peridomiciliar.<sup>73,74,80</sup>

Estudos soroepidemiológicos têm sido conduzidos no mundo inteiro para determinação da prevalência de anticorpos contra *B. burgdorferi* sensu lato em cães e da importância destes animais na epidemiologia dessa doença.<sup>75,76,78</sup> O conhecimento da soroprevalência em cães pode constituir-se em um importante indicador da dispersão do agente etiológico, bem como indicar o risco de exposição humana.

Em cães, a infecção é usualmente assintomática. Entretanto podem ser observados sinais envolvendo o sistema músculo-esquelético, com quadro de artrite progressiva. Atualmente, cães são considerados animais sentinelas para a BL, cuja prevalência correlaciona-se positivamente com aquela verificada em seres humanos, na mesma área.<sup>77,78</sup>

A BL em ruminantes tem sido assinalada na América do Norte, na Europa e os estudos soroepidemiológicos demonstram que animais positivos, em sua maioria, são assintomáticos,<sup>39,81</sup> apesar da soroprevalência nos EUA chegar a 66%. Estudos na região sudeste do Brasil revelaram positividade acima de 50%.<sup>39,81</sup>

## 2.1.5 Sobre a borrelia

### 2.1.5.1 Biologia da borrelia

As bactérias do gênero *Borrelia* pertencem, juntamente com as espiroquetas do gênero *Treponema* e *Leptospira*, à ordem das *Spirochaetales*, um grupo caracterizado por vigoroso movimento e formato em espiral.<sup>82</sup>

As borrelíias são bactérias gram-negativas que não vivem em água, terra ou plantas, partilhando antes a necessidade de um hospedeiro que alterna entre vertebrados e artrópodes hematófagos.<sup>83</sup> Essas bactérias distinguem-se morfológicamente das leptospiras e os treponemas, por serem maiores e por possuírem um número maior de flagelos periplasmáticos e uma quantidade menor de espiras.<sup>82</sup>

Das espécies de borrelia, *B. burgdorferi* (Figura 4) é a mais comprida (20 a 30  $\mu\text{m}$ ) e a mais estreita (0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$ ). No plano ultra-estrutural, *B. burgdorferi* se parece com outras espiroquetas do gênero *Borrelia*, sendo constituída por um cilindro protoplasmático, e por uma túnica externa trilaminar, envolvida exteriormente por uma camada de peptidoglicano. Em cada extremidade da bactéria inserem-se sete a catorze flagelos que se cruzam na região central, designados endoflagelos ou flagelos periplasmáticos.<sup>84</sup> O principal componente estrutural do flagelo é a flagelina, uma proteína de 41-kDa.



FIGURA 4: *Borrelia burgdorferi*

*B. burgdorferi* são bactérias fastidiosas, que crescem melhor em atmosfera microaerófila à temperatura de 33°C-34°C em um complexo meio líquido chamado Barbour-

Stoenner-Kelly (BSK). O crescimento bacteriano é lento, com um tempo de duplicação de 12 à 24h. O crescimento da *B. Burgdorferi* é bastante lento quando comparado com o de outras bactérias, fato que condiciona o longo período de incubação até o aparecimento da primeira manifestação clínica. *In vitro*, vai perdendo sua patogenicidade após sucessivas passagens.<sup>84</sup>

#### 2.1.5.2 Caracterização antigênica e genética

Da caracterização fenotípica e genotípica das diferentes cepas de *B. Burgdorferi sensu lato* foram identificadas, até o momento, onze novas espécies,<sup>85</sup> das quais só três são reconhecidas como sendo patogênicas para o homem: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* e *B. afzelii*. Todas três são encontradas na Europa, diferentemente dos EUA, onde somente a *B. burgdorferi sensu stricto* é reconhecida como causadora de infecções em humanos.

A heterogeneidade observada nos quadros clínicos da BL entre os EUA e a Europa parece ser resultante de diferenças observadas entre as cepas isoladas nos dois continentes relativamente à morfologia, proteínas de superfície externa, plasmídeos e homologia ao DNA.<sup>84</sup>

*B. burgdorferi* (cepa B31) foi a primeira espiroqueta que teve o seu genoma completamente seqüenciado. Ela tem um pequeno cromossomo linear que é inferior a 1 Mb e está entre os menores cromossomos bacterianos conhecidos. Possui ainda, nove plasmídeos circulares e doze lineares que somados, constituem 40% do seu DNA. A presença de plasmídeos lineares é uma exclusividade do gênero *Borrelia* e contribuem para a maior parte do DNA extra-cromossômico.<sup>84,85</sup>

Observou-se que os genes que codificam as proteínas de superfície OspA e OspB se localizam num plasmídeo linear. Também foi verificado que a diminuição da infecciosidade da bactéria está associada à perda de plasmídeos.<sup>84</sup>

A membrana externa da *B. burgdorferi* contém várias proteínas (Osps): OspA de 30 a 32 kDa, OspB de 34 kDa e OspC, de 23 kDa. Estas proteínas exercem um papel importante para o diagnóstico laboratorial e em funções biológicas – induzindo a ativação policlonal de linfócitos B e a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais.<sup>86</sup>

*B. burgdorferi* sensu lato possui ainda uma proteína fundamental de natureza endoflagelar, com cerca de 41 kDa,<sup>84</sup> cuja homologia significativa com antígenos endoflagelares de outros espiroquetídeos, particularmente o *Treponema pallidum*, justifica parcialmente a existência de reações cruzadas entre estes microorganismos. Essa proteína é a primeira contra a qual se formam anticorpos no decurso da doença, enquanto a reatividade contra as proteínas de superfície Osp A e Osp B só se manifesta, e de forma irregular, em fases tardias, já de cronicidade.

O genoma da *B. burgdorferi* codifica poucas proteínas com reconhecida atividade biosintética; por conseguinte, a bactéria parece depender do hospedeiro para a maioria de suas necessidades nutricionais. Uma característica muito incomum da *B. burgdorferi* é que ela não requer ferro, pelo menos para crescimento *in vitro*.<sup>88</sup> Seu genoma também não codifica nenhuma toxina reconhecível. Em vez disso, *B. burgdorferi* causa infecções pela migração através de tecidos, adesão a células hospedeiras, e evasão do sistema imune.

## 2.1.6 Patogenia

### 2.1.6.1 Transmissão da *Borrelia burgdorferi*

*B. burgdorferi* se adapta aos diversos ambientes no carrapato e nos mamíferos durante seu ciclo biológico, em parte pela expressão seletiva de genes. Estudos demonstraram que a *B. burgdorferi* muda sua expressão antigênica de superfície em resposta a resposta imune do hospedeiro. A modificação mais marcante ocorre quando a *B. burgdorferi* migra do carrapato para o mamífero durante a refeição do vetor. Esta passagem, envolve o aumento e a diminuição da expressão certos de genes que codificam proteínas de superfície externa (Osps). A OspA tem sua expressão diminuída, e a OspC tem sua expressão aumentada na superfície celular, já que a expressão da OspC pela bactéria é necessária para a infecção no hospedeiro mamífero.<sup>87</sup>

A bactéria geralmente habita o terço médio do intestino do carrapato, migrando na maioria das vezes para as suas glândulas coxais e é injetada juntamente com a saliva quando este parasita um mamífero.<sup>82</sup>

### 2.1.6.2 Infecção localizada

Após penetrarem a pele, onde são inoculadas no momento da picada, as espiroquetas, embora sendo bactérias predominantemente extra-celulares, invadem as células endoteliais e penetram os tecidos. Ocorre, então, primeiramente uma multiplicação da bactéria localizada no sítio da picada. Depois de um período de incubação de 3 a 32 dias, surge o EMC no local da picada.<sup>69</sup>

Dependendo da espécie de borrelia e do hospedeiro, a lise mediada pelo sistema de complemento pode ser a primeira linha de defesa do hospedeiro.<sup>27</sup> Como parte da resposta imune inata, macrófagos ativados pelas lipoproteínas da espiroqueta e por outros sinais, iniciam a produção de citocinas pro-inflamatórias, especialmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Macrófagos englobam e degradam as espiroquetas em compartimentos intracelulares.<sup>83</sup> Dentro de dias após o início da doença, a maioria dos indivíduos apresentam Abs da classe IgM em resposta a OspC ou a proteína flagelar de 41-kDa. Assim, tanto a resposta imune inata como a adaptativa participam na luta contra a infecção.

### 2.1.6.3 Infecção disseminada

Dentro de dias a semanas depois do início da infecção, a bactéria freqüentemente se dissemina para vários outros tecidos e órgãos. Para se propagar, *B. burgdorferi* liga-se a certas proteínas do hospedeiro. Três classes distintas de moléculas (integrinas, proteoglicanas e glicoproteínas) foram caracterizadas como receptores para espiroquetas. Da mesma maneira que nos carrapatos, a dispersão desses agentes através das matrizes teciduais pode ser facilitada pela ligação do plasminogênio e seus ativadores à superfície da bactéria.<sup>69</sup>

A despeito da ativação da resposta imune, *B. burgdorferi* pode sobreviver durante a disseminação pela troca ou minimização da expressão antigênica das proteínas de superfície e também pela inibição de certas respostas hospedeiras imunes importantes. *B. burgdorferi* pode diminuir a expressão de certas lipoproteínas em resposta ao sistema imune do hospedeiro.<sup>87</sup>



Demonstrou-se em modelos murinos que ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, são requeridas para um ótimo controle da disseminação da infecção. A combinação dessas respostas leva à produção de anticorpos contra muitos componentes da bactéria,<sup>89</sup> que promovem a morte da espiroqueta pelo sistema complemento e opsonização.

Apesar das respostas imunológicas do hospedeiro aos múltiplos antígenos, e da pronta instituição da terapêutica antibiótica, *B. burgdorferi* sensu lato pode estabelecer uma infecção persistente, sendo certo que uma pequena fração de indivíduos irá progredir para a cronicidade.<sup>69</sup>

A membrana externa da *B. burgdorferi* contém várias características que acentuam a evasão imune. A membrana possui poucas proteínas integrais. Múltiplos genes codificam famílias de lipoproteínas altamente homólogas, que contribuem para a diversidade antigênica. Várias dessas proteínas, incluindo OspA até OspF, são expressas diferentemente e podem diminuir sua expressão durante a infecção.<sup>69,87</sup> Assim, a bactéria minimiza ou troca sua expressão antigênica de proteínas e inibe certas respostas imunes do hospedeiro.

Sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos surgem dois tipos de teorias.<sup>69</sup> [1] a doença resulta de um processo auto-imune induzido pelo próprio espiroquetídeo, desencadeando mecanismos que continuariam a agredir o organismo muito tempo depois da sua erradicação; [2] a doença crônica é apenas reflexo da infecção persistente, sabendo-se que nos doentes têm sido isolados microorganismos semanas a anos após a infecção, a partir da pele, líquido, tecido e líquido sinoviais, olhos, miocárdio e sangue.

Quanto à capacidade de evasão de *B. burgdorferi* sensu lato aos Acs, a variabilidade antigênica da sua superfície e a secreção de uma glicoproteína, cobrindo e encapsulando o microorganismo, impediriam seu reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro e bloquearia a penetração antibiótica, mas está também demonstrada a sobrevivência paradoxal do espiroquetídeo no interior dos próprios macrófagos do hospedeiro.<sup>82</sup>

Por outro lado, a resistência das cepas bacterianas à destruição pelas células fagocitárias parece relacionar-se com a sua capacidade infectante, e a resistência à via alterna do complemento explicaria parcialmente a disseminação de espiroquetídeos nos tecidos.<sup>84</sup> Quanto ao desenvolvimento de artrite crônica, parece dever-se em grande medida à liberação de interleucina-1 (IL-1) pelos macrófagos, induzida por *B. burgdorferi* sensu lato ou pelos seus produtos bacterianos (lipoproteínas, lipopolissacarídeos, e peptidoglicano).

Observações experimentais demonstraram também a influência da susceptibilidade do hospedeiro tanto na disseminação rápida e persistência de elevado número de espiroquetídeos nos tecidos, como na ausência de resposta à antibioticoterapia. Com efeito, constata-se nos doentes norte-americanos um terreno imunogenético próprio, associado a especificidades alélicas que parecem determinar a evolução para formas crônicas de artrite,<sup>56</sup> justificando, pelo menos em parte, o maior número de casos de reumatismo verificados nesta população e que não se confirma nos doentes europeus.<sup>52</sup>

### 2.1.7 Quadro clínico

Do ponto de vista clínico, a DL, à semelhança do que ocorre com a sífilis, geralmente evolui em estágios, com remissões, exacerbações, e diferentes manifestações clínicas a cada fase. Sintomas envolvendo a pele, o sistema nervoso e as articulações são os principais tipos de desordens dessa doença. Consideram-se habitualmente três fases clínicas:<sup>51,67</sup> fase primária ou de infecção localizada; fase secundária, ou de infecção disseminada recente; e fase terciária, de doença crônica.

A natureza básica da doença é similar no mundo inteiro, mas há variação regional, primariamente entre a doença encontrada nos EUA da achada na Europa e Ásia.<sup>4</sup> Essa variação estaria relacionada com a distribuição geográfica das espécies de borrelias patogênicas aos homens e aos seus respectivos organotropismos. Assim, nos EUA há o predomínio de manifestações articulares; e na Europa, o predomínio é de sintomas cutâneos e neurológicos.<sup>25</sup> Na Ásia, a manifestação é basicamente cutânea.<sup>69,90</sup>

No Brasil, observa-se a presença de manifestações clínicas clássicas da DL, como o EMC e complicações articulares, neurológicas e cardíacas.<sup>10,12,37,41,42</sup> Raros casos de linfocitoma benigno e lesões cutâneas em placas que lembram esclerodermia, também já foram notados.<sup>10,91</sup>

Apesar da presença de todas as manifestações clínicas da DL clássica, a doença no Brasil distingui-se pela grande frequência de recorrência, especialmente nos pacientes medicados tardiamente na fase inicial da doença.<sup>45</sup>

### 2.1.7.1 Fase primária

O estágio primário é caracterizado pelo surgimento de uma lesão eritematosa de crescimento centrífugo denominado eritema crônico migratório (EMC). O EMC (Figura 5) é o mais importante e freqüente sinal clínico da doença.<sup>4,25</sup> Ocorre no local da picada do carrapato após um período de incubação de três a trinta e dois dias.<sup>4,61</sup>



FIGURA 5: Eritema migratório crônico

A lesão inicia-se tipicamente como uma mácula ou pápula eritematosa que sofre uma expansão, em dias ou semanas, à medida que as espiroquetas se espalham centrifugamente pela pele.<sup>25,86</sup> Forma-se uma lesão anular de diâmetro superior a cinco centímetros, cujo centro pode sofrer um clareamento parcial com o crescimento da lesão. Menos comumente, o centro da lesão pode apresentar-se vesicular ou necrótico.<sup>36</sup> Na maioria das vezes assume aspecto circular, podendo apresentar variações morfológicas, como a forma triangular, ovalada ou alongada.<sup>42</sup>

Nos EUA, o EMC surge no local da picada em 70 – 80% dos pacientes.<sup>25,56</sup> Contudo, devido ao pequeno tamanho da ninfa do carrapato, a maioria dos pacientes não noticia ou se recorda da picada do vetor. Nos doentes americanos, o EMC é usualmente assintomático, mas pacientes também o descrevem como sendo de um início pruriginoso ou doloroso. Costuma ser acompanhado de sintomas inespecíficos como: fadiga, febre, cefaléas, mialgias dentre outros.<sup>83</sup> O EMC é menos freqüentemente associado a *B. garinii* ou *B. afzelii*, espécies encontradas na Europa.<sup>52</sup>

O EMC acomete pessoas de qualquer idade ou sexo. Nos adultos, localiza-se geralmente nas pernas, na região inguinal e nos pés; e nas crianças, na parte superior do

corpo.<sup>52</sup> O EMC regride espontaneamente em quatro a dez semanas, porém estão relatadas evoluções tão longas quanto seis até doze meses.

A correta identificação dessa lesão pode estabelecer o diagnóstico clínico da DL, não necessitando sequer de confirmação histológica. No entanto, a história prévia de picada de carrapato e a resposta à terapêutica podem ser dados complementares úteis.<sup>4,25</sup>

Em cerca de 50-75% dos casos nessa fase, a sorologia é negativa.<sup>56</sup> *B. burgdorferi* sensu lato já foi identificada nas lesões de EM pela técnica de PCR.

No Brasil, já foram verificadas todas as formas de acometimento cutâneo, incluindo o EMC, observadas na DL.<sup>37</sup> Não se sabe a frequência de pacientes que iniciam o quadro com EMC, em nosso país, mas quando presente, a lesão de pele aguda surge em média após 10,8 dias após a picada do carrapato e tem duração média entre 3 a 90 dias.<sup>45</sup>

#### 2.1.7.2 Fase secundária

Durante essa fase, que corresponde a um período de generalização, e resulta simultaneamente da disseminação hematogênica das espiroquetas e da reação imunológica do hospedeiro, pode ocorrer o desenvolvimento outras manifestações clínicas; que decorrem essencialmente de alterações neurológicas, articulares, cutâneas e cardíacas.<sup>67</sup> O conseqüente envolvimento de múltiplos órgãos leva ao aparecimento de diversos quadros clínicos, isolados ou em sobre-posição.<sup>25</sup>

Manifestações neurológicas podem ocorrer semanas, meses ou anos posteriores ao início da doença. Meningite linfocítica, radiculoneurite motora e sensorial, neuropatia craniana, particularmente a paralisia facial, que pode ser bilateral, são as anormalidades neurológicas mais comuns da fase secundária.<sup>52</sup> Cerca de 10% dos pacientes não tratados desenvolvem neuroborreliose crônica, às vezes, após longos períodos de infecção latente tornando o diagnóstico difícil.<sup>92</sup>

A meningite da borreliose geralmente cursa com cefaléia de intensidade variável, nuchalgia e sinais meníngeos discretos ou ausentes. O líquido mostra pleocitose linfocítica, nível de glicose normal ou levemente reduzido e concentração de proteínas normal ou pouco elevada, podendo se assemelhar a uma meningite viral.<sup>52</sup> Imunoglobulinas específicas contra

*Borrelia burgdorferi* podem ser produzidas intratecalmente. Há descrição de isolamento da própria bactéria no líquido.<sup>4</sup>

Meningites decorrentes da sífilis, tuberculose, doenças fúngicas e viroses podem revelar citologia no líquido semelhantes, e especialmente no caso da sífilis, encontro de altas frequências de Acs contra a *B. burgdorferi* tanto no líquido como no sangue.<sup>91</sup>

O acometimento do sistema nervoso é mais freqüente na Europa que nos EUA, possivelmente devido ao grande neurotropismo da *B. garinii*, que não é encontrada na América do Norte. Na Europa, a *B. garinii* tem sido isolada principalmente a partir do líquido de doentes com neuroborreliose<sup>52</sup> e pode causar uma encefalomielite crônica com paraparesia espástica, neuropatia dos nervos cranianos ou alterações cognitivas. Nos EUA, *B. burgdorferi* sensu stricto desencadeia um comprometimento menos severo no SNC<sup>2</sup> e está presente em cerca de 15% dos pacientes.

No Brasil, o envolvimento neurológico na SIRLS é observado em 25% dos pacientes, não havendo diferenças clínicas com pacientes do hemisfério norte.<sup>45</sup> Meningite linfocitária e neurites cranianas periféricas estão entre as principais manifestações nervosas observadas nesse país.<sup>12,37,38</sup>

O quadro reumatológico dessa fase, que representa cerca de 60% dos pacientes não tratados, é comumente descrito como “artrite de Lyme” e consiste de mono ou oligoartrite.<sup>93</sup> O joelho é a articulação mais envolvida, embora possa acometer qualquer outra.<sup>4,25</sup> A história prévia de picada de carrapato ou de EMC é valorosa para um diagnóstico inequívoco de “artrite de Lyme”.

Embora as características clínicas da “artrite de Lyme” sejam fundamentalmente similares na Europa e EUA, é neste último que se encontram as maiores manifestações articulares, já que a genoespécie lá encontrada – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto é eminentemente artrítogênica.<sup>4</sup> A “artrite de Lyme” é o sinal clínico mais freqüente da disseminação sistêmica da DL nos EUA.<sup>4,93</sup>

Mesmo não sendo tratada, a artrite pode regredir espontaneamente dentro de alguns dias a poucas semanas. Alguns pacientes podem desenvolver sinovite crônica, com um ano ou mais de evolução.<sup>37</sup>

Pacientes com “artrite de Lyme” apresentam uma grande quantidade de Acs em resposta aos múltiplos antígenos da espiroqueta.<sup>89</sup> Raramente se isola *B. burgdorferi* do

líquido sinovial sendo a detecção de DNA bacteriano por PCR nessa localidade o teste mais sensível.<sup>94</sup>

No Brasil, a artrite ocorre em cerca de 30% dos casos de disseminação precoce, e envolve particularmente joelho com freqüente associação de queixas de mialgia e fadiga crônica.<sup>45</sup> Percentagem semelhante foi verificada por Costa et al. ao descrever o perfil clínico da DLS no Estado de MS.<sup>41</sup> Também nesse Estado, Naka em dissertação de mestrado no ano de 2006, ao caracterizar o perfil clínico e epidemiológico da SIRLS em crianças, identificou manifestações articulares em 78% dos pacientes que apresentaram positividade para a pesquisa de Acs anti-*B. burgdorferi*.<sup>143</sup>

As manifestações cardíacas foram, pela primeira vez, descritas no contexto da DL por Steere et al. em 1980.<sup>95</sup> A cardite de Lyme é uma manifestação secundária da BL e é observada em cerca de 8% dos pacientes não tratados dentro semanas ou meses após o início da infecção. A ocorrência mais comum é o bloqueio átrio-ventricular de diferentes graus.<sup>4,86,96</sup> Alguns casos de pericardite, disfunção de ventrículo esquerdo, e raramente cardiomegalia já foram descritos.<sup>96</sup>

Na Europa, a *B. burgdorferi* já foi isolada de biópsias endomiocárdicas de pacientes com cardiomiopatia crônica dilatada.<sup>97</sup>

No Brasil, o acometimento cardíaco na SIRLS foi verificado em aproximadamente 5% dos pacientes estudados, com relato de casos de arritmia e cardiomegalia.<sup>45</sup>

As dermatoses características dessa fase incluem os eritemas anulares secundários e uma ou mais lesões de linfocitoma borreliano (LB).<sup>67</sup>

Após um período de vários dias ou semanas depois do começo da lesão primária do EMC, a infecção, quando não tratada adequadamente, pode disseminar-se levando ao surgimento de novas lesões semelhantes à inicial, mas usualmente menores, sem relação com o local da picada anterior e com centros mais claros denominados de eritemas anulares secundários.<sup>11</sup>

O LB é uma lesão nodular endurecida, avermelhada e indolor e é uma manifestação da DL que tem sido definida como acometimento da fase secundária (infecção disseminada precoce), mas pode também ocorrer diretamente no local da picada do carrapato, sendo considerado como infecção localizada (fase primária). Esta lesão ocorre quase exclusivamente na Europa e está associada com a infecção por *B. afzelii* e *B. garinii*.<sup>86</sup>

O LB acomete principalmente crianças e com predileção pelos lóbulos das orelhas.<sup>98</sup> Nos adultos a localização mais habitual é na região do mamilo. Não raramente é precedido pelo EMC ou concomitantemente com este, o qual se localiza então nas mesmas áreas.<sup>98</sup>

Títulos séricos elevados de Acs específicos anti-*B. burgdorferi* sensu lato são encontrados em mais da metade dos doentes com LB.<sup>85</sup>

### 2.1.7.3 Fase terciária (infecção tardia)

As manifestações tardias da DL ocorrem mais de um ano após a infecção. Assim, após um período de latência de meses ou anos, a doença evolui para a fase tardia, caracterizada por manifestações crônicas, persistentes, graves e de prognóstico reservado.<sup>51</sup>

Esse estágio é caracterizado em nível cutâneo pela ACA, notadamente marcada pelo aspecto esclerodérmico da pele. Esta afecção surge em particular nos doentes idosos e com um predomínio pelo sexo feminino, embora também se observe em crianças.<sup>4,36</sup> É descrita em 10% dos pacientes com DL. Ocorre quase que exclusivamente na Europa por ser causada geralmente pela *B. afzelii*.<sup>4,99</sup>

Inicia-se como uma lesão edematosa vermelho-azulada, usualmente sobre uma extremidade, mais comumente sobre a perna ou pé. Há variações entre a intensidade do eritema e do edema presentes.<sup>36</sup> Progridem lenta e incidiosamente e no início da fase inflamatória o eritodema pode evoluir por surtos. Nódulos fibrosos podem formar-se junto às articulações. A progressão gradual para as lesões cutâneas atróficas pode demorar anos. A pele torna-se então translúcida, atrófica com aparência enrugada, evidenciando os vasos subcutâneos.<sup>99</sup>

Complicações extra-cutâneas do sistema neurológico ou esquelético podem ocorrer. A maioria dos doentes com ACA sofre neuropatia periférica, geralmente sensitiva, que é normalmente ligeira ou moderada e em cerca de 20% dos doentes a artrite do joelho precede ou ocorre simultaneamente.<sup>93</sup>

O diagnóstico clínico de ACA pode ser suportado por achados histopatológicos e sorológicos. Ocorre elevação sorológica dos títulos de Acs específicos da classe IgG em cerca de 70% dos pacientes com ACA.<sup>89</sup> O isolamento e identificação de *B. burgdorferi* sensu lato a partir destas lesões confirma o diagnóstico.

Lesões cutâneas com aspecto de esclerodermia em placa (morfea) são também descritas, de forma isolada sem a presença da ACA.<sup>100</sup>

No Brasil, não há relato de ACA,<sup>10,45</sup> mas Costa et al., em 1998,<sup>40</sup> descreveram dois pacientes que evoluíram com lesão de pele semelhante à esclerodermia, confirmados através de biópsia de pele, que mostrou aumento no depósito de colágeno na derme.

Em relação ao acometimento articular, nessa fase, cerca de 10% dos pacientes evoluem para artrite crônica erosiva, com proliferação sinovial e erosões da cartilagem articular e do osso subcondral.<sup>93,101</sup> Um ou ambos joelhos estão acometidos em dois terços dos pacientes.<sup>41</sup>

Esses casos de artrite crônica poderiam ser explicados pela indução de auto-imunidade, já que uma similaridade entre uma parte específica da Osp A e a proteína LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*), molécula de adesão expressa em algumas células T sinoviais já foi encontrada.<sup>102</sup>

O envolvimento neurológico inclui diferentes síndromes com um polimorfismo acentuado.<sup>51</sup> Cerca de 15% dos doentes não tratados convenientemente, na fase mais precoce da doença, evoluem com acometimento do SNC ou periférico.<sup>41</sup>

Nessa fase, cerca de 48% dos doentes norte-americanos, apresentam um tipo de encefalopatia que tem como sintomas fadiga intensa associada à perda de memória e de capacidades intelectuais, alterações de sono e no humor e por vezes perturbações sutis na linguagem, que se revelam reversíveis após terapêutica.<sup>92</sup>

No estágio terciário, a DL pode mimetizar desordens auto-imunes como a doença reumatóide, esclerose múltipla e a esclerose lateral amiotrófica. O diagnóstico laboratorial da DL nestas situações é quase impossível, pois é alta a frequência de sorologias falso-positivos nessas condições clínicas.<sup>4</sup>

No Brasil, as manifestações crônicas são de difícil diagnóstico devido a interferência nos exames sorológicos para a identificação de Acs específicos contra *B. burgdorferi* sensu stricto promovidas por desordens auto-imunes que frequentemente estão presentes nessas condições clínicas.<sup>45</sup>



#### 2.1.7.4 Outras manifestações

Quadros de miosite e miosite nodular focal já foram associados à DL. Estes quadros podem ser concomitantes com lesões de ACA e morfea.<sup>52</sup>

Alterações oculares na BL são raras e resultam da inflamação dos tecidos como conjuntivite, ceratite, iridociclite e neuropatia óptica.<sup>4</sup>

Em uma pequena percentagem dos pacientes com o diagnóstico de DL pode ocorrer o desenvolvimento de uma síndrome denominada Pós-Lyme. Esta síndrome consiste na persistência de queixas após terapia antibiótica adequada e é caracterizada por sintomas não-específicos como mialgias, fadiga crônica, cefaléia, déficits cognitivos, artrite oligoarticular e parestesias ou disestesias das extremidades.<sup>103</sup>

A causa dessa síndrome permanece ainda desconhecida e não é muito comum em crianças. Uma das teorias a propósito da patogenia desta síndrome sugere que a *B. burgdorferi* poderia desencadear processos imunológicos ou neuro-hormonais no cérebro e que causariam dor persistente, déficits cognitivos, ou fadiga, apesar da erradicação da espiroqueta pela terapia antibiótica.<sup>4</sup> Entre os doentes de Lyme, uma história anterior de depressão ou ansiedade parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da DL crônica.

#### 2.1.8 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da BL é baseado primariamente em achados clínicos, com base num enquadramento epidemiológico e suportado pelos testes laboratoriais. Embora o EMC e a ACA constituam os marcadores mais característicos da doença,<sup>26</sup> essas lesões típicas podem não estar presentes, além do próprio quadro clínico ser muitas vezes sobreponível a outras infecções de etiologia infecciosa. Desta maneira, o recurso dos testes laboratoriais constitui uma importante ferramenta na confirmação do diagnóstico clínico.

As técnicas laboratoriais, para o auxílio no diagnóstico dessa doença, podem ser divididas em: métodos de detecção direta – cultura, técnicas de coloração, imuno-histoquímica e, mais recentemente, testes de análise e caracterização molecular; e métodos indiretos – testes imunológicos.<sup>9,80,104</sup> A escolha de uma metodologia estará relacionada com o

tipo de amostra enviada ao laboratório e as informações enviadas pelo médico sobre o tipo de manifestações clínicas observadas e o respectivo tempo de evolução.

O diagnóstico laboratorial pode ter algumas limitações decorrentes da utilização de diferentes metodologias, suscetíveis de envolverem um número muito variável de testes laboratoriais, cujo valor preditivo é condicionado por múltiplos fatores como, a acentuada diversidade antigênica das cepas e os critérios de interpretação dos resultados. Os testes sorológicos não são devidamente padronizados na literatura com uma variação da sensibilidade e especificidade entre diferentes laboratórios, sendo o ensaio imunoenzimático ELISA indireto e WB são os mais utilizados.<sup>104</sup>

#### 2.1.8.1 Métodos diretos

Uma variedade de técnicas laboratoriais tem sido desenvolvida para a detecção direta da *B. burgdorferi* sensu lato. Essas técnicas fornecem evidências da presença de espiroquetas intactas ou de seus componentes como DNA ou proteínas em carrapatos vetores, hospedeiros ou pacientes.

##### 2.1.8.1.1 Cultura

A cultura em meio seletivo é a melhor forma de demonstrar a presença da *B. burgdorferi* sensu lato, porém ela é raramente utilizada na prática, já que requer um tipo especial de meio de cultura (BSK modificado) e um longo tempo de cultivo devido a uma multiplicação muito lenta das borrelíias.<sup>105</sup> Outro fator limitante para seu uso é a sua aplicação para pacientes que ainda não iniciaram tratamento.

Dos métodos diretos, a cultura é, sem dúvida, a que oferece melhores resultados na confirmação da infecção ativa, entretanto, a sensibilidade é baixa em pacientes com doença tardia,<sup>55</sup> quando se sugere que a infecção já esteja debelada pelo uso de antibióticos.

*B. burgdorferi* sensu lato tem sido isolada de vários tecidos e fluídos humanos de pacientes com DL, incluindo biópsias de lesões de EMC e de ACA,<sup>106</sup> de LB,<sup>98</sup> líquido,<sup>106,112</sup> e sangue.<sup>55</sup> Também já foi reportado o isolamento de tecido cardíaco<sup>97</sup> e fluído sinovial.<sup>94</sup>

#### 2.1.8.1.2 Coloração e imunohistoquímica

Esses métodos têm por base a identificação provável de *B. burgdorferi* sensu lato, distinguindo-a das outras espiroquetas do gênero *Leptospira* e *Treponema* pela sua morfologia característica.<sup>84</sup>

Uma das técnicas que contribuem para a visualização direta das espiroquetas nos tecidos é a coloração pela prata – Wharthin-Starry – que permite a confirmação de cerca de 40 a 50% dos casos.<sup>68</sup>

A visualização direta do microorganismo à microscopia de campo escuro, em materiais biológicos são procedimentos demorados e pouco produtivos, pois as borrelíias são bactérias fastidiosas e encontradas em pequeno número no sangue e tecidos.<sup>91</sup>

#### 2.1.8.1.3 PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

A utilização da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), como um método molecular para detecção da *B. burgdorferi* sensu lato, tem auxiliado muito o diagnóstico laboratorial da DL.<sup>112</sup> Por ser capaz de detectar um única espiroqueta ou até de amplificar apenas quantidades mínimas do seu DNA em amostras biológicas, um resultado negativo apresentado por esta técnica traduz com muita confiança a ausência da bactéria na amostra em questão.<sup>107</sup>

O PCR tem sido usado para amplificar o DNA genômico da *B. burgdorferi* sensu lato na pele, sangue, líquido e fluído sinovial de pacientes com DL.<sup>107,112</sup> A sensibilidade deste método é maior com amostras de pele de lesão de EMC e de fluído sinovial de pacientes com

“artrite de Lyme”. Para amostras de líquido e sangue a sensibilidade do método é baixa. Resultados falso-positivos para a DL já foram relatados pelo método de PCR.<sup>107,112</sup>

Uma das limitações dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos é a geração de resultados falso-positivos devido à contaminação. A sensibilidade do PCR pode ser reduzida pela degradação do DNA da bactéria durante o transporte da amostra, estocagem e processamento.<sup>94,104</sup>

O PCR é colocado como de grande potencial, porém não tem sido viável economicamente até o momento devido ao seu elevado custo, o que impossibilita sua adoção na rotina laboratorial.<sup>108</sup>

No Brasil, o ensaio do PCR realizado no soro e tecidos de pacientes, assim como nos carrapatos e animais reservatórios, utilizando-se *primers* identificadores de *B. burgdorferi* *sensu stricto*, ou amplificadores de regiões conservadas, portanto marcadores do gênero *Borrelia*, tem sido negativo.<sup>14,58</sup>

### 2.1.8.2 Método indiretos

A detecção de uma resposta imunológica específica em associação com as manifestações cutâneas, cardíacas, neurológicas e articulares constitui o principal método para confirmar o diagnóstico da BL, face as dificuldades dos métodos bacteriológicos tradicionais.<sup>68,86</sup>

Na patogênese da infecção humana por *B. burgdorferi* *sensu lato* tanto a resposta celular quanto a humoral desempenham um importante papel. Embora a avaliação da resposta celular tenha sido utilizada como método diagnóstico em alguns casos, a interpretação dos testes positivos é difícil nas situações clínicas ambíguas. Assim, as técnicas de detecção de Acs específicos são, atualmente, as principais ferramentas usadas para apoiar o diagnóstico clínico da BL.<sup>104,110</sup>

Os testes imunológicos permitem a detecção de imunoglobulinas específicas anti-*B. burgdorferi* *sensu lato* das classes IgM e IgG. Os Acs da classe IgM aparecem primeiro, usualmente 3 a 4 semanas depois do início da infecção, e atingem seus valores máximos entre a sexta e oitava semana quando ,então começam a declinar.<sup>89</sup> Os Acs desta classe podem

persistir por semanas ou meses, o que pode significar a existência de reatividade na fase tardia ou recorrente da doença ou mesmo durante a reinfecção.<sup>84</sup>

Imunoglobulinas da classe IgG elevam-se lentamente, não sendo identificadas nas primeiras 4 ou 6 semanas; e atingem um pico, meses ou anos, após a infecção aguda, podendo permanecer detectáveis como cicatriz sorológica por muitos anos, mesmo em pacientes clinicamente curados.<sup>89</sup>

Existem riscos de obtenção de resultados falso-positivos e falso-negativos a partir dos testes de sorologia para borrelias, portanto a interpretação dos mesmos deve ser cautelosa. Resultados falso-positivos dos ensaios sorológicos para DL podem ocorrer pela reação cruzada dos Acs dos pacientes com outras doenças infecciosas como sífilis, leptospirose, mononucleose infecciosa; e doenças auto-imunes, como artrite reumatóide, esclerodermia e lúpus eritematoso sistêmico.<sup>69,89,104,110</sup> Por sua vez, os resultados falso-negativos podem ser resultado do seqüestro dos Acs específicos pela presença de imunocomplexos circulantes nos doentes com BL ou pelo emprego precoce de antibióticos.<sup>109,110</sup>

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção de Acs anti-*B. burgdorferi* sensu lato, incluindo a IFI, o ELISA e o WB. Os dois primeiros constituem os chamados “testes de triagem” e o WB “teste de confirmação”.

Objetivando um suporte laboratorial mais seguro no diagnóstico da DL, convencionou-se estabelecer, na rotina laboratorial, a realização de um “teste de triagem” (IFI ou ELISA) seguido de um “teste de confirmação” (WB). Esta medida ajudou a aumentar a especificidade e a sensibilidade dos sorodiagnósticos, que até o presente, ainda não foram padronizados.<sup>109</sup>

#### 2.1.8.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

Utilizado usualmente como “teste de triagem”, a IFI é um ensaio subjetivo para ser empregado no diagnóstico das borrelioses. Embora diversos estudos tenham demonstrado uma menor sensibilidade, especificidade e operacionalidade da IFI quando comparado ao ELISA,<sup>104,109</sup> outros a consideram como um teste confirmatório deste último, através da utilização de soros previamente absorvidos por *Treponema phagedenis*.<sup>111</sup>

### 2.1.8.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A técnica de ELISA é o método mais utilizado para a detecção de Acs anti- *B. burgdorferi* sensu lato,<sup>109,110</sup> já que apresenta inúmeras vantagens em relação a outros ensaios imunológicos, incluindo facilidade de execução, baixo custo, repetibilidade, capacidade de automação e de apresentar maior sensibilidade e especificidade entre os testes de triagem.<sup>19</sup>

O ensaio ELISA indireto tem sido utilizado para o diagnóstico e levantamentos epidemiológicos em humanos em todas as regiões onde há a descrição da BL.<sup>4,8,12,14,30,40,41,43,143</sup> Em animais, estudos de soroprevalência de borreliose são feitos por meio de ELISA indireto com antígeno sonicado total ou suas frações.<sup>39,75,81,113</sup> No Brasil, assim como em outros países, o teste ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* foi padronizado também para bovinos, caninos e eqüinos, utilizando-se antígeno sonicado total de *B. burgdorferi* sensu stricto cepa G39/40.<sup>39,75,81,113</sup>

A escolha do tipo de antígeno – borrelias íntegras, antígeno sonicado ou frações protéicas - a ser usado no ELISA tem grande importância na especificidade desta técnica.<sup>44</sup> A utilização de frações protéicas e antígeno sonicado tem mostrado melhores resultados,<sup>1</sup> sendo este último o mais empregado. Outras variáveis a considerar na escolha do antígeno é a variabilidade antigênica entre as genoespécies da *B. burgdorferi* sensu lato e o aparecimento temporal dos Acs aos diferentes antígenos nos vários estágios da DL.

Apesar de, nos EUA o FDA (*Food and Drug Administration*) ter aprovado, ao mínimo, 70 diferentes Kits comerciais para detecção sorológica de Acs anti- *B. burgdorferi* sensu lato, não há uma padronização para esses testes.<sup>109</sup> Com efeito, variações existem entre as metodologias em termos de composição antigênica e detecção das classes específicas de imunoglobulinas evidenciando, assim uma limitação do ELISA. Tais variações podem ocorrer entre diferentes Kits comerciais, bem como em lotes do mesmo Kit.

A falta de padronização laboratorial é um problema universal,<sup>109</sup> e decorre em parte, do emprego de borrelias isoladas de diferentes origens (homem, carrapato). Contribui ainda para divergências laboratoriais, emprego de borrelias que sofreram inúmeras passagens no meio de cultura BSK, que determinam a diminuição da virulência e perda de plasmídeos, interferindo na expressão de antígenos pelos microorganismos.

Embora o ELISA seja a técnica mais empregada e reconhecida no diagnóstico laboratorial da DL,<sup>80,109</sup> cada laboratório deve estabelecer padrões de controle adequados, com

o título mínimo e linha de corte (*cut-off*) seguros a fim de assegurar a qualidade do resultado. Portanto, o uso de Kits comerciais para fins diagnóstico de ser evitado, em função das muitas reações cruzadas.<sup>55,109,110</sup>

Nos ensaios de ELISA, as reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio da conjugação de um dos destes componentes com uma enzima, que posteriormente age sobre um substrato, produzindo uma coloração, que pode ser detectada visualmente ou mensurada por espectrofotometria. Essas técnicas, normalmente, utilizam uma superfície sólida para imobilização do Ag ou Ac, permitindo que se realize a remoção dos componentes que não reagiram por lavagem.<sup>19</sup>

No ELISA indireto, o Ag é adsorvido a uma microplaca – superfície sólida. O soro teste é incubado e os Acs específicos contra esse antígeno se ligarão a ele, enquanto os não específicos são removidos por lavagem. Em seguida, uma anti-imunoglobulina humana marcada com uma enzima é adicionada. Por último, um substrato é adicionado e sofrendo ação enzimática, promoverá uma coloração, cuja intensidade é proporcional à concentração dos Acs específicos presentes na amostra.<sup>19</sup>

#### 2.1.8.2.3 Western blotting (WB)

O WB, pelo fato de ser mais sensível e específico,<sup>9,14,89</sup> é atualmente a técnica de confirmação de qualquer sorologia positiva ou duvidosa, resultante dos “testes de triagem” – IFI e ELISA.

O WB é um teste qualitativo que permite a detecção de frações proteicas específicas (bandas), ao contrário dos testes IFI e ELISA, que em regra põem em evidência o Ag total. A ligação dos Acs presentes no soro do paciente com antígenos da *B. burgdorferi* sensu lato é detectada através de uma reação enzimática, que produz uma banda colorida imunofluorescente no local de ligação com o Ag.<sup>19</sup>

A utilização deste ensaio deve seguir critérios de interpretação, pois existem variações antigênicas regionais para a borrelia, além de espécies distintas e homólogas. Assim, face à existência de proteínas com diferente importância, deve-se estabelecer critérios de definição do respectivo significado diagnóstico das bandas reativas de acordo com o Ag utilizado, para cada região estudada; e também da quantidade de bandas, no mínimo cinco.<sup>4,12,37</sup> A adoção

desses critérios permite reduzir a discrepância dos resultados entre laboratórios, onde é elevada a variabilidade dos padrões de reatividade.

Na tentativa de padronizar o diagnóstico sorológico da BL, o CDC dos EUA estabeleceu critérios para a interpretação do WB.<sup>44,89</sup> De acordo com esse critério, IgM por WB é considerado positivo se pelo menos duas de três bandas: OspC (21 a 25 kDa), 39 (BmpA) e 41kDa (Fla) estiverem presentes; e para IgG é necessário a presença de pelo menos cinco das dez bandas: 18, OspC (21 a 25), 28, 30, 39 (BmpA), 41 (Fla), 45, 58, 66 e 93 kDa.

As maiores limitações do WB incluem o custo, a variabilidade da resposta de Acs em pacientes com a mesma manifestação clínica da BL e a interpretação subjetiva da intensidade da banda, o que pode levar a leituras falso-positivas. Estes falso-positivos são particularmente observados com a classe IgM devido a presença de uma baixa reatividade aos Acs OspC e 41-kDa no soro de indivíduos que se apresentam com outro tipo de infecção e também com os indivíduos têm uma doença de origem não infecciosa.<sup>89</sup>

### 2.1.8.3 Critério diagnóstico DL no Brasil

No Brasil, estudos identificaram que o perfil clínico e laboratorial da doença no país divergia dos demais continentes;<sup>12,41-43,114,143</sup> constatou-se que o diagnóstico da enfermidade nem sempre é fácil nas situações em que o EMC, que é o aspecto clínico distintivo da doença, está ausente ou quando a doença manifesta-se tardiamente, na forma isolada de complicação articular, neurológica ou cardíaca, Laboratorialmente verificou-se que o padrão de reatividade dos testes sorológicos (ELISA e WB) era diferente. A frequência de resultados sorológicos falso-negativos e positivos é maior que o observado nos EUA e o ELISA revela títulos inferiores, com negativação precoce dos Acs. Do ponto de vista clínico, apesar de todas as manifestações da DL clássica, a enfermidade aqui se distingue pela grande frequência de recorrência, especialmente nos pacientes medicados tardiamente na fase inicial da doença.<sup>45</sup>

No Brasil, embora o microorganismo ainda não tenha sido isolado, existem evidências laboratoriais sugerindo que borrelias sejam o agente etiológico. Observa-se reatividade humoral<sup>18,41,116</sup> e celular<sup>115</sup> aos componentes da *B. burgdorferi* sensu lato nos pacientes



brasileiros, embora tanto os testes sorológicos como a linfoproliferação apresentem menor sensibilidade, em comparação ao visto nos EUA e Europa.

A partir dessas observações, o Centro de Referência para a Doença de Lyme no Brasil (Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do HCFMUSP-SP – LIM-17) propôs os seguintes critérios para o diagnóstico da doença,<sup>45</sup> que devido às dificuldades de isolamento do microorganismo, é semelhante ao do CDC em Atlanta; e baseia-se na sintomatologia clínica, na epidemiologia e associado à sorologia positiva para *B. burgdorferi* – cepa G 39/40, de origem americana, realizados pelo ELISA indireto ou WB.

Considera-se como caso positivo a presença de 3 critérios maiores ou de 2 parâmetros maiores e 2 menores.

#### Parâmetros Maiores:

- Epidemiologia
- EM ou Manifestação sistêmica
- Sorologia positiva para *B. burgdorferi*\*

\* Detecção de níveis de anticorpos para a *Borrelia* por dois testes, de ELISA e WB, interpretados da seguinte maneira:

I - Sorologia positiva no ensaio imunoenzimático (ELISA) com títulos maiores que 1/100 para IgM e 1/400 para IgG ou

II - Presença de *Western blotting* positivo (no soro) com pelo menos duas bandas específicas para IgM ou quatro bandas específicas para IgG, ou concomitância de uma banda de IgM e duas IgG.

#### Parâmetros Menores

- Recorrência
- Fadiga crônica, mialgia, artralgia, parestesia das extremidades
- Identificação de “Espiroquetídeos” (campo escuro, Giemsa ou Panótico).

## 2.1.9 Tratamento

O tratamento da DL deve ser precoce e prolongado, especialmente do estágio primário, para evitar recidiva dos sintomas. Complicações tardias respondem pouco aos antibióticos.<sup>66</sup>

Na fase aguda, doxicilina, 100mg duas vezes ao dia por 14 a 21 dias para adultos, é a droga de escolha, porém é contra-indicada para gestantes e crianças menores de oito anos. Para esses casos, tem-se como alternativa o uso de amoxicilina. No caso de alergia, cefuroxime é a terceira opção. Eritromicina ou seus congêneres, como a azitromicina, são recomendados somente para pacientes que não puderem fazer uso das terapias anteriormente descritas.<sup>117</sup> Ciprofloxacina, rifampicina e aminoglicosídeos são ineficazes contra *B. burgdorferi*.<sup>4</sup>

Nas primeiras 24 horas de tratamento, em 15% dos pacientes da fase aguda, pode-se desenvolver um episódio semelhante à reação de Jarisch-Herxheimer, que é caracterizada por febre, artralgia e *rash* cutâneo.<sup>115</sup>

Antibióticos parenterais são geralmente recomendados para casos de borreliose do sistema nervoso e cardíaco.<sup>118</sup> Ceftriaxona endovenoso por 2 a 4 semanas é a terapia de escolha. Como alternativas, pode-se utilizar cefotaxime ou penicilina G cristalina.

Para pacientes com “artrite de Lyme”, os antibióticos orais são utilizados por 30 a 60 dias. Pacientes que não respondem devem receber tratamento intravenoso por 30 dias. Corticosteróides são indicados para pacientes que, mesmo após a antibioticoterapia, permanecem com sintomas devido à inflamação articular persistente.<sup>117</sup>

No Brasil, o tratamento da SIRLS é semelhante ao preconizado nos EUA e Europa, porém com uma antibioticoterapia de duração um pouco maior, em função da grande frequência de recorrências. A resposta ao tratamento, quando instituído nos três primeiros meses da infecção, costuma ser satisfatória, sem recidivas clínicas. Contudo, tem-se recorrência em cerca de 75% dos casos em que os pacientes são medicados tardiamente.<sup>45</sup>

### 2.1.10 Prevenção

Algumas recomendações são importantes na prevenção de enfermidades transmitidas por carrapatos, uma vez que a infecção humana é, usualmente, acidental e ocorre ao se adentrar no ecossistema onde circula o agente etiológico.

Recomendações para prevenir a BL incluem: evitar a exposição aos carrapatos limitando as atividades ao ar-livre em locais infestados por esses vetores; uso de repelentes; uso de roupas de cores claras e calças compridas; e freqüentes observações na pele para uma precoce detecção e remoção dos carrapatos.<sup>119</sup>

Após o regresso do campo, recomenda-se inspeção cuidadosa do corpo à procura de carrapatos, especialmente se manteve contato com animais. Os carrapatos devem ser removidos com um par de pinças aplicado o mais próximo da pele. A retirada dentro de 24 a 48 horas após o ataque reduzirá o risco de infecção, em função do risco de transmissão da espiroqueta pelo carrapato aumentar proporcionalmente ao tempo em que o carrapato fica agarrado à pele.<sup>119</sup>

Alguns profissionais como veterinários, geólogos, topógrafos, assim como freqüentadores habituais de matas são os indivíduos mais predispostos à infecção.<sup>45</sup>

Os cuidados no domicílio também são importantes, pois se verificou que a maioria das crianças é picada por carrapatos em suas próprias casas, principalmente em jardins. Os cães de estimação também devem ser freqüentemente examinados à procura de carrapatos, com tratamento veterinário adequado em casos de infestação.<sup>119</sup>

Tratamento antibiótico de rotina após uma picada de carrapato, não é recomendado, mesmo em áreas endêmicas. A vasta maioria dos carrapatos (70-80%), mesmo em áreas onde a DL é altamente endêmica, não está infectada com *B. burgdorferi*. Ademais, o risco de infecção depois de uma picada de carrapato em uma localidade endêmica é inferior a 5%.<sup>61</sup>

A vacina utilizada contra a infecção da *Borrelia burgdorferi* é um recombinante da proteína de superfície OspA, autorizada pelo FDA em 1998 e é preconizada para pessoas entre 15 e 70 anos, residentes em áreas de risco e exposta freqüentemente à carrapatos. Para assegurar uma boa proteção, é necessário 3 doses da vacina. Pacientes imunizados poderão apresentar resultados falso-positivos no diagnóstico sorológico contra proteína recombinante OspA.<sup>120</sup>

## 2.2 BABESIOSE

A babesiose é uma enfermidade infecciosa transmitida por carrapatos com ampla distribuição mundial. É causada por hemoprotozoários do gênero *Babesia* e infecta animais silvestres, domésticos e ocasionalmente o homem.<sup>16</sup> Aproximadamente cem espécies do gênero já foram identificadas, das quais ao menos duas – *B. microti* e *B. divergens* – são capazes de causar a infecção em humanos.

As infecções por babesia seguem, usualmente, uma distribuição regional. Nos EUA, a BH é causada predominantemente pela *B. microti*<sup>122</sup> enquanto na Europa, onde a doença é consideravelmente rara, mas aparentemente mais letal, *B. divergens* aparece como o agente principal.<sup>121</sup> Recentemente, alguns casos humanos no oeste dos EUA foram atribuídos a uma nova cepa relatada, a *Babesia* tipo W\A1.<sup>125</sup> Há também suspeitas de infecção humana causada por outras espécies como *B. bovis* e *B. canis*. Indivíduos com BH podem ser assintomáticos.<sup>123,124</sup>

*Babesia* são parasitas protozoários pertencentes à família *Babesiidae*, da ordem *Piroplasmorida*, dentro do filo *Apicomplexa*.<sup>124</sup>

As babesias são parasitos intraeritrocitários dos hospedeiros vertebrados, causando doença hemolítica com anemia.<sup>123</sup> Espécies do gênero *Babesia* têm sido classificadas informalmente em pequenas ou grandes babesias, de acordo com as dimensões que elas assumem dentro dos eritrócitos dos hospedeiros vertebrados. Assim, as grandes babesias são espécies com trofozoítos medindo entre 2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  e incluem, *B. bovis*, *B. caballi*, e *B. canis*.; enquanto as babesias pequenas medem de 1,0 a 2,5  $\mu\text{m}$  e incluem as espécies *B. gibsonii*, *B. microti* e *B. rodhaini*.

### 2.2.1 Vetores e hospedeiros

Transmitida por carrapatos *Ixodídeos*, a babesia apresenta um ciclo de vida que envolve estágio assexuado nas células sanguíneas de hospedeiros vertebrados e estágios assexuado e sexuado nos carrapatos (hospedeiro invertebrado). Praticamente qualquer mamífero que sirva de hospedeiro para um carrapato infectado, pode ser considerado um

potencial reservatório da babesia. Pequenas espécies de mamíferos, roedores, bovinos, eqüinos e, ocasionalmente humanos são hospedeiros competentes para babesia.<sup>16,123,124</sup>

Até o presente, somente carrapatos ixodídeos foram identificados como vetores para babesia. Acredita-se que carrapato responsável pela transmissão da *B. divergens* aos humanos é o *Ixodes ricinus*, que também é vetor da BL na Europa.<sup>121</sup> O ciclo de vida do *I. ricinus* requer três anos para completar-se. Um primeiro ano para a fase larval, um segundo para ninfa e um terceiro para a fase adulta.

As espécies de babesia são heteroxenas, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo biológico, especificamente no caso da *B. bigemina*, o bovino e o carrapato; no bovino, hospedeiro vertebrado, ocorre somente reprodução assexuada dos protozoários e no carrapato, hospedeiro invertebrado, ocorre tanto reprodução assexuada como sexuada.<sup>126</sup>

A fêmea do carrapato se infecta com *B. bigemina* no final da fase parasitária no bovino. No intestino do carrapato inicia-se a reprodução sexuada dando origem aos oocinetos que invadem todos os órgãos do carrapato, inclusive ovários, num processo contínuo de divisão assexuada. Através da infecção dos ovários, os oocinetos passam aos ovos e larvas, configurando a transmissão transovariana, de geração a geração. O processo de esporogonia continua nas larvas, invadindo também todos os órgãos, inclusive as células da glândula salivar, onde são produzidos os esporozoítos que serão transmitidos aos bovinos por ocasião do parasitismo do carrapato. Nos bovinos, os esporozoítos vão diretamente parasitar os eritrócitos, se transformando em merozoítos que por reprodução assexuada formam novos parasitos que invadem novas células e assim sucessivamente.<sup>126</sup>

Como conseqüência desta merogonia o hospedeiro bovino poderá ou não apresentar a doença clínica, dependendo de vários fatores entre os quais, a virulência do parasito, a quantidade de inóculo e o nível de resistência do hospedeiro.<sup>126</sup>

A destruição de eritrócitos por *Babesia* spp. continua até que o hospedeiro morra ou, por tratamento ou processo imunológico, elimine ou diminua o parasito, passando a ser um portador sadio.<sup>16</sup>

Nos EUA, um pequeno roedor – *Peromyscus leucopus* – é essencial para a manutenção do ciclo da *B. microti*. Estudos mostraram que cerca de 40% desses animais estão infectados com *Babesia* spp.<sup>123</sup>

No Brasil, o *Boophilus microplus* é o principal transmissor biológico das babesias bovinas.<sup>8</sup>

O fenômeno da variação antigênica, quer no vetor, quer na evasão do sistema imune do hospedeiro vertebrado pelas babesias, é similar ao que ocorre com outros hemoprotozoários, como *Leishmania* e *Trypanosoma*, e com as espiroquetas do gênero *Borrelia*, que realizam trocas e escapes imunológicos determinados ora geneticamente, ora ambiental, o que pode ser uma mutação e irreversível.<sup>126</sup>

### 2.2.2 Babesiose humana

O primeiro caso de BH na literatura médica foi descrito em 1957, na Iugoslávia, em um trabalhador rural esplenectomizado com sintomas de malária. Em seguida, vários outros casos de BH foram descritos na Europa, em pacientes esplenectomizados e freqüentemente resultando em óbito, e tendo como agente a *B. divergens*.<sup>16</sup>

Nos EUA, o primeiro relato da doença ocorreu em 1969, sendo o primeiro caso de babesiose em uma pessoa previamente saudável. O agente etiológico foi identificado com sendo um parasita babesial de roedores, *B. microti*.<sup>125</sup>

Mais de 300 casos de BH por *B. microti* já foram descritos nos EUA.<sup>127</sup> Infecção por *B. microti* é endêmica na região dos Grandes Lagos e no nordeste dos EUA.

Desde 1957, cerca de 30 casos de BH foram identificados na Europa; a maioria causada por *B. divergens*. Os casos humanos de infecção por *B. divergens* foram registrados na França, Espanha, Grã-Bretanha, Suíça, Suécia.<sup>16</sup> Geograficamente coincide com a população de gado infectada por *B. divergens* e áreas infestadas por *I. ricinus*,<sup>128</sup> envolvendo habitantes de áreas rurais que são expostos ao carrapato em virtude de suas ocupações ou atividades recreacionais. Os casos sintomáticos no gado ocorrem de maio a junho com um segundo pico em setembro e outubro. Casos humanos também ocorrem entre maio e setembro,<sup>16</sup> correspondendo ao pico de atividade da ninfa do *I. ricinus*.

Há também relatos, embora raros, de BH em outras partes do mundo, incluindo México, China, Taiwan, Egito, África do Sul e América Latina.<sup>16</sup> No Brasil, o primeiro caso de BH foi relatado em 1983 no Estado de Pernambuco e, recentemente, tem sido verificada a coexistência de anticorpos anti-*Babesia* e anti-*Borrelia* em pacientes de outras localidades.<sup>5,6,7,80,129,143</sup>

Em muitos países da América Latina, a *B. bovis* e *B. bigemina* são endêmicas de bovinos e representam um sério problema para a saúde animal e conseqüentemente para o homem.<sup>130</sup>

A infecção humana por *B. microti* apresenta-se com um largo espectro de manifestações clínicas, desde assintomática a casos agudos e fatais, os quais são mais comuns em pessoas idosas e imunocomprometidas.<sup>129</sup> Em indivíduos saudáveis, a BH é usualmente assintomática. Em pessoas imunocompetentes, a infecção por *B. microti* pode ser assintomática ou apresentar sintomas semelhantes ao de um resfriado.<sup>129</sup> Alternativamente, algumas infecções tornam-se crônicas e podem se manifestar somente quando o paciente se tornar esplenectomizado ou imunocomprometido.<sup>132</sup>

Tipicamente os sintomas da babesiose causada por *B. microti* são menos agudos que os da *B. divergens*, e se iniciam 1 a 4 semanas depois da picada do vetor infectado. O início é gradual com mialgia, anorexia, fadiga e calafrios como os sinais mais comuns.<sup>134</sup> Esses sinais são frequentemente seguidos por febre (maior que 38°C), náusea e vômito.<sup>121,127</sup> Nos casos graves, hemoglobinúria pode ocorrer. Alterações laboratoriais incluem anemia, trombocitopenia, leucopenia e elevação das enzimas hepáticas.<sup>122,125,134</sup> As características clínicas da babesiose são semelhantes as vistas na malária, o que muitas vezes pode levar a um erro no diagnóstico, principalmente em regiões onde a malária é endêmica.<sup>128</sup>

BH por *B. divergens* em pacientes esplenectomizados tem um início agudo e é considerado como emergência médica. Uma a três semanas seguintes à infecção, paciente apresenta grave hemólise intravascular com hemoglobinúria e icterícia. Febre alta persistente, calafrios e sudorese ocorrem com mialgia, dores de cabeça, vômito e diarreia. Sem tratamento, ou nos casos em que o tratamento é instituído tardeamente, falência múltipla dos órgãos pode ocorrer 4 a 7 dias depois do início da hemoglobinúria, resultando em óbito.<sup>124,129</sup>

*B. bovis*, *B. canis*, *B. microti* e espécies de babesias não identificadas têm sido descritas em humanos na Europa, baseado nas características morfológicas e reatividade antigênica.<sup>16,121,124</sup>

Além da transmissão por picada de carrapato, outras duas vias de transmissão são descritas para a infecção em humanos; a transmissão por transfusão sanguínea e a transmissão transplacentária.<sup>16,127</sup>

Mais de 40 casos de babesiose adquiridos por transfusão sanguínea já foram registrados nos EUA e pelo menos um foi confirmado no Japão.<sup>135</sup> A maioria desses casos

envolvia a transmissão de *B. microti* por doadores assintomáticos. O período de incubação para o aparecimento da infecção tem variado de 17 dias a 8 semanas.<sup>136</sup>

Babesia pode ser transmitida em uma variedade de componentes de sangue incluindo, bolsas de hemácias frescas ou congeladas. Os doadores são geralmente assintomáticos e em muitos dos casos não tem história de picada de carrapato.<sup>137</sup>

### 2.2.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da BH é sustentado pelo desenvolvimento de manifestações clínicas, associado à epidemiologia e suportado pela confirmação laboratorial. Métodos laboratoriais para a babesiose incluem: identificação do parasito intra-eritrocitário através de microscopia em amostra de sangue periférico, detecção sorológica de Acs anti-*Babesia* e detecção molecular de material genético da babesia por PCR.<sup>133</sup>

A técnica mais utilizada no diagnóstico da BH, tanto nos EUA pela infecção de *B. microti* quanto na Europa para *B. divergens*, é o exame microscópico manual de uma amostra de sangue periférico para demonstrar a presença desses parasitas no interior dos eritrócitos.<sup>16</sup> Nas infecções por *B. microti* (Figura 6), a parasitemia nos eritrócitos varia de 1 a 20% nos indivíduos normoesplênicos e é acima de 80% nos esplenectomizados. Parasitemias em infecções humanas por *B. divergens* varia de 1 a 50% dos eritrócitos.<sup>16</sup> O encontro do parasita no interior dos eritrócitos por essa técnica é considerado diagnóstico definitivo da infecção humana por babesia.

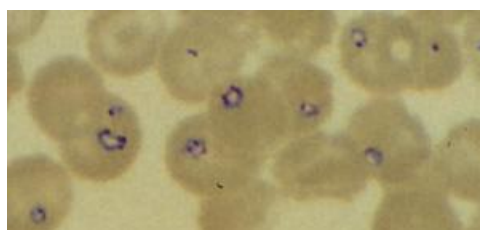


FIGURA 6: *Babesia microti* - coloração Giemsa

As amostras de sangue são usualmente coradas pelo método de Giemsa ou Wright's. Essa técnica apresenta melhores resultados na presença de altas taxas de parasitemias durante infecções agudas.<sup>134</sup> A duração da parasitemia detectável por esse método varia de 3 semanas a



12 semanas. Analisadores automáticos são incapazes de identificar os eritrócitos infectados com babesia.

A técnica possui algumas limitações, como a baixa sensibilidade, a experiência do analista e o tempo gasto para cada análise. As formas anelares da babesia no interior dos eritrócitos variam enormemente e podem ser confundidas com os trofozoítos de *Plasmodium* spp.; contudo, a ausência do pigmento de hemozoína poderia ajudar no diagnóstico da babesiose. Esta diferença não é sempre óbvia, uma vez que a hemozoína não está presente nos trofozoítos jovens de *Plasmodium* spp.. Identificação das formas em tetrade (Figura 7) e de merozoítos extracelulares de *Babesia* spp., ou o achado de gametócitos de *Plasmodium* spp., quando presentes, são usados para diferenciar esses gêneros.<sup>124,128</sup>

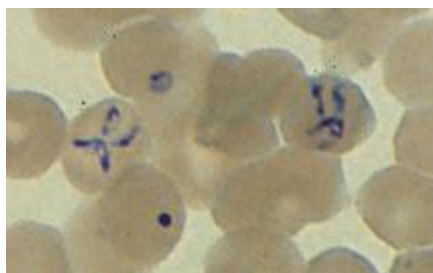


FIGURA 7: *Babesia* spp. - forma em tetrade

Os testes sorológicos utilizados no diagnóstico da BH são a IFI e o ELISA. Embora IFI seja atualmente a técnica sorológica recomendada para o diagnóstico das infecções por *B. microti*, particularmente em infecções crônicas, ela oferece alguns inconvenientes como a subjetividade do operador durante a leitura, número limitante de amostras, é um método laborioso e nem sempre é muito específica. WB também foi proposto como alternativa para o sorodiagnóstico na rotina laboratorial.<sup>138</sup> Contudo, WB também é laborioso e não é apropriado para um grande número de amostras.

Comparando o Elisa com WB e o IFI para uso na rotina laboratorial, o ELISA é de mais fácil execução e pode ser usado para um grande número de amostras.<sup>112</sup>

Estudos mostraram que a sensibilidade e a especificidade do IFI e ELISA são semelhantes para o diagnóstico da *B. microti*.<sup>133</sup>

Acs podem ser detectados em pacientes com BH poucos meses após o início da doença e se manterem elevados por muitos anos após a infecção. Embora a persistência de

Acs não indique necessariamente uma infecção ativa ou parasitemia, o monitoramento de Acs anti-*Babesia* em doadores de sangue tem sido sugerido para prevenir a transmissão por transfusão associada à babesiose.<sup>135</sup>

Estudos demonstraram não haver reação cruzada entre *Babesia* spp. e *Borrelia burgdorferi* nos ensaios sorológicos.<sup>5,6,80,133</sup> As técnicas de Elisa e IFI para detecção de Acs anti-*Babesia* spp. podem apresentar reação cruzada com infecção por malária.<sup>8,134</sup>

Métodos de diagnóstico molecular, apesar de, ainda, não serem usados rotineiramente, são vistos como muito promissores e de grande potencial para o auxílio no diagnóstico da BH. O desenvolvimento de PCR para detecção de *B. microti* e *B. divergens* já foram descritos. Estudos demonstraram que esta técnica é mais sensível e igualmente específica quando comparada a microscopia manual.<sup>139</sup>

O PCR mostra-se também como uma importante ferramenta na diferenciação das infecções por diferentes espécies de babesia – *B. microti* e *B. divergens*, e *Plasmodium* spp..<sup>139</sup>

## 2.2.4 Tratamento

O tratamento preconizado para a infecção humana por *B. microti* é clindamicina 1200mg duas vezes ao dia via oral associada à quinina na dose de 650 mg três vezes ao dia também por via oral durante sete dias.<sup>124,127,132</sup>

Pacientes esplenectomizados, que não podem tolerar a quinina, podem usar um tratamento oral alternativo de maior duração com azatromicina 500 mg ao dia combinado com atovaquone 750 mg ao dia.<sup>132,134</sup>

Para infecções por *B. divergens* o tratamento deve ser rápido e agressivo. O indicado é um tratamento intravenoso com clindamicina 600 mg três vezes ao dia com dez dias de duração.<sup>128,134</sup>

## 2.3 CO-INFECÇÃO

Estudos têm demonstrado a co-infecção em humanos e animais por diferentes patógenos transmitidos por carrapato, como a borrelia, a rickettsia, babesia, ehrlichia e vírus.<sup>4-8,80,129,131,140,143</sup>

Alguns casos de BH em associação com a DL foram descritos na América do Norte, como em Connecticut e Minnessota nos EUA. Isso pode ser explicado pelo fato do reservatório tanto da *B. burgdorferi* como da *B. microti* ser o roedor *P. leucopus*,<sup>8</sup> e também porque ambas as enfermidades possuem um vetor em comum – carrapato do gênero *Ixodes*.

Também há relatos de casos de BH associados com a DL na Europa. Neste continente, *I. ricinus* é o vetor comum da *Babesia* e da *Borrelia*.<sup>4,131</sup>

Os sintomas iniciais da babesiose e da DL freqüentemente se sobrepõem. Como a babesiose, a DL apresenta-se com uma série de sintomas não específicos, incluindo febre, fadiga e outros sintomas comuns nos resfriados. Co-infecção parece agravar o quadro clínico da DL e babesiose em humanos.<sup>132</sup>

A co-infecção em humanos de borrelias e babesias pode resultar em várias complicações por um longo período de tempo. As principais manifestações clínicas incluem fadiga, dor de cabeça, anorexia, conjuntivite e esplenomegalia.<sup>140</sup>

Co-infecção pode alterar a apresentação clínica e a resposta ao tratamento da DL. Certas manifestações clínicas, como trombocitopenia e leucopenia, que não são características da DL, poderiam sugerir co-infecção com babesiose ou ehrlichiose.<sup>7,140</sup>

A terapia antibiótica para DL é ineficaz para *B. microti*. Um paciente co-infectado pode, ao final do tratamento, apresentar uma infecção por babesia persistente. Co-infecção com outros agentes transmitidos por carrapato pode resultar em manifestações mais severas.<sup>140</sup>

Inquéritos sorológicos estimam que cerca de 13% dos pacientes com DL em áreas endêmicas de babesia estão co-infectados com *B. microti*.<sup>140</sup>

No Brasil, em 2003, foi verificada a coexistência de anticorpos anti-*Babesia* e anti-*Borrelia* em dois irmãos que adquiriram a doença em Cotia-SP em 1992.<sup>8</sup> A partir desta constatação, Yoshinari et al. sugeriram a possibilidade da co-infecção por dois microorganismos transmitidos por carrapatos em áreas endêmicas para a DLS no país. Nesse mesmo estudo, 59 pacientes brasileiros com diagnóstico de BL pesquisados para a presença

de Acs anti-*Babesia bovis* utilizando-se o ELISA e o WB como técnicas laboratoriais. Demonstrou-se uma maior frequência de Acs contra a *B. bovis* nesses pacientes em comparação com a população normal.

Em 2006, no Mato Grosso do Sul, Naka, em dissertação de mestrado, também identificou a coexistência de Acs anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* em crianças com suspeita clínica de DL.<sup>143</sup>

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 GERAL

Pesquisa de anticorpos anti-borrelia e anti-babesia em soros de doadores de sangue sadios.

### 3.2. ESPECÍFICOS

1. Estimar a prevalência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* e anti-*Babesia bovis* em soro de doadores sadios do banco de sangue humano - Hemosul - de Campo Grande-MS.
2. Estabelecer o serviço de diagnóstico laboratorial da borreliose de Lyme e outras enfermidades emergentes intercorrentes e transmitidas por carrapatos, como a babesiose, no Hospital Universitário da UFMS.

## 4 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

#### 4.1.1 Critérios de inclusão

Foram colhidos 115 (cento e quinze) soros de doadores sadios, já previamente analisados e selecionados para transfusão, no banco de sangue do Hemosul – trata-se do banco de sangue mais representativo para o Estado de Mato Grosso do Sul. No momento da coleta, foi realizada uma explicação detalhada sobre a pesquisa. Todos os pacientes aceitaram participar do estudo mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O consentimento livre e esclarecido foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os soros desses doadores sadios do banco de sangue humano (HEMOSUL) foram mantidos congelados a uma temperatura de  $-20^{\circ}$  C até o momento da realização das provas laboratoriais e, para serem incluídos na pesquisa tiveram que respeitar os seguintes critérios de exclusão: presença de auto-anticorpos, de doenças auto-imunes e do colágeno; de doença infecciosa crônica ou neoplasias malignas; exames de VDRL e /ou FTA abs positivos.

#### 4.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão propostos neste trabalho tinham por objetivo evitar que possíveis patologias intercorrentes pudessem interferir nas provas sorológicas de ELISA indireto e WB.

Após a realização dos exames complementares, foram excluídos os soros dos doadores que apresentaram positividade para os seguintes exames: Chagas, HIV 1 e 2, HTLV, hepatites B e C e sífilis (VDRL), PCR (proteína C reativa) e Fator reumatóide.

## 4.2 COLETA DE AMOSTRAS E EXAMES COMPLEMENTARES

Todos os pacientes foram submetidos à coleta de sangue no banco de sangue do Hemosul, onde foram realizados os exames complementares citados acima.

As amostras de soro dos doadores foram congeladas a - 20° C e transportadas em gelo até o Centro de Referência para a Doença de Lyme no Brasil (Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do HCFMUSP-SP – LIM-17), para a realização de pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* pelo método de ELISA indireto e WB e anti-*Babesia* pelo método de ELISA indireto.

## 4.3 TIPO DE PESQUISA E PERÍODO

Trata-se de uma pesquisa analítica, observacional, de corte transversal, de março a outubro de 2005. Foram selecionadas as amostras nesse período e realizadas a análise sorológica e o preenchimento dos formulários onde constavam os dados epidemiológicos dos pacientes.

## 4.4 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*BORRELIA BURGENDORFERI* IgG E IgM PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA)

### 4.4.1 Antígeno utilizado

Antígeno de *Borrelia burgdorferi* – foram utilizados como substratos antigênicos sonicados totais da *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cepa americana G 39/40 na concentração de 4,8 mg/ml, mantidas no Laboratório de Investigação da Interação entre Microorganismo e Artrite, da Disciplina de Reumatologia, Departamento de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de referência para a Borreliose de Lyme no Brasil.

### 4.4.2 Execução do ELISA indireto

As análises por ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* foram procedidas segundo protocolo de Grodzicki et al.<sup>9</sup> e Yoshinari et al.:<sup>18</sup>

1. Foram sensibilizadas duas placas de 96 orifícios (Immulon I), uma para IgG e outra para IgM com 100µl de antígeno, sonicado total de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, na concentração de 15 µg/ml, diluído em tampão carbonato pH 9,6.
2. A placa foi incubada em câmara úmida, a 4°C *overnight*.
3. Em seqüência, a placa foi lavada por cinco vezes com tampão fosfato (PBS) com 0,05% de Tween 20, pH 7,4.
4. Após, foi realizado o bloqueio dos sítios da placa com a adição de 100µl da solução protéica feita com leite desnatado a 5% diluído em PBS com 0,05% de Tween 20, pH 7,4, com incubação da placa em câmara úmida, por 1 hora, à temperatura ambiente.
5. Após 1 hora, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS com 0,05% de Tween 20, pH 7,4.



6. Em seguida, foi preparada a diluição do soro padrão positivo, controles negativos e soros teste, utilizando-se PBS-Tween com 5% de leite desnatado pH 7,4; depois de preparadas, as amostras de soro foram adicionadas aos poços da placa, incluindo um controle positivo, 8 controles negativos e os soros dos doadores em duplicata nas diluições de 1/100 para IgM e 1/400 para IgG e, então incubadas por 1 hora em temperatura ambiente.
7. Após 1 hora, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS Tween 0,05% pH 7,4.
8. Posteriormente, foi adicionado 100 µl de conjugado; soro de cabra, anti-imunoglobulina específica humana (anti-IgM ou anti-IgG) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), diluído a 1/1000 em PBS-Tween com leite desnatado pH 7,4 e, depois incubadas em câmara úmida por mais 1 hora em temperatura ambiente
9. Após o tempo de incubação, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com PBST 0,05% pH 7,4.
10. Posteriormente, foram adicionados 100µl em cada orifício da placa de solução substrato revelador – para-nitro-fenil-fosfato (PNPP), na concentração de 1mg/ml, diluído em tampão glicina pH 10,5 para leitura em espectrofotômetro para ELISA (Labsystems Multiskan MS) em comprimento de onda de 405 nm.
11. Interpretação dos resultados – uma amostra foi considerada positiva se apresentasse uma DO (densidade óptica) igual ou maior ao valor do *cut-off*, que é obtido pela média dos valores de DOs dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão desses valores, garantindo um nível de confiança de 99,8%.
12. Os valores em DOs expressos pelo espectrofotômetro para as microplacas foram convertidos em títulos, utilizando para esse fim um gráfico de calibração do título, em papel milimetrado. O título considerado positivo para IgG foi maior ou igual a 1/400 e para IgM maior ou igual a 1/100.

## 4.5 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*BORRELIA BURGENDORFERI* IgG E IgM PELO WESTERN BLOTTING

A separação eletroforética e as análises por Western blotting para *B. burgdorferi* em humanos foram procedidas segundo protocolo de Grodzicki et al.<sup>9</sup> e Yoshinari et al.<sup>42</sup>

### 4.5.1 Execução da eletroforese

Para realização do trabalho, procedeu-se a eletroforese vertical do extrato total de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 (obtido através do sonicado total da *Borrelia burgdorferi* cepa G 39/40, de origem americana), preservado no laboratório através de passagem em meio de cultura BSK, ou conservado congelado em nitrogênio líquido reduzido com dithiothreitol (Bio Rad) em gel de poliacrilamida a 10% com uso de pente contínuo. A eletroforese foi realizada em aparelho Protean II (Bio Rad), com amperagem de 25mA, em câmara fria.

As proteínas do gel foram transferidas para o papel de nitrocelulose com porosidade de 0,2µm através de cuba de transferência Protean II (Bio Rad) durante 18 horas com voltagem de 25 mV, em câmara fria.

Após transferência do antígeno, o papel de nitrocelulose foi corado com Ponceu (por 10 minutos) e lavado com água destilada para retirar o excesso do corante.

### 4.5.2 Execução do Western blotting

O papel de nitrocelulose, obtido anteriormente na eletroforese, foi cortado em tiras e incubado com tampão Tris (TBS) – Tween 0,1% - leite desnatado 5% pH 7,4, durante 1 hora e meia à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Posteriormente, as tiras foram lavadas 3 vezes com TBS - Tween 0,1% pH 7,4, 10 minutos cada vez, sob agitação constante.

As amostras de soro foram diluídas na proporção de 1/100 em TBS-Tween 0,1% - leite desnatado 5% pH 7,4, incluindo 1 controle positivo, 1 controle negativo e os soros dos doadores com resultado positivo pelo método de ELISA indireto.

As amostras foram incubadas com as tiras de nitrocelulose, sob agitação constante, por 1 hora à temperatura ambiente.

Após a incubação, as tiras foram lavadas 3 vezes como descrito anteriormente e, então adicionou-se o conjugado; soro de coelho, anti-IgM ou anti-IgG humano conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1/3.000 para IgM e 1/6.000 para IgG em TBS - Tween 0,1% - leite desnatado 5%, e incubou-se durante 1 hora e meia à temperatura ambiente, sob agitação constante.

As tiras foram lavadas por mais 3 vezes como descrito anteriormente e adicionou-se o substrato, composto por 10mL de tampão Tris para revelação com 99µL de solução de NBT (nitrobluetetrazolium) e 66µL de solução de BCIP (bromocloroindolilfosfato) em 2 placas de Petri, nas quais as tiras foram distribuídas separadamente (IgG e IgM).

Após a adição de 1ml de substrato por fita de papel de nitrocelulose, as placas foram mantidas sob agitação constante e protegidas da luz, e aguardou-se o aparecimento de bandas no controle positivo, quando a reação foi bloqueada com água destilada.

## 4.6 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*BABESIA BOVIS* IgG E IgM PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA)

### 4.6.1 Antígeno utilizado

O antígeno de *Babesia bovis* foi obtido segundo metodologia descrita por Madruga et al.<sup>19</sup> Bezerros foram inoculados com *B. bovis* (isolado mantido no Banco de Endo, Ecto e Hemopatógenos da Embrapa Gado de Corte) conforme método de Kessler et al.,<sup>28</sup> cujo sangue foi colhido quando houve alta parasitemia (superior a 20%), em citrato de sódio e lavado três vezes com tampão fosfato para remoção de leucócitos. Nestas condições, o sangue parasitado foi armazenado a -70°C. Posteriormente, as hemácias lisadas e os parasitas foram

centrifugados a 22.000 x g por três vezes, com solução tampão fosfato. A solubilização deste material foi feito com tampão de lise (50 mM TRIS, 5mM de EDTA, 5 mM de iodoacetamida, 0,1mM de fenilmetilsulfonilfluoreto, 0,1 mM de N-alfa- ptosil-L-lisil clorometil cetona, 1% de Nonidet-P-40).

O material lisado foi centrifugado a 30.000 x g durante 60 minutos, filtrado através de membrana de 0,45 µm e sonicado por dez minutos, com intervalos de um minuto, em banho de gelo. O extrato antigênico de *B. bovis* foi submetido à dosagem de proteínas totais solúveis pela técnica do reagente de Folin.<sup>19</sup>

#### 4.6.2 Execução do ELISA indireto

As análises por ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *B. bovis* foram procedidas segundo protocolo de Yoshinari et al.:<sup>8</sup>

1. Foram sensibilizadas duas placas de 96 orifícios (Immulon I), uma para IgG e outra para IgM com o antígeno de *Babesia bovis*, na concentração de 7,5 µg/ml diluído em DPBS (tampão de Dubelco's, pH 7,2) e adicionado 100µl em cada orifício.
2. As placas foram incubadas em câmara úmida, a 4° C *overnight*.
3. No dia seguinte, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBST 0,1% pH 7,4 e, em seguida foi adicionado a solução bloqueio – solução protéica feita com soro de coelho a 5% diluído em PBST 0,1% - e distribuído 100 µl/ poço.
4. As placas foram incubadas em câmara úmida, por uma hora, à 37°C, e enquanto se aguardava, foram preparados os soros testes e oito controles negativos na diluição de 1/100 para a placa de IgM e 1/400 para IgG . O soro controle positivo foi preparado na diluição de 1/50 para a placa IgM e 1/100 para a placa IgG.
5. Os soros testes e os controles negativos foram preparados da seguinte maneira: para a placa de IgM, 5,0µl de soro teste ou controle negativo foram diluídos em 500µl de PBST 0,1% e para a placa de IgG, 2,5µl de soro teste ou controle negativo em 1000µl de PBST 0,1%. O preparo dos controles positivos foi

realizado, como segue: para a placa de IgM, 2,5µl de controle positivo em 500µl de PBST 0,1% e para a placa de IgG, 5,0µl de controle positivo em 500µl de PBST 0,1%.

6. Após uma hora, foram retiradas as placas da câmara úmida e lavadas por cinco vezes, com PBST 0,05% pH 7,4.
7. Depois de preparadas, as amostras de soro foram adicionadas aos poços da placa, incluindo um controle positivo, 8 controles negativos e os soros dos doadores em duplicata nas diluições de 1/100 para IgM e 1/400 para IgG e, então incubadas por 1 hora à 37°C.
8. Após esse período, as placas foram lavadas por mais cinco vezes com PBST 0,1% pH 7,4.
9. Foi adicionado o conjugado, anti-IgM ou anti-IgG humano conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), diluído a 1:2.000 em PBST a 0,1% e distribuído 100µl por poço.
10. As placas foram novamente incubadas em câmara úmida, por uma hora, a 37° C.
11. Em seguida, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBST 0,1% pH 7,4.
12. Posteriormente, foi adicionado 100µl em cada orifício da placa de solução substrato revelador – para-nitro-fenil-fosfato (PNPP), na concentração de 1mg/ml, diluído em tampão glicina pH 10,5 para leitura em espectrofotômetro para ELISA (Labsystems Multiskan MS) em comprimento de onda de 405 nm.
13. Interpretação dos resultados – uma amostra foi considerada positiva se apresentasse uma DO (densidade óptica) igual ou maior ao valor do *cut-off*, que é obtido pela média dos valores de DOs dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão desses valores, garantindo um nível de confiança de 99,8%.
14. Os valores em DOs expressos pelo espectrofotômetro para as microplacas foram convertidos em títulos, utilizando para esse fim um gráfico de calibração do título, em papel milimetrado. O título considerado positivo para IgG foi maior ou igual a 1/400 e para IgM maior ou igual a 1/100.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Segundo os critérios de inclusão da pesquisa, 115 pacientes foram selecionados, submetidos ao protocolo e suas amostras foram separadas para sorologia.

A idade dos pacientes variou de 18 a 65 anos, sendo 29 (25,2%) do sexo feminino e 86 (74,8%) do sexo masculino. Em relação à procedência, 113 (98,26%) pacientes eram da zona urbana de Campo Grande–MS e apenas 2 (1,74%) eram da zona rural de cidades do interior do Estado de Mato Grosso do Sul.

### 5.2 RESULTADOS DOS EXAMES SOROLÓGICOS

#### 5.2.1 ELISA para *Borrelia burgdorferi*

Das 115 amostras analisadas, 09 (7,8%) apresentaram positividade para *B. burgdorferi*. Destas nove, duas (1,8%) tiveram títulos positivos para IgM, quatro (3,4%) para IgG, e três (2,6%) apresentaram concomitância para IgG e IgM.

Foram considerados positivos os títulos de anticorpos pelo método de ELISA maiores ou iguais a 1/100 para IgM e 1/400 para IgG.

Tabela 1: Resultado do ELISA para *Borrelia burgdorferi* em doadores de sangue.

grupo	<i>n</i>	Positivos	%
Doadores	115	09	7,8

As Tabelas 2 e 3 apresentam a frequência de positividade da sorologia para anticorpos das classes IgM e IgG, respectivamente, aos antígenos de *B. burgdorferi* pelo método ELISA.

Tabela 2 – Títulos detectados para *Borrelia burgdorferi* – IgM pelo ELISA.

TÍTULO	IgM + n°
1:100	03
1:200	01
1:400	01
Total	05/115

Tabela 3 – Títulos detectados para *Borrelia burgdorferi* – IgG pelo ELISA.

TÍTULO	IgG + n°
1:400	05
1:800	01
1:1600	01
Total	07/115

A positividade da sorologia para *B. burgdorferi* nos soros dos doadores analisados foi de 4,34% para os Acs da classe IgM e 6,08% para os da classe IgG.

As frequências das classes de anticorpos, isoladas ou em concomitância, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência de anticorpos da classe IgM e IgG para *B. burgdorferi* (ELISA) em pacientes doadores de sangue.

Grupo	IgM +	IgG+	IgM + e IgG +	Total
Doador (n=115)	02	04	03	09/115

### 5.2.2 Western blotting para *Borrelia burgdorferi*

A análise por WB (teste de confirmação) foi realizada em todas as nove amostras que apresentaram positividade para Acs anti-*Borrelia* pela técnica do ELISA. O WB confirmou

todos os resultados obtidos pelo ELISA. Das nove amostras testadas pelo WB, duas tiveram títulos positivos para IgM, quatro para IgG, e três apresentaram concomitância para IgG e IgM.

A tabela 5 mostra os resultados da sorologia para *Borrelia burgdorferi* pela técnica do ELISA e do WB em doadores de sangue.

Tabela 5: ELISA e Western blotting para *Borrelia burgdorferi*.

SORO n°	BORRELIA			
	ELISA		W.B.	
	IgM	IgG	IgM	IgG
8	1/400	1/400	(+)	(+)
12	1/100	1/400	(+)	(+)
16	1/100	NEG	(+)	NEG
47	1/200	NEG	(+)	NEG
113	1/100	1/400	(+)	(+)
36	NEG	1/400	NEG	(+)
53	NEG	1/400	NEG	(+)
61	NEG	1/1600	NEG	(+)
67	NEG	1/800	NEG	(+)

### 5.2.3 - ELISA para *Babesia bovis*

Das 115 amostras analisadas, 12 (10,43%) apresentaram positividade para *B. bovis*. Destas doze, seis (5,2%) tiveram títulos positivos para IgM, uma (0,9%) para IgG, e cinco (4,3%) apresentaram concomitância para IgG e IgM.

Foram considerados positivos os títulos de anticorpos pelo método de ELISA maiores ou iguais a 1/100 para IgM e 1/400 para IgG.

Tabela 6: Resultado do ELISA para *Babesia bovis* em doadores de sangue.

grupo	<i>n</i>	positivos	%
Doadores	115	12	10,4



As Tabelas 7 e 8 apresentam a frequência de positividade da sorologia para anticorpos das classes IgM e IgG, respectivamente, aos antígenos de *Babesia bovis* pelo método ELISA.

Tabela 7 – Títulos detectados para *Babesia bovis* – IgM pelo ELISA.

TÍTULO	IgM + n°
1:100	06
1:200	04
1:400	01
Total	11/115

Tabela 8 – Títulos detectados para *Babesia bovis* – IgG pelo ELISA.

TÍTULO	IgG + n°
1:400	05
1:800	01
Total	06/115

A positividade da sorologia para *Babesia bovis* nos soros dos doadores analisados foi de 9,56% para os anticorpos da classe IgM e 5,21% para os da classe IgG.

As frequências das classes de anticorpos, isoladas ou em concomitância, estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Frequência de anticorpos da classe IgG e IgM para *B. bovis* (ELISA) em pacientes doadores de sangue.

Grupo	IgM +	IgG+	IgM + e IgG +	Total
Doador (n=115)	06	01	05	12/115

#### 5.2.4 Coexistência de anticorpos anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* em doadores de sangue pelo ELISA

Das 115 amostras analisadas, 02 (1,74%) apresentaram positividade tanto para *B. burgdorferi* como para *B. bovis*. Ambas as amostras reagentes apresentaram títulos positivos somente para a classe IgM. Positividade para Acs da classe IgG e/ou concomitância para IgG e IgM não foi verificada.

Foram considerados positivos os títulos de anticorpos pelo método de ELISA maiores ou iguais a 1/100 para IgM e 1/400 para IgG.

Tabela 10: Resultado do ELISA para coexistência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* e *Babesia bovis* em doadores de sangue.

grupo	<i>n</i>	positivos	%
Doadores	115	02	1,74

A tabela 11 mostra os soros reagentes pelo ELISA para *Borrelia burgdorferi* e *Babesia bovis*.

SORO n°	BORRELIA		BABESIA	
	ELISA		ELISA	
	IgM	IgG	IgM	IgG
8	1/400	1/400	1/200	NEG
12	1/100	1/400	NEG	NEG
16	1/100	NEG	NEG	NEG
47	1/200	NEG	NEG	NEG
113	1/100	1/400	1/100	NEG
36	NEG	1/400	NEG	NEG
53	NEG	1/400	NEG	NEG
61	NEG	1/1600	NEG	NEG
67	NEG	1/800	NEG	NEG
1	NEG	NEG	1/100	NEG
23	NEG	NEG	1/100	1/400
34	NEG	NEG	NEG	1/400
70	NEG	NEG	1/400	1/800
71	NEG	NEG	1/100	1/400
82	NEG	NEG	1/200	NEG
85	NEG	NEG	1/100	NEG
89	NEG	NEG	1/200	1/400
91	NEG	NEG	1/200	NEG
100	NEG	NEG	1/100	1/400

### 5.2.5 Implantação do serviço de diagnóstico laboratorial da borreliose de Lyme e outras enfermidades emergentes intercorrentes e transmitidas por carrapatos, como a babesiose, no Hospital Universitário da UFMS.

Para o cumprimento do segundo objetivo específico proposto neste trabalho, realizou-se a capacitação de vários profissionais da área da saúde através de treinamentos em imunodiagnóstico nos laboratórios de imunologia e biologia molecular da Área de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte - MS e no laboratório de Reumatologia (LIM-17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Embora este projeto tenha sido aprovado pela FUNDECT – Fundação de Apoio do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - (protocolo nº 405/02) - a estruturação do laboratório para diagnóstico da BL, babesiose e outras zoonoses no Hospital Universitário da UFMS ainda não foi totalmente completada. Esse serviço de diagnóstico estará localizado no Laboratório Multiuso de Doenças Infecto-Parasitárias vinculado à UFMS.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 RESULTADOS DA SOROLOGIA PARA *BORRELIA BURGENDORFERI*

O estudo epidemiológico das borrelioses tem como principal ferramenta imunológica o ELISA e o WB.<sup>4,9</sup> No Brasil, estudos soropidemiológicos foram realizados em humanos,<sup>8,12,18,37,41,143</sup> em cães<sup>75</sup> e em bovinos<sup>81</sup> utilizando-se antígeno sonicado total de *B. burgdorferi* sensu stricto cepa G39/40. Os resultados verificados nas populações humana e de animais domésticos no Brasil foram similares aos obtidos em áreas endêmicas dos EUA.<sup>80</sup> Estudos já caracterizaram Mato Grosso do Sul, como uma região de risco para a BL,<sup>40,41,143</sup> no entanto não dispomos em nosso Estado de dados que permitam conhecer a soroprevalência de Acs anti-*Borrelia* em soro de humanos sadios e que indiquem a possibilidade da existência de casos assintomáticos em uma população ativa.

Estudos sorológicos em diversas regiões já foram conduzidos no intuito de se conhecer a soroprevalência de Acs anti-*Borrelia* em soros de humanos sadios. Stefancikova et al. em 2001, pesquisaram a presença de Acs anti-*Borrelia* IgG e IgM pelo método ELISA nos soros de 439 pacientes com suspeita de BL no leste da Eslováquia. Desse total, em 64 casos (14,6%) os anticorpos foram positivos, sendo 33 (51,5%) para IgG, 22 (34,4%) para IgM e 9 (14%) para ambas as classes.<sup>145</sup>

Chmielewski et al. em 2002, analisando 1000 amostras de soro obtidas de doadores de sangue sadios na Polônia, detectaram a presença de Acs específicos anti-*Borrelia burgdorferi* em 11-13% das amostras.<sup>142</sup> Um estudo na Holanda utilizando o ELISA como teste diagnóstico identificou uma prevalência de 9% para Acs IgG contra *B. burgdorferi* em doadores de sangue.<sup>149</sup>

Zwolinski et al. em 2004, em uma análise de 56 soros de doadores de sangue (usados como grupo controle da pesquisa), identificaram a presença de Acs específicos anti-*Borrelia burgdorferi* em 7,1% das amostras.<sup>148</sup> LLEDÓ et al. também em 2004, analisaram 1825 amostras de soros obtidas de uma população da província de Madrid que procuraram centros de saúde por razões não relacionadas a doenças infecciosas. Acs específicos anti-*Borrelia burgdorferi*, foram detectados, utilizando-se a técnica de IFI, em 63 (3,45%) das amostras.<sup>144</sup>

Cisak et al. em 2005, utilizando 56 amostras de soro de doadores de sangue urbanos como grupo controle da pesquisa, mostraram soropositividade para Acs IgG e/ou IgM anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato em apenas 4 casos (7,1%). Utilizou-se o ELISA como teste sorológico.<sup>147</sup>

No Brasil, Yoshinari et al.<sup>12</sup> em 1997 estimaram que a frequência de soropositividade para a DL na população brasileira é de 3%, após testes em soros de indivíduos saudáveis. Estudos sorológicos em humanos (1067 amostras) realizados nas regiões de Itapevi e Cotia (áreas endêmicas para a BL), Estado de São Paulo, constataram 7,5% de positivos no ELISA.<sup>17</sup>

No Brasil, Gauditano et al. compararam pacientes com DLS com um grupo controle constituído de 80 amostras de soros de doadores de sangue normais e encontraram positividade para IgG em 1,25% e para IgM em 2,5%.<sup>14</sup>

Naka em dissertação de mestrado no ano de 2006, no Estado de MS, detectou positividade para Acs Anti-*B. burgdorferi* tanto para a classe IgG como para a IgM em 8% das amostras, de um grupo controle composto por 100 crianças saudáveis.<sup>143</sup>

No presente estudo, o teste ELISA contra *B. burgdorferi* mostrou frequência de positividade em 7,8% dos pacientes, sendo 1,8% para IgM, 3,4% para IgG e 2,6% para IgM e IgG concomitantemente.

Apesar de haver variações nas porcentagens de soropositividade para Acs anti-*Borrelia* em indivíduos saudáveis nos diversos estudos conduzidos em diferentes regiões do globo, os resultados aqui obtidos se aproximam muito de alguns já realizados.<sup>17,147,148</sup>

Ao comparar os resultados deste trabalho com a frequência de soropositividade da DL para a população brasileira como um todo (3%), uma maior porcentagem é verificada (7,8%). Porcentagem esta, que é muito semelhante à encontrada na população da região de Cotia (7,5%), a qual é considerada endêmica para a doença.<sup>17</sup>

Os baixos títulos de Acs, tanto para IgM como para IgG, obtidos neste estudo e em outras pesquisas<sup>12,41,58,143</sup> corroboram para a suspeição que o patógeno responsável pela resposta humoral destes indivíduos seja distinto das espécies de borrelíias isoladas em outros continentes ou, até mesmo, tratar-se de microorganismos diferentes do gênero *Borrelia*, mas que deva ter em sua composição antigênica epítomos similares ao da *Borrelia* spp.

A constatação de que todas as amostras positivas para borrelia eram provenientes de indivíduos da área urbana reafirma o caráter cosmopolita dessa enfermidade em nossa região, uma vez que Costa et al.<sup>41</sup> e Naka<sup>143</sup> também relataram essa característica.

A validação e confiabilidade dos resultados obtidos nos testes sorológicos para borrelia foram suportadas pela seleção criteriosa na escolha das amostras e pela adoção de um *cut-off*, obtido pela média dos valores de DOs dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão desses valores, o que garantiu um nível de confiança de 99,8% para as análises realizadas pelo ELISA. Ademais, o WB confirmou todos os resultados positivos identificados pelo ELISA.

É possível supor que as porcentagens de positividade para borrelia possam ser, na realidade, superiores às verificadas neste levantamento, uma vez que até o momento, o agente etiológico ainda não foi isolado no país e Ag utilizado (sonicado total da *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cepa americana G 39/40) é proveniente de outro continente.

Embora os Acs da classe IgM sejam característicos da fase aguda, existem relatos de persistência dos níveis positivos por mais de quatro a seis meses, inclusive até por um ano.<sup>10</sup> A presença dessa classe de Acs no soro desses indivíduos sadios não significa necessariamente que a infecção esteja ativa.

Os títulos de IgG positivos mesmo em pacientes assintomáticos, ocorrem devido à persistência do antígeno nos tecidos afetados. Isso foi confirmado pela reação da polimerase em cadeia (PCR) nestes tecidos.<sup>43</sup>

A frequência de soropositividade de 7,8% para Acs contra *Borrelia burgdorferi* em doadores de sangue no Estado de MS é um indicativo da ampla distribuição do agente em nossa região e da probabilidade de haver casos humanos sem sintomatologia.

## 6.2 RESULTADOS DA SOROLOGIA PARA *BABESIA BOVIS*

Embora a babesiose seja considerada uma zoonose emergente, poucos levantamentos soroepidemiológicos foram realizados em uma população de humanos sadios.

Hernández et al. em um trabalho realizado em Cuba, utilizando a técnica de IFI com Ags de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, detectaram uma frequência de positividade para

Acs anti-*Babesia* em 7,0% dos trabalhadores agropecuários e 3,9% nos doadores de sangue. Neste estudo, 3,7% dos indivíduos estudados apresentaram Acs contra *B. bovis* e 1,6% contra *B. bigemina*.<sup>130</sup>

Em Moçambique, um outro estudo realizado em indivíduos assintomáticos utilizando a técnica de fixação de complemento, detectou que 7,1% das amostras estudadas tinham Acs contra *Babesia bovis* e 4,5 % para *Babesia bigemina*.<sup>130</sup>

Osorno et al. realizaram um estudo em uma área de risco para babesiose e encontraram Acs contra *Babesia spp.* em 38% das 101 amostras de sangue examinadas, demonstrando que a infecção pode ser latente ou assintomática.<sup>141</sup>

Pesquisas realizadas em indivíduos assintomáticos, mas que mantinham um maior tempo de exposição aos fatores de risco como o contato freqüente com o gado bovino mostraram uma prevalência maior desses Acs.

Um estudo na Venezuela registrou positividade de 42% para anticorpos contra a *Babesia bigemina* e 22,1% contra a *Babesia bovis* em médicos veterinários, trabalhadores agropecuários e soldados de origem rural.<sup>127</sup> Semelhantes resultados foram anotados em áreas rurais no México onde se relatou soroprevalência de 37 %.<sup>146</sup>

No Brasil, Yoshinari e col. utilizando o ELISA como teste imunológico, realizaram um estudo em grupo de pacientes constituído por 49 indivíduos normais para estimar a freqüência da soropositividade para babesiose na população normal. Os resultados relatados mostraram que a freqüência de Acs contra *B. bovis* em um grupo controle foi de 10,2%, sendo 8,2% para Acs da classe IgG e 2,04% para Acs da classe IgM.<sup>8</sup>

No Mato Grosso do Sul, Naka em 2006 registrou 3% de positividade para Acs anti-*Babesia* em um grupo controle constituído de 100 crianças sadias.<sup>143</sup>

Os resultados da pesquisa da Acs anti-*Babesia bovis* por meio da técnica de ELISA obtidos neste estudo mostraram uma freqüência de positividade em 10,4% das amostras, sendo 5,2% para Acs da classe IgM, 0,9% para a classe IgG e 4,3% para IgM e IgG concomitantemente. Este resultado (10,4%) se aproximou muito do obtido por Yoshinari et al.<sup>8</sup> (10,2%) ao estimar a freqüência da soropositividade para babesiose em uma população normal.

A positividade dos anticorpos contra a *Babesia bovis* nos indivíduos deste estudo pode ser também devido à memória imunológica dos indivíduos testados, pois se demonstrou que



os anticorpos anti-*Babesia* podem se manter detectáveis por um período de um a dois anos após a infecção primária.<sup>130,146</sup>

Os baixos títulos de Acs contra *B. bovis*, obtidos neste estudo, são indicativos de infecção crônica ou sub-clínica, pois em geral, os títulos de Acs produzidos contra a babesia declinam durante o curso desses tipos de infecções.<sup>133</sup>

Babesiose é uma doença zoonótica, com a natural infecção de humanos como resultado natural da interação com ciclos enzoóticos estabelecidos. O Estado de Mato Grosso do Sul, com um rebanho estimado de 25 milhões de cabeças de gado, é uma região onde a população bovina se encontra em situação epidemiológica de estabilidade enzoótica para a *Babesia bovis*. O Estado tem na bovinocultura uma das suas principais atividades econômicas e um grande número de pessoas está envolvido nessa cadeia produtiva, muitas delas, na lida diária com o animal o que possibilitaria a infecção em humanos sugerindo, de acordo com os resultados observados neste trabalho, uma ampla dispersão do agente em nosso meio.

Em Mato Grosso do Sul, um projeto em rede foi realizado pela Embrapa Gado de Corte de Campo Grande, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Universidade de São Paulo e Universidade Federal do Rio de Janeiro. Como parte dos resultados obtidos verificou-se que uma grande proporção de bovinos em seis municípios do interior de MS apresentou sorologia positiva tanto para *B. burgdorferi* (68,8 a 99,2% dos bovinos) como para *Babesia bovis* (71,2 a 98,4% dos bovinos). Houve ainda coexistência de ambos agentes em 54,5 a 97% nos bovinos.<sup>79</sup>

A incidência de babesiose em humanos parece ser maior onde há criação de gado, como em áreas do oeste da França e Irlanda. Na Europa, a doença tem distribuição sazonal, com a maioria dos casos ocorrendo em épocas em que os carrapatos são mais ativos (maio a setembro).<sup>128</sup>

Apesar dos relatos de babesiose humana serem raros, os sintomas são semelhantes à malária, com febre, mal-estar, mialgia, artralgia, hemólise, icterícia e alterações de função hepática.<sup>140</sup> Comparada à alta incidência de malária no homem e da babesiose em animais selvagens e domésticos como bovinos, cavalos, cães e roedores, o homem parece ser raramente infectado pela *Babesia* spp., ou pelo menos essa infecção raramente é aparente.

Vários autores já relataram a transmissão de *Babesia* spp. por transfusão sangüínea.<sup>135,136,137</sup> Os resultados observados neste trabalho permitem sugerir a adoção em bancos de sangue de testes sorológicos para *Babesia* spp. juntamente com um questionário

abordando a epidemiologia da doença para diminuir a possibilidade, ainda que remota, deste tipo de transmissão.

### 6.3 CO-INFECÇÃO BORRELIA E BABESIA

Vários estudos registram a co-infecção em humanos e animais causadas por diferentes patógenos transmitidos por carrapatos como borrelia e babesia.<sup>4</sup>

No Brasil, Yoshinari et al. descreveram a co-infecção entre *Babesia* spp. e *Borrelia* spp., identificados por métodos sorológicos, em dois enfermos residentes em áreas endêmica para a SIRLS em Cotia–SP. Verificou-se através da sorologia com *B. bovis* que pacientes com SIRLS apresentavam uma maior positividade para estes Acs em comparação a um grupo de indivíduos normais. Os autores sugeriram a possibilidade da transmissão dos dois microorganismos pelo mesmo carrapato em áreas endêmicas para a SIRLS no Brasil.<sup>8</sup>

Registrou-se na presente pesquisa a coexistência de Acs anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* em duas amostras (1,73%), sendo os Acs da classe IgM os únicos detectados.

Os resultados poderiam ser esperados, uma vez que MS foi identificado como uma região de risco para a DL<sup>40,41</sup> e também pelo fato de Naka<sup>143</sup> em 2006 ter relatado a coexistência de Acs para esses dois microorganismos em crianças com suspeita de DL.

A co-infecção por *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp. e *Babesia* spp. é resultado de vetores comuns para os respectivos patógenos dessas doenças, mais comumente carrapatos do gênero *Ixodes*.<sup>129</sup> No Brasil, pacientes com SIRLS muitas vezes apresentam anemia, adenomegalia, fadiga, neuropatia motora e outros sintomas que permanecem após tratamento, sugerindo outro foco infeccioso, que pode ser um destes parasitas, transmitido pelo mesmo carrapato.

Embora possamos supor que a co-infecção desses dois indivíduos tenha sido transmitida por carrapatos, o modo como esta transmissão ocorreu ainda não está claro. Costa et al.<sup>40</sup> sugeriram que carrapatos do gênero *Amblyomma* são os potenciais transmissores da borrelia aos humanos em MS, enquanto que a babesiose, em nosso país, é transmitida por outras espécies de carrapatos (*Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor* spp.). Assim, a confirmação da transmissão desses dois agentes por uma mesma espécie de

vetor necessitaria de um estudo mais específico. Poderia-se também supor, até mesmo, que a transmissão tenha ocorrido por uma outra espécie de vetor, pois provavelmente, a exemplo do que ocorre com SILRS, a babesiose deve apresentar características próprias em nossa região, com possíveis variações genéticas das espécies, o que levaria a particularidades na interação patógeno-vetor em ecossistemas distintos.

A presença de anticorpos contra a borrelia e a babesia sugere que estes indivíduos tiveram contato com estes microorganismos em nossa região. Assim ressaltamos a importância de se realizar mais estudos clínicos e epidemiológicos em nosso Estado, o que possibilitará uma maior compreensão da interação entre essas duas zoonoses em nosso ambiente.

Esperamos que os resultados obtidos nesta pesquisa possam contribuir para o mapeamento dessas zoonoses, pois as enfermidades transmitidas por carrapato são de difícil diagnóstico, uma vez que os pacientes geralmente não citam picada pelo ectoparasito, as manifestações clínicas na fase inicial da doença são pouco específicas e o diagnóstico laboratorial ainda carece de uma maior especificidade e sensibilidade para esses agentes.

A co-infecção de microorganismos agrava e prolonga a doença tornando-se uma preocupação de saúde pública. No Brasil, apesar dos esforços, não se conhece por completo as manifestações clínicas das co-infecções transmitidas por carrapatos, tampouco o diagnóstico laboratorial é suficientemente seguro. Portanto entendemos que novos estudos sobre soroprevalência, descrição de casos clínicos e identificação de vetores e reservatórios são de extrema importância para auxiliar no diagnóstico dessas enfermidades.

#### 6.4 ESTABELEECER O SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA BORRELIOSE DE LYME E OUTRAS ENFERMIDADES EMERGENTES INTERCORRENTES E TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS, COMO A BABESIOSE, NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFMS.

As doenças transmitidas por artrópodes são as enfermidades que mais acometem o homem e os animais, principalmente pelo fato da habilidade de transmissão mecânica ou

biológica pelo artrópode. Os carrapatos constituem-se no segundo grupo de vetores que maior número de patógenos transmite.<sup>80</sup>

As análises sorológicas obtidas a partir das amostras de indivíduos sadios neste trabalho revelam a ampla dispersão desses agentes em nosso ambiente. Por isto, acreditamos que a implantação em nosso Estado de metodologias diagnósticas para a SIRLS e outras enfermidades emergentes intercorrentes e transmitidas por carrapatos, como a babesiose contribuirá para a identificação de casos suspeitos, o que certamente trará grandes benefícios para a população exposta a esses vetores.

Imaginamos também que esse serviço de diagnóstico contribuirá para um melhor conhecimento das enfermidades transmitidas por carrapatos possibilitando a padronização laboratorial de novas técnicas diagnóstico, a busca na identificação do agente etiológico da SIRLS no país, além da relevante troca de informações com outros centros de pesquisas como o Centro de Referência para a Doença de Lyme no Brasil (Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do HCFMUSP-SP – LIM-17).

Por fim, os resultados obtidos nesta pesquisa podem significar que esses indivíduos sadios tiveram contato com os agentes pesquisados, ou ainda, com outro(s) agente(s) que tenha(m) determinante(s) antigênico(s) similar(es) sugerindo uma ampla distribuição desses patógenos em nosso meio. Dessa maneira, os estudos devem prosseguir, pois essas zoonoses necessitam de uma melhor delineação em nosso Estado, tanto quanto ao seu aspecto epidemiológico e clínico, como em relação à execução de ensaios sorológicos mais sensíveis e aperfeiçoamento e padronização das técnicas laboratoriais. Isto contribuirá para a melhor compreensão da interação entre essas duas zoonoses em nosso ambiente permitindo a identificação e caracterização dos pacientes com manifestações clínicas e laboratoriais, além da real possibilidade da existência de casos assintomáticos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A pesquisa em soro de doadores de sangue do HEMOSUL – MS de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo ELISA detectou positividade em 7,8% dos indivíduos investigados, sendo 1,8% da classe IgM, 3,4% da classe IgG e 2,6% para IgM e IgG concomitantemente.

- A pesquisa de anticorpos anti-*Babesia bovis* pelo ELISA em soro de doadores do banco de sangue do HEMOSUL – MS revelou uma positividade em 10,4% dos indivíduos analisados, sendo 5,2% da classe IgM e 0,9% da classe IgG. 4,3% das amostras apresentaram reatividade para anticorpos de ambas as classes.

- Houve concomitância dos anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* e *Babesia bovis* em duas amostras (1,74%) dos doadores pesquisados, o que poderia indicar a transmissão de mais de um agente pela picada do carrapato-vetor (co-infecção).

- A presença de anticorpos anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* no soro de doadores de sangue pode significar que esses indivíduos sadios tiveram contato com os agentes pesquisados, ou ainda, com outro(s) agente(s) que tenha(m) determinante(s) antigênico(s) similar(es) sugerindo uma ampla distribuição desses patógenos em nosso meio com a possibilidade de casos clínicos assintomáticos.

- O encontro de anticorpos anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* no soro de doadores de sangue evidencia a possibilidade, ainda que remota, da transmissão desses agentes via transfusão sangüínea, o que tornaria essa questão uma relevante preocupação para a saúde pública.

- A implantação definitiva do serviço de diagnóstico laboratorial da borreliose de Lyme e outras enfermidades emergentes intercorrentes e transmitidas por carrapatos no Hospital Universitário da UFMS contribuirá para o conhecimento da situação regional dessas zoonoses, além de fornecer suporte para o clínico e estimular o desenvolvimento de futuras pesquisas na área.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennet CE. Ticks and Lyme disease. *Adv. Parasitol* 1995; 36:343-405.
2. Ornstein K, Berglund J, Bergström S, Norrby R, Barbour AG. Three major Lyme *Borrelia* genospecies (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified by PCR in cerebrospinal fluid from patients with neuroborreliosis in Sweden. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 341-6.
3. Masuzawa T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi sensu lato* in east Asia. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 229-35.
4. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 2001; 395:115-25.
5. Magnarelli LA, Dumler JS, Anderson JF, Johnson RC, Fikrig E. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *J Clin Microbiol* 1995;33: 3054-3057.
6. Telford SR, Armstrong PM, Katavolos P, Fppa I, Garcia ASO, Wilson ML & Spielman A. A new tick-borne encephalitis-like virus infecting New England deer ticks, *Ixodes dammini*. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3(2): 165-170.
7. Nadelman RB; Horowitz HW; Hsieh TC et al. Simultaneous human granulocitic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 27-30.
8. Yoshinari NH, Abrão MG, Bonoldi VLN, Soares CO, Madruga RM, Scofield A, et al. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of Babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia County, state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98 (3): 311-8.
9. Grodzicki RL, Steere AC. Comparision of immunoblotting and indirect-linked immunosorbent assay using different antigens preparations for diagnosing early Lyme disease. *J Infect Dis* 1998; 157: 790-97.

10. Fonseca AH, Salles RS, Salles SAN, Madureira RC, Yoshinari NH. Borreliose de Lyme símile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *An Bras Dermatol* 2005; 80(2):171-8.
11. WHO – Report of a Workshop of Lyme Borreliosis 1993; p.1-9.
12. Yoshinari NH, Barros, P JL, Bonoldi, VLN, et al. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, v.52, 1997; p.111-117.
13. Baker-Zander S. & Lukerhart SA. Antigenic cross-reactivity between *Treponema pallidum* and other pathogenic members of the family Spirochaetaceae. *Infect. Immun.*, v. 46(1), 1984; p.116-121.
14. Gauditano G, Bonoldi VLN, Hiratsuka RC, Kiss MH, Yoshinari NH. Aspectos imunológicos comuns entre a doença de Lyme e a febre reumática. *Rev Bras Reumatol* 2000; 40 (1): 1-8.
15. Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 2004; 129: S191-220.
16. Gorenflot A, Moubri K, Precigout E, Carcy B, Schettters TP. Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92(4):489-501.
17. Yoshinari, NH. Doença de Lyme-símile no Brasil. *Rev. Assoc. Nac. Clin. Vet. Peq. Anim.*, v.26, 2001; p.13.
18. Yoshinari NH, Barros P JL, Yassuda P, Baggio D, Steere AC, Pagliarini RC & Cossermelli W. Estudo epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. *Revta. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, 1992; 47(2):71-75.
19. Madruga CR, Araújo, FR, Soares CO. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Embrapa, Campo Grande, 2001; 360p.
20. Herxheimer K & Hartman KU. Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arc. Dermatol. Syph.* 1902; 61(57):255-300.
21. Burgdorfer W. Discovery of *Borrelia burgdorferi* In: Coyle PK (ed.) *Lyme Disease*. Mosby Year Book, Boston. 1993; P. 3-7.
22. Montiel NJ, Baumgarten JM, Sinha AA. Lyme disease part II: clinical features and treatment. *Cutis* 2002; 69:443-8.

23. Huppertz HI. Lyme arthritis- experience in Germany. Rev Rheum [Engl Ed] 1997; 64 (Suppl): 205S-206S.
24. Steere AC; Malawista SE; Snyderman D. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthr and Rheum 1977; 20:7-17.
25. Steere AC; Malawista SE; Hardin JA et al. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. Ann Intern Med 1977; 86:685-98.
26. Steere AC, Grodzick RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease. N Engl J Med 1983; 308: 733-740.
27. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int J Syst Bacteriol 1984; 34: 496-497.
28. Baranton G, Postic D & Saint Giros I. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42:378-83.
29. Euzeby JP Les espèces et les genres bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 1994. Revue Med. Vét. 1995; 146:3-22.
30. Canica MM, Nato F, Merle LD, Mazie JC, Baranton G & Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of lyme borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. 1993; 25:441-448.
31. Talhari S, Schettine APM, Parreira VJ. Eritema crônico migrans. Doença de Lyme - Estudo de três casos. In: Anais do Congresso Brasileiro de Dermatologia, [resumo], Goiânia; 1987.
32. Filgueiras AL, Goutijo Filho PP. Doença de Lyme. Rio Dermatol 1989; 2: 4-5.
33. Azulay RD, Abulafia L, Sodre CS. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. Int J Dermatol. 1991; 30:569-71.
34. Yoshinari NH, Steere AC, Cossermelli W. Revisão da Borreliose de Lyme. Rev Ass Med Brasil 1989; 35: 34-7.



35. Yoshinari NH, Oyafuso LK, Monteiro FGV, Barros PJJ, Cruz FCM, Ferreira LGE, et al. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 1993; 48:170-4.
36. Barros PJJ, Levy LH, Monteiro FGV, Yoshinari NH. Doença de Lyme. Acometimento cutâneo e tratamento das fases iniciais. *Rev Assoc Med Bras* 1993; 39:170-2.
37. Costa IP, Yoshinari NH, Barros PJJ, Bonoldi VLN, Leon EP, Zeitune AD et al. Doença de Lyme em Mato Grosso do Sul: relato de três casos clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1996; 51:253-7.
38. Pirana S, Bento RF, Bogar P, Silveira JAM, Yoshinari NH. Paralisia facial e surdez súbita bilateral na doença de Lyme. *Rev Bras Otorrinol* 1996; 62:500-2.
39. Fonseca AH, Ishikawa MM, Soares CO, Massard CL, & Yoshinari NH. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. *Revta. Univ. Rural Sér. Cienc. Da Vida*, 1996; 18(1/2):85-89.
40. Costa, I.P. Pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* e do agente etiológico em soro e líquido de pacientes com manifestações clínicas compatíveis com a Doença de Lyme, no Estado de Mato Grosso do Sul. São Paulo (Dissertação de Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.
41. Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Perfil clínico e laboratorial da doença de Lyme-símile no Estado de Mato Grosso do Sul: análise de 16 pacientes. *Rev Bras Reumatol* 2001; 41 (3): 142-150.
42. Yoshinari NH, Bonoldi VLN, Barros – Battesti, DM, Schumaker TTS. Doença de Lyme Símile no Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 1999; 39(2): 57-8.
43. Barros, PJJ. Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e Reação em Cadeia de Polimerase. São Paulo. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2000.
44. Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease- United States, 2001– 2002. *MMWR*. 2004; 53: 365–369.
45. Gauditano G, Bonoldi VLN, Costa IP, Battesti DMB, Barros PJJ, Fonseca AH, Higuchi ML, Yoshinari NH. Síndrome de Lyme-Símile ou complexo infecto-reacional do carrapato - Síndrome de Baggio-Yoshinari. *Rev Paulista Reumatol* 2005; 4 (3):17.

46. Burgdorfer W. Lyme Borreliosis: Ten Years after Discovery of the Etiologic Agent, *Borrelia burgdorferi*. Infection 1991; 19: 256-28.
47. Naleway AL, Belongia EA, Kazmierczak JJ, Greenlee RT, Davis JP. Lyme disease incidence in Wisconsin: a comparison of state-reported rates and rates from a population-based cohort. Am J Epidemiol 2002; 155 (12): 1120-7.
48. Chow CC, Evans AS, Noonan-Toly CM, White D, Johnson GS, Marks SJ et al. Lyme disease trends- Dutchess County, New York, 1992-2000. The Mount Sinai J of Medicine 2003; 70 (3): 207-213.
49. Cinco M, Barbone F, Ciufolini MG, Mascioli M, Rosenfeld MA, Stefanel P et al. Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 1056-61.
50. Orloski KA, Hayes EB, Campbell GL, and Dennis DT. Surveillance for Lyme disease – United States, 1992-1998. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2000; 49:1-11.
51. Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, et al. Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood: a prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. Acta Paediatr Suppl 1993; 386: 1–76.
52. Stanek G; Strle F. Lyme borreliosis. Lancet 2003;362:1639-47
53. Dennis DT and Hayes EB. Epidemiology of Lyme borreliosis. In Gray OKJS, Lane RS & Stanek G (ed.), Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing, Oxford, England. 2002. p. 251-280.
54. Bourée P. La maladie de Lyme. In: Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Paris, Éditions Techniques, 1990; 8039 R10: 1-6.
55. Diagnosis of Lyme Disease. Lancenet 1989 (July 22): 198-199.
56. Nadelman R, Wormser GP. Lyme borreliosis. Lancenet. v. 352, 1998; p.557-565.
57. Barbour AG, Maupin GO, Teltow GJ, Carter CJ, Piesman J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease – like illness. J. Infect. Dis. 1996, v.173, p.403-9.
58. Abel IS, Marzagão G, Yoshinari NH, Schumaker TTS. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest reserve, Cotia County, State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95 (5): 621-4.

59. Barros-Battesti DM. Estudo de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à *Borrelia*, no Município de Itapevi, Estado de São Paulo. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998.
60. Urioste S, Hall LR, Telford SR, Titus RG. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2 dependent mechanism. I. Exp. Med., v.180, 1994; p.1077-1085.
61. Shapiro ED, Gerber MA Lyme Disease. Clin. Infect. Dis., v.31, 2000 ; p.533-42.
62. Shapiro ED, Gerber MA. Lyme disease: fact versus fiction. Pediatric Annals 2002; 31 (3): 170-7.
63. Hoogstraal H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Adv. Parasitol. 1985; 24:135-238.
64. Sonenshine DE. Biology of Ticks. Vol. 2. Oxford University Press, New York. 1991; 464p.
65. Anderson JF. Epizootiology of Lyme Borreliosis. Scan J Infect Dis 1991; 77: 23-34.
66. Yoshinari, NH.; Costa, IP. Doença de Lyme. In: Bonfá, ESDO; Yoshinari, NH. Reumatologia para o clínico, São Paulo: Roca, 2000.
67. Gustavson R. Epidemiological studies on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Oslo – Copenhagen – Stockholm, Scandinavian University Press, 1993.
68. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 1108-32.
69. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. J Clin Invest 2004;113(8):1093-1101.
70. Bhide MR, Travnicek M, Levkutova M, Curlik J, Revajova V, Levkut M. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2005; 43: 165-72.
71. Gern L, and Pierre-Francois H. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, p. 149-174. 2002. In Gray OKJS, Lane RS & Stanek G (ed.), Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing, Oxford, England. 2002. p. 251-280.

72. Kurtenbach K, Carey D, Hoodless AN, Nutall PA, Randolph SE. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol* v. 35, n. 1, 1998; p.77-81.
73. Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Search for *Borrelia* sp. in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: a short report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (5):631-35.
74. Barros-Battesti, DM; Yoshinari, NH; Bonoldi, VLN; Gomes, AC. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild mammals from na Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.37, 2000; p.820-827.
75. Soares CO, Fonseca AH, Manera GB, Scofield A, Fonseca AH, Yoshinari NH. Sorologia para borreliose em cães procedentes da baixada fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Brasil Med Vet.* 1999; 21:111-3.
76. Goossens HAT, Bogaard AE, Nohlmans MKE. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *J Clin Microbiol*, 2001; 39 (3): 844-8.
77. Merino FJ et al. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria. *European Journal of Epidemiology*, v.16, 2000; p.97-100.
78. Olson PE et al. Canine as sentinels for Lyme disease in San Diego County, California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, 2000; p. 126-129.
79. Soares CO et al. Caracterização clínica, epidemiológica e laboratorial da borreliose de Lyme e a coexistência com a babesiose em humanos e bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. In press 2005.
80. Soares CO, Ishikawa, MM, Fonseca AH, Yoshinari NH. Borrelioses, Agentes e Vetores. *Pesq Vet Bras* 2000; 20: 1-19.
81. Ishikawa MM, Fonseca AH, Soares CO, et al. Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. *Rev Bras Med Vet* 1997; 19:166-8.
82. Singh SK, Girschick HJ. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 575-83.
83. Cann KJ, Wright DJM. Lyme disease. *Lancet* 1992; 339: 1598.

84. Collares-Pereira M. *B. burgdorferi*, o agente etiológico. In: *Borrelia Burgdorferi*, o agente da Borreliose de Lyme (Prova Complementar de Doutorado, U.N.L. Lisboa, 1992: 5-12.
85. Wang G, Dam A Puan, Schwartz I, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 633-653.
86. Hengge UR, Tannapfel A, Tyring SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T. Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (8): 489-500.
87. Schwan TG, and Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in tick and mice. *J Clin Microbiol*, 2000; 38:382-388.
88. Posey JE, and Gherardini FC. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, 2000; 288:1651-1653.
89. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993; 167:392-400.
90. Baum J. Lyme disease in the USA. *Rev Rheum [Engl Ed]* 1997; 64 (Suppl): 200S-201S.
91. Yoshinari, N.H.; Gonçalves, R. Doença de Lyme-símile no Brasil. *Diagn Tratamento*, 2003; 8(2): 61-70.
92. Logigian EL; Kaplan RF; Steere AC. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *N Engl J Med* 1990; 323: 1438-44.
93. Steere AC; Schoen RT; Taylor E. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann Intern Med* 1987; 107:725-31.
94. Nocton JL; Dressler F; Rutledge BJ et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme disease. *N Engl J Med* 1994; 330:229-34.
95. Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE. Lyme Carditis: Cardiac Abnormalities of Lyme Disease. *Ann Intern Med* 1980; 93: 8-16.
96. Nagi KS; Joshi R; Thakin RK. Cardiac manifestations of Lyme disease: a review. *Can J Cardiol* 1996;12:503-06.

97. Stanek; Klein J; Bittner R; Glogar D. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. N Eng J Med 1990; 322:249-52.
98. Åsbrink E, Hovmark, A. Cutaneous Manifestations in Ixodes-borne *Borrelia* Spirochetosis. Int J Dermatol 1987; 26: 215-223.
99. Leslie TA; Levell NJ; Cutler SJ; et al. Acrodermatitis chronica atrophicans: a case report and review of the literature. Br J Dermatol 1994; 131: 687-93.
100. Aberer E; Stanek G; Ertl E et al. Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). Acta Derm Venerol (Stockh) 1987; 67:225-31.
101. Hendrickx G, De Boeck H, Gossens A, Demanet C, Vandenplas Y. Persistent synovitis in children with Lyme arthritis: two unusual cases. An immunogenetic approach. Eur J Pediatr 2004; 163: 646-50.
102. Gross DM; Forsthuber T; Tary-Lehmann M et al. Identification of Lfa-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. Science 1998; 281:703-06
103. Kaplan RF, Trevino RP, Johnson GM, Levy L, Dornbush R, Hu LT et al. Cognitive function in post-treatment Lyme disease - Do additional antibiotics help? Neurology 2003; 60: 1916-22.
104. Tugwell P, Dennis DT, Weinstein A, Wells G, Shea B, Nichol G et al. Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1997; 127 (12): 1109-23.
105. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 1984; 57:521-525.
106. van Dam AP; Kurper H; Vosk, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin Infect Dis 1993; 17:708-17.
107. Schwaiger M, Péter O, Cassinotti P. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 461-9.
108. Lunemann JD, Zarmas S, Priem S, Franz J, Zschenderlein R, Aberer E et al. Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 2001; 39 (3): 1130-3.

109. Cermakova Z, Ryskova O, Honegr K, Cermakova E, Hanovcova I. Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. *Med Sci Monit* 2005; 11 (4): 121-5.
110. Stone EG, Lavombe EH, Rand PW. Antibody testing and Lyme disease risk. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (5): 722-4.
111. Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Einhäupl K: Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. *Infection*, 1984; 12: 331-337.
112. Avery RA, Gary F, Eppes SC. Diagnostic utility of *Borrelia burgdorferi* cerebrospinal fluid polymerase chain reaction in children with Lyme meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(8): 705-8.
113. Joppert AM, Hagiwara MK, Yoshinari NH. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43:251-5.
114. Yoshinari NH, Barros PJJ, Gauditano G, Fonseca AH. Report of 57 cases of Lyme-like disease (LLD) in Brazil. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: S188.
115. Bonoldi, VLN. Estudo da resposta linfoproliferativa aos antígenos da *Borrelia burgdorferi* nos pacientes com doença de Lyme símile na população brasileira. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
116. Yoshinari, N.H.; Steere, A.C.; Barros, P.J.L.; Cruz, F.C.M.; Mendonça, M.; Oyafuso, L.K.; Levy, L.; Cossermelli, W. Lyme disease in Brazil: Report of five cases. *Rev Esp. Reumatol (Suppl)*, 1993; 20:156.
117. Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere et al. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(Suppl 1): 1-14.
118. Pachner AR. The therapy of Lyme neuroborreliosis. *Curr Treat Option Neurol* 2005; 7(2): 167-70.
119. Elston DM. Prevention of arthropod-related disease. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 547-54.

120. MMWR. Recommendation for the use of Lyme disease vaccine: recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practice. Centers for Disease Control, United States. 1999; v.48, p.833.
121. Meer-Scherrer L, Adelson M, Mordechai E, Lottaz B, Tilton R. *Babesia microti* infection in Europe. Current Microbiology 2004; 48: 435-7.
122. Eskow ES, Krause PJ, Spielman A, Freeman K, Aslanzadeh J. Southern extension of the range of human babesiosis in the Eastern United States. J Clin Microbiol 1999; 37 (6): 2051-2.
123. Gray J, Stedingk V, Granstrom M. Zoonotic babesiosis. Int. Med. Microbiol. 2002; 291:108-111.
124. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13:451-469.
125. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW, Garnett ME, Eberhard ML, Wilson M et al. Babesiosis in Washington State. A new species of babesia? Ann Intern Med 1993; 119 (4): 284-90.
126. Friedhoff, KT. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc., 1988. Cap. 2, p. 23-52.
127. White DJ, Talarico J, Chang HG, Birkhead GS, Heimberger T, Morse DL. Human babesiosis in New York State: review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. Arch Intern Med 1998; 158: 2149-54.
128. Kjemtrup AM, Conrad PA. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. Int. J. Parasitol. 2000; 30:1323-1337.
129. Hermanowska-Szpakowicz T, Skotarczak B, Kondrusik M, Rymaszewska A, Sawczuk M, Maciejewska A et al. Detecting DNAs of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. Ann Agric Environ Med 2004; 11: 351-4.
130. Hernandez MS, Castellano MA, Martínez RP, Pérez BS, González JRB, Sibello AS. Pesquisaje de *Babesia* em trabalhadores agropecuários y donantes em la província de Ciego de Avila. Rev Cubana Med Trop 1997; 49 (2): 130-5.



131. Stanczak J, Gabre RM, Kruminis- Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med* 2004; 11: 109-14.
132. Krause PJ, Spielman A, Telford III, et al. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N Engl J Med*, 1998; 339:160-5.
133. Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Raphaelli I, Tilton RC. Serological diagnosis of human babesiosis by IgG Enzyme-linked immunosorbent assay. *Current Microbiology* 2004; 49: 385-9.
134. Telford III SR, Gorenflot A, Brasseur P, Spielman A. Babesial infections in humans and wildlife. In JP Kreier *Parasitic Protozoa*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, San Diego, v.5, 1993; p.1-47.
135. Herwaldt BL, Neitzel DF, Gorlin JB, Jensen KA, Perry EH, Peglow WR, Slemenda SB, Won KY, Nace EK, Pieniazek NJ, Wilson M. Transmission of *Babesia microti* in Minnesota through four blood donations from the same donor over a 6-month period. *Transfusion*, 2002; 42:1154-1158.
136. Popovsky MA. Transfusion-transmitted babesiosis. *Transfusion* 1991 31:296-298 (Editorial).
137. McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, Tabor E. Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. *Transfusion*, 2000; 40:274-84.
138. Ryan R, Krause PJ, Radoif J, Freeman K, Spielman A, Lenz R, et al. Diagnosis of babesiosis using an immunoblot serologic test. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8:1177-1180.
139. Persing DH, Mathiesen WF, Marshall SR, Telford A, Spielman A, Thomford JW, Conrad PA. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992; 30:2097-2103.
140. Krause PJ, Telford SR III, Spielman A, et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increase severity and duration of illness. *JAMA*, 1996; 275:1657-60.
141. Osorno BM, Veja C, Ristie M, Robles C, Barra S. Isolation of *Babesia* spp. from asymptomatic human beings. *Vet Parasitol*, 1976; 2: 11-120.

142. Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanowska S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in healthy population in Poland] *Przegl Epidemiol.* 2002;56(1): 33-8. Polish.
143. Naka EM. Pesquisa de anticorpos anti-*borrelia burgdorferi* e anti-*babesia bovis* em soro de crianças com manifestações clínicas e epidemiologia compatíveis com a síndrome de lyme-símile no Estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2005.
144. Lledó, L; Gegúndez, MI; Saz, JV; Beltrán, M. Screening of the prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Madrid province, Spain. *European Journal of Epidemiology*, v. 19, 2004; p. 471-472.
145. Stefancikova, A; Tetko, B; Rozicka, I; Salyova, N; Ohlasova, D. Epidemiological survey of human borreliosis diagnosed in Eastern Slovakia. *Annals of Agriculture Environmental Medicine*, v. 8, 2001; p. 171-175.
146. Rios L, Alvarez G, Blair S. Serological and parasitological study and report of the first case of human babesiosis in Colombia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36 (4): 493-8
147. Cisak, E; Chmielewska-Badora, J.; Zwolinski, J.; Wójcik-Fatla, A.; Polak, J; Dutkiewicz, J. Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (South-eastern Poland). *Annals Agricola Environmental Medicine*,v. 12, May 2005;p. 127-132.
148. Zwolinski J, Chmielewska-Badora J, Cisak E, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in forestry workers from the Lublin region] *Wiad Parazytol.* 2004;50(2):221-7. Polish.
149. Nolmans M K, A E van den Bogaard, A A Blaauw , C P van Boven. Prevalence of Lyme borreliosis in The Netherlands. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1991. 135:2288-2292.