

**FERNANDO AGUILAR LOPES**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA  
SÍNDROME DE BAGGIO-YOSHINARI EM MATO GROSSO DO SUL**

**CAMPO GRANDE  
2017**

**FERNANDO AGUILAR LOPES**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA  
SÍNDROME DE BAGGIO-YOSHINARI EM MATO GROSSO DO SUL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, curso de Doutorado, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, sob orientação do Prof. Dr. Izaías Pereira da Costa e co-orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro e da Prof.<sup>a</sup> Dra. Jania de Rezende.

**CAMPO GRANDE  
2017**



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**  
**Doutorado**

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete, às oito horas, no Anfiteatro I da FAMED/UFMS, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Izaías Pereira da Costa (UFMS), Cleber Oliveira Soares (Embrapa/CNPQC), Carina Elisei de Oliveira (UCDB), Anamaria Mello Miranda Paniago (UFMS) e Adivaldo Henrique Fonseca (UFRRJ), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **FERNANDO AGUILAR LOPES**, CPF 70500690197, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Diagnóstico sorológico e molecular da Síndrome de Baggio-Yoshinari em Mato Grosso do Sul**" e orientação de Izaías Pereira da Costa. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresse conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiação
Dr. Izaías Pereira da Costa		Aprovado
Dr. Cleber Oliveira Soares		Aprovado
Dra. Carina Elisei de Oliveira		aprovado
Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago		aprovado
Dr. Adivaldo Henrique Fonseca		aprovado
Dra. Sonia Maria Oliveira de Andrade (Suplente)		Aprovado

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação       Aprovação com revisão       Reprovação

**OBSERVAÇÕES:** O aluno atendeu a contento as perguntas feitas por membros da Banca.  
A profa Dr. Sonia Maria Oliveira de Andrade anunciou a fidelidade de seu parecer do Prof. Cleber Oliveira Soares

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

**Assinaturas:**  
  
Presidente da Banca Examinadora  
  
Aluno

A DEUS por estar ao meu lado a cada dia, permitindo-me a vida e presenteando-nos a cada dia com um dia melhor que o anterior...

Aos meus pais, ANTONIO ROBERTO LOPES (*sempre presente*) e MARIA LUIZA ARCE AGUILAR LOPES, aos quais dedico toda minha vida, e agradeço eternamente pois, se hoje posso caminhar sozinho, foi porque um dia me ensinaram a dar o primeiro passo. E tenho certeza, pai, que do outro plano da vida ainda continua vibrando com cada passo e com cada vitória nossa. Tudo tem sua marca...

À minha amada esposa ELAINE CRISTINA MELHADO BIDOIA LOPES por sua presença constante e paciente ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, compreendendo os momentos de presença-ausente, e apoiando cada etapa da concretização desse trabalho...  
TE AMO...

Ao meu irmão ALEXANDRE AGUILAR LOPES pela parceria de sempre, incentivando e apoiando, distante mas sempre por perto...

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. IZAÍAS PEREIRA DA COSTA pela orientação, amizade, dedicação e apoio dispensados para a realização deste trabalho.

Às professoras Dra. ANA RITA COIMBRA MOTTA DE CASTRO e Dra. JANIA DE REZENDE, co-orientadoras e amigas, pela dedicação e apoio dispensados para a realização deste trabalho.

À professora Dra. SÔNIA MARIA OLIVEIRA DE ANDRADE pela amizade sempre acolhedora, não medindo esforços para nos orientar metodologicamente.

Ao professor Dr. ALBERT SCHIAVETO DE SOUZA pela orientação e correção estatística.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste que compartilharam seus conhecimentos e nos conduziram durante essa jornada.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial à Coordenadoria de Pós-graduação (CPG/PROPP/UFMS) e ao Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP-UFMS) por autorizar o contrato de afastamento parcial de trabalho que permitiu a realização deste curso.

À equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-17) do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial ao Professor Dr. NATALINO HAJIME YOSHINARI, Dra. VIRGÍNIA LÚCIA NAZÁRIO BONOLDI e Dra. ELENICE MANTOVANI pelo treinamento ofertado para a realização dos ensaios sorológicos.

À Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) por permitir a realização dos ensaios moleculares e à equipe do Laboratório de Biologia Molecular BIOTECH S-*Inova*, em especial à professora Dra. CARINA ELISEI DE OLIVEIRA e à técnica de laboratório MARIA HELENA ARAÚJO.

Aos amigos NÁDIA CRISTINA PEREIRA CARVALHO, MARIA RITA SANT'ANA, KARINE DE MELO CARVALHO e LETÍCIA ARASHIRO TIBANA, do Setor de Microbiologia Clínica – Bacteriologia do HUMAP-UFMS, pelo apoio e compreensão, permitindo que pudesse adequar meus horários de trabalho.

Aos amigos MAÍNA DE OLIVEIRA NUNES, TATIANA MARY SAKAMOTO e PAULO CÉSAR DE LORENZO, do Laboratório do HUMAP-UFMS, pelo apoio e incentivo.

Ao meu compadre e irmão LUIZ GONÇALVES MENDES JUNIOR da Santa Casa de Campo Grande pela amizade e apoio para as adequações de horários e plantões contribuindo para que o trabalho fosse justo e perfeito.

Aos colegas da FARMÁCIA HOSPITALAR da Santa Casa de Campo Grande, pelo apoio e compreensão, permitindo que pudesse adequar meus horários de trabalho.

Aos meus familiares e amigos que compreenderam meus momentos de isolamento e distância para concretização desse sonho.

A todos os pacientes e controles que participaram deste estudo pois sem eles este trabalho não seria realizado.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos,  
ele provavelmente não leva a lugar algum.”  
Frank A. Clark

## RESUMO

A Doença de Lyme (DL) é uma zoonose emergente, transmitida por carrapatos e causada por espiroquetas do grupo *Borrelia burgdorferi* lato sensu. No Brasil, frequentemente sub-diagnosticada devido ao acentuado polimorfismo clínico, apresenta algumas características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais diferentes que permitem caracterizar uma Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY), zoonose emergente e de descrição restrita ao território brasileiro. O objetivo deste estudo foi avaliar o diagnóstico sorológico e molecular da Síndrome de Baggio-Yoshinari em Mato Grosso do Sul. Participaram do estudo 41 pacientes com sinais e sintomas sugestivos de SBY e todos foram submetidos a exames sorológicos, por metodologias ELISA e *Western blotting* (WB), e moleculares para detecção de DNA de *Borrelia burgdorferi* por meio da amplificação da região genômica *flgE*. A positividade sorológica pelas metodologias ELISA e WB foi de 26,8% e 34,2% para anticorpos IgM anti-*Borrelia*, e 43,9% para anticorpos IgG anti-*Borrelia* pelas duas metodologias. Na detecção molecular utilizando o gene *flgE* a positividade observada foi de 29,3%. As amostras positivas na reação de PCR foram purificadas, sequenciadas e as sequências obtidas apresentaram 100% de similaridade com o gene da proteína do gancho flagelar de *B. burgdorferi* (flgE) depositado no *GenBank* (L43849.1), demonstrando, pela primeira vez, a presença de DNA de *Borrelia burgdorferi* lato sensu em amostras de soro e sangue humano na região Centro-Oeste do Brasil. Estes resultados confirmam a existência de borreliose causada por *B. burgdorferi* lato sensu no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, e sugerem a necessidade de continuidade dos estudos epidemiológicos, sorológicos e moleculares a fim de melhor caracterizar essa zoonose emergente no estado de Mato Grosso do Sul, que raramente é fatal, porém de grande morbidade quando não adequadamente diagnosticada e tratada, devido às recorrências e complicações clínicas progressivas.

Descritores: *Borrelia burgdorferi*; Doença de Lyme; flgE; Doença de Lyme-símile; Síndrome de Baggio-Yoshinari

## ABSTRACT

Lyme Disease (LD) is an emerging zoonosis, transmitted by ticks and caused by spirochete *Borrelia burgdorferi* group. In Brazil, often under-diagnosed due to marked clinical polymorphism and complex laboratory confirmation, it presents some epidemiological characteristics, different clinical and laboratory that can characterize a Brazilian Lyme-like disease or Baggio-Yoshinari Syndrome (BYS), emerging zoonosis and description restricted to Brazil. The aim of this study was to perform the serological and molecular diagnosis of Baggio-Yoshinari Syndrome in Mato Grosso do Sul State. Forty one patients with positive epidemiological histories were recruited for the study and underwent serological by ELISA and Western blotting (WB) tests, and *Borrelia burgdorferi* DNA detection by amplification of the genomic region *flgE*. The seropositivity by ELISA and WB methodologies were 26.8% and 34.2% for anti-*Borrelia* IgM antibodies, and 43.9% for anti-*Borrelia* IgG antibodies by both methods. The gene *flgE* was amplified from ADN of 29.3% of the samples. Upon sequencing, these positive samples revealed 99-100% homology to *Borrelia burgdorferi* flagellar hook protein (*flgE*) deposited in GenBank (L43849.1), demonstrating for the first time, the presence *Borrelia burgdorferi* lato sensu ADN in human blood samples in the Midwest region of Brazil. These results support the existence of borreliosis caused by *B. burgdorferi* lato sensu in the state of Mato Grosso do Sul, with symptoms similar to classic Lyme disease and suggest the need for continuity of epidemiological, serological and molecular studies to better characterize this zoonosis emerging in Brazil, which is rarely fatal, but of great morbidity when not properly diagnosed and treated due to recurrences and progressive clinical complications.

Key words: *Borrelia burgdorferi*; Lyme disease; *flgE*; Lyme-like disease; Baggio-Yoshinari Syndrome

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Critérios adotados pelo LIM17-HCFMUSP para diagnóstico de SBY .....	36
Figura 2 –	Valores de referência para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de ensaio imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) .....	46
Figura 3 –	Valores de referência para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de <i>Western blotting</i> (WB) ...	47
Figura 4 –	Valores de índice <i>Kappa</i> ( <i>K</i> ) e concordância .....	52
Figura 5 –	Descrição dos dados epidemiológicos e clínicos, Campo Grande-MS (n=41) .....	53
Figura 6 –	Resultados das amostras testadas para detecção de anticorpos IgM e IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> e título das amostras pelo método ELISA por paciente, Campo Grande-MS (n=41) .....	59
Figura 7 –	Resultados das amostras testadas para detecção de anticorpos IgM e IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> e número de bandas detectadas pelo método <i>Western blotting</i> (WB) por paciente, Campo Grande-MS (n=41) .....	62
Figura 8 –	PCR gene <i>flgE</i> para <i>B. burgdorferi</i> lato sensu em amostras de sangue total e soro .....	67
Figura 9 –	PCR gene <i>flgE</i> para <i>B. burgdorferi</i> lato sensu em amostras de sangue total .....	67
Figura 10 –	Resultados das amostras testadas para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> lato sensu, Campo Grande-MS (n=41) ....	67
Figura 11 –	Dendograma de similaridade baseado na comparação da região codificadora do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> lato sensu .....	73
Figura 12 –	Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos por meio do Clustal W 2.0 .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados da pesquisa e título de anticorpos IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método ELISA, Campo Grande-MS (n=41) .....	59
Tabela 2 –	Resultados da pesquisa e título de anticorpos IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método ELISA, Campo Grande-MS (n=41) .....	59
Tabela 3 –	Resultados da pesquisa de anticorpos IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> e número de bandas detectadas pelo método <i>Western blotting</i> , Campo Grande-MS (n=41) .....	62
Tabela 4 –	Resultados da pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> e número de bandas detectadas pelo método <i>Western blotting</i> , Campo Grande-MS (n=41) .....	62
Tabela 5 –	Análise da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelos métodos ELISA e <i>Western blotting</i> (WB), Campo Grande-MS (n=41) .....	65
Tabela 6 –	Análise da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelos métodos ELISA e <i>Western blotting</i> (WB), Campo Grande-MS (n=41) .....	65
Tabela 7 –	Análise da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelos métodos ELISA e <i>Western blotting</i> (WB), Campo Grande-MS (n=41) .....	65
Tabela 8 –	Resultados das amostras testadas para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> lato sensu, Campo Grande-MS (n=41) ....	66
Tabela 9 –	Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de ELISA, Campo Grande-MS (n=41) ...	70
Tabela 10 –	Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> e sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de ELISA, Campo Grande-MS (n=41) .....	70
Tabela 11 –	Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> e sorológicos para detecção de anticorpos IgM anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de <i>Western blotting</i> , Campo Grande-MS (n=41) .....	71

Tabela 12 –	Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> e sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de Western blotting, Campo Grande-MS (n=41) .....	71
Tabela 13 –	Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> e sorológicos para detecção de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método de Western blotting com critério de interpretação combinada, Campo Grande-MS (n=41) .....	71
Tabela 14 –	Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene <i>flgE</i> de <i>Borrelia burgdorferi</i> e sorológicos para detecção de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método <i>Western blotting</i> , independente da classe de anticorpo e utilizando o critério de interpretação combinada, Campo Grande-MS (n=41) .....	72
Tabela 15 –	Características do alinhamento utilizando a ferramenta <i>BLASTn</i> com Score (Máx. / Total), <i>e-value</i> e Identidade por número de acesso .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Bb	<i>Borrelia burgdorferi</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
BSK	<i>Barbour-Stoenner-Kelly</i>
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DL	Doença de Lyme
DLSB	Doença de Lyme-símile brasileira
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
EM	Eritema migratório
EV	Endovenosa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HUMAP	Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian
IFI	Imunofluorescência indireta
INF- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-4	Interleucina 4
LCE	Líquido Cérebro Espinhal
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Osp	Outer surface proteins
PBS	Tampão salino-fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SBY	Síndrome de Baggio-Yoshinari
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFC	Síndrome da fadiga crônica
SIRLS	Síndrome infecto-reacional Lyme-símile
TAPOS	Tick Associated Poly-Organic Syndrome
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
T <sub>H</sub>	Linfócito T Auxiliar
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VO	Via oral
WB	Western blotting

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1	Doença de Lyme .....	19
2.2	Síndrome de Baggio-Yoshinari .....	28
3	OBJETIVOS .....	42
3.1	Objetivo geral .....	42
3.2	Objetivos específicos .....	42
4	METODOLOGIA .....	43
4.1	Tipo de estudo .....	43
4.2	Local e período da pesquisa .....	43
4.3	População de estudo .....	43
4.4	Coleta de amostras .....	44
4.5	Testes sorológicos .....	45
4.6	Testes moleculares .....	48
4.7	Análise estatística .....	51
4.8	Considerações éticas .....	52
5	RESULTADOS .....	53
5.1	Características da população estudada .....	53
5.2	Detecção de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método ELISA .....	58
5.3	Detecção de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> pelo método <i>Western blotting</i> (WB) .....	61
5.4	Correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias ELISA e <i>Western blotting</i> .....	64
5.5	Análise Molecular .....	66
5.6	Correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias sorológicas e molecular .....	70
5.7	Resultados das amostras submetidas ao sequenciamento .....	72
6	DISCUSSÃO .....	75
7	CONCLUSÃO .....	88
	REFERÊNCIAS .....	89

	17
<b>APÊNDICE A – FORMULÁRIO .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética .....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO B – Aprovação do GEP/HUMAP-UFMS .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO C – Trabalho apresentado no XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA – SBP e XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA – FLAP .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO D – Trabalho apresentado no XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REUMATOLOGIA .....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO E – Artigo publicado no JSM Tropical Medicine and Research .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO F – Artigo submetido à Revista Brasileira de Reumatologia</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO G – Depósito de patente Instituto Nacional da Propriedade Industrial .....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Doença de Lyme (DL) ou Borreliose de Lyme é uma zoonose emergente de caráter multissistêmico e de distribuição mundial, causada por espiroquetas do grupo *Borrelia burgdorferi* lato sensu (l.s.) e transmitida por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* (STEERE, 2001).

Clinicamente evolui em estágios e o aspecto distintivo na fase inicial é a lesão de pele denominada eritema migratório (EM). No estágio secundário, observam-se lesões cutâneas semelhantes a inicial e/ou complicações sistêmicas articulares, cardíacas ou neurológicas. O diagnóstico baseia-se na presença dos sintomas clínicos, história epidemiológica compatível e sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi* (STEERE *et al.*, 1980; STEERE, 2001; YOSHINARI *et al.*, 1999a).

No Brasil, os primeiros estudos datam do final da década de 80 (YOSHINARI *et al.*, 1989). Os primeiros casos de manifestações cutâneas foram descritos em 1987 (TALHARI *et al.*, 1987; TALHARI; TALHARI; FERREIRA, 1992) e em 1992 a descrição de casos com manifestações sistêmicas foi publicada (YOSHINARI *et al.*, 1992; YOSHINARI *et al.*, 1993a). Em sequência, outros casos foram descritos e algumas diferenças clínicas, laboratoriais e epidemiológicas em relação à Doença de Lyme descrita no hemisfério norte começaram a ser evidenciadas (COSTA *et al.*, 2001; YOSHINARI *et al.*, 1993b; YOSHINARI *et al.*, 1995; YOSHINARI *et al.*, 1997; YOSHINARI *et al.*, 1999a; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

As diferenças observadas em nível local permitiram caracterizar uma Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) que, apesar do clássico eritema migratório e das habituais complicações sistêmicas encontradas na Doença de Lyme, cursa com grande frequência de recorrências, desordens imunológicas e produção de autoanticorpos, ao longo da prolongada evolução clínica, diferentemente da Doença de Lyme (GAUDITANO *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2007a; YOSHINARI *et al.*, 1995).

Do ponto de vista epidemiológico, a doença existe em todo território nacional e é adquirida em áreas com existência de matas, animais silvestres que atuam como reservatórios e os carrapatos como vetores, além de animais domésticos que atuam como transportadores de carrapatos para o ambiente domiciliar. O vetor considerado transmissor preferencial da Doença de Lyme, *Ixodes ricinus*, não foi localizado nas

áreas de risco e de casos observados no Brasil (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2000; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002).

Em Mato Grosso do Sul, dados da literatura relatam a presença de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* em ambientes e animais silvestres estudados e ausência de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, sugerindo que outros carrapatos também podem ser vetores da Síndrome de Baggio-Yoshinari (COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002). Neste contexto, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pode também contribuir para manutenção do ciclo epidemiológico (bactéria-vetor-hospedeiro) e ser igualmente sugerido como vetor da Síndrome de Baggio-Yoshinari (YPARRAGUIRRE *et al.*, 2007; YOSHINARI *et al.*, 2003).

Mas a caracterização ainda não está completa. Embora seja uma zoonose de distribuição cosmopolita, laboratorialmente a bactéria ainda não foi cultivada em meio de cultura BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) a partir de amostras clínicas na América do Sul, África e Austrália (STEERE, 2001).

A primeira identificação genotípica do agente etiológico em território nacional foi descrita por Madureira (2007) a partir de amostra de um paciente com manifestações clínicas sugestivas da Doença de Lyme-símile brasileira. Em 2010, as particularidades da identificação genotípica do agente etiológico realizada por Mantovani (2010), *Borrelia burgdorferi* lato sensu na apresentação morfológica atípica, diferente das conhecidas em outros continentes, permitiram sugerir a Síndrome de Baggio-Yoshinari como uma zoonose emergente e de descrição restrita ao território brasileiro.

Assim, uma nova definição para Síndrome de Baggio-Yoshinari pôde ser proposta. Zoonose emergente, até o momento restrita ao território brasileiro, causada por *Borrelia burgdorferi* lato sensu na apresentação morfológica atípica, transmitida por carrapatos não pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*, responsável pelo desenvolvimento de manifestações clínicas semelhantes à Doença de Lyme exceto pela grande frequência de sintomas recorrentes e complicações imuno-alérgicas (MANTOVANI, 2010).

O diagnóstico laboratorial baseia-se na pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*, mas a resposta imunológica é baixa e, embora relevante para o diagnóstico, os títulos são baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue (MANTOVANI *et al.*, 2007b).

Assim, diante das dificuldades observadas com relação ao diagnóstico e a definição de caso desta enfermidade, a estruturação de um centro de referência e de um serviço de pesquisa e diagnóstico sorológico e molecular possibilitariam a realização de estudos de prevalência para que se possa conhecer a real magnitude dessa doença, além de oportunizar o diagnóstico adequado dos pacientes com manifestações clínicas sugestivas da Síndrome de Baggio-Yoshinari que necessitam de diagnóstico laboratorial diferencial e conclusivo. A enfermidade é raramente fatal, porém de grande morbidade quando não adequadamente diagnosticada e tratada, devido às recorrências e complicações clínicas progressivas, motivos pelos quais se torna relevante para a área da Saúde Pública a implantação do centro diagnóstico no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP/UFMS).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doença de Lyme

#### 2.1.1 Definição

A borreliose de Lyme ou Doença de Lyme é uma zoonose encontrada no Hemisfério Norte (EUA e Eurásia), transmitida por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, causada por espiroquetas do grupo *Borrelia burgdorferi* lato sensu e com inúmeras manifestações clínicas sistêmicas (STEERE, 2001).

#### 2.1.2 Histórico

Inicialmente denominada artrite de Lyme, a Doença de Lyme foi descoberta por Allen Caruthers Steere em 1975, na comunidade de *Old Lyme*, em *Connecticut*, nos Estados Unidos da América, descrevendo casos sugestivos de artrite idiopática juvenil, antecedidos por picada de carrapato e a formação de uma lesão cutânea expansiva denominada eritema migratório (STEERE *et al.*, 1977).

Anteriormente, a descrição da lesão cutânea expansiva característica da doença já havia sido realizada por Afzelius (1910), na Suécia, e por Lipschütz (1913), na Áustria, que descreveram os primeiros casos de pacientes com placas eritematosas, únicas ou múltiplas, de crescimento centrífugo, aos quais denominaram eritema crônico migratório (ECM). A partir dos primeiros relatos, foram identificados novos casos de ECM em vários países europeus, principalmente, da Europa Central, além de outras formas cutâneas menos comuns, descritas no final do século XIX e começo do século XX, como o linfocitoma cútis e a acrodermatite crônica atrófica (ACA) (BUCHWALD, 1883; HERXHEIMER; HARTMANN, 1902).

As primeiras formas de neuroborreliose foram descritas por Garin & Bujadoux (1922) em um paciente que desenvolveu radiculite e paralisia de membro superior associada à pleocitose mononuclear do líquido-cérebro espinhal (LCE) após picada de carrapato e desenvolvimento de ECM. Entretanto, somente em 1930 o estudo realizado por Hellerström (1930) correlacionou o ECM a manifestações extracutâneas em um caso simultâneo de ECM e meningite.

Em 1958, Hollström sugeriu a etiologia bacteriana do ECM após obter a cura de pacientes portadores de ECM utilizando penicilina procaína (HOLLSTRÖM, 1951; HOLLSTRÖM, 1958). Em 1982, o agente etiológico da Doença de Lyme foi identificado por Willy Burgdorfer e denominado *Borrelia burgdorferi* (BURGDORFER *et al.*, 1982).

Reconhecida como importante doença infecciosa emergente, após mais de 30 anos das primeiras observações na comunidade de *Old Lyme*, em *Connecticut*, USA, é a principal doença transmitida por artrópodes nos EUA e na Europa (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2010; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004; STEERE, 2006).

### 2.1.3 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da Doença de Lyme são bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* lato sensu (STEERE, 2001).

Taxonomicamente, pertence ao filo *Spirochaetes*, assim como *Treponema pallidum* e *Leptospira interrogans*, e à família *Spirochaetaceae*. A espiroqueta *B. burgdorferi* é uma bactéria Gram negativa, microaerófila, medindo 0,2 a 0,25µm por 4 a 30µm, multiflagelada, com 7 a 11 flagelos periplasmáticos, o que lhe confere formato espiralado e movimento helicoidal (BARBOUR; HAYES, 1986; JOHNSON *et al.*, 1984; SOARES *et al.*, 2000; TILLY; ROSA; STEWART, 2008; TRABULSI *et al.*, 2008).

Estruturalmente, difere de outros patógenos bacterianos devido à ausência de diversos lipopolissacarídeos, toxinas e outros sistemas especializados de secreção. A membrana celular externa da *Borrelia* spp é composta por lipoproteínas de superfície, como a OspA, OspB, OspC e outras, que atuam como fatores de virulência e fatores imunogênicos ao hospedeiro, participando do processo de transmissão e ativando o sistema imune contra a infecção bacteriana (GRIMM *et al.*, 2004; TILLY; ROSA; STEWART, 2008; WOODMAN; COOLEY; STEVENSON, 2008).

O genoma está localizado no protoplasma e contém um cromossomo linear de 910.725 pares de bases e pelo menos 17 plasmídeos lineares e circulares com um tamanho combinado de mais de 533.000 pares de bases. O cromossomo

contém 853 genes que codificam um conjunto básico de proteínas para a replicação do DNA, transcrição, tradução, transporte de solutos e metabolismo energético, mas não contém genes para reações biossintéticas celulares (CHARON; GOLDSTEIN, 2002; FRASER *et al.*, 1997; TILLY; ROSA; STEWART, 2008).

Diversos genes codificados por plasmídeos estão relacionados com a infectividade ou evasão do sistema imune, influenciando na persistência no carrapato ou no hospedeiro mamífero. Mutações em genes cromossômicos que codificam proteínas de flagelo, como o *flgE*, alteram a síntese flagelar ocasionando alterações na morfologia e na motilidade da espiroqueta, perda da forma espiralada e do movimento em torno do próprio eixo (CHARON; GOLDSTEIN, 2002; FRASER *et al.*, 1997; TILLY; ROSA; STEWART, 2008).

De crescimento lento nos meios de cultura, a *Borrelia* spp cresce em meio de cultura específico BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) e é corado pelos métodos de Giemsa, hematoxilina/eosina e com corantes a base de prata (PFISTER; WILSKE; WEBER, 1994; BONOLDI, 2009).

O complexo *Borrelia burgdorferi* lato sensu (l.s.) é um grupo diversificado de bactérias, de ampla distribuição geográfica, que inclui 20 espécies de espiroquetas já identificadas, além de outras ainda em estudo. As descrições de novas espécies e variantes continuam a ser realizadas e, provavelmente, o número atual de espécies descritas irá aumentar (RUDENKO *et al.*, 2011; SAMUELS; RADOLF, 2010; TILLY; ROSA; STEWART, 2008).

A maioria das espiroquetas conhecidas possui distribuição limitada. Assim sendo, onze espécies identificadas do complexo *B. burgdorferi* lato sensu estavam estritamente associados à Eurásia (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana* e *B. yangtze*), enquanto outras cinco estavam restritas aos Estados Unidos (*B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis* e *B. kurtenbachii*), além de três outras espécies de distribuição cosmopolita (*B. burgdorferi* stricto sensu, *B. bissetti* e *B. carolinensis*) (RUDENKO *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2000; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004; TILLY; ROSA; STEWART, 2008).

Dessas 20 espécies, nove estão associadas a casos de borreliose em humanos: (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissetti*, *B. burgdorferi* stricto sensu, *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* e *B. valaisiana*). Nos Estados Unidos, a *B. burgdorferi* stricto sensu é a principal espécie encontrada. Por outro lado, na

Europa, além da *B. burgdorferi* stricto sensu, são também frequentes *B. garinii* e *B. afzelii* (BASILE, 2017; RUDENKO *et al.*, 2011; SAMUELS; RADOLF, 2010).

A diversidade etiológica e antigênica explica o organotropismo e o aparecimento de quadros clínicos e laboratoriais distintos nas diferentes regiões. Demonstra-se predomínio de queixas cutâneas e articulares nos Estados Unidos, enquanto as neurológicas prevalecem na Europa e Ásia. Embora a distribuição dessa zoonose seja universal, a bactéria ainda não foi isolada na América do Sul, África e Austrália (RUDENKO *et al.*, 2011; STANEK; STRLE, 2008; STEERE, 2001).

#### 2.1.4 Vetores e reservatórios

Nos EUA e Eurásia, o carrapato transmissor da Doença de Lyme pertence ao complexo *Ixodes ricinus*. Nos EUA encontra-se o *Ixodes scapularis* e o *Ixodes pacificus*; na Europa o *Ixodes ricinus* e na Ásia o *Ixodes persulcatus*. Participam do ciclo de transmissão da Doença de Lyme, tanto os pequenos mamíferos como os grandes vertebrados. Larvas e ninfas de carrapatos contraem a infecção ao se alimentarem em pequenos roedores, enquanto os artrópodes adultos acasalam-se nos mamíferos de grande porte (HAMER *et al.*, 2010; LOGIUDICE *et al.*, 2003; MLADENOVIC *et al.*, 2010; SPACH *et al.*, 1993; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

Ao adentrar no ecossistema propício, áreas com vegetação preservada e na existência de animais silvestres, o homem contrai a zoonose ao ser picado principalmente pelas ninfas dos carrapatos que, pelo seu tamanho diminuto, nem sempre são percebidos. Dados da literatura relatam que 50% dos pacientes recordam-se de picadas ou de terem tido contato com carrapato e esse fato torna-se relevante pois a enfermidade só se desenvolve no homem se o carrapato não for removido nas primeiras 24 horas. Com relação aos vetores, existe ainda a descrição da transmissão transovariana de espiroquetas (CRIPPA; RIAS; GERN, 2002; HAMER *et al.*, 2010; LOGIUDICE *et al.*, 2003; MLADENOVIC *et al.*, 2010; SPACH *et al.*, 1993; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

### 2.1.5 Aspectos clínicos

A evolução da Doença de Lyme ocorre em estágios. O estágio primário geralmente se inicia com o surgimento de uma lesão de pele, denominada eritema migratório (EM), que pode se desenvolver no sítio da picada do carrapato após um período de incubação que varia de 3 a 32 dias. O eritema migratório caracteriza-se por lesão de pele expansiva em decorrência da migração das borrelias na derme, geralmente de centro claro e borda avermelhada e que costuma durar dias a meses. Normalmente, a lesão não é dolorosa nem pruriginosa, podendo assumir outros aspectos como ser intensamente eritematosa ou ser confluenta a partir de minúsculas lesões menores (STEERE *et al.*, 1980; STEERE, 2001; STEERE, 2006; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

Associados ao eritema migratório estão presentes sintomas e sinais gerais semelhantes à gripe, que correspondem à disseminação sanguínea dos microrganismos, tais como: febre, calafrios, cefaleia, nuchalgia, mialgia, artralgia, disestesia de extremidades, linfadenopatia, conjuntivite, *rash* malar, alteração do sono e outros (STEERE, 2001; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

Após semanas ou meses, nos pacientes não adequadamente diagnosticados e tratados, surge o estágio secundário e outras manifestações clínicas podem aparecer. Lesões cutâneas semelhantes à lesão inicial, geralmente menos expansivas, múltiplas e sem relação com o local da picada anterior, acompanhadas de queixas osteoarticulares, neurológicas ou cardíacas, que podem cursar com recidivas naqueles pacientes que não tiveram diagnóstico e tratamento oportunos da doença. Os surtos de artrite podem ser recorrentes e durar de semanas a meses. A sintomatologia neurológica inclui a tríade: meningite, neurite craniana e radiculite periférica. As queixas cardíacas são raras e manifestam-se na forma de arritmias ou miocardites (ARVIKAR; STEERE, 2015; STEERE *et al.*, 1980; STEERE, 2001; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

A Doença de Lyme crônica decorre dos episódios recorrentes de artrite ou de complicações tardias da borreliose não tratada oportunamente. Assim na neuroborreliose crônica descrevem-se as síndromes desmielinizantes, encefalopatias e ataxias. Na Europa existe a acrodermatite crônica atrófica (ACA), que é uma lesão de pele atrófica semelhante à esclerodermia e causada pela *Borrelia afzelii*, tendo sido descrita a recuperação de borrelias a partir da pele em

lesões com duração de muitos anos (LOGIGIAN *et al.*, 1990; OSCHMANN *et al.*, 1998; STANEK; STRLE, 2008; STRLE *et al.*, 1999; STEERE, 2001).

#### 2.1.6 Diagnóstico

De acordo com o critério diagnóstico do *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011) o diagnóstico da Doença de Lyme baseia-se na presença de sintomas clínicos, como o eritema migratório ou queixas sistêmicas articulares, neurológicas ou cardíacas, associado à sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi* lato sensu. Em áreas de risco, a simples constatação do eritema migratório pode ser fator diagnóstico. O ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) é a prova laboratorial de triagem e, o *Western blotting* (WB), a prova confirmatória. O *Western blotting* para ser considerado positivo necessita mostrar um determinado padrão de reatividade, quantitativo e qualitativo, em relação às bandas proteicas das borrelias expressas no *immunoblotting*: para anticorpos das classes IgM pelo menos duas de três bandas (24 kDa – OspC, 39 kDa – BmpA e 41 kDa – Fla), e para IgG pelo menos cinco das dez bandas (18 kDa, 21 kDa – OspC, 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa – BmpA, 41 kDa – Fla, 45 kDa, 58 kDa, 66 kDa e 93 kDa). A utilização da PCR na prática clínica ainda é pouco frequente pois, além do custo, requer que existam borrelias circulantes ou em tecidos (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005; DRESSLER *et al.*, 1993; GRODZICKI; STEERE, 1988; MAGNARELLI, 1995; MANDELL *et al.*, 1989; MARQUES, 2015; STEERE, 2006).

Yoshinari e Mantovani (2006) salientam que a Doença de Lyme tem diferentes agentes etiológicos e a sensibilidade dos testes laboratoriais varia com a espécie de *Borrelia* empregada em determinada região geográfica. Entretanto, a sorologia é o método de escolha no diagnóstico laboratorial da Doença de Lyme, pois a cultura do microrganismo e sua visualização em microscopia de campo escuro, a partir de materiais biológicos semeados em meio de cultivo BSK, são procedimentos demorados e pouco produtivos, haja vista que borrelias são bactérias fastidiosas.

Em áreas de incidência elevada da doença recomenda-se a confirmação laboratorial apenas para indivíduos que não se recordam da exposição ao carrapato (MONIUSZKO *et al.*, 2015; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004).

### 2.1.7 Tratamento

As diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomendam a antibioticoterapia para o tratamento da Doença de Lyme em todos os estágios (WORMSER *et al.*, 2006). Pacientes tratados com antibióticos apropriados nos estágios iniciais da doença de Lyme geralmente se recuperam completamente (RAHN & MALAWISTA, 1991). Os antibióticos comumente utilizados para tratamento via oral incluem doxiciclina, amoxicilina ou cefuroxima axetil. Pacientes com manifestações neurológicas e/ou cardíacas de doença podem necessitar de tratamento intravenoso com drogas como ceftriaxona ou penicilina (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

A recomendação para o tratamento de pacientes adultos com manifestações cutâneas na ausência de manifestações neurológicas específicas é doxiciclina (100mg duas vezes ao dia), amoxicilina (500mg três vezes ao dia) ou cefuroxima axetil (500mg duas vezes ao dia) durante 14 dias (intervalo 10-21 dias para doxiciclina e 14-21 dias para amoxicilina ou cefuroxima axetil) (WORMSER *et al.*, 2006).

Para pacientes adultos com doença de Lyme precoce e manifestações neurológicas de meningite ou radiculopatia, recomenda-se o uso de ceftriaxona (2g uma vez ao dia por via intravenosa durante 14 dias (intervalo 10-28 dias)). A terapia parenteral com cefotaxima ou penicilina G pode ser alternativa satisfatória. Para pacientes com hipersensibilidade a  $\beta$ -lactâmicos, evidências crescentes indicam que doxiciclina via oral (200-400mg por dia, 12/12 horas, por 10-28 dias) pode ser adequada (WORMSER *et al.*, 2006).

Considerada manifestação tardia da doença, a artrite de Lyme possui indicação de tratamento com doxiciclina ou amoxicilina por via oral durante 30 dias. A terapia endovenosa com ceftriaxona pode ser recomendada para pacientes com resposta insuficiente à terapia antimicrobiana por via oral (ARVIKAR; STEERE, 2015).

### 2.1.8 Epidemiologia

A distribuição geográfica da doença é ampla, ainda em expansão, e as manifestações clínicas variam conforme a espécie do complexo *Borrelia burgdorferi*

lato sensu encontrada em determinada localidade geográfica (KUGELER *et al.*, 2015; RUDENKO *et al.*, 2011; STEERE, 2001).

Rudenko *et al.* (2011) já alertavam para mudanças epidemiológicas e a amplitude das manifestações clínicas da DL, indo de pequenos eritemas migratórios (EM) à artrite grave ou às manifestações neurológicas, em virtude do envolvimento de novas e/ou desconhecidas espécies de *Borrelia*, assim como o relato de aumento da espiroquetemia descrito por Pritt *et al.* (2016) e que foi observado com a descrição de uma nova genoespécie de *Borrelia burgdorferi* lato sensu (*Borrelia mayonii*) (PRITT *et al.*, 2016).

Considerando os casos notificados de Doença de Lyme nos Estados Unidos, Shapiro (2014) afirma que a doença está em ascensão no território norte americano. O número de casos notificados passou de 10.000 em 1992 para 25.000 a 30.000 atualmente. A incidência da doença de Lyme é mais alta entre crianças de 5 a 14 anos de idade e adultos de meia-idade (40 a 50 anos de idade), e é um pouco mais comum entre homens do que entre as mulheres (SHAPIRO, 2014).

Dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) confirmam a notificação de mais de 36.000 novos casos da Doença de Lyme nos Estados Unidos no ano de 2013, mas considerando subnotificações, o número real de casos estimados pelo CDC está em torno de 300.000 novos casos por ano (KUGELER *et al.*, 2015; MEAD, 2015). Na Europa, dados do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) confirmam o aumento no número de casos e mais de 360.000 novos casos foram registrados ao longo das duas últimas décadas (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2010).

As estimativas do CDC e do ECDC mostram o crescimento acelerado considerando um aumento no número de casos dez vezes maior do que se acreditava anteriormente. Esses dados asseguram a Doença de Lyme entre as doenças infecciosas que mais crescem nos EUA e Europa Ocidental (KUGELER *et al.*, 2015; MEAD, 2015).

Nos Estados Unidos, a vigilância dos casos de Doença de Lyme foi iniciada pelo CDC em 1982 e, desde 1990, é uma doença de notificação compulsória estando entre as principais doenças transmitidas por vetores na América do Norte e representa um desafio em termos de Saúde Pública (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005).

### 2.1.9 Evolução

No Hemisfério Norte, a persistência de espiroquetas no hospedeiro após o uso adequado de antibióticos ainda é controversa. Com exceção de recidivas articulares, que eram interpretadas como manifestações de autoimunidade, não se admitia a hipótese de recorrência clínica e a necessidade de prolongar e/ou reiniciar um novo tratamento antimicrobiano.

Assim, considerava-se como Doença de Lyme crônica os casos clínicos de diagnóstico tardio que não foram oportunamente tratados, haja vista que muitos destes pacientes não exibiam sinais de infecção ativa. Mas muitas das características observadas na evolução da doença ainda são mal compreendidas e geram controvérsias (ARVIKAR; STEERE, 2015; BAKER, 2008; FEDER *et al.*, 2007; LANTOS, 2015; MALONEY, 2016; PUIUS; KALISH, 2008; STEERE *et al.*, 2001; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004).

Por outro lado, Cameron (2010) defende a existência da Doença de Lyme Crônica e afirma que a sintomatologia pode ser severa, com complicações articulares, neurológicas e cardíacas. Relata que não há marcadores clínicos ou laboratoriais que confirmem a erradicação do agente e sugere a necessidade de estudos que avaliem a resistência bacteriana e a ocorrência de falha terapêutica.

Marques (2008) afirma que a Doença de Lyme crônica é, provavelmente, um dos aspectos mais controversos da Doença de Lyme. O termo tem sido erroneamente utilizado para descrever diferentes situações: pacientes com manifestações clínicas características da Doença de Lyme tardia (artrite, encefalomielite ou neuropatia periférica), pacientes com a síndrome pós-Doença de Lyme e ainda, pacientes com sinais e sintomas que receberam, de forma equivocada, o diagnóstico laboratorial diferencial com base em metodologias e testes não validados (LANTOS, 2015; MALONEY, 2016; MARQUES, 2008; O'CONNELL, 2014).

Dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (2016) estimam que cerca de 10 a 20% dos pacientes acometidos anualmente pela Doença de Lyme permanecerão sintomáticos mesmo após a terapia antimicrobiana adequada.

A síndrome pós-DL ou TAPOS (Síndrome Poli-orgânica associada ao carrapato) é uma entidade clínica observada nos EUA, bastante controvertida e indefinida, que surge nos pacientes com DL tratados com antibióticos. Caracteriza-

se pelo desenvolvimento de sintomas persistentes, com duração superior a seis meses, como mialgia, artralgia, dor radicular, disestesias, sintomas neurocognitivos e intensa fadiga (ASCH *et al.*, 1994; AUCOTT; CROWDER; KORTTE, 2013; AUCOTT, 2015; BAKER, 2008; LANTOS, 2015; PUIUS & KALISH, 2008).

## **2.2 Síndrome de Baggio-Yoshinari**

### 2.2.1 Definição

A Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) ou Doença de Lyme-símile brasileira (DLSB) é uma zoonose emergente, de descrição restrita, até o momento, ao território brasileiro, causada por *Borrelia burgdorferi* lato sensu na apresentação morfológica atípica, transmitida por carrapatos não pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*, e responsável pelo desenvolvimento de manifestações clínicas semelhantes à Doença de Lyme, exceto pela grande frequência de sintomas recorrentes e complicações imunoalérgicas (MANTOVANI, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Histórico

O histórico da Doença de Lyme-símle brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari é recente. No final da década de 80, os primeiros relatos com descrições de manifestações cutâneas sugestivas da Doença de Lyme, como o eritema migratório, foram realizados por Talhari *et al.* (1987) no Amazonas e posteriormente por Figueira, Trope e Gontijo Filho (1988) no Rio de Janeiro.

Em 1989, orientado pelo Dr. Allen Caruthers Steere, o Dr. Natalino Hajime Yoshinari (Médico Reumatologista da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP) iniciou os estudos com uma equipe multidisciplinar em território brasileiro (YOSHINARI; STEERE; COSSERMELLI, 1989) e, em parceria com o Dr. Roberto Baggio (Entomologista do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo – ICBUSP) e o Dr. Paulo Yassuda (Microbiologista do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo – ICBUSP), organizou um grupo de pesquisa que buscou regiões suspeitas coletando carrapatos para

análise e procurando casos de Doença de Lyme no Brasil (BONOLDI, 2009; YOSHINARI *et al.*, 1992).

Ainda no começo da década de 90, Azulay *et al.* (1991), utilizando o método de Imunofluorescência Indireta (IFI) e *Borrelia burgdorferi* lato sensu como substrato, evidenciaram a presença de anticorpos no soro em três de cinco pacientes com eritema migratório (EM).

Em 1993 os primeiros casos autóctones de borreliose foram descritos no município de Itapevi-SP em duas crianças, da mesma família, com histórico de febre, eritema migratório e artrite após serem picados por carrapatos. A confirmação sorológica positiva para *Borrelia burgdorferi* lato sensu foi realizada no Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM17-HCFMUSP) (YOSHINARI *et al.*, 1993a).

A partir de então, novos casos clínicos foram identificados com a presença do eritema migratório, manifestações extracutâneas, complicações clínicas sistêmicas semelhantes e sorologia positiva utilizando as metodologias de ELISA e *Western blotting*. Entretanto, algumas diferenças clínicas e epidemiológicas em relação à Doença de Lyme descrita no Hemisfério Norte começaram a ser evidenciadas (CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 1996; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2001; PIRANA *et al.*, 2000; RODRIGUES; MEIRELES; BRAZ, 2007; SARAIVA *et al.*, 2011; SHINJO *et al.*, 2009; YOSHINARI *et al.*, 1993b; YOSHINARI *et al.*, 1995; YOSHINARI *et al.*, 1997; YOSHINARI *et al.*, 1999a; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

Clinicamente, apesar da ocorrência do clássico eritema migratório e das complicações sistêmicas habituais encontradas na Doença de Lyme, a enfermidade brasileira cursava com recorrências, especialmente se o tratamento com antibióticos demorasse mais que três meses do início da infecção (YOSHINARI *et al.*, 1995). O isolamento de bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* lato sensu nos fluidos biológicos e em tecidos também não obteve êxito (YOSHINARI *et al.*, 1995). A pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* de origem americana ou europeia (PIRANA *et al.*, 2000), embora relevante para o diagnóstico, revelava títulos baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue ou líquido cérebro-espinhal. Verificou-se também que os pacientes diagnosticados no Brasil exibiam alta

frequência de autoanticorpos dirigidos contra diferentes constituintes celulares (GAUDITANO *et al.*, 2000).

Reconhecidas as diferenças e com o intuito de diferenciar a clássica Doença de Lyme, a doença identificada no país passou a receber inúmeras denominações como Doença de Lyme-símile, Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (SIRLS) ou Doença de Lyme-símile Brasileira (GAUDITANO *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2007a).

De acordo com Mantovani (2010), a complexidade das informações e a dificuldade de interpretação das mesmas, considerando que muitos dos dados encontrados eram restritos apenas ao território brasileiro, dificultaram as publicações dos resultados e a divulgação das pesquisas à comunidade médica-científica do país. Assim sendo, foi necessário negar a existência da clássica Doença de Lyme no país, e propor a existência de uma zoonose inédita e emergente transmitida por carrapatos, chamada de Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY), com inúmeras diferenças nos aspectos epidemiológicos, etiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos, em relação à Doença de Lyme clássica (GAUDITANO *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2007a).

Inicialmente, a Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) foi definida por Gauditano *et al.* (2005), como uma enfermidade de origem infecciosa, transmitida por carrapatos não pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*, causada por microrganismo(s) aparentemente de comportamento latente, ainda não identificado(s), possivelmente espiroquetas, que causava o eritema migratório e complicações clínicas sistêmicas semelhantes às observadas na Doença de Lyme, exceto pela grande frequência de recorrências e de desordens imunológicas, ao longo da prolongada evolução clínica.

### 2.2.3 Agente etiológico

Desde o início das pesquisas, um dos maiores desafios era a identificação do agente etiológico. Ao contrário do observado nos EUA e Eurásia, a espiroqueta brasileira jamais fora cultivada em meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK), embora tenham sido tentadas inúmeras modificações no meio de cultivo, seja a partir do sangue, líquido cefalorraquidiano ou amostras de pele – eritema migratório (MANTOVANI *et al.*, 2007a; YOSHINARI *et al.*, 2009) e nem tampouco a partir de

carrapatos ou do sangue de animais silvestres coletados em áreas de risco (ABEL *et al.*, 2000; BARROS-BATTESTI *et al.*, 2000; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002).

Talhari *et al.* (2010), usando imunohistoquímica específica, relataram a visualização de espiroquetas em biópsias de pele de eritema migratório entretanto não conseguiram isolar esses microrganismos em cultura em meio BSK.

A primeira identificação genotípica do agente etiológico em território nacional foi descrita por Madureira (2007) a partir de amostra de sangue de um paciente com manifestações clínicas sugestivas da Doença de Lyme-símile brasileira, utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA que apresentou identidade de 99% (886/889) com *B. burgdorferi* lato sensu.

Embora o isolamento e cultivo da bactéria ainda não tenham sido realizados, uma hipótese recente e promissora em relação ao agente etiológico foi proposta por Mantovani (2010) que, utilizando biologia molecular, propôs o agente etiológico como sendo *Borrelia burgdorferi* lato sensu na apresentação morfológica atípica, sem flagelos e desprovida de inúmeros constituintes da membrana externa, o que corroboraria com diversas características observadas na Síndrome de Baggio-Yoshinari permitindo avançar na caracterização da doença em território nacional.

#### 2.2.4 Vetores e reservatórios

A presença de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* hematófagos para o homem, considerados vetores transmissores preferenciais da Doença de Lyme clássica nos EUA e Eurásia, não foi identificada em áreas de risco, incluindo Mato Grosso do Sul (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2000; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002; GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

Estudos de campo realizados em áreas de risco mostraram que gambás e roedores silvestres participam como animais reservatórios, contribuindo na manutenção da doença na natureza, enquanto os carrapatos das espécies *Ixodes loricatus*, *Ixodes didelphidis* e *Amblyomma cajennense* seriam os vetores responsáveis pela transmissão da zoonose entre os animais silvestres e ao homem. Animais domésticos, além de contraírem a infecção, atuam como transportadores de vetores para o ambiente peridomiciliar (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2000; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002).

No Brasil, o gênero *Amblyomma* é o mais comum capaz de picar humanos, mas outras espécies de carrapatos podem também desempenhar um papel relevante na ecologia e epidemiologia da Síndrome de Baggio-Yoshinari (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2000; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002; FONSECA *et al.*, 2005).

Em Mato Grosso do Sul, dados da literatura relataram a presença de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* e a ausência de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* em coletas realizadas a partir de animais silvestres da região, corroborando com a hipótese de que *Amblyomma cajennense* possa ser o vetor da Síndrome de Baggio-Yoshinari (COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002).

No entanto, outros carrapatos também podem ser vetores da Síndrome de Baggio-Yoshinari. O carrapato mais comum no gado é o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um carrapato comum no Brasil que se alimenta predominantemente em hospedeiros não humanos, podendo participar potencialmente do ciclo epidemiológico (bactérias/vetor/hospedeiro), mantendo os agentes infecciosos na natureza. Muitos agentes bacterianos foram detectados e também cultivados em células embrionárias *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, incluindo *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia* spp, *Coxiella burnetti*, *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia theileri* (agente etiológico da borreliose bovina) (REZENDE *et al.*, 2008; REZENDE *et al.* 2012; YPARRAGUIRRE *et al.*, 2007).

Yoshinari *et al.* (2003) sugerem que os carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, responsáveis pela transmissão da babesiose em bovinos, possam ser igualmente sugeridos como vetores da Síndrome de Baggio-Yoshinari, pois foi observada coexistência de anticorpos para *Borrelia burgdorferi* e *Babesia bovis* em doentes com Síndrome de Baggio-Yoshinari (NAKA *et al.* 2008; YOSHINARI *et al.* 2003).

Dados semelhantes foram descritos por Mantovani *et al.* (2012) que observaram o mesmo padrão no sequenciamento de DNA de amostras positivas de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* e de amostras de sangue periférico de bovinos com amostras de pacientes com Síndrome de Baggio-Yoshinari, reforçando diferenças na epidemiologia da Síndrome de Baggio-Yoshinari com a clássica Doença de Lyme.

Dados da literatura obtidos em áreas brasileiras de ocorrência da Síndrome de Baggio-Yoshinari registraram a presença de anticorpos anti-*Borrelia* em animais

domésticos, roedores silvestres e marsupiais. Considerados como potenciais reservatórios, muitas vezes visualizaram-se espiroquetídeos em amostras sanguíneas, espiroquetídeos que não se desenvolveram em meios de culturas BSK e não foram identificados pela PCR, a exemplo do que ocorre em carrapatos e doentes com Síndrome de Baggio-Yoshinari (ABEL *et al.*, 2000; COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2002; MONTANDON *et al.*, 2014).

Spolidorio (2009) descreveu, no Estado de Espírito Santo, uma importante associação entre a ocorrência de casos de Síndrome de Baggio-Yoshinari e a presença de capivaras, sugerindo que carrapatos que parasitam estes roedores, possam participar no ciclo epidemiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari. Igualmente importante é o surgimento de sintomas clínicos da Síndrome de Baggio-Yoshinari após contato com animais domésticos como cavalos, cachorros e bovinos.

#### 2.2.5 Aspectos clínicos

O período de incubação entre a picada e o desenvolvimento da lesão pode variar de três dias a semanas, sendo a média de 10 dias. A lesão de pele costuma durar em média 30 dias, havendo casos em que o eritema migratório persiste por vários meses. Na fase de disseminação dos microrganismos, ocorre surgimento de febre e outros sintomas *flu-like*. Neste estágio, podem aparecer novas lesões de pele, múltiplas e menos expansivas que a inicial, chamadas de anulares secundárias (COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2001; YOSHINARI *et al.*, 1992; YOSHINARI *et al.*, 1997).

Na fase aguda, definida como enfermidade com menos de três meses de evolução após a picada por carrapato, observa-se que, em cerca de 50% dos pacientes, surge uma lesão macular ou papular, de crescimento centrífugo, de bordas eritematosas e centro mais claro, chamada de eritema migratório, acompanhada de sintomas *flu-like*. Outras vezes, a lesão é homogeneamente avermelhada e, em outras situações, surge por meio da aglutinação de múltiplas e minúsculas lesões puntiformes (COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2001; FONSECA *et al.*, 2005; YOSHINARI *et al.*, 1997).

A fase de latência ou recorrência acontece quando não há diagnóstico oportuno na fase aguda ou quando o tratamento convencional com antibióticos é inadequado ou ineficiente, originando complicações secundárias cutâneas (anelares

secundárias, acrodermatite crônica atrófica e linfocitoma), neurológicas, articulares e cardíacas. O período entre a contaminação e o início das complicações sistêmicas é variável, oscilando de semanas a anos. No Brasil, as complicações articulares e neurológicas ocorrem em aproximadamente 35% dos casos e as cardíacas em 5% (YOSHINARI *et al.*, 1992; YOSHINARI *et al.*, 1997; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

A artrite inicial é geralmente de padrão oligoarticular de grandes articulações, especialmente de joelhos. O surto inflamatório dura de semanas a meses, a biópsia sinovial revela inflamação inespecífica e o fluido sinovial exhibe padrão inflamatório com elevado número de leucócitos. Surtos iniciais de artrite tendem a regredir espontaneamente, mas nas fases de recidivas, existe a tendência ao desenvolvimento de poliartrite de caráter aditivo, com envolvimento de pequenas e grandes articulações, sem períodos de melhora, lembrando manifestações articulares da artrite reumatóide (YOSHINARI *et al.*, 1995).

Assim como observado na Doença de Lyme, o quadro neurológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari é caracterizado pela tríade: meningite linfomonocitária, neurite craniana e radiculopatia periférica, havendo descrição de casos de encefalite e/ou encefalomielite e distúrbios psiquiátricos (SHINJO *et al.*, 2009).

Manifestações oculares podem estar presentes em todas as fases da doença. A conjuntivite é mais frequente na fase primária, enquanto que na fase secundária há o predomínio de queratite, uveíte e infecção de retina manifestada por diplopia, edema, fotofobia e embaçamento visual (MORA; CARTA, 2009).

A arritmia é a manifestação característica do envolvimento cardíaco podendo durar meses, embora geralmente não necessite de implantação de marca passo (YOSHINARI *et al.*, 1997; YOSHINARI *et al.*, 1999a; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

Yoshinari *et al.* (2010) e Mantovani (2010) descreveram as principais manifestações clínicas observadas na Síndrome de Baggio-Yoshinari:

1. cutâneas: eritema migratório, eritema anular secundário, linfocitoma benigno (YOSHINARI *et al.*, 2007), acrodermatite crônica atrófica (MANTOVANI *et al.*, 2007a), paniculite (MANTOVANI *et al.*, 2007a) e lesões de pele semelhantes à esclerodermia no local inicial da picada (FONSECA *et al.*, 2005);
2. ósteo-musculares: artrite, artralgia, miosite e síndrome da fadiga crônica (SFC). A síndrome da fadiga crônica é definida como cansaço físico ou

- mental com duração superior a seis meses que não melhora com repouso, e é exacerbado por atividades físicas, sendo caracterizada na presença de quatro dos seguintes sintomas: fadiga prolongada, cefaleia, mialgia, diminuição de memória ou concentração, artralgia, dor de garganta, adenomegalia cervical e distúrbio do sono (YOSHINARI *et al.*, 2010);
3. neurológicas: meningite linfomonocitária, neurite de nervos cranianos (paralisia facial, diplopia, surdez, disfagia, dislalia, nevralgia do trigêmeo), radiculopatias periféricas sensitivo-motoras, síndrome de *Guillain-Barré*, mononeurite múltipla, convulsões, encefalomielite, encefalopatia e disfunção esfíncteriana (SHINJO *et al.*, 2009);
  4. distúrbios cardíacos como arritmias e insuficiência cardíaca por cardiomegalia (YOSHINARI *et al.*, 1997; YOSHINARI *et al.*, 1999a; YOSHINARI *et al.*, 1999b);
  5. distúrbios psiquiátricos como depressão grave, tentativas de suicídio, síndrome do pânico, transtorno bipolar, esquizofrenia (SHINJO *et al.*, 2009);
  6. distúrbios de adequação social como fuga de escolas, busca de isolamento e abandono de empregos (SHINJO *et al.*, 2009);
  7. distúrbios oculares intrínsecos como uveíte, coriorretinite e arterite retiniana (SATO *et al.*, 2003);
  8. distúrbios do cognitivo que incluem diminuição de memória, dificuldade de expressão, distúrbios do sono e dificuldades de concentração, memorização ou raciocínio (SHINJO *et al.*, 2009); e
  9. disfunções imuno-alérgicas como maior sensibilidade a drogas e alimentos, urticárias e sintomas graves como edema angioneurótico adquirido (YOSHINARI *et al.*, 1995).

A alta frequência de recidivas é o aspecto clínico distintivo da Síndrome de Baggio-Yoshinari e ocorre em cerca de 75% dos casos, especialmente quando os doentes não são diagnosticados e tratados oportunamente na fase aguda (SHINJO *et al.*, 2009; YOSHINARI *et al.*, 1995). Importante salientar que os episódios de recorrências são geralmente subdiagnosticados, pois os dados epidemiológicos ocorridos no passado não são inquiridos ou associados com sintomas atuais. Ademais, manifestações cutâneas e sintomas *flu-like* tendem a desaparecer ao

longo da prolongada evolução clínica, dificultando ainda mais o diagnóstico dos casos de evolução prolongada (SHINJO *et al.*, 2009).

Mantovani e colaboradores (2007a) afirmam que o diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari tende a ser difícil, especialmente na fase latente ou recorrente, recomendando a utilização do guia diagnóstico baseado em parâmetros maiores e menores (Figura 1) como preconizado pelo Laboratório de Referência Nacional (LIM-17 do HCFMUSP), que considera o caso positivo na presença de três parâmetros maiores ou dois maiores e dois menores simultaneamente.

Figura 1 – Critérios adotados pelo LIM17-HCFMUSP para diagnóstico de SBY

PARÂMETROS MAIORES	PARÂMETROS MENORES
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epidemiologia compatível quando do início da infecção: picada, visita às áreas de risco, visualização de carrapatos no ambiente ou animais, animais doentes no local.</li> <li>• Sorologia positiva para <i>Borrelia burgdorferi</i> (ELISA ou WB) nos padrões adotados no LIM-17 do HCFMUSP</li> <li>• Clínica pertinente: EM ou complicação sistêmica (articular, neurológica, cardíaca ou ocular).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Episódios de recorrência</li> <li>• Visualização de "espiroquetídeos" à microscopia óptica (MO)</li> <li>• Síndrome da Fadiga crônica</li> </ul>

Fonte: Mantovani *et al.*, (2007a).

### 2.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari baseia-se nos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial consiste na pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*. A técnica sorológica para pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* foi modificada no LIM-17 do HCFMUSP, e é preciso atentar ao fato de que os títulos dos ensaios no país são baixos e flutuantes, com riscos de se encontrar casos falsos positivos e negativos. Na falta do

isolamento do agente brasileiro, emprega-se a *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana nos ensaios sorológicos (ELISA e WB) (COSTA, 1998; BARROS, 2000; MANTOVANI, 2004).

Dentre as enfermidades que cursam com sorologia falso-positiva temos a sífilis; leishmaniose visceral; doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia, artrite reumatoide; infecções virais; rickettsioses agudas; neuropatias crônicas (YOSHINARI *et al.*, 1997; YOSHINARI *et al.*, 1999b).

Segundo Yoshinari *et al.* (1995), pacientes que desenvolvem torpor, confusão mental ou coma, na vigência de exantema cutâneo, devem ser pesquisados para rickettsioses, como a febre maculosa brasileira (*Rickettsia rickettsii*) ou novas rickettsioses ditas brandas, causadas por *Rickettsia parkeri*, *R. amblyommii*, *R. felis*, *R. bellii* e *R. rhipicephali*.

Pacientes com diagnóstico clínico-epidemiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari desenvolvem sorologia positiva (ELISA ou WB) para *Borrelia burgdorferi* em aproximadamente 65% dos casos, enquanto nos indivíduos normais, a frequência de positividade é de aproximadamente 16% (MANTOVANI *et al.*, 2007b).

Na fase aguda da zoonose ocorre predomínio de anticorpos da classe IgM e na convalescência de IgG, mas esta distinção tende a desaparecer nos surtos de recorrências (YOSHINARI *et al.*, 1995). As pequenas oscilações de títulos ou de resultados não indicam que houve modificações na evolução clínica. Vale ressaltar que a interpretação dos resultados de sorologias realizadas com metodologias adaptadas ao nosso meio é diferente das realizadas nos EUA e Eurásia (YOSHINARI *et al.*, 1995).

A hipótese de que a Síndrome de Baggio-Yoshinari seja causada pela *Borrelia burgdorferi* de morfologia atípica, sem flagelos e desprovida de inúmeros constituintes da membrana externa, também explica a baixa sensibilidade dos testes sorológicos para a *Borrelia burgdorferi* de origem americana. Os resultados sorológicos, embora úteis, do ponto de vista prático, devem ser interpretados com muita cautela, pela ocorrência de falsos negativos e positivos (MANTOVANI, 2010).

A técnica de ELISA é realizada com antígeno sonicado total de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana e segue metodologia adotada nos EUA. Em contrapartida, a interpretação do Western blotting no Brasil é diferente da preconizada no Hemisfério Norte, pois se valoriza a quantidade de bandas presentes e não a ocorrência de bandas específicas, como é preconizada nos outros

continentes. A pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* (ELISA) no líquido cérebro-espinhal (LCE) pode ser útil quando houver suspeita de acometimento neurológico na Síndrome de Baggio-Yoshinari, mas tem as mesmas restrições do estudo sorológico. Em geral, indivíduos normais não apresentam anticorpos anti-*Borrelia* no líquido cefalorraquidiano, mas o teste ELISA pode ser positivo em inúmeras enfermidades infecciosas ou autoimunes (MANTOVANI, 2004; YOSHINARI *et al.*, 1995).

Estudos realizados no LIM-17 do HCFMUSP indicam que pacientes com Síndrome de Baggio-Yoshinari desenvolvem autoanticorpos ao longo da prolongada evolução clínica (YOSHINARI *et al.*, 1995; GAUDITANO *et al.*, 2000). Outras desordens imunológicas também foram descritas no Brasil, como surgimento dos anticorpos contra fator antinuclear (FAN) e anticardiolipina, hipergamaglobulinemia e elevação de IgE (YOSHINARI *et al.*, 1995).

### 2.2.7 Tratamento

A definição da terapêutica a ser utilizada depende do estágio da Síndrome de Baggio-Yoshinari, embora seja um aspecto nem sempre fácil de ser definido, exceto quando diante de um paciente com histórico agudo e epidemiologia compatível, que desenvolveu eritema migratório após picada por carrapato e que frequentou área de risco recentemente. Em geral, os pacientes procuram assistência médica na vigência de complicações tardias, e nestas condições, como foi salientado anteriormente, o diagnóstico e tratamento são extremamente complexos (MANTOVANI, 2010).

A dificuldade de tratamento da Doença de Lyme tem várias explicações. Na fase de disseminação sanguínea das espiroquetas, essas bactérias, além de terem predileção por determinados tecidos e capacidade de penetração intracelular (MA; STURROCK; WEIS; 1991; PETNICKI-OCWIEJA; KERN, 2014), adquirem grande capacidade de resistência aos antimicrobianos e anticorpos, sobrevivendo no interior de macrófagos e células endoteliais. Ademais, nos estágios mais avançados, existe o desenvolvimento da autoimunidade, quando a patogênese está associada com existência da reatividade cruzada entre os componentes bacterianos e constituintes *self* humanos. Esse aspecto imunológico é comprovado pelo surgimento de

anticorpos anticomponentes neuronais, cardiolipina, fator reumatoide e fator antinuclear (STEERE, 2001).

A infecção primária da Síndrome de Baggio-Yoshinari é tratada com doxiciclina 100mg duas vezes ao dia pelo prazo mínimo de 30 dias. Crianças podem receber amoxicilina ou azitromicina pelo mesmo período. Surto recorrentes iniciais podem ser tratados com os mesmos antimicrobianos por um período prolongado de cerca de três meses, embora os resultados dessa terapia antimicrobiana sejam inconstantes (MANTOVANI *et al.*, 2007b).

Na presença de complicações neurológicas como meningite, encefalite, neurite ou na vigência de artrite recorrente, pode-se empregar ceftriaxona 2g/EV/dia por 30 dias, seguido de dois meses adicionais de doxiciclina 100mg duas vezes ao dia.

Nesta fase costuma-se associar hidroxicloroquina na dose de 400mg/dia por tempo prolongado, embora não esteja totalmente demonstrado se esta opção terapêutica seria mais eficiente que o uso isolado da doxiciclina pelo período de três meses. Sintomas como fadiga crônica e distúrbios de cognição respondem pouco ao uso de antibióticos e costumam merecer outras formas de abordagem terapêutica. Não existe ainda um consenso sobre o tratamento da Síndrome de Baggio-Yoshinari de evolução clínica prolongada com episódios de recidivas, há casos de boa resposta aos antimicrobianos assim como casos não responsivos (MANTOVANI *et al.*, 2007b; SHINJO *et al.*, 2009; YOSHINARI *et al.*, 2010).

### 2.2.8 Epidemiologia

Ainda considerada como doença rara em território nacional, caracteriza-se como agravo inusitado e, de acordo com a Portaria Nº 1.271, de 6 de junho de 2014, a notificação é compulsória e a investigação obrigatória (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

Dados oficiais brasileiros ainda são escassos, mas a elevada morbidade quando não adequadamente diagnosticada e tratada, devido às recorrências e complicações clínicas progressivas, permite caracterizá-la para ingressar no grupo das doenças emergentes, re-emergentes e negligenciadas no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2015; SHINJO *et al.*, 2009).

No Brasil, estudos soroepidemiológicos de Borreliose realizados em bovinos, cães, equinos e animais silvestres apresentaram valores próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte (COSTA *et al.*, 2002; FONSECA *et al.*, 1996; ISHIKAWA, 1996; ISHIKAWA, 2000; JOOPERT *et al.*, 2001; MADUREIRA, 2007; MADUREIRA *et al.*, 2007; SALGADO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 1999; YOSHINARI *et al.*, 1995;).

Após os primeiros casos de borreliose em humanos descritos no estado de São Paulo em 1992 (YOSHINARI *et al.*, 1993a), diversos outros casos têm sido descritos, utilizando técnicas sorológicas e moleculares em diversos estados brasileiros: Mato Grosso do Sul (COSTA; BONOLDI; YOSHINARI, 2001; COSTA; LOPES; REZENDE, 2016; NAKA *et al.*, 2008; REZENDE *et al.*, 2016), São Paulo (SARAIVA *et al.*, 2011), Amazonas (SANTOS *et al.*, 2010a; SANTOS *et al.*, 2011; TALHARI *et al.* 2010), Tocantins (CARRANZA-TAMAYO; COSTA; BASTOS, 2012) e Paraná (GONÇALVES *et al.*, 2015).

Em Mato Grosso do Sul, levantamento da casuística realizado por Costa, Bonoldi e Yoshinari (2001) identificou 16 casos, incluindo a descrição do primeiro caso de meningite de Lyme no Brasil. Em 2016, este grupo de pesquisadores descreveu um caso de linfocitoma cútis associado à Borreliose mimetizando o lúpus tímido (COSTA; LOPES; REZENDE, 2016).

### 2.2.9 Evolução

Yoshinari *et al.* (2010) reforçam que a evolução clínica da Síndrome de Baggio-Yoshinari tem características diferentes da observada na clássica Doença de Lyme. Estudos realizados no LIM-17 do HCFMUP mostram que 75% dos casos tratados adequadamente na fase aguda são curados. Por outro lado, se a terapia antimicrobiana for iniciada tardiamente, apenas 25% dos pacientes tem a cura da zoonose.

Os pacientes com diagnóstico tardio tendem a apresentar recorrências cutâneas, articulares, neurológica, oculares e/ou cardíacas. Observa-se um aumento na frequência dos relatos de complicações clínicas crônicas, com sintomas graves e com sequelas que pouco melhoram com a reintrodução da terapia antimicrobiana, além do fato de mimetizarem diversas outras patologias, como esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, ataxias, demência, distúrbios

psiquiátricos, ceratite, cegueira, surdez, esclerodermia em placa, artrite deformante e lúpus tímido, complicações tardias estas que tiveram início anos anteriores ao quadro clínico atual e nem sempre são diagnosticados como SBY (COSTA; LOPES; REZENDE, 2016; FONSECA *et al.*, 2005; KOWACS *et al.*, 2013; MANTOVANI *et al.*, 2007b; ROSA-NETO; GAUDITANO; YOSHINARI, 2014; SANTOS *et al.*, 2011; SARAIVA *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 2003; SHINJO *et al.*, 2009; YOSHINARI *et al.*, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar o diagnóstico sorológico e molecular da Síndrome de Baggio-Yoshinari em Mato Grosso do Sul.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Para a consecução do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar o desempenho dos testes sorológicos pelos métodos ELISA e *Western blotting* para diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari;
- b) padronizar o método PCR para o diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari;
- c) avaliar o desempenho do método PCR para diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari;
- d) realizar triagem sorológica pelos métodos ELISA e *Western blotting* em amostras de pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Baggio-Yoshinari e identificar recidivas em pacientes com diagnóstico anterior já confirmado, atendidos no Ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP);
- e) detectar o agente etiológico pela técnica de PCR e analisar a homologia entre os isolados de *Borrelia burgdorferi* lato sensu; e
- f) analisar a concordância dos resultados dos testes sorológicos e moleculares.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de estudo

Estudo analítico, seccional, utilizando técnicas sorológicas e moleculares para avaliação de testes diagnósticos.

### 4.2 Local e período da pesquisa

A pesquisa foi realizada com pacientes atendidos no Ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP-UFMS), provenientes de todo o estado de Mato Grosso do Sul e encaminhados via central de regulação da Secretaria Estadual de Saúde (SES-MS), no período de 2013 a 2016.

### 4.3 População de estudo

#### 4.3.1 Grupo controle

Foram selecionados 40 indivíduos voluntários para padronização das metodologias sorológicas e moleculares, determinação do *cut-off* para realização dos ensaios sorológicos na população local e validação da reação de PCR, sendo 75% (30/40) do sexo feminino e 25% (10/40) do sexo masculino. A idade dos indivíduos no período da coleta variou de 18 a 65 anos e a mediana das idades foi de 45 anos. Todos eram provenientes da zona urbana de Campo Grande - MS, negaram histórico de picada de carrapato e não frequentavam áreas de risco.

#### 4.3.2 Pacientes com suspeita ou diagnóstico clínico de SBY

Após ampla divulgação entre os médicos reumatologistas do município de Campo Grande – MS, os pacientes que atenderam os critérios de inclusão e concordaram com a participação na pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram submetidos ao procedimento de coleta das amostras.

#### 4.3.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos os pacientes de ambos os sexos, na faixa etária acima de 18 anos, com suspeita clínica da Síndrome de Baggio-Yoshinari que preencheram os critérios diagnósticos definidos pelo Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM17-HCFMUSP), sendo necessário o preenchimento de três parâmetros maiores ou dois parâmetros maiores associados a dois parâmetros menores.

#### 4.3.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes com diagnóstico diferencial confirmado para outras doenças infecciosas ou autoimunes, gestantes, indígenas e vulneráveis, definidos como pessoas ou grupos que, por quaisquer razões ou motivos, tenham a sua capacidade de autodeterminação reduzida ou impedida, ou de qualquer forma estejam impedidas de opor resistência, sobretudo no que se refere ao TCLE (BRASIL, 2012).

### 4.4 Coleta de amostras

Os pacientes foram submetidos a uma punção venosa periférica em membro superior. Utilizando as normas de biossegurança e as técnicas de antisepsia adequadas, preferencialmente na veia mediana cubital ou mediana cefálica, foi realizada uma coleta utilizando a técnica para coleta de sangue a vácuo na qual foram coletados, aproximadamente, 10mL de sangue divididos em um tubo sem e um tubo com anticoagulante EDTA para obtenção, respectivamente, de soro e sangue total, para a realização dos exames sorológicos e moleculares.

## 4.5 Testes sorológicos

### 4.5.1 Detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)

Realizada no Laboratório de Imunologia Clínica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Todas as amostras de soro foram inicialmente submetidas à pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pela metodologia de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) indireto, conforme metodologia já padronizada (BARROS, 2000; COSTA, 1998; GRODZICKI; STEERE, 1988; MANDELL *et al.*, 1989; MANTOVANI, 2010) e utilizada no Laboratório de Referência Nacional LIM17-HCFMUSP.

As placas de ELISA poliestireno *Immulon 1B* (Thermo Electron Corporation, USA) foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução na concentração de 15µg/mL de sonicação total de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 (obtido a partir do sonicação total da *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, de origem americana, inicialmente isolada de carrapatos *Ixodes scapularis*, conservado congelado em nitrogênio líquido, gentilmente cedido pelo laboratório de referência nacional LIM17-HCFMUSP) diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e mantidas a 4°C em câmara úmida durante a noite. As placas foram lavadas por três vezes com tampão fosfato (PBS) com 0,05% de Tween 20 (pH 7,4).

Após sensibilização, os sítios inespecíficos das placas foram bloqueados com 100µL por poço de solução proteica com leite desnatado a 5%, diluído em tampão fosfato com 0,5% de Tween 20 (pH 7,4). As placas foram então incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e, após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS) com 0,05% de Tween 20 (pH 7,4). As amostras diluídas em PBS Tween com 5% de leite desnatado pH 7,4, na proporção 1/100 para pesquisa de anticorpos IgM e 1/400 para anticorpos IgG, foram então adicionadas na placa.

As placas foram novamente incubadas durante 1 hora e, após a incubação, lavadas por três vezes com tampão fosfato (PBS) com 0,05% de Tween 20 (pH 7,4). Foram adicionados 100µL/poço de anti-IgM ou anti-IgG humano conjugado à enzima

fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1/1000 em PBS-Tween-leite desnatado (pH 7,4), e incubadas por 1 hora. As placas foram lavadas novamente três vezes como descrito acima e adicionados 100µL/poço de substrato p-nitro-fenil-fosfato 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 405nm.

Interpretação dos resultados: a amostra considerada positiva apresentou uma DO (densidade óptica) igual ou maior ao valor do *cut-off* obtido pela média dos valores de DO dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão desses valores, garantindo um nível de confiança de 99,8%. Os valores em DO expressos pelo espectrofotômetro foram convertidos em títulos, utilizando-se, para esse fim, um gráfico de calibração do título, em papel milimetrado. A interpretação foi realizada conforme Figura 2.

Figura 2 – Valores de referência para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Classe de Anticorpo pesquisada	Valores de Referência	
	Título	Interpretação
IgM	< 1 / 50	NEGATIVO
IgG	< 1 / 200	NEGATIVO

Fonte: Mantovani *et al.*, (2007a).

#### 4.5.2 Detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método *Western blotting* (WB)

Realizada no Laboratório de Imunologia Clínica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Todas as amostras foram submetidas à detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pela metodologia de *Western blotting* (WB), conforme metodologia padronizada (BARROS, 2000; COSTA, 1998; DRESSLER *et*

*al.*, 1993; MANTOVANI, 2004) e utilizada no Laboratório de Referência Nacional LIM17-HCFMUSP.

Para o *Western blotting* foi realizada a eletroforese vertical do extrato total de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 (obtido a partir do sonicado total da *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, de origem americana, inicialmente isolada de carrapatos *Ixodes scapularis*, conservado congelado em nitrogênio líquido, gentilmente cedido pelo laboratório de referência nacional LIM17-HCFMUSP), na concentração de 900µg/poço reduzido com dithiothreitol (Bio Rad®) em gel de poliacrilamida a 10%.

As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,2mm. Após transferência do antígeno, o papel de nitrocelulose foi corado com Ponceau (por 10 minutos) e lavado com água destilada para retirar o excesso do corante e cortado em tiras, as quais foram bloqueadas (tampão TBS 1x com Tween 0,1% com 5% de leite desnatado 5% em pH 7,4), lavadas, incubadas com as amostras diluídas 1:100, lavadas, incubadas com conjugado diluído 1/1000 (anti-IgM ou anti-IgG humano conjugado à enzima fosfatase alcalina), lavadas e reveladas.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme Figura 3.

Figura 3 – Valores de referência para pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método de *Western blotting* (WB)

Classe de Anticorpo pesquisada	Valores de Referência	
	Número de bandas	Interpretação
IgM	2	POSITIVO
IgG	4	POSITIVO
IgM e IgG	1 e 2 (respectivamente)	POSITIVO

Fonte: Mantovani *et al.*, (2007a).

## 4.6 Testes moleculares

Realizados no Laboratório de Biologia Molecular – BIOTECH *S-Inova*, da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

### 4.6.1 Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizada extração orgânica utilizando a digestão com enzimas proteolíticas, purificação com solventes orgânicos e precipitação com etanol.

O protocolo adaptado de Sambrook, Fritschi e Maniatis (1989) consiste em cinco etapas básicas:

1. rompimento da membrana celular;
2. ressuspensão do material em um tampão de extração contendo detergente, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e agente tamponante visando a solubilização de membrana lipoproteica e desnaturação de proteínas mas mantendo o DNA protegido da ação de enzima de degradação;
3. extração com solvente orgânico e formação de duas fases: orgânica (proteínas, lipídeos e outras macromoléculas) e aquosa (DNA, RNA e alguns polissacarídeos);
4. precipitação do DNA através da adição de etanol à fase aquosa; e
5. ressuspensão em água ultrapura.

Assim sendo, todas as amostras de sangue total e soro foram descongeladas, homogeneizadas e 350µL foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 2mL. Adicionado então 25µL de Proteinase K (20mg/mL), homogeneizado e incubado por 15 minutos a 65°C em banho-maria.

Após 15 minutos, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionados 250µL de SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio). Foram homogeneizadas por inversão e então incubadas por 6 minutos a 65°C em banho-maria.

Na sequência, foram adicionados 800µL de clorofórmio com agitação vigorosa por 2 minutos em agitador do tipo vortex, até que a porção líquida fluísse livremente e a hemoglobina presente na amostra apresentasse um aspecto de partículas de

chocolate. Adicionou-se 400µL da solução de precipitação proteica e homogeneizou-se por mais 2 minutos em agitador do tipo vortex até que a amostra tornou-se uniformemente viscosa. Realizada então a centrifugação por 10 minutos a 12.000 RPM para separação da fase aquosa e fase orgânica.

A fase aquosa, superior, foi pipetada para um novo tubo de microcentrífuga de 2mL. Adicionado 1mL de etanol absoluto refrigerado e homogeneizado por inversão até a observação de um precipitado que se inicia em torno de 30-60 segundos podendo levar até 10 minutos dependendo da quantidade de DNA presente na amostra.

Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de etanol 70% refrigerado. Centrifugado por 2 minutos a 12.000 RPM e o sobrenadante descartado. Novamente centrifugado por 1 minuto a 12.000 RPM e os resíduos de etanol retirados com o auxílio de uma pipeta do tipo *Pasteur*. Os tubos então foram invertidos para secagem.

Após completa secagem, foram adicionados 100µL de água ultrapura para cada tubo, homogeneizado levemente e incubados por 10 minutos a 37°C.

A pureza (260nm/280nm) e a concentração (ng/µL) do DNA total obtido foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro *BioDrop® Touch Duo Spectrophotometer by BioDrop®* England e em seguida o material foi acondicionado em freezer a -20°C até a realização dos testes moleculares.

#### 4.6.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

##### 4.6.2.1 Gradientes

Gradientes de temperatura foram realizados para determinar a temperatura ideal de anelamento das amostras no *primer* utilizado.

##### 4.6.2.2 Gene *flgE* (gancho flagelar) – *Borrelia* spp e ciclos de temperatura

O DNA de *Borrelia burgdorferi* extraído das amostras de sangue total e soro foi diluído 1:10 em água ultrapura livre de DNase/RNase e submetido à técnica de PCR. Os iniciadores utilizados foram desenhados por Rezende *et al.* (Instituto

Nacional da Propriedade Industrial – INPI – Processo BR 10 2016 021522 6) para amplificação de um fragmento de 262pb da região de codificação do gene conservado que sintetiza o gancho flagelar (*flgE*) de *B. burgdorferi* baseado em Sal *et al.* (2008). Foram utilizados os seguintes *primers*: *flgE* 262 FW (5' – TCCTCCGGGATTTCATACAAG – 3') e *flgE* 262 Rev (5' – TGGGTGCAAATGTAGGTGAA – 3').

Amplificação foi realizada em 25µL de volume final de reação contendo 17,55µL de H<sub>2</sub>O ultrapura livre de DNase/RNase, 2,50µL de Tampão PCR 10x, 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,50µL de dNTP mix (10mM), 0,25µL de cada *primer* (10pmoles), 0,2µL de Platinum™ TaqDNA Polymerase e 3µL de DNA extraído da amostra diluído 1:10.

As condições de ciclos da PCR consistiram de uma desnaturação inicial durante 3 minutos a 95°C, seguida de 45 ciclos repetitivos, consistindo em desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 62°C por 25 segundos, extensão a 72°C por 25 segundos, seguidos por uma extensão final durante 5 minutos a 72°C.

As boas práticas de laboratório foram seguidas para evitar a contaminação e, para todas as reações, foram utilizados um controle positivo (DNA de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40) e dois controles negativos (mix puro e amostra de sangue humano de um paciente sem histórico clínico e/ou epidemiológico de borreliose).

O produto final das reações foi analisado em gel de agarose 1,5%, corado por Brometo de Etídio (5µg/µL) por 10 minutos e visualizados sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador. Fotografou-se as bandas com auxílio de máquina fotográfica digital interligada ao sistema AlphaDigidoc® (Gel Documentation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

#### 4.6.2.3 Quantificação de DNA

A pureza (260nm/280nm) e a concentração (ng/µL) total de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (BioDrop® Touch Duo Spectrophotometer by BioDrop England).

#### 4.6.2.4 Sequenciamento

Os produtos das reações de PCR que apresentaram positividade foram purificadas com o *ExoSAP-IT<sup>®</sup> PCR Product Cleanup* (USB<sup>®</sup>) e sequenciados em ambas as direções pelo método de terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) utilizando kit BigDye (ABI Corporation) num ABI 3130 (Applied Biosystems<sup>™</sup>). As sequências foram alinhadas utilizando o software Sequencher (Versão 4.10.1, Gene Codes Corporation) e comparadas com a sequência de *Borrelia burgdorferi* publicadas no GenBank por meio da ferramenta de alinhamento local de nucleotídeos BLASTn (*Standard Nucleotide – Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

#### 4.7 Análise estatística

As variáveis avaliadas neste estudo foram apresentadas na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas (SHOTT, 1990). A avaliação da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelos métodos ELISA e Western blotting foi realizada por meio do teste de *Kappa* e interpretados conforme Figura 4 (LANDIS; KOCH, 1977). O mesmo teste foi utilizado na avaliação da concordância entre o resultado da reação de PCR para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e o resultado obtido na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelos métodos ELISA e Western blotting. A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico SPSS, versão 23.0, considerando um nível de significância de 5% (ROWE, 2007).

Figura 4 – Valores de índice *Kappa* (*K*) e concordância

Valor Índice <i>Kappa</i> ( <i>K</i> )	Concordância
0	Pobre
0 a 0,20	Ligeira
0,21 a 0,40	Considerável
0,41 a 0,60	Moderada
0,61 a 0,80	Substancial
0,81 a 1,00	Excelente

Fonte: Adaptado de Landis; Koch (1977).

#### 4.8 Considerações éticas

Por se tratar de uma pesquisa envolvendo seres humanos, atendendo os requisitos da Resolução CONEP 466/12 (BRASIL, 2012), o projeto de pesquisa intitulado “Diagnóstico sorológico e caracterização por biologia molecular do agente etiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari (Doença de Lyme-símile Brasileira)”, foi cadastrado na Plataforma Brasil, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e aprovado sem pendências conforme parecer N° 1.065.681 de 15 de maio de 2015 – CAAE 42325815.1.0000.0021 (Anexo A).

O projeto de pesquisa também foi submetido ao Colegiado Executivo do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) através da Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP) e aprovado conforme Resolução nº 59 de 17 de julho de 2015 (Anexo B).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características da população estudada

Considerando os dados demográficos dos 41 pacientes incluídos no estudo, 68,3% (28/41) eram do sexo feminino e 31,7% (13/41) do sexo masculino. A idade dos pacientes no período da coleta variou de 18 a 76 anos e a mediana das idades foi de 43 anos. O histórico de picada por carrapato esteve presente em 63,4% (26/41) dos pacientes, sendo 69,2% (18/26) do sexo feminino e 30,8% (8/26) do sexo masculino.

A figura 5 descreve as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes com suspeita clínica de SBY.

Figura 5 – Descrição dos dados epidemiológicos e clínicos, Campo Grande-MS (n=41)

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE	DESCRIÇÃO
SBY – 001:	Masculino, 61 anos, nega histórico de picada de carrapato, refere convívio em área rural e de mata, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 002:	Feminino, 59 anos, nega histórico de picada de carrapato, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular acompanhada de quadro depressivo.
SBY – 003:	Feminino, 22 anos, nega histórico de picada de carrapato, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 004:	Masculino, 29 anos, tem histórico de frequentes picadas de carrapato devido à atividade profissional em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular.

---

SBY – 005:	Feminino, 41 anos, tem histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal ósteo-muscular e neurológica acompanhada de quadro depressivo.
SBY – 006:	Feminino, 58 anos, nega histórico de picada de carrapato, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 007:	Masculino, 57 anos, nega histórico de picada de carrapato, refere convívio em área de mata, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 008:	Feminino, 41 anos, tem histórico de picada de carrapatos, queixa clínica principal neurológica e ósteo-muscular compatível com poliradiculoneuropatia periférica e miosite.
SBY – 009:	Feminino, 45 anos, tem histórico de picada de há 12 anos, queixa clínica principal cutâneo-mucosa. Evoluiu com condrite nasal e perfuração do septo. Apresenta recidivas da condrite nasal, cuja biópsia mostrou processo inflamatório crônico. Fez uso de ceftriaxona com remissão do quadro clínico. Dois anos após apresentou recidiva com melhora somente com uso de Doxiciclina 100mg 12/12 horas.
SBY – 010:	Feminino, 47 anos, tem histórico de picada de carrapato, apresentou eritema cerca de 60 dias antes da coleta, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios do cognitivo.
SBY – 011:	Masculino, 49 anos, tem histórico de picada de carrapato em 2005, manifestações neurológicas e ósteo-muscular, com sorologia positiva para borreliose e submetido a tratamento com ceftriaxona e doxiciclina com melhora do quadro. Retorna com queixa clínica principal neurológica, ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.

---

---

---

SBY – 012:	Feminino, 18 anos, tem histórico de picada de carrapatos em zona rural. Apresentou eritema migratório localizado em membro inferior direito cerca de três meses antes da coleta de sangue para realização dos exames. Relata cefaleia, fadiga crônica, edema em mãos e pés, artralgia em mãos e artrite em pés.
SBY – 013:	Feminino, 76 anos, tem histórico de picada de carrapato, convívio em zona rural, apresentou eritema migratório cerca de 25 dias antes da coleta, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 014:	Feminino, 40 anos, tem histórico de picada de carrapato há cerca de cinco anos, queixa clínica principal ósteo-muscular. Relata mialgia, cefaleia, artralgia e artrite em mãos e joelhos.
SBY – 015:	Feminino, 32 anos, nega histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal cutânea e ósteo-muscular. Lesão na face direita de início a quatro anos, de características hiperemiadas, evoluindo com expansão e atrofia. Tratamento com ceftriaxona por 30 dias seguido de doxiciclina por 90 dias.
SBY – 016:	Feminino, 39 anos, tem histórico de picada de carrapato há cinco anos, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios psiquiátricos. Tratamento com doxiciclina por 60 dias com melhora do quadro.
SBY – 017:	Feminino, 49 anos, tem histórico de picada de carrapato por conta da atividade profissional, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 018:	Feminino, 44 anos, tem histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal neurológica, ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.

---

---

---

SBY – 019:	Feminino, 57 anos, nega histórico de picada de carrapato embora esteja exposta por conta da atividade profissional, queixa clínica principal ósteo-muscular com artrite e deformação articular em articulação interfalângicas.
SBY – 020:	Feminino, 43 anos, tem histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal neurológica compatível com poliradiculoneuropatia periférica e miosite. Desenvolveu quadro de autoimunidade pós-infecção.
SBY – 021:	Feminino, 36 anos, tem histórico de exposição a carrapatos mas não se recorda da picada, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios do cognitivo. Tratamento com doxiciclina por 60 dias.
SBY – 022:	Feminino, 42 anos, nega histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 023:	Masculino, 43 anos, nega histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 024:	Masculino, 18 anos, tem histórico de picada por carrapato, convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular, distúrbio psiquiátricos e cognitivos.
SBY – 025:	Masculino, 34 anos, tem histórico de contato e frequentes picadas de carrapatos por conta da atividade profissional. Queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 026:	Feminino, 42 anos, tem histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal neurológica e ósteo-muscular.
SBY – 027:	Feminino, 32 anos, não se recorda de picada de carrapatos, queixa clínica principal cutânea e ósteo-muscular. Lesão na face direita de início a quatro anos, de características hiperemiadas, evoluindo com expansão e atrofia. Tratamento com ceftriaxona por 30 dias seguido de doxiciclina por 90 dias. Melhora da lesão.

---

---

---

SBY – 028:	Feminino, 39 anos, tem histórico de picada de carrapato há cinco anos, queixa clínica principal ósteo-muscular, neurológica e distúrbios psiquiátricos. Tratamento com doxiciclina por 60 dias com melhora do quadro.
SBY – 029:	Feminino, 44 anos, tem histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal neurológica, ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.
SBY – 030:	Masculino, 42 anos, nega picada de carrapatos, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 031:	Feminino, 51 anos, nega picada de carrapatos, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 032:	Feminino, 47 anos, tem histórico de picada de há 12 anos, queixa clínica principal cutaneomucosa. Fez uso de ceftriaxona com remissão do quadro clínico. Dois anos após apresentou recidiva com melhora somente com uso de Doxiciclina.
SBY – 033:	Feminino, 47 anos, histórico de picada de carrapato há cerca de três anos, com formação de eritema, queixa clínica principal ósteo-muscular.
SBY – 034:	Feminino, 59 anos, nega histórico de picada de carrapato, refere convívio em área rural, queixa clínica principal ósteo-muscular acompanhada de quadro depressivo.
SBY – 035:	Feminino, 44 anos, refere que teve diagnóstico de Doença de Lyme nos Estados Unidos em 2013 sendo tratada com 21 dias de antibiótico e melhora do quadro. Queixa clínica principal distúrbios do cognitivo.
SBY – 036:	Masculino, 42 anos, tem histórico de picada de carrapato há cerca de dois meses. Relata febre, mialgia e artralgia. Fez uso de Doxiciclina 100mg 12/12 horas.
SBY – 037:	Feminino, 33 anos, tem histórico de picadas frequentes de carrapatos por conta da atividade profissional, queixa clínica principal ósteo-muscular e distúrbios do cognitivo.

---

---

---

SBY – 038:	Masculino, 50 anos, tem histórico de picada de carrapato em zona rural há cerca de cinco anos. Relata febre, mialgia, artralgia e fadiga. Nega lesão de pele. Sinais de neurite periférica com queixa de parestesia e dificuldade de marcha. Artralgia e artrite metacarpofalangeana.
SBY – 039:	Masculino, 49 anos, tem histórico de picada de carrapato em zona rural há cerca de três anos. Relata febre, mialgia e artralgias em episódios recorrentes há três anos. Sinais de neurite periférica com queixa de parestesia. Apresentou melhora com doxiciclina e ceftriaxona.
SBY – 040:	Masculino, 54 anos, nega histórico de picada de carrapato, convívio frequente em área rural por conta da atividade profissional queixa clínica principal neurológica.
SBY – 041:	Masculino, 35 anos, tem histórico de picada de carrapato, queixa clínica principal ósteo-muscular.

---

## 5.2 Detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA

Todas as 41 amostras de soro dos pacientes encaminhados com suspeita clínica e que preencheram os critérios diagnósticos estabelecidos foram testadas para a detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA. Os resultados foram interpretados conforme parâmetros adotados pelo Laboratório de Referência Nacional LIM-17 HCFMUSP.

A positividade observada foi de 26,8% (11/41) para anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi*, sendo 81,8% (9/11) em pacientes do sexo feminino, e 43,9% (18/41) para anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi*, sendo 88,9% (16/18) em pacientes do sexo feminino. A positividade global por título e classe de anticorpo e a positividade por amostra estão descritas nas Tabelas 1 e 2 e na Figura 6.

Tabela 1 – Resultados da pesquisa e título de anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA, Campo Grande-MS (n=41)

Resultado	Anticorpos IgM	
	N.º	%
Negativo	30	73,1
Positivo 1:100	5	12,2
Positivo 1:200	4	9,8
Positivo 1:400	2	4,9
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100,0</b>

Tabela 2 – Resultados da pesquisa e título de anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA, Campo Grande-MS (n=41)

Resultado	Anticorpos IgG	
	N.º	%
Negativo	23	56,1
Positivo 1:200	8	19,5
Positivo 1:400	10	24,4
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100,0</b>

Figura 6 – Resultados das amostras testadas para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* e título das amostras pelo método ELISA por paciente, Campo Grande-MS (n=41)

Identificação da amostra	ELISA	
	IgM (Título)	IgG (Título)
SBY – 001	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 002	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 003	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 004	NEGATIVO	NEGATIVO

SBY – 005	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 006	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 007	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 008	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 009	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 010	NEGATIVO	POSITIVO – (1/400)
SBY – 011	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 012	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 013	POSITIVO (1/100)	POSITIVO – (1/400)
SBY – 014	POSITIVO (1/200)	POSITIVO – (1/400)
SBY – 015	NEGATIVO	POSITIVO – (1/400)
SBY – 016	POSITIVO (1/200)	POSITIVO – (1/400)
SBY – 017	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 018	POSITIVO (1/100)	POSITIVO – (1/400)
SBY – 019	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 020	POSITIVO (1/100)	POSITIVO (1/200)
SBY – 021	POSITIVO (1/200)	POSITIVO (1/400)
SBY – 022	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY - 023	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY - 024	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 025	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 026	POSITIVO (1/200)	NEGATIVO
SBY – 027	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 028	POSITIVO (1/400)	POSITIVO (1/400)
SBY – 029	NEGATIVO	NEGATIVO

SBY – 030	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 031	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 032	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 033	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 034	POSITIVO (1/400)	NEGATIVO
SBY – 035	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 036	POSITIVO (1/100)	POSITIVO (1/400)
SBY – 037	NEGATIVO	POSITIVO (1/200)
SBY – 038	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 039	POSITIVO (1/100)	POSITIVO (1/400)
SBY – 040	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 041	NEGATIVO	NEGATIVO

### 5.3 Detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método *Western blotting* (WB)

Todas as 41 amostras de soro de pacientes encaminhados com suspeita clínica e que preencheram os critérios diagnósticos estabelecidos foram testadas para a detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método *Western blotting*. Os resultados foram interpretados conforme parâmetros adotados pelo Laboratório LIM-17 HCFMUSP.

A positividade observada foi de 34,2% (14/41) para anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi*, sendo 78,6% (11/14) em pacientes do sexo feminino, e 43,9% (18/41) para anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi*, sendo 83,3% (15/18) em pacientes do sexo feminino. Utilizando o critério de positividade simultânea, a positividade foi de 19,5% (8/41), sendo 87,5% (7/8) em pacientes do sexo feminino. A positividade global considerando a classe de anticorpo e o número de bandas presente e positividade por amostra estão descritas nas Tabelas 3 e 4 e na Figura 7.

Tabela 3 – Resultados da pesquisa de anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi* e número de bandas detectadas pelo método *Western blotting*, Campo Grande-MS (n=41)

Resultado	Anticorpos IgM	
	N.º	%
Negativo	19	46,3
Positivo – 1 banda	8	19,5
Positivo – 2 bandas	11	26,8
Positivo – 3 bandas	1	2,5
Positivo – 4 bandas	2	4,9
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100,0</b>

Tabela 4 – Resultados da pesquisa de anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi* e número de bandas detectadas pelo método *Western blotting*, Campo Grande-MS (n=41)

Resultado	Anticorpos IgG	
	N.º	%
Negativo	18	43,9
Positivo – 2 bandas	5	12,2
Positivo – 4 bandas	18	43,9
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100,0</b>

Figura 7 – Resultados das amostras testadas para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* e número de bandas detectadas pelo método *Western blotting* (WB) por paciente, Campo Grande-MS (n=41)

Identificação da amostra	Western blotting	
	IgM (Nº de bandas)	IgG (Nº de bandas)
SBY – 001	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 002	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 003	NEGATIVO	NEGATIVO

SBY – 004	NEGATIVO	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 005	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 006	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 007	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 008	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 009	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 010	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 011	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 012	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 013	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 014	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 015	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 016	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 017	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (2 bandas)
SBY – 018	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 019	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 020	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 021	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 022	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 023	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 024	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 025	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 026	POSITIVO (4 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 027	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 028	POSITIVO (4 bandas)	POSITIVO (2 bandas)

SBY – 029	POSITIVO (3 bandas)	NEGATIVO
SBY – 030	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 031	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 032	NEGATIVO	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 033	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 034	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 035	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 036	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 037	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (2 bandas)
SBY – 038	POSITIVO (1 banda)	POSITIVO (2 bandas)
SBY – 039	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (4 bandas)
SBY – 040	NEGATIVO	NEGATIVO
SBY – 041	POSITIVO (2 bandas)	POSITIVO (2 bandas)

#### **5.4 Correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias ELISA e *Western blotting***

As tabelas 5, 6 e 7 mostram a concordância geral entre os resultados obtidos pelas metodologias ELISA e *Western blotting*.

Tabela 5 – Análise da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi* pelos métodos ELISA e *Western blotting* (WB), Campo Grande-MS (n=41)

ELISA	<i>Western blotting</i>		Valor de <i>p</i>	Concordância ( <i>Kappa</i> )
	Positiva	Negativa		
Positiva	8	3	0,002	0,485
Negativa	6	24		

Tabela 6 – Análise da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelos métodos de ELISA e *Western blotting* (WB), Campo Grande-MS (n=41)

ELISA	<i>Western blotting</i>		Valor de <i>p</i>	Concordância ( <i>Kappa</i> )
	Positiva	Negativa		
Positiva	14	4	<0,001	0,604
Negativa	4	19		

Tabela 7 – Análise da concordância entre os resultados obtidos na detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelos métodos ELISA e *Western blotting* (WB), Campo Grande-MS (n=41)

ELISA	<i>Western blotting</i>		Valor de <i>p</i>	Concordância ( <i>Kappa</i> )
	Positiva	Negativa		
Positiva	18	2	<0,001	0,611
Negativa	6	15		

## 5.5 Análise Molecular

Todas as 41 amostras de sangue total de pacientes encaminhados com suspeita clínica de SBY e que preencheram os critérios diagnósticos estabelecidos foram testadas para a detecção do gene *flgE* (gancho flagelar) de *Borrelia burgdorferi* lato sensu.

O mesmo procedimento foi realizado com as 41 amostras de soro utilizadas para pesquisa de anticorpos a fim de comparação e definição da melhor amostra para detecção molecular.

A amplificação da região *flgE* do DNA de *Borrelia burgdorferi* lato sensu foi de 29,3% (12/41) em amostras de sangue total e 2,4% (1/41) em amostras de soro (Figura 8 e Figura 9). A positividade global e por amostra estão descritas na Tabela 8 e Figura 10.

Tabela 8 – Resultados das amostras testadas para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu, Campo Grande-MS (n=41)

Resultado	Gene <i>flgE</i>	
	N.º	%
Negativo	29	70,7
Positivo	12	29,3
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100,0</b>

Figura 8 – PCR gene *flgE* para *B. burgdorferi* lato sensu. M: marcador DNA (100pb); C-: controle negativo; colunas 01, 02, 03 e 04: amostras de soro humano; colunas 05, 06, 07 e 08 amostras de sangue total humano; C+: controle positivo *B. burgdorferi*.

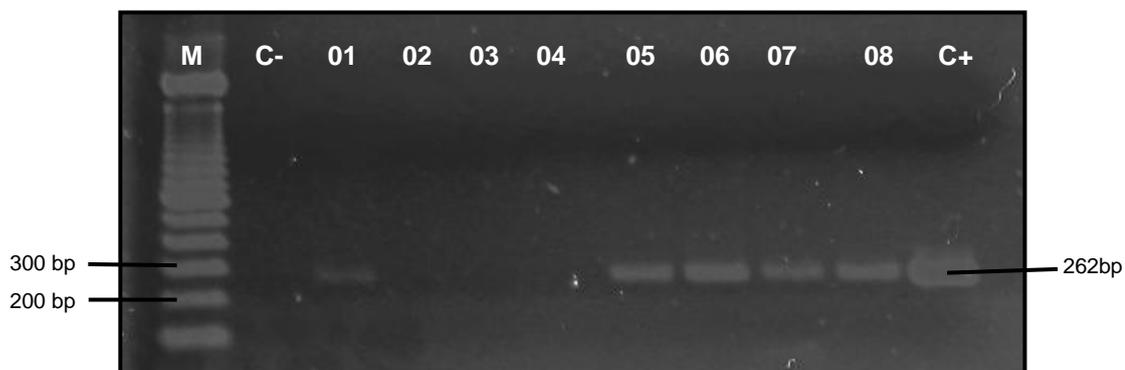


Figura 9 – PCR gene *flgE* para *B. burgdorferi* lato sensu. M: marcador DNA (100pb); colunas 05, 06, 07, 08 e 09 amostras de sangue total humano; C+: controle positivo *B. burgdorferi*; C-: controle negativo.

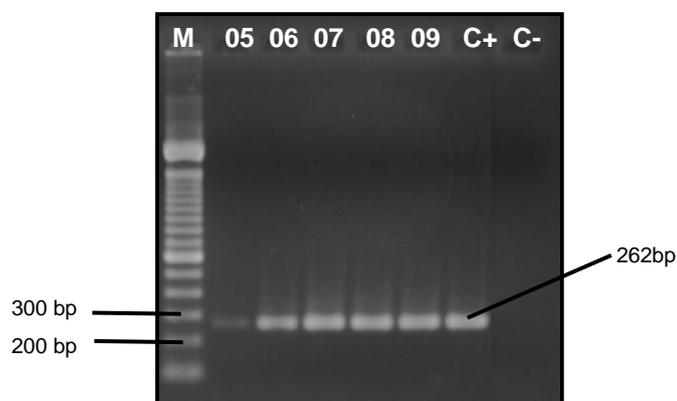


Figura 10 – Resultados das amostras testadas para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu, Campo Grande-MS (n=41)

Identificação da amostra	PCR
	<i>flgE</i>
SBY – 001	NEGATIVO
SBY – 002	NEGATIVO

SBY – 003	NEGATIVO
SBY – 004	NEGATIVO
SBY – 005	NEGATIVO
SBY – 006	NEGATIVO
SBY – 007	NEGATIVO
SBY – 008	NEGATIVO
SBY – 009	POSITIVO
SBY – 010	POSITIVO
SBY – 011	NEGATIVO
SBY – 012	POSITIVO
SBY – 013	POSITIVO
SBY – 014	POSITIVO
SBY – 015	POSITIVO
SBY – 016	POSITIVO
SBY – 017	NEGATIVO
SBY – 018	POSITIVO
SBY – 019	NEGATIVO
SBY – 020	POSITIVO
SBY – 021	POSITIVO
SBY – 022	NEGATIVO
SBY - 023	NEGATIVO
SBY - 024	NEGATIVO
SBY – 025	NEGATIVO
SBY – 026	NEGATIVO
SBY – 027	NEGATIVO

SBY – 028	NEGATIVO
SBY – 029	NEGATIVO
SBY – 030	NEGATIVO
SBY – 031	NEGATIVO
SBY – 032	NEGATIVO
SBY – 033	NEGATIVO
SBY – 034	NEGATIVO
SBY – 035	NEGATIVO
SBY – 036	POSITIVO
SBY – 037	NEGATIVO
SBY – 038	NEGATIVO
SBY – 039	POSITIVO
SBY – 040	NEGATIVO
SBY – 041	NEGATIVO

O controle positivo *Borrelia burgdorferi* foi utilizado em todas as reações, assim como os controles negativos da mix pura e de uma amostra de DNA extraído de sangue total humano de um paciente sem histórico clínico e/ou epidemiológico de borreliose.

Foram testadas também 40 amostras do grupo controle constituído de pacientes sem histórico clínico e/ou epidemiológico de borreliose que foram utilizadas para padronização das técnicas sorológicas. Todas as amostras do grupo controle apresentaram-se negativas.

## 5.6 Correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias sorológica e molecular

As tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14 mostram a concordância geral entre os resultados sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* das classes IgM e IgG, respectivamente, e moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu.

Tabela 9 – Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA, Campo Grande-MS (n=41)

PCR	ELISA		Valor de <i>p</i>	Concordância ( <i>Kappa</i> )
	Positiva	Negativa		
Positiva	8	4	<0,001	0,577
Negativa	3	26		

Tabela 10 – Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA, Campo Grande-MS (n=41)

PCR	ELISA		Valor de <i>p</i>	Concordância ( <i>Kappa</i> )
	Positiva	Negativa		
Positiva	11	1	<0,001	0,589
Negativa	7	22		

Tabela 11 – Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método ELISA, independente da classe de anticorpo, Campo Grande-MS (n=41)

PCR	ELISA		Valor de <i>p</i>	Concordância (Kappa)
	Positiva	Negativa		
Positiva	11	1	<0,001	0,507
Negativa	9	20		

Tabela 12 – Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método *Western blotting*, Campo Grande-MS (n=41)

PCR	<i>Western blotting</i>		Valor de <i>p</i>	Concordância (Kappa)
	Positiva	Negativa		
Positiva	7	5	0,036	0,326
Negativa	7	22		

Tabela 13 – Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método *Western blotting*, Campo Grande-MS (n=41)

PCR	<i>Western blotting</i>		Valor de <i>p</i>	Concordância (Kappa)
	Positiva	Negativa		
Positiva	12	0	<0,001	0,692
Negativa	6	23		

Tabela 14 – Análise da concordância entre os resultados moleculares para detecção do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu e sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* pelo método *Western blotting*, independente da classe de anticorpo e utilizando o critério de interpretação combinada, Campo Grande-MS (n=41)

PCR	<i>Western blotting</i>		Valor de <i>p</i>	Concordância ( <i>Kappa</i> )
	Positiva	Negativa		
Positiva	12	0	0,001	0,453
Negativa	12	17		

### 5.7 Resultados das amostras submetidas ao sequenciamento.

As sequências *forward* e *reverse* de sete amostras foram agrupadas em contigs e submetidas ao alinhamento local (BLAST) para verificação de suas similaridades. Foram alinhadas globalmente com a sequência de referência GenBank: *Borrelia burgdorferi* flagellar hook protein (*flgE*) – L43849.1 (proteína) e CP009656.1 (genoma total).

As sequências obtidas mostraram quase 100% de similaridade com várias sequências de *B. burgdorferi* lato sensu, possibilitando a identificação em nível de espécie. Estas sequências foram alinhadas com a sequência de *B. burgdorferi* (L43849.1) com o software Clustal W 2.0 software (Larkin *et al.*, 2007) em um comprimento de 228bp, totalmente conservado, codificando 76 aminoácidos.

O gene *flgE* está localizado na posição 115 a 1443 da sequência de referência L43849.1 que codifica a proteína de interesse nesta sequência. Apresenta um códon de início codificando 12 aa e um *stop códon*, na sequência apresenta 6 aa e em seguida inicia um novo *códon* com 442 aa na 5' 3' Frame 2.

Na comparação com genoma completo, a sequência está alinhada na posição 293666-293898 do genoma CP009656.1.

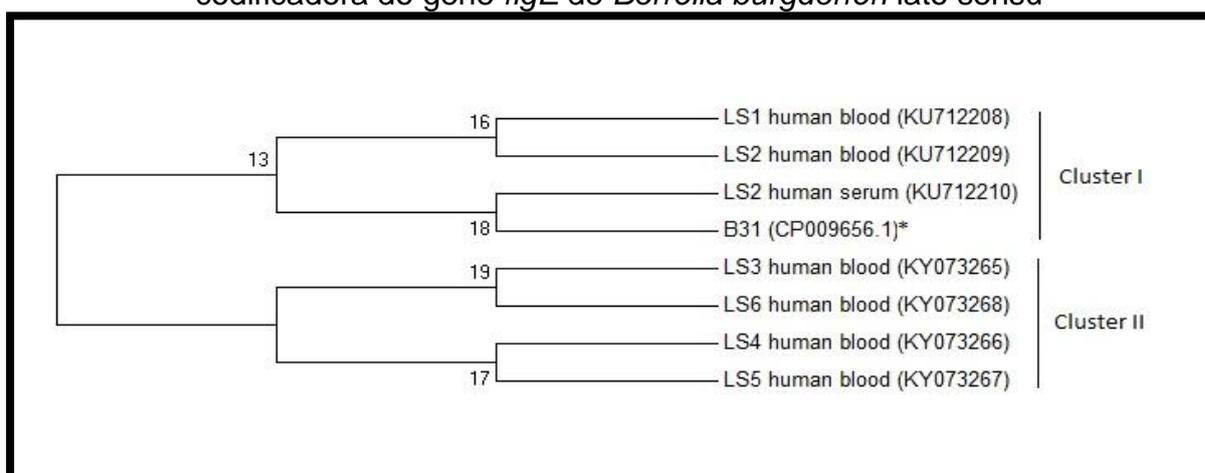
As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank com os números de acesso KU712208, KU712209, KU712210, KY073265, KY073266, KY073267 e KY073268 (Tabela 15). As sequências foram agrupadas em um grupo monofilético pela análise filogenética e o dendograma de similaridade está

representado na Figura 11. O alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos está representado na Figura 12.

Tabela 15 – Características do alinhamento utilizando a ferramenta *BLASTn* com Score (Máx. / Total), *e-value* e Identidade por número de acesso

Número de Acesso	<i>BLASTn</i>		
	Score	<i>e-value</i>	Similaridade
	Máx. / Total		(%)
KU712208	422 / 422	2e-114	100
KU712209	422 / 422	2e-114	100
KU712210	422 / 422	2e-114	100
KY073265	418 / 418	3e-113	100
KY073266	409 / 409	2e-110	99
KY073267	414 / 414	4e-112	99
KY073268	418 / 418	3e-113	100

Figura 11 – Dendograma de similaridade baseado na comparação da região codificadora do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi* lato sensu



\* B31 (CP009656.1) = *Borrelia burgdorferi*

Figura 12 – Alinhamento múltiplo das sequencias de nucleotídeos por meio do Clustal W 2.0.

```

LS4 human blood (KY073266)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
LS5 human blood (KY073267)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGNAACAGTTGGAAGTTACACT
LS1 human blood (KU712208)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
LS2 human blood (KU712209)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
LS2 human serum (KU712210)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
B31 (CP009656.1)             GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
LS3 human blood (KY073265)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
LS6 human blood (KY073268)   GGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACGTAAATTTGAAATTGGGAACAGTTGGAAGTTACACT
*****

LS4 human blood (KY073266)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTCTTATTCAAGATGGATAT
LS5 human blood (KY073267)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
LS1 human blood (KU712208)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
LS2 human blood (KU712209)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
LS2 human serum (KU712210)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
B31 (CP009656.1)             GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
LS3 human blood (KY073265)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
LS6 human blood (KY073268)   GATTCAATTACTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTATTATTCAAGATGGATAT
*****

LS4 human blood (KY073266)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
LS5 human blood (KY073267)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
LS1 human blood (KU712208)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
LS2 human blood (KU712209)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
LS2 human serum (KU712210)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
B31 (CP009656.1)             GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
LS3 human blood (KY073265)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
LS6 human blood (KY073268)   GGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAAATGGTGTATAGTTGGCATTAT
*****

LS4 human blood (KY073266)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAANATTGCTCTTGCTTCTTG-
LS5 human blood (KY073267)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTGT
LS1 human blood (KU712208)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTTT
LS2 human blood (KU712209)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTTT
LS2 human serum (KU712210)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTTT
B31 (CP009656.1)             TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTTT
LS3 human blood (KY073265)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTGT
LS6 human blood (KY073268)   TCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTTCTTGT
*****

```

## 6 DISCUSSÃO

Os pacientes com Síndrome de Baggio-Yoshinari não oportunamente diagnosticados na fase aguda da doença e não tratados com a terapia antimicrobiana adequada podem evoluir com surtos de recidivas clínicas, desordens autoimunes e desenvolver complicações tardias, especialmente neurológicas e reumatológicas, classificadas no grupo de doenças crônicas idiopáticas (BONOLDI, 2009).

O principal objetivo do estudo foi atendido confirmando o diagnóstico sorológico e molecular da Síndrome de Baggio-Yoshinari em amostras de pacientes com clínica e epidemiologia compatíveis no estado de Mato Grosso do Sul.

Ao longo dos quatro anos do estudo, 41 pacientes foram selecionados pelos serviços de reumatologia do município de Campo Grande-MS, provenientes de diversas cidades do estado de Mato Grosso do Sul, e encaminhados para a investigação laboratorial para doença de Lyme-símile com base nos critérios adotados.

A maioria dos pacientes selecionados para o estudo era do sexo feminino assim como registrado por Costa *et al.* (2001) e Naka *et al.* (2008), ambos em Mato Grosso do Sul, mas também na região Amazônica (SANTOS *et al.*, 2011), no estado de São Paulo (PASSOS *et al.*, 2009) e em diversas séries de casos no continente europeu (BERGLUND *et al.*, 1995; FULOP; POGGENSEE, 2008; HUBALEK, 2009). Diferentemente dos Estados Unidos onde a frequência é maior em pacientes do sexo masculino (BACON; KUGELER; MEAD, 2008).

A frequência maior de positividade em pacientes do sexo feminino pode ser decorrente das mudanças socioeconômico-culturais registradas com o aumento da força laboral feminina em atividades menos urbanas, assim como a disseminação de atividades de turismo rural e ecoturismo onde há aumento da exposição ao ecossistema propício para o ciclo da doença.

Com relação à faixa etária, o critério de inclusão neste trabalho era ser maior de 18 anos e, por essa razão, a mediana das idades foi de 43 anos. Dados próximos aos observados por Costa *et al.* (2001), onde a mediana foi de 35 anos, e por Santos *et al.* (2011) que foi de 35,6 anos. Nos Estados Unidos, Mead (2015) mostrou uma distribuição bimodal da incidência da Doença de Lyme em relação à idade com altas taxas entre crianças de 5 a 15 anos e adultos acima de 50 anos.

Dados na população infantil são ainda mais escassos em nível nacional. Em Mato Grosso do Sul, Naka *et al.* (2008) avaliaram 100 pacientes na faixa etária de 9 meses a 16 anos, mediana de 7 anos e 1 mês, e Passos *et al.* (2009) que avaliaram crianças com idade média de 4,6 anos em São Paulo.

O histórico de picada por carrapato esteve presente em 63,4% (26/41) dos pacientes. Dados superiores aos descritos por Yoshinari e Mantovani (2006) que afirmam que 50% dos pacientes referem histórico de picadas por carrapatos ou contato próximo com estes parasitas, seja visualizando nas roupas, seja em animais ou em solos de localidades visitadas.

A utilização de métodos sorológicos como ELISA e *Western blotting* para pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* tem sido a principal ferramenta para o estudo soropidemiológico das borrelioses, sendo utilizado tanto na confirmação de casos clínicos, quanto na avaliação soropidemiológica dessa zoonose emergente (YOSHINARI *et al.*, 2003).

Yoshinari *et al.* (2003) estimaram que a frequência de soropositividade para borreliose na população brasileira é de 3%, após testes sorológicos em indivíduos saudáveis. Estudos soropidemiológicos em humanos (1067 amostras) realizados nas regiões de Itapevi e Cotia (áreas endêmicas para a Borreliose de Lyme), estado de São Paulo, constataram 7,5% de positivos no ELISA.

Gauditano *et al.* (2005) compararam pacientes com Doença de Lyme-símile 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% dos indivíduos analisados.

Estudos também já caracterizaram Mato Grosso do Sul como região de risco para ocorrência de Borreliose de Lyme-símile em animais silvestres (COSTA *et al.*, 2002), em cães (SALGADO *et al.*, 2008) e em humanos (COSTA *et al.*, 2001; NAKA *et al.*, 2008), incluindo também estudo realizado em doadores de sangue que permitiu conhecer a soroprevalência de anticorpos anti-*Borrelia* em indivíduos saudáveis e que indicam a possibilidade da existência de indivíduos assintomáticos (ARÃO, 2007).

O atual "padrão ouro" de diagnóstico para a Doença de Lyme é um algoritmo baseado em testes sorológicos (ELISA e *Western blotting*) para pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*. Considerando a necessidade de detecção da resposta imune do hospedeiro, dados da literatura estimam que 60% dos casos

agudos podem não ser detectados em fase inicial haja vista que o tempo necessário para títulos detectáveis de anticorpos pode ser de algumas semanas (CDC, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2007a; MONIUSZKO *et al.*, 2015).

Assim sendo, Molins *et al.* (2016) têm proposto a revisão desse algoritmo sugerindo a realização de dois testes ELISA em substituição ao padrão atual ELISA e *Western blotting*, ou ainda a manutenção do teste ELISA e a revisão dos critérios interpretativos para o *Western blotting* visando o aumento da sensibilidade diagnóstica e atribuindo maior valor a detecção de anticorpos IgG anti-*Borrelia*, sobretudo nos casos de convalescentes de fase aguda e em fase tardia sistêmica (neurológica, cardíaca e articular), defendendo inclusive a utilização de algoritmos diferentes de acordo com a fase da infecção.

Considerando a sensibilidade limitada dos testes sorológicos disponíveis, sobretudo na fase inicial da doença, Lahey *et al.* (2015) examinaram antígenos de superfície de *Borrelia burgdorferi* e desenvolveram um painel multi-antígeno com dez novos marcadores, aliando a sensibilidade combinada e mantendo a alta especificidade, na tentativa de melhor identificar a infecção precoce, sendo critério de positividade do teste a reatividade, no mínimo, a dois marcadores.

No Brasil, devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos e aos títulos baixos e pouco persistentes, já se utiliza rotineiramente a realização de ambos os testes simultaneamente e considera-se resultado positivo se um dos testes for reagente (BONOLDI, 2009).

A positividade observada no estudo de 26,8% (11/41) para anticorpos da classe IgM anti-*Borrelia burgdorferi* e de 43,9% (18/41) para anticorpos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pela metodologia de ELISA em pacientes sintomáticos é inferior à observada por Moniuszko *et al.* (2015) que relataram 35,0% de anticorpos IgM mas superior aos 30,0% de anticorpos IgG relatados pelos mesmos autores em pacientes com EM na Polônia.

Nossos dados também estão abaixo dos observados por Chmielewska-Badora *et al.* (2006) que analisaram pela metodologia de ELISA um grupo de 180 pacientes com diagnóstico de Doença de Lyme e obtiveram 61,7% (111/180) de anticorpos IgM e 53,9% (97/180) de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*.

Estudo de soroprevalência realizado por Jovanovic *et al.* (2015) na Sérvia avaliou os títulos de anticorpos pela metodologia de ELISA em três populações distintas: 0,0% (0/34) de anticorpos IgM e 11,8% (4/34) de anticorpos IgG em

trabalhadores rurais; 14,3% (5/35) de anticorpos IgM e 14,3% (5/35) de anticorpos IgG em soldados; e 2,9% (1/35) de IgM e 5,7% (2/35) de anticorpos IgG em doadores de sangue.

Os dados observados no presente trabalho são superiores aos observados por Naka *et al.* (2008) em população pediátrica de Mato Grosso do Sul que registrou 17,0% (17/100) para anticorpos IgM e 12,0% (12/100) para anticorpos da classe IgG.

Em Mato Grosso do Sul, Arão (2007) também já realizou estudo soropidemiológico em pacientes assintomáticos doadores de sangue onde a positividade encontrada para anticorpos IgM foi de 4,34% e de 6,09% para anticorpos IgG pela metodologia de ELISA.

Quando analisamos a positividade pela metodologia de *Western blotting* observada no estudo, 34,2% (14/41) para anticorpos IgM anti-*Borrelia burgdorferi* e 43,9% (18/41) para anticorpos IgG, além de 19,5% (8/41) pelo parâmetro de positividade simultânea que considera o somatório total de bandas IgM e IgG conforme o padrão preconizado pelo Laboratório de Investigação em Reumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (LIM-17), centro de referência no Brasil (MANTOVANI *et al.*, 2007a).

Nossos dados também estão abaixo dos observados por Chmielewska-Badora *et al.* (2006) que analisaram pela metodologia *Western blotting* um grupo de 180 pacientes com diagnóstico de Doença de Lyme e obtiveram 62,2% (112/180) de anticorpos IgM e 59,4% (107/180) de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*.

Utilizando a metodologia *Western blotting* para estudo de soroprevalência na Sérvia, Jovanovic *et al.* (2015) avaliaram os títulos de anticorpos também em três populações distintas: 0,0% (0/34) de anticorpos IgM e 11,8% (4/34) de anticorpos IgG em trabalhadores rurais; 8,6% (3/35) de anticorpos IgM e 14,3% (5/35) de anticorpos IgG em soldados; e 2,9% (1/35) de IgM e 5,7 (2/35) de anticorpos IgG em doadores de sangue.

Em Mato Grosso do Sul, Arão (2007) também realizou estudo soropidemiológico em pacientes assintomáticos doadores de sangue e encontrou positividade de 4,34% para anticorpos IgM e de 6,09% para anticorpos IgG pela metodologia de *Western blotting*.

Visando comparar os resultados das duas metodologias implantadas na população local, adotou-se como critério interpretativo a necessidade de execução tanto do teste ELISA quanto do teste *Western blotting* na detecção de anticorpos

anti-*Borrelia burgdorferi*. A análise da concordância entre os resultados da pesquisa de anticorpos IgM e IgG pelas metodologias ELISA e *Western blotting* mostrou relação estatística entre os testes, assim como observado por Chmielewska-Badora *et al.* (2006) e Pritt *et al.* (2016).

Assim como observado por Bonoldi (2009), os ensaios sorológicos utilizando as metodologias ELISA e *Western blotting* demonstraram concordância moderada a substancial pelo índice *Kappa*, permitindo valorizar o resultado positivo de um dos testes.

A concordância *Kappa* observada na detecção de anticorpos IgM anti-*Borrelia* pelas metodologias ELISA e *Western blotting* foi moderada. Quando comparadas a detecção de anticorpos IgG anti-*Borrelia* e a positividade do teste sorológico por metodologia independente da classe de anticorpo pesquisado, as concordâncias *Kappa* foram substanciais.

O protocolo estabelecido para diagnóstico laboratorial da Doença de Lyme sugere a utilização do teste ELISA como triagem e o *Western blotting* deve ser realizado apenas como confirmatório dos resultados positivos e inconclusivos no ELISA, sendo que a pesquisa de anticorpos IgM anti-*Borrelia* pelo método *Western blotting* só deve ser realizado nos casos em que o tempo de evolução da doença é inferior a 4 semanas (CDC, 2016; MARQUES, 2015).

Contudo, considerando a dificuldade no isolamento das cepas de *Borrelia* spp circulantes em território nacional e a utilização nos ensaios sorológicos da cepa americana (*Borrelia burgdorferi* cepa G39/40), é importante a realização de ambos os testes para aumentar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial da Síndrome de Baggio-Yoshinari (MANTOVANI *et al.*, 2007a).

No ambiente intracelular, a forma *L* de *Borrelia burgdorferi* fica protegida da ação dos anticorpos e das células de defesa do sistema imune do hospedeiro e, assim sendo, pode permanecer viável por longos períodos no hospedeiro ocasionando o desenvolvimento de títulos baixos e flutuantes de anticorpos e a dificuldade no diagnóstico (BONOLDI, 2009).

O teste ELISA detecta anticorpos contra proteínas específicas mas de forma global enquanto que o teste *Western blotting* detecta-os individualmente. Considerado menos específico que o *Western blotting*, tem sido amplamente utilizado como teste de triagem e para estudos de soroprevalência populacionais,

embora sujeito a resultados falso-positivos devido à ocorrência de reações cruzadas (DATTWYLER; LUFT, 1989).

Considerado teste confirmatório, o *Western blotting* apresenta positividade de 50% na fase aguda e de 80% após a fase aguda, mas necessita de treinamento técnico para criteriosa interpretação, quase subjetiva, dos seus resultados podendo haver resultados indeterminados (GRODZICKI; STEERE, 1988; MOLINS *et al.*, 2016).

Segundo Passos *et al.* (2009), o resultado positivo por umas das metodologias de imunodiagnóstico na vigência de quadro clínico e epidemiológico não compatíveis com o de borreliose, a presença de um resultado falso-positivo deve ser considerada. As principais doenças que apresentam resultados sorológicos falso-positivos por reações cruzadas com a doença de Lyme-símile são a sífilis (em qualquer estágio de evolução) e doenças com componentes imunológicos como a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico.

Moniuszko *et al.* (2015) alertam que a antibioticoterapia adequada quando do diagnóstico inicial do EM pode inclusive inibir a produção de anticorpos anti-*Borrelia* em níveis detectáveis pelos métodos usuais. Quando não tratado, o EM tende a desaparecer em aproximadamente 4 semanas após a picada mas perde-se a oportunidade de evitar o desenvolvimento dos estágios secundários da doença.

Berende *et al.* (2010) alertam para a habilidade que as bactérias do gênero *Borrelia* possuem para escapar do sistema imune do hospedeiro. No hospedeiro vertebrado, as espiroquetas são reconhecidas por vários mecanismos da resposta imune, incluindo o sistema complemento e diversas células imunes inatas. O reconhecimento de *Borrelia* pelas células dendríticas leva à maturação destas células e desencadeia a transcrição de um grande número de genes, tais como os que expressam quimiocinas, inibidores de apoptose, metaloproteases de matriz e um grande subconjunto de citocinas, incluindo mediadores pró-inflamatórios e citocinas imunomoduladoras.

Após a apresentação do antígeno pelas células dendríticas, linfócitos T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub> iniciam a resposta adaptativa, promovendo a liberação de IFN- $\gamma$  e IL-4, que estão diretamente relacionadas com a gravidade dos sintomas agudos. Na sequência, as citocinas liberadas pelos linfócitos T<sub>H</sub> induzem a proliferação de linfócitos B e, conseqüentemente, a produção de imunoglobulinas (BERENDE *et al.*, 2008).

Embora o sistema imune tente prevenir a infecção, a espiroqueta tem seus próprios mecanismos para evitar as defesas do hospedeiro. Sabe-se que os componentes da saliva do carrapato são capazes de inibir a resposta das células dendríticas e assim, aumentar a virulência de *Borrelia*. As espiroquetas também podem inativar o sistema complemento do hospedeiro ao interferir nas proteínas reguladoras do complemento. Outro mecanismo eficaz para escapar à resposta imune do hospedeiro é a variação antigênica de *Borrelia* spp. (BASILE *et al.*, 2017; BERENDE *et al.*, 2008).

Assim sendo, é possível que mesmo na vigência de sinais e sintomas compatíveis com um quadro de borreliose a pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* seja negativa e Perronne (2014) aborda possíveis causas: *cut-off* inadequado, a formação de imunocomplexos que impedem a detecção do anticorpo, a diversidade antigênica de *Borrelia* spp e a coinfeção com outros patógenos que podem ser responsáveis por alguns ou todos os sintomas ou que podem alterar a resposta imune do hospedeiro (BRUNNER, 2006; SCHUTZER *et al.*, 1990).

A efetividade das metodologias sorológicas para o diagnóstico tem sido limitada e outras técnicas tem sido alvo de pesquisas e padronizações. Nesse contexto a utilização da PCR tem conquistado espaço mas ainda está aquém da expectativa e gerando ampla discussão (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005; ESHOO *et al.*, 2012; MARQUES, 2015; MOLINS *et al.*, 2016; MONIUSZKO *et al.*, 2015; PRIEM *et al.*, 1997; TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA; CHMIELEWSKI, 2002).

A utilização de técnicas moleculares para diagnóstico laboratorial de *Borrelia* spp foi inicialmente descrita por Rosa e Schwan (1989) mas diversos estudos utilizando PCR no diagnóstico de infecções por *Borrelia burgdorferi* têm sido publicados utilizando uma diversidade de protocolos de extração, *primers* e ciclos de reação (SCHMIDT, 1997). Agüero-Rosenfeld *et al.* (2005) e Dunaj *et al.* (2013) afirmam que, embora seja um método promissor, uma das causas da não utilização rotineira da reação de PCR, além do custo, é a ausência de consenso e padronização para o diagnóstico molecular.

Cabe ressaltar que a realização da reação de PCR apresenta diversas variáveis que precisam ser controladas além da reação de PCR propriamente dita: extração do DNA, amplificação e a detecção dos *amplicons*. Assim sendo, as condições da amostra, o controle de inibidores, a escolha do alvo e dos *primers*,

além da padronização do procedimento podem ser decisivos para a sensibilidade da reação (SCHMIDT, 1997).

O uso de controles internos negativos e positivos na reação de PCR reduzem a influência de inibidores de amplificação e reduz números de resultados falsos negativos (IVACIC *et al.*, 2007).

As análises moleculares mostraram uma positividade de 29,3% (12/41) para a detecção do gene *flgE*. Das doze amostras positivas, sete foram purificadas e submetidas ao sequenciamento. A análise filogenética utilizando a sequência de genes da flagelina confirmou a homologia entre os isolados e permitiu a construção do dendograma.

O gene que sintetiza o gancho flagelar (*flgE*) é um gene cromossômico único, de aproximadamente 1kb, que codifica para a proteína flagelina (41kDa) e é responsável pela síntese do gancho flagelar, estrutura que conecta o filamento flagelar periplasmático ao corpo basal. Por ser altamente conservado, sua diversidade é valiosa para distinguir as espécies de *Borrelia* (PICKEN, 1992; FUKUNAGA *et al.*, 1996). Apresenta baixa homologia com cromossomos humanos e mostrou-se positivo na identificação da borrelia brasileira em amostras de doentes com doença de Lyme-símile no Brasil (MANTOVANI, 2010; SAL *et al.*, 2008).

Mantovani (2010) explica que espiroquetas na forma L não podem expressar flagelos periplasmáticos mas, analisando resultados dos testes de *Western blotting*, observaram que de maneira geral, pacientes com a Síndrome de Baggio-Yoshinari exibiam no *Western blotting* a presença de 41KDa, uma proteína da flagelina. Os flagelos são constituídos de três componentes: o corpo basal, um gancho (*flgE*) e um filamento. Como espécies mutantes de *B. burgdorferi* para a síntese de flagelos periplasmáticos apresentam o formato de bastonetes, sugeriu-se que o *flgE* poderia ser preservado nas espiroquetas brasileiras e assim, conseguiram identificar o agente e propor a nova definição para a Síndrome de Baggio-Yoshinari.

Analisando o plasma de pacientes com EM, Goodman *et al.* (1995) encontraram uma positividade na PCR de 18,4% (14/76). Em pacientes que apresentavam EM associados a sintomas sistêmicos a taxa de detecção foi mais elevada chegando a 30,3% e, nos casos de lesões múltiplas de pele, a positividade encontrada foi de 37,5%.

Após triagem sorológica utilizando ELISA e *Western blotting*, Santino *et al.* (2008) registrou 7,5% (20/265) de PCR positivos em pacientes com manifestações

clínicas e sorologia positiva, e 0,8% (2/265) em pacientes com manifestações clínicas e sorologia indeterminada.

Chmielewska-Badora *et al.* (2006) observaram uma positividade de 11,1% (20/180) em pacientes com diagnóstico sorológico positivo de Doença de Lyme. Inferior aos 20,8% (10/48) observado por Cerar *et al.* (2008) em um grupo de pacientes diagnosticados como neuroborreliose. De acordo com diferentes estudos, a especificidade da reação de PCR é próxima a 100%, enquanto que a sensibilidade varia 0-100% (média de 14%) (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005).

Um resultado positivo na PCR corrobora com as evidências clínicas da disseminação sistêmica da doença (DUNAJ *et al.*, 2013). Goodman *et al.* (1995) obtiveram 30,3% (10/33) de positividade na PCR de pacientes com manifestações clínicas sistêmicas e 9,3% (4/43) de positividade na PCR na ausência dessas manifestações.

Conforme relatado por Dunaj *et al.* (2013), a escolha da amostra sanguínea para a realização das análises moleculares, em detrimento à biópsia cutânea, líquido cérebro-espinhal ou líquido sinovial, deve-se a facilidade de obtenção por simples punção venosa independente da fase da doença ou da manifestação clínica apresentada.

A maioria das amostras analisadas apresentou positividade apenas em amostras de sangue total sendo negativo no soro. Apenas 2,44% (1/41) dos pacientes apresentaram positividade em amostras de sangue total e soro.

Coburn; Leong e Erban (1993) demonstraram a capacidade de ligação de *Borrelia burgdorferi* às plaquetas do hospedeiro e Goodman *et al.* (1995) afirmam que talvez esse seja o motivo da maior concentração de espiroquetas no sangue total em relação ao soro.

A positividade dos resultados da PCR depende da concentração de espiroquetas na amostra analisada. A baixa e transitória espiroquetemia normalmente observada, aliada ao organotropismo (articulações, coração, meninges) já descrito, além da presença de potenciais inibidores (heparina, etanol, DNA humano) podem influenciar a escolha das melhores condições para a coleta sanguínea (DUNAJ *et al.*, 2013; SCHMIDT, 1997).

Assim sendo, os resultados positivos da reação de PCR tendem a ser esperados com maior frequência na fase de disseminação da doença quando as espiroquetas começam a migrar da pele para diferentes órgãos e tecidos (DUNAJ *et*

*al.*, 2013). Maraspin *et al.* (2011) corroboram enfatizando que a bacteremia é mais comumente presente na fase inicial, após a picada de carrapato, que em estágios avançados da doença.

Comparando a detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* com a detecção de DNA de *Borrelia burgdorferi* em pacientes com EM, Moniuszko *et al.* (2015) observaram que a PCR a partir de biópsia de pele tende a ser mais sensível e específica como teste diagnóstico em pacientes com EM, especialmente em pacientes em fase aguda (<14 dias), mas ainda assim afirmam que a eficácia é inferior ao esperado.

Santos *et al.* (2010b) afirmam que apesar de a técnica de PCR detectar sequências de ácido nucleico de *Borrelia*, com alta especificidade, a sensibilidade do método é variável (20% a 81%).

Um resultado negativo na PCR na presença de sinais e sintomas clínicos da Doença de Lyme pode ser atribuído à ausência ou à baixa quantidade de espiroquetas circulantes na corrente sanguínea (PACHNER; DELANEY, 1993) ou a adesão de espiroquetas aos tecidos (SCHMIDT, 1997).

Assim como observado por von Stedingk *et al.* (1995) em amostras teciduais, o resultado positivo esteve presente em maior quantidade em amostras diluídas 1:10, evidenciando a presença de efeitos inibitórios, e por essa razão a diluição das amostras foi incorporada ao nosso protocolo.

Bunikis e Barbour (2002) já alertavam que a positividade da PCR na ausência de sintomas pode ser decorrente da presença de material genético de espiroquetas não viáveis e questionou a utilização da metodologia para definição de infecção. Em contrapartida, afirmaram que a reação de PCR negativa também não exclui a presença de uma infecção por *Borrelia burgdorferi*, podendo sugerir que o alvo molecular não estivesse preservado.

Atualmente, não existe um teste confirmatório de erradicação da infecção por *B. burgdorferi* (MARQUES, 2015). Ensaios sorológicos podem permanecer positivos durante anos após o tratamento bem sucedido da borreliose (MARQUES, 2015; SCHMIDT, 1997), inclusive com anticorpos da classe IgM (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005). Outro ponto importante questionado por Bunikis e Barbour (2002) foi a utilização da positividade da reação de PCR como uma medida de eficácia do tratamento haja vista a longa persistência de DNA bacteriano após o tratamento adequado com antibióticos.

Normalmente, o tratamento oportuno de pacientes proporcionado pelo diagnóstico em tempo hábil é eficaz, e estudos *follow-up* por sorologia e PCR são raros (MONIUSZKO *et al.*, 2015; PÍCHA *et al.*, 2015).

Um fenômeno interessante observado por Schmidt (1997) é que PCR muitas vezes se torna reativa só depois de alguns dias de tratamento. Reações de PCR negativas em seis dos dez pacientes com EM estudados e não tratados tornaram-se positivas quando nova coleta foi realizada e testada imediatamente após o fim da terapia (SCHMIDT *et al.*, 1995; SCHMIDT *et al.*, 1996). Resultados semelhantes foram relatados em dois pacientes alemães com EM (MAIWALD *et al.*, 1995) e para pacientes com neuroborreliose (HANSEN; LEBECH, 1992). Schmidt (1997) sugere que o aumento da sensibilidade da PCR logo após o início do tratamento pode ser explicado pelo aumento do número de bactérias mortas pela ação antimicrobiana.

Dados esses que são controversos. Picha *et al.* (2008) mostraram que a detecção de DNA de *Borrelia* spp diminui de 58,1% para 41,7% após o início do tratamento com antibióticos. Kondrusik *et al.* (2007) complementam afirmando que a diminuição da positividade da reação de PCR está diretamente proporcional ao tempo de antibioticoterapia efetiva. Nesse sentido, afirmam que quatro semanas de terapia antimicrobiana efetiva reduziu a positividade da reação de PCR de 73,3% para 52,3%.

A concordância *Kappa* foi avaliada na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia*, pelas metodologias ELISA e *Western blotting*, e a detecção do gene *flgE*.

Quando analisadas as positivities pelo método ELISA na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia*, além da positividade global independente da classe de anticorpos, e a detecção do gene *flgE* pela técnica de PCR, a concordância *Kappa* foi moderada para todas as comparações.

Quando analisadas as positivities pelo método *Western blotting* na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia*, além da positividade considerando o critério de interpretação combinada, e a detecção do gene *flgE* pela técnica de PCR, a concordância *Kappa* foi considerável para os anticorpos IgM, moderada para o critério de interpretação combinada e substancial para os anticorpos IgG.

As análises comparativas das diversas metodologias caracterizaram a reação de PCR como complementar ao diagnóstico sorológico. No entanto, nossos resultados positivos na reação de PCR, acompanhados do sequenciamento, confirmam a presença de *Borrelia burgdorferi* e mostram o valor diagnóstico da

reação de PCR como ferramenta complementar diagnóstica na fase precoce ou de recidiva da doença, especialmente quando não é possível a detecção de anticorpos em níveis satisfatórios.

A presença de sequências detectáveis por PCR não necessariamente indicam a presença de doença ativa (DUNAJ *et al.*, 2013) pois, assim como discutido por Schmidt (1997), a reação de PCR não pode diferenciar entre o DNA de organismos vivos e mortos, ou ainda de organismos inteiros ou componentes de *Borrelia spp.* No entanto, há evidência crescente de que a reação de PCR positiva pode estar associada com doença ativa (DUNAJ *et al.*, 2013). As falhas de tratamento associadas com piora em curso ou o reaparecimento dos sintomas geralmente cursam com persistência de reatividade da reação de PCR.

A borreliose de Lyme tem revelado um amplo espectro de condições clínicas, variando de manifestações cutâneas e artrite grave a neurológicas. Os dados epidemiológicos de diversos países europeus e dos Estados Unidos têm mostrado aumento significativo no número de casos diagnosticados (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015; MEAD, 2015) e atribui a melhoria diagnóstica ao melhoramento e desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos nas últimas décadas (HUBÁLEK, 2009). Recentemente, as definições da doença também têm mudado e, o que antes não era diagnosticado como borreliose de Lyme, atualmente pode ser (RUDENKO *et al.*, 2011). E mesmo os benefícios da recomendação de prolongar a terapia antimicrobiana na vigência de sintomas persistentes têm sido questionados por ensaios clínicos randomizados (BERENDE *et al.*, 2016; CLARISSOU *et al.*, 2009; MARQUES, 2008).

Yoshinari *et al.* (2010) já afirmaram que a Doença de Lyme clássica não existe no Brasil. Embora ainda haja necessidade de ampliar e divulgar os conhecimentos, não há como negar a ocorrência de uma exótica zoonose emergente brasileira conhecida como Síndrome de Baggio-Yoshinari ou Borreliose Humana Brasileira. Negligenciar esta doença, além de retardar o diagnóstico oportuno e o tratamento efetivo desta zoonose, tem propiciado o surgimento de complicações clínicas irreversíveis.

A possibilidade de haver um longo período de latência entre o contágio inicial e o surgimento dos sintomas, assim como episódios de recidivas durante sua evolução, não deixa dúvidas de que, uma parte considerável da população brasileira, ainda não dimensionada, carece do diagnóstico e perece das

complicações crônicas desta grave e mórbida enfermidade infecciosa transmitida pela picada de carrapatos.

Como bem discutido por Mantovani (2010) e Yoshinari *et al.* (2009), as dificuldades no diagnóstico não podem servir de justificativa para negar a existência da doença. O diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari permanece baseado na presença de um quadro clínico compatível, com epidemiologia positiva para exposição a picadas de carrapatos e detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*.

No entanto, em situações em que estes critérios são insatisfatórios ou inconclusivos, a utilização da reação de PCR como ferramenta de apoio diagnóstico pode ser de grande valia para definição de conduta e mudança de prognóstico através do diagnóstico oportuno. Espera-se que a continuidade dos estudos e as publicações do grupo local possam fornecer subsídios para padronização de amostras e metodologias, além do estabelecimento de outros alvos moleculares que permitam utilizar a reação de PCR como teste confirmatório em casos de prolongada evolução e difícil definição da doença.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que há circulação de *Borrelia burgdorferi* lato sensu entre a população estudada comprovada por meio da sorologia positiva e detecção de DNA por reação de PCR.

Entre a população estudada, houve predomínio de pacientes do sexo feminino (68,3%) e a mediana de idade foi de 43 anos. O histórico de picada por carrapatos foi relatado por 63,4% dos pacientes.

A pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*Borrelia burgdorferi* pela técnica de ELISA foi positiva em 26,9% e em 43,9%, respectivamente. Pela técnica de *Western blotting*, a positividade observada foi de 34,2% e 43,9% para anticorpos IgM e IGG, respectivamente.

A técnica de PCR permitiu a detecção de *Borrelia burgdorferi* lato sensu em 29,3% das amostras analisadas. Após a análise por sequenciamento, as sequências obtidas foram alinhadas globalmente com a sequência de referência depositada no *GenBank* (*Borrelia burgdorferi* flagellar hook protein (flgE) – L43849.1 (proteína) e CP009656.1 (genoma total)) e mostraram similaridade próxima a 100% com várias sequências de *Borrelia burgdorferi* lato sensu.

A triagem sorológica e a detecção molecular pela técnica de PCR em pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Baggio-Yoshinari, assim como a identificação de recidivas em pacientes com diagnóstico sorológico anterior já confirmado e submetidos à terapia antimicrobiana, mostraram concordância estatística medida pelo índice *Kappa* ( $p < 0,001$ ) e permitiram melhora na assistência aos usuários atendidos com redução do tempo para definição diagnóstica.

Por fim, o presente estudo auxiliará na ratificação do estado de Mato Grosso do Sul como área de ocorrência de Síndrome de Baggio-Yoshinari, despertando junto ao corpo clínico a necessidade de incluí-la entre as hipóteses diagnósticas quando presentes a epidemiologia e a sintomatologia compatíveis.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. Borrelia-like Spirochetes Recovered from Ticks and Small Mammals Collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 621-624, Sep./Oct. 2000.
- AFZELIUS, A. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stokholm: Sitzung vom 16. Dezember 1909. **Archiv für Dermatologie und Syphilis**, Wien, v. 101, n. 2-3, p. 403-404, June 1910.
- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; WANG, G.; SCHWARTZ, I.; WORMSER, G. P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 3, p. 484-509, July 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- ARÃO, C. A. B. **Pesquisa de anticorpos anti-Borrelia e anti-Babesia em soro de doadores de sangue**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Rede Centro-Oeste – Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.
- ARVIKAR, S. L.; STEERE, A. C. Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 269-280, June 2015.
- ASCH, E. S.; BUJAK, D. I.; WEISS, M.; PETERSON, M. G.; WEINSTEIN, A. Lyme disease: an infectious and post infection syndrome. **The Journal of Rheumatology**, v. 21, p. 454-61, 1994.
- AUCOTT, J. N. Posttreatment Lyme Disease Syndrome. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 309-323, June 2015.
- AUCOTT, J. N.; CROWDER, L. A.; KORTTE, K. B. Development of a foundation for a case definition of post-treatment Lyme disease syndrome. **International Journal of Infectious Diseases**, Brookline, v. 17, n. 6, p. e443-e449, June 2013.
- AZULAY, R. D.; ABULAFIA, L. A.; SODRE, C. T.; AZULAY, D. R.; AZULAY, M. M. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 569-71, Aug. 1991.
- BACON, R. M.; KUGELER, K. J.; MEAD, P. S. Surveillance for Lyme Disease - United States, 1992-2006. **MMWR. Surveillance summaries: Morbidity and mortality Weekly Report. Surveillance summaries / CDC**, Atlanta, v. 57, s.10, p. 1-9, Oct. 2008.

BAKER, P. J. Perspectives on “Chronic Lyme Disease”. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 121, n. 7, p. 562-564, July 2008.

BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* Species. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 50, n. 4, p. 381-400, Dec. 1986.

BARROS, P. J. L. **Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e reação em cadeia de polimerase**. 2000. 163 f. Tese (Doutorado em Medicina – Reumatologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/FMUSP, São Paulo, 2000.

BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; GOMES, A. C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 37, n. 6, p. 820-827, Nov. 2000.

BASILE, R. C.; YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MACORIS, D. G.; QUEIROZ-NETO, A. Brazilian borreliosis with special emphasis on humans and horses. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 167-172, Jan./Mar. 2017.

BERENDE, A.; OOSTING, M.; KULLBERG, B.; NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B. Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. **European Cytokine Network**, Montrouge, v. 21, n. 1, p. 7-18, Mar. 2010.

BERENDE, A.; HOFSTEDE, H. J. M. T.; VOS, F. J.; MIDDENDORP, H. V.; VOGELAAR, M. L.; TROMP, M.; HOOGEN, F. H. V. D.; DONDEERS, A. R. T.; EVERS, A. W. M.; KULLBERG, B. J. Randomized Trial of Longer-Term Therapy for Symptoms Attributed to Lyme Disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 374, n. 13, p. 1209-1220, Mar. 2016.

BERGLUND, J.; EITREM, R.; ORNSTEIN, K.; LINDBERG, A.; RINGNÉR, A.; ELMRUD, H.; CARLSSON, M.; RUNEHAGEN, A.; SVANBORG, C.; NORRBY, R. An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 333, n. 20, p. 1319-1324, Nov. 1995.

BONOLDI, V. L. N. **Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos em pacientes com Doença de Lyme-símile brasileira (Síndrome de Baggio-Yoshinari)**. 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/FMUSP, São Paulo, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica: guia de bolso**. 8. ed. Brasília, DF, 2010. p. 152-154.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 jun. 2013. Disponível em: <[http://www.conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/index.html](http://www.conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html)>. Acesso em 04 jan. 2014.

BRASIL. Portaria nº 1.271, de 6 de junho de 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jun 2014. Seção 1, p. 67.

BRUNNER, M. Report refuting value of immune complexes to diagnose Lyme disease is invalid. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 2, p. 304-306, Feb. 2006.

BUCHWALD, A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. **Derm Vierteljahresschr**, v. 15, p. 553-556, 1883.

BUNIKIS, J.; BARBOUR, A. G. Laboratory testing for suspected Lyme disease. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 86, n. 2, p. 311-340, Mar. 2002.

BURGDORFER, W.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; BENACH, J. L.; GRUNWALDT, E.; DAVIS, J. P. Lyme Disease – A tick-borne Spirochetosis? **Science**, Washington, v. 216, p. 1317-1319, June 1982.

CAMERON, D. J. Proof that chronic Lyme Disease exists. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, New York, v. 2010, n. 2010, p. 1-4, Feb. 2010.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; COSTA, J. N. G.; BASTOS, W. M. Lyme disease in the state of Tocantins, Brazil: report of the first cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 16, n. 6, p. 586-589, Nov./Dec. 2012.

CARVALHO, J. A.; TEIXEIRA, S. R. F.; CARVALHO, M. P.; VIEIRA, V.; ALVES, F. A. Doenças emergentes: uma análise sobre a relação do homem com o seu ambiente. **Praxis**, Volta Redonda, v. 1, n. 1, p. 19-23, jan. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Lyme Disease**, Atlanta: CDC, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/lyme/>>. Acesso em 03 Abr 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Lyme Disease**, Atlanta: CDC, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/lyme/>>. Acesso em 04 Jan 2017.

CERAR, T; OGRINC, K.; CIMPERMAN, J.; LOTRIC-FURLAN, S.; STRLE, F.; RUZIC-SABLJIC, E. Validation of cultivation and PCR methods for diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 10, p. 3375-3379, Oct. 2008.

CHARON, N. W.; GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 46, p. 47-73, June 2002.

CHMIELEWSKA-BADORA, J.; CISAK, E.; WÓJCIK-FATLA, A.; ZWOLIŃSKI, J.; BUCZEK, A.; DUTKIEWICZ, J. Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 13, n. 2, p. 307-311, Dec. 2006.

CLARISSOU, J.; SONG, A.; BERNEDE, C.; GUILLEMOT, D.; DINH, A.; ADER, F.; PERRONNE, C.; SALOMON, J. Efficacy of a long-term antibiotic treatment in patients with a chronic Tick Associated Poly-organic Syndrome (TAPOS). **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 39, n. 2, p. 108-115, Feb. 2009.

COBURN, J.; LEONG, J. M.; ERBAN, J. K. Integrin alpha IIb beta 3 mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 15, p. 7059-7063, Aug. 1993.

COSTA, I. P.; YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; LEON, E. P.; ZEITUNE, A. D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme em Mato Grosso do Sul: relato de três casos, incluindo o primeiro relato de meningite de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 6, p. 253-7, nov./dez. 1996.

COSTA, I. P. **Pesquisa de anticorpos anti-Borrelia e do agente etiológico em soro e liquor de pacientes com manifestações clínicas compatíveis com a Doença de Lyme, no Estado de Mato Grosso do Sul**. 1998. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina - Reumatologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/FMUSP, São Paulo, 1998.

COSTA, I. P.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. Perfil clínico e laboratorial da Doença de Lyme-símile no Estado de Mato Grosso do Sul: análise de 16 pacientes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 142-150, maio/jun. 2001.

COSTA, I. P.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 631-635, July 2002.

COSTA, I. P.; LOPES, F. A.; REZENDE, J. Linfocitoma cútis associado à Borreliose: um dilema diagnóstico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 56, s. 2, p. S27-S28, ago. 2016.

CRIPPA, M.; RAIS, O.; GERN, L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 2, n. 1, p. 3-9, June 2002.

DATTWYLER, R. J.; LUFT, B. J. Lyme borreliosis problems in diagnosis and treatment. **Current clinical topics in infectious diseases**, New York, v. 11, p. 56-81, 1989.

DRESSLER, F.; WHALEN, J. A.; REINHARDT, B. N.; STEERE, A. C. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 167, n. 2, p. 392-400, Feb. 1993.

DUNAJ, J.; MONIUSZKO, A.; ZAJKOWSKA, J.; PANCEWICZ, S. The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. **Przegląd epidemiologiczny**, Warsaw, v. 67, n. 1, p. 35-39, Mar. 2013.

ESHOO, M. W.; CROWDER, C. C.; REBMAN, A. W.; ROUNDS, M. A.; MATTHEWS, H. E.; PICURI, J. M.; SOLOSKI, M. J.; ECKER, D. J.; SCHUTZER, S. E.; AUCOTT, J. N. Direct molecular detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* from whole blood of patients with early Lyme Disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-6, May 2012.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Lyme borreliosis in Europe**. ECDC, 2010. Disponível em: <[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/emerging\\_and\\_vector-borne\\_diseases/tick\\_borne\\_diseases/lyme\\_disease/Pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/emerging_and_vector-borne_diseases/tick_borne_diseases/lyme_disease/Pages/index.aspx)>. Acesso em 30 jan. 2016.

FEDER, H. M.; JOHNSON, B. J.; O'CONNELL, S.; SHAPIRO, E. D.; STEERE, A. C.; WORMSER, G. P. *et al.* A critical appraisal of "chronic Lyme disease". **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 357, n. 14, p. 1422-1430, Oct. 2007.

FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 1, 1989.

FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1/2, p. 85-89, 1996.

FONSECA, A. H.; SALLES, R. S. A. N.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme símile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p. 171-8, mar./abr. 2005.

FRASER, C. M.; CASJENS, S.; HUANG, W. M.; SUTTON, G. G.; CLAYTON, R.; LATHIGRA, R.; WHITE, O.; KETCHUM, K. A.; DODSON, R.; HICKEY, E. K.; GWINN, M.; DOUGHERTY, B.; TOMB, J. F.; FLEISCHMANN, R. D.; RICHARDSON, D.; PETERSON, J.; KERLAVAGE, A. R.; QUACKENBUSH, J.; SALZBERG, S.; HANSON, M.; VAN VUGT, R.; PALMER, N.; ADAMS, M. D.; GOCAYNE, J.; WEIDMAN, J.; UTTERBACK, T.; WATTHEY, L.; MCDONALD, L.; ARTIACH, P.; BOWMAN, C.; GARLAND, S.; FUJII, C.; COTTON, M. D.; HORST, K.; ROBERTS, K.; HATCH, B.; SMITH, H. O.; VENTER, C. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, London, v. 390, n. 6660, p. 580-586, Dec. 1997.

FUKUNAGA, M.; OKADA, K.; NAKAO, M.; KONISHI, T.; SATO, Y. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 46, n. 4, p. 898-905, Oct. 1996.

FÜLÖP; B.; POGGENSEE, G. Epidemiological situation of Lyme borreliosis in Germany: Surveillance data from six Eastern German States, 2002 to 2006. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, s. 1, p. 117-120, Dec. 2008.

GARIN, C. H.; BUJADOUX, C. H. Paralyse par les tiques. **Journal de Médecine de Lyon**, Lyon, v. 71, n. 1, p. 765-767, Jan. 1922.

GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIRATSUKA, R. C.; KISS, M. H.; YOSHINARI, N. H. Aspectos imunológicos comuns entre a Doença de Lyme e a Febre Reumática. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-8, jan./fev. 2000.

GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; COSTA, I. P.; BARROS-BATTESTI, D. M.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H. Síndrome de Lyme-símile ou complexo infecto-reacional do carrapato – Síndrome de Baggio-Yoshinari. **Revista Paulista de Reumatologia**, São Paulo, v. 4, p. 16-17, 2005.

GONÇALVES, D. D.; MOURA, R. A.; NUNES, M.; CARREIRA, T.; VIDOTTO, O.; FREITAS, J. C.; VIEIRA, M. L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in humans in a rural area of Paraná State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 571-575, abr./jun. 2015.

GOODMAN, J. L.; BRADLEY, J. F.; ROSS, A. E.; GOELLNER, P.; LAGUS, A.; VITALE, B.; BERGER, B. W.; LUGER, S.; JOHNSON, R. C. Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. **The American journal of medicine**, New York, v. 99, n. 1, p. 6-12, July 1995.

GRODZICKI, R. L.; STEERE, A. C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigens preparations for diagnosis of early Lyme disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 157, n. 4, p. 790-797, Apr. 1988.

GRIMM, D.; TILLY, K.; BYRAM, R.; STEWART, P. E.; KRUM, J. G.; BUESCHEL, D, M.; SCHWAN, T. G.; POLICASTRO, P. F.; ELIAS, A. F.; ROSA, P. A. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, n. 101, v. 9, p. 3142-7, Mar. 2004.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. ; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (*Ixodidae*) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 83-100, Oct. 2006.

HAMER, S. A.; TSAO, J. I.; WALKER, E. D.; HICKLING, G. J. Invasion of the Lyme Disease Vector *Ixodes scapularis*: Implications for *Borrelia burgdorferi* Endemicity. **Ecohealth**, New York, v. 7, n. 1, p. 47-63, Aug. 2010.

HANSEN, K.; LEBECH, A. M. The clinical and epidemiological profile of Lyme neuroborreliosis in Denmark 1985-1990: A prospective study of 187 patients with *Borrelia burgdorferi* specific intrathecal antibody production. **Brain**, Oxford, v. 115, n. 2, p. 399-423, Apr. 1992.

HELLERSTRÖM, S. Erythema chronicum migrans afzelii. **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v. 11, p. 315-318, 1930.

HERXHEIMER, K.; HARTMANN, K. U. Acrodermatitis chronica atrophicans. **Archiv für Dermatologie und Syphilis**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 57-76, July 1902.

HOLLSTRÖM, B. Successful treatment of erythema migrans Afzelius. **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 235-243, Mar. 1951.

HOLLSTRÖM, B. Penicillin treatment of erythema chronicum migrans. **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v. 38, n. 1, p. 285-289, Mar. 1958.

HUBÁLEK, Z. Epidemiology of lyme borreliosis. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v. 37, p. 31-50, Apr. 2009.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico**. 1996. 51 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ, Rio de Janeiro, 1996.

ISHIKAWA, M. M. **Perfil da produção de anticorpos anti-Borrelia burgdorferi em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural**. 2000. 80 p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ, Rio de Janeiro, 2000.

- IVACICA, L.; REEDB, K. D.; MITCHELLC, P. D.; GHEBRANIOUS, N. A LightCycler TaqMan assay for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 57, n. 2, p. 137-143, Feb. 2007.
- JOHNSON, R. C.; SCHMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme Disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, n. 4, p. 496-497, Oct. 1984.
- JOPPERT, A. M.; HAGIWARA, M. K.; YOSHINARI, N. H. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 251-255, Sept./Oct. 2001.
- JOVANOVIĆ, D.; ATANASIEVSKA, S.; PROTIC-DJOKIC, V.; RAKIC, U.; LUKAC-RADONCIC, E.; RISTANOVIC, E. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in occupationally exposed persons in the Belgrade area, Serbia. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 807-814, July/Sept. 2015.
- KOWACS, P. A.; MARTINS, R. T.; PIOVESAN, E. J.; PINTO, M. C. A.; YOSHINARI, N. H. Chronic unremitting headache associated with Lyme disease-like illness. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 71, n. 7, p. 470-473, July 2013.
- KONDRUSIK, M.; FERENCZI, E.; ZAJKOWSKA, J.; PANCEWICZ, S.; GRYGORCZUK, S.; SWIERZBIŃSKA, R.; HERMANOWSKA-SZPAKOWICZ, T. The evaluation of serum presence of antibodies reacting with West Nile Fever virus (WNV) antigens among inhabitants from Podlaskie and Swietokrzyskie region. **Przegląd Epidemiologiczny**, Warszawa, v. 61, n. 2, p. 409-416, 2007.
- KUGELER, K. J.; FARLEY, G. M.; FORRESTER, J. D.; MEAD, P. S. Geographic distribution and expansion of human Lyme Disease, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 8, p. 1455-1457, Aug. 2015.
- LAHEY, L. J.; PANAS, M. W.; MAO, R.; DELANOY, M.; FLANAGAN, J. J.; BINDER, S. R.; REBMAN, A. W.; MONTOYA, J. G.; SOLOSKI, M. J.; STEERE, A. C.; DATTWYLER, R. J.; ARNABOLDI, P. M.; AUCOTT, J. N. Development of a multiantigen panel for improved detection of *Borrelia burgdorferi* infection in early Lyme Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 53, n. 12, p. 3834-3841, Dec. 2015.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, Mar. 1977.
- LANTOS, P. M. Chronic Lyme Disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 325-340, June 2015.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Bethesda, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, Sept. 2007.

LOGIUDICE, K.; OSTFELD, R. S.; SCHMIDT, K. A.; KEESING, F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 2, p. 567-571, Jan. 2003.

LOGIGIAN, E. L.; KAPLAN, R. F.; STEERE, A. C. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 323, n. 21, p. 1438-1444, Nov. 1990.

LIPSCHUTZ, B. Ubereine Seltene Erythemform (Erythema cronicum migrans). **Archiv für Dermatologie und Syphilis**, Wien, v. 118, n. 1, p. 349-56, July 1913.

MA, Y.; STURROCK, A.; WEIS, J. J. Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 2, p. 671-678, Feb. 1991.

MADUREIRA, R. C. **Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em equinos do Estado do Pará e caracterização genotípica de isolados de *Borrelia* spp.** 2007. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Veterinária/UFRRJ, Rio de Janeiro, 2007.

MADUREIRA, R. C.; CORRÊA, F. N.; CUNHA, N. C.; GUEDES JUNIOR, D. S.; FONSECA, A. H. Ocorrência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 43-46, jan./abr. 2007.

MAGNARELLI, L. A. Current status of laboratory diagnosis for Lyme disease. **The American Journal of Medicine**, Tucson, v. 98, n. 4A, p. 10S-14S, Apr. 1995.

MAIWALD, M.; STOCKINGER, C.; HASSLER, D.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; SONNTAG, H. G. Evaluation of the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples by polymerase chain reaction. **Infection**, München, v. 23, n. 3, p. 173-179, May/June 1995.

MALONEY, E. L. Controversies in Persistent (Chronic) Lyme Disease. **Journal of Infusion Nursing**, Hagerstown, v. 39, n. 6, p. 369-375, Nov./Dec. 2016.

MANDELL, H.; STEERE, A. C.; REINHARDT, B. N.; YOSHINARI, N. H.; MUNSAT, T. L. Lack of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 320, n. 4, p. 255-256, Jan. 1989.

MANTOVANI, E. **Padronização do Western Blotting para *Borrelia burgdorferi* no líquido cefalorraquidiano de pacientes com Doença de Lyme-símile no Brasil.** 2004. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas/UniFMU, São Paulo, 2004.

MANTOVANI, E.; COSTA, I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a news tick borne disease or Lyme disease variation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 4, p. 443-456, Oct. 2007a.

MANTOVANI, E.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. Análise clínica e sorológica de pacientes com Síndrome Infecto-Reacional Lyme-Símile. **Revista Paulista de Reumatologia**, São Paulo, v. 6, p. 29, 2007b.

MANTOVANI, E. **Identificação do agente etiológico da Doença de Lyme-Símile Brasileira (Síndrome de Baggio-Yoshinari).** 2010. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/FMUSP, São Paulo, 2010.

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. Amplification of the flgE gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 3, p. 153-157, May/June 2012.

MARASPIN, V.; OGRINC, K.; RUZIC-SABLJIC, E.; LOTRIC-FURLAN, S.; STRLE, F. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of adult patients with borreliac lymphocytoma, Lyme neuroborreliosis, Lyme arthritis and acrodermatitis chronica atrophicans. **Infection**, München, v. 39, n. 1, p. 35-40, Feb. 2011.

MARQUES, A. Chronic Lyme Disease: a review. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 341-360, June 2008.

MARQUES, A. R. Laboratory Diagnosis of Lyme Disease: Advances and Challenges. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p.295-307, June 2015.

MEAD, P. S. Epidemiology of Lyme Disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p.187-210, June 2015.

MLADENOVIC, J.; CEKANAC, R.; STAJKOVIC, N.; KRSTIC, M. Risk of Lyme disease development after a tick bite. **Vojnosanit Pregl**, Beograd, v. 67, n. 5, p. 369-374, May 2010.

MOLINS, C. R.; DELOREY, M. J.; SEXTON, C.; SCHRIEFER, M. E. Lyme borreliosis serology: performance of several commonly used laboratory diagnostic tests and a large resource panel of well-characterized patient samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 11, p. 2726-34, Nov. 2016.

MONIUSZKO, A.; DUNAJ, J.; ZAJKOWSKA, J.; CZUPRYNA, P.; ŚWIERZBIŃSKA, R.; GUZIEJKO, K.; ALEKSIEJCZUK, P.; BARRY, G.; KONDRUSIK, M.; PANCEWICZ, S. Comparison of detection of *Borrelia burgdorferi* DNA and anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in patients with erythema migrans in north-eastern Poland. **Postępy Dermatologii i Alergologii**, Poznań, v. 32, n. 1, p. 11-14, Feb. 2015.

MONTANDON, C. E.; YOSHINARI, N. H.; MILAGRES, B. S.; MAZIOLI, R.; GOMES, G. G.; MOREIRA, H. N.; PADILHA, A. F.; WANDERLEY, G. G.; MANTOVANI, E.; GALVÃO, M. A. M.; LANGONI, H.; MAFRA, C. Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 287-290, Apr./June 2014.

MORA, P.; CARTA, A. Ocular manifestations of Lyme borreliosis in Europe. **International Journal of Medical Sciences**, Australia, v. 6, n. 3, p. 124-5, Mar. 2009.

NAKA, E. N.; COSTA, I. P.; ARÃO, C. A. B.; SOARES, C. O.; YOSHINARI, N. H. Pesquisa de anticorpos anti-Borrelia e anti-Babesia em soro de crianças com manifestações clínicas e epidemiologia compatíveis com a Doença de Lyme-Símile no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 74-85, mar./abr. 2008.

O'CONNELL, S. Lyme borreliosis. **Medicine**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 14-17, Jan. 2014.

OSCHMANN, P.; DORNDORF, W.; HORNIG, C.; SCHÄFER, C.; WELLENSIEK, H. J.; PFLUGHAUPT, K. W. Stages and syndromes of neuroborreliosis. **Journal of Neurology**, Basel, v. 245, n.5, p. 262-272, May 1998.

PACHNER, A. R.; DELANEY, E. The polymerase chain reaction in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. **Annals of Neurology**, Boston, v. 34, n. 4, p. 544-550, Oct. 1993.

PASSOS, S. D.; GAZETA, R. E.; LATORRE, M. R.; DURIGON, E. L.; GAUDITANO, G.; YOSHINARI, N. H. Características clínico-epidemiológicas da Doença Lyme-símile em crianças. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 2, p.139-144, 2009.

PETNICKI-OCWIEJA, T.; KERN, A. Mechanisms of *Borrelia burgdorferi* internalization and intracellular innate immune signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 175, Dec. 2014.

PERRONNE, C. Lyme and associated tick-borne diseases: global challenges in the context of a public health threat. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 74, June 2014.

PFISTER, H. W.; WILSKÉ, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **The Lancet**, London, v. 343, n. 8904, p. 1013-1016, Apr. 1994.

PÍCHA, D.; MORAVCOVÁ, L.; HOLECKOVÁ, D.; ZD'ÁRSKY, E.; VALESOVÁ, M.; MARESOVÁ, V.; HERCOGOVÁ, J.; VANOUSOVÁ, D. Examination of specific DNA by PCR in patients with different forms of Lyme borreliosis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 47, n. 10, p. 1004-1010, Oct. 2008.

PICKEN, R. N. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme Disease and North American Relapsing Fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1, p. 99-114, Jan. 1992.

PIRANA, S.; YOSHINARI, N. H.; SILVEIRA, A. M.; BENTO, R. F.; BONOLDI, V. L. N. Serum reactivity for *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* antigens in patients with peripheral facial paralysis in Brazil. **The Brazilian Journal of Rheumatology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 55-59, Mar./Apr. 2000.

PRIEM, S.; RITTIG, M. G.; KAMRADT, T.; BURMESTER, G. R.; KRAUSE, A. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme Borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 3, p. 685-690, Mar. 1997.

PRITT, B. S.; MEAD, P. S.; HOANG-JOHNSON, D. K.; NEITZEL, D. F.; RESPICIO-KINGRY, L. B.; DAVIS, J. P.; SCHIFFMAN, E.; SLOAN, L. M.; SCHRIEFER, M. E.; REPLOGLE, A. J.; PASKEWITZ, S. M.; RAY, J. A.; BJORK, J.; STEWARD, C. R.; DEEDON, A.; LEE, X.; KINGRY, L. C.; MILLER, T. K.; FEIST, M. A.; THEEL, E. S.; PATEL, R.; IRISH, C. L.; PETERSEN, J. M. Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 5, p. 556-564, May 2016.

PUIUS, Y. A.; KALISH, R. A. Lyme Arthritis: pathogenesis, clinical presentation, and management. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 289-300, June 2008.

RAHN, D. W.; MALAWISTA, S. E. Lyme Disease. **The Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 154, n. 6, p. 706-714, June 1991.

REZENDE, J.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MARTINS, O. P. Ocorrência de *Borrelia* spp. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 50-52, jan./mar. 2008.

REZENDE, J.; RANGEL, C. P.; CUNHA, N. C. FONSECA, A. H. Primary embryonic cells of *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma cajennense* ticks as a substrate for the development of *Borrelia burgdorferi* (strain G39/40). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 3, p. 577-582, Aug. 2012.

- REZENDE, J.; LOPES, F. A.; ALVES, F. C. G.; BRUNO, A. R.; MORENO, S. E.; COSTA, I. P.; FONSECA, A. H.; CORDEIRO, M. D.; OLIVEIRA, C. E. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mato Grosso Do Sul, Brazil. **JSM Tropical Medicine and Research**, Henderson, v. 1, n. 1, p. 1003-4, Aug. 2016.
- RODRIGUES, B. D.; MEIRELES, V. M. B.; BRAZ, M. N. Borreliose de Lyme Símile – Relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 21, n. 3, p. 63-67, jul./set. 2007.
- ROSA, P. A.; SCHWAN, T. G. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 160, n. 6, p. 1018-1029, Dec. 1989.
- ROSA-NETO, N. S.; GAUDITANO, G.; YOSHINARI, N. H. Meningoencefalite linfomonocitária crônica, oligoartrite e eritema nodoso: relato de síndrome de Baggio-Yoshinari de longa e recorrente evolução. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 148-151, mar./abr. 2014.
- ROWE, P. **Essential statistics for the pharmaceutical sciences**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 2007.
- RUDENKO, N.; GOLOVCHENKOA, M.; GRUBHOFFERA, L.; OLIVER JR, J. H. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 123-128, Sept. 2011.
- SAL, M. S.; LI, C.; MOTALAB, M. A.; SHIBATA, S.; AIZAWA, S. I.; CHARON, N. W. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook basal body structure. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 6, p. 1912-1921, Mar. 2008.
- SALGADO, F. P.; HONER, M. R.; ISHIKAWA, M. M.; MADUREIRA, R. C.; SOARES, C. L.; RIGO, L.; FONSECA, A. H. Detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em cães procedentes do centro de controle de zoonoses de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 97-101, abr./jun. 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 1. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAMUELS, D. D.; RADOLF, J. D. **Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis**. 1. ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2010.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, Dec. 1977.

SANTINO, I.; BERLUTTI, F.; PANTANELLA, F.; SESSA, R.; DEL PIANO, M. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA by PCR in serum of patients with clinical symptoms of Lyme borreliosis. **Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Letters**, Wrexham, v. 283, n. 1, p. 30-35, June 2008.

SANTOS, M.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; LOBO, R.; TALHARI, S. Antibody reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto antigens in patients from the Brazilian Amazon region with skin diseases not related to Lyme disease. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 552-556, May 2010a.

SANTOS, M.; HADDAD-JUNIOR, V.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, S. Borreliose de Lyme. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 930-938, nov./dez. 2010b.

SANTOS, M.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, C.; FERREIRA, L. C. L.; ZELGER, B.; TALHARI, S. Presence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients with morphea from the Amazonic region in Brazil. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v. 50, n. 11, p. 1373-1378, Nov. 2011.

SARAIVA, M. D.; SANTOMAURO-JUNIOR, A. C.; SIMIS, N. P. B.; DEGENSZAJN, J.; KIM, E. I. M. Síndrome de Baggio-Yoshinari: relato de caso. **Autopsy and Case Reports**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 63-67, 2011.

SATO, M. T.; SCHMITT, A.; GREBOGE, P.; ARANA, J.; MOREIRA, A. T. R.; YOSHINARI, N. H. Neurorretinite associada à ceratite intersticial: relato do primeiro caso de doença de Lyme no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 62, p. 275-83, 2003.

SCHMIDT, B. L.; ABERER, E.; STOCKENHUBER, C.; WAGNER, C.; KLADÉ, H.; BREIER, F.; LUGER, A. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in the urine from patients with Lyme borreliosis. **Journal of Spirochetal and Tick-borne Diseases**. Thorofare, v. 2, n. 4, p. 76-81, Nov. 1995.

SCHMIDT, B. L.; MUELLEGGER, R. R.; STOCKENHUBER, C.; PETER SOYER, H.; HOEDL, S.; LUGER, A.; KERL, H. Detection of *Borrelia burgdorferi*-Specific DNA in urine specimens from patients with erythema migrans before and after antibiotic therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 1359-1363, June 1996.

SCHMIDT, B. L. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 1, p. 185-201, Jan. 1997.

SCHUTZER, S. E.; COYLE, P. K.; BELMAN, A. L.; GOLIGHTLY, M. G.; DRULLE, J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. **The Lancet**, London, v. 335, n. 8685, p. 312-315, Feb. 1990.

SHAPIRO, E. D. Lyme Disease. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 370, n. 18, p. 1724-1731, May 2014.

SHINJO, S. K.; GAUDITANO, G.; MARCHIORI, P. E.; BONOLDI, V. L. N.; COSTA, I. P.; MANTOVANI, E.; YOSHINARI, N. H. Manifestação neurológica na Síndrome de Baggio-Yoshinari (Síndrome brasileira semelhante à doença de Lyme). **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 492-505, set./out. 2009.

SHOTT, S. **Statistics for health professionals**. London: W.B. Saunders Company, 1990.

SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 21, n.3, p. 111-114, 1999.

SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 1-19, jan./mar. 2000.

SPACH, D. H.; LILES, W. C.; CAMPBELL, G. L.; QUICK, R. E.; ANDERSON JR, D. E.; FRITSCH, T. R. Tick-borne diseases in the United States. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 329, n. 13, p. 936-947, Sept. 1993.

SPOLIDORIO, M. G. **Perfil sorológico e molecular de zoonoses transmitidas por carrapatos em humanos e animais oriundos de seis municípios do estado do Espírito Santo**. 2009. 74 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/FMUSP, São Paulo, 2009.

STANEK, G.; STRLE, F. Lyme Disease: European Perspective. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 327-339, June 2008.

STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; SNYDMAN, D. R.; SHOPE, R. E.; ANDIMAN, W. A.; ROSS, M. R.; STEELE, F. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 20, n. 1, p. 7-17, Jan./Feb. 1977.

STEERE, A. C.; BATSFORD, W. P.; WEINBERG, M.; ALEXANDRE, J.; BERGER, H. J.; WOLFSON, S.; MALAWISTA, S. E. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme Disease. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 93, n. 1, p. 8-16, July 1980.

STEERE, A. C.; GROSS, D.; MEYER, A. L.; HUBER, B. T. Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 16, n. 3, p. 263-268, May 2001.

STEERE, A. C. Lyme Disease. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 345, n. 2, p. 115-125, July 2001.

STEERE, A. C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 113, n. 8, p. 1093-1101, Apr. 2004.

STEERE, A. C. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. **Wiener klinische Wochenschrift**, Wien, v. 118, n. 21-22, p. 625-633, Nov. 2006.

STRLE, F.; NADELMAN, R. B.; CIMPERMAN, J.; NOWAKOWSKI, J.; PICKEN, R. N.; SCHWARTZ, I.; MARASPIN, V.; AGUERO-ROSENFELD, M. E.; VARDE, S.; LOTRIC-FURLAN, S.; WORMSER, G. P. Comparison of culture confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, n. 130, v. 1, p. 32-36, Jan. 1999.

TALHARI, S.; SCHETTINI, A. P. M.; PARREIRA, V. J.; CRUZ, R. G.; MELO, I. S.; TALHARI, A. C. Eritema crônico migrans / Doença de Lyme - Estudo de três casos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DERMATOLOGIA, 43., 1987, Goiânia. **Anais do Congresso Brasileiro de Dermatologia [resumo]** Goiânia: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 1987.

TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; FERREIRA, L. C. L. Eritema cronicum migrans, eritema crônico migratório, doença de Lyme ou Borreliose de Lyme. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 5, p. 205-209, set. 1992.

TALHARI, S.; SANTOS, M. N. S.; TALHARI, C.; FERREIRA, L. C. L.; SILVA, R. M. JR.; ZELGER, B.; MASSONE, C.; RIBEIRO-RODRIGUES, R. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Brazil: occurrence confirmed by immunohistochemistry and focus floating microscopy. **Acta Tropica**. Atlanta, v. 115, n. 3, p. 200-204, Sept. 2010.

TILLY, K.; ROSA, P. A.; STEWART, P. E. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 217-234, June 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, S.; CHMIELEWSKI, T. Limitation of serological testing for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and western blot in comparison with PCR and culture methods. **Wiener Klinische Wochenschrift**, Wien, v. 114, n. 13-14, p. 601-605, July 2002.

VON STEDINGK, L. V.; OLSSON, I.; HANSON, H. S.; ASBRINK, E.; HOVMARK, A. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 14, n. 1, p. 1-5, Jan. 1995.

WOODMAN, M. E.; COOLEY, A. E.; STEVENSON B. Production of outer surface protein A by *Borrelia burgdorferi* during transmission from infected mammals to feeding ticks is insufficient to trigger OspA seroconversion. **Federation of European Microbiological Societies**, New York, v. 54, n. 2, p. 277-82, Nov. 2008.

WORMSER, G. P.; DATTWYLER, R. D.; SHAPIRO, E. S.; HALPERIN, J. J.; STEERE, A. C.; KLEMPNER, M. S.; KRAUSE, P. J.; BAKKEN, J. S.; STRLE, F.; STANEK, G.; BOCKENSTEDT, L.; FISH, D.; DUMLER, J. S.; NADELMAN, R. B. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, n. 9, p. 1089-134, Nov. 2006.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; COSSERMELLI, W. Revisão da borreliose de Lyme. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v. 35, p. 34-38, 1989.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; OYAFUSO, L. K.; MENDONÇA, M.; BAGGIO, D. Clínica e sorologia da doença de Lyme no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 32, supl., p. 57, 1992.

YOSHINARI, N. H.; OYAFOSO, L. K.; MONTEIRO, F. G. V.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; FERREIRA, L. G. E.; BONASSE, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 170-174, 1993a.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. M. C.; MENDONÇA, M.; OYAFUSO, L. K.; LEVY, L.; COSSERMELLI, W. Lyme disease in Brazil: report of five cases. **Revista Española de Reumatología**, Madrid, v. 20, n. 6, 1993b.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; COSSERMELLI, W. Borreliose de Lyme. Zoonose emergente de interesse multidisciplinar. **Newslab**, São Paulo, n. 12, p. 90-104, 1995.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; PIRANA, S. Outline of Lyme borreliosis in Brazil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 52, p. 111-117, Mar./Apr. 1997.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; GAUDITANO, G.; FONSECA, A. H. Report of 57 cases of Lyme-like disease (LLD) in Brazil. **Arthritis & Rheumatism**, New York, v. 43, s. 9, p. S188, Dec. 1999a.

YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Doença de Lyme-símile no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 57-58, 1999b.

YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L. N.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of Babesiosis and Lyme Borreliosis in patients from Cotia Country, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 311-318, Apr. 2003.

YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E. Síndrome Infecto-Reacional Lyme-Símile. **Atualidades Sociedade Brasileira de Parasitologia**, Goiânia, 2006.

YOSHINARI, N. H.; SPOLIDORIO, M.; BONOLDI, V. L. N.; SOTTO, M. Lyme disease like syndrome associated lymphocytoma: first case report in Brazil. **Clinics**, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 525-6, Aug. 2007.

YOSHINARI, N. H.; VASCONCELOS, A. S.; TIRIBA, A. C.; GAUDITANO, G.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N. Report n the unusual presence of latent microorganisms in animals: a risk to research and health of employees? **The Brazilian Journal of Rheumatology**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 517-528, Sept./Oct. 2009.

YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G. Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 363-369, 2010.

YPARRAGUIRRE, L. A.; MACHADO-FERREIRA, E.; ULLMANN, A. J.; PIESMAN, J.; ZEIDNER, N. S.; SOARES, C. A. A hard tick relapsing fever group spirochete in a Brazilian *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New Rochelle, v. 7, n. 4, p. 717-721, 2007.

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa:

#### **DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA SÍNDROME DE BAGGIO-YOSHINARI EM MATO GROSSO DO SUL.**

Para que seja completamente informado sobre a natureza, os objetivos e os procedimentos que serão realizados durante a pesquisa, apresentamos para seu conhecimento este termo de consentimento de acordo com a Resolução CNS 466/2012. Por favor, faça quaisquer perguntas e tire as dúvidas que tiver antes de concordar em participar deste estudo.

**A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:** A Doença de Lyme é transmitida pela picada de carrapato e se apresenta com sintomas bastante variados. O motivo que nos leva a estudar o problema da Doença de Lyme é a dificuldade em se estabelecer um diagnóstico adequado em tempo hábil para o tratamento. O diagnóstico laboratorial é feito através de exames de sangue. Embora a Doença de Lyme seja raramente fatal, é de grande morbidade quando não adequadamente diagnosticada e tratada, devido às recorrências e complicações clínicas progressivas. O objetivo desse projeto é realizar o diagnóstico sorológico e a caracterização por biologia molecular do agente etiológico da Doença de Lyme. Após a avaliação clínica, o médico solicitará o exame para a pesquisa da Doença de Lyme. Inicialmente participarão da pesquisa 50 voluntários, de ambos os sexos e na faixa etária acima de 18 anos, com suspeita clínica que preencha os critérios diagnósticos estabelecidos. De posse do pedido médico será coletada uma amostra de 10 mL de sangue. Se necessário, ao longo do tratamento, poderão ser realizadas outras coletas para acompanhamento dos títulos sorológicos como controle de tratamento.

**DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS:** Como em qualquer exame de sangue, pode haver um pouco de dor no momento da picada da agulha ou ainda o risco mínimo de formação de um pequeno hematoma no local da coleta. Ao aceitar participar do projeto, você terá como benefício o auxílio na confirmação ou exclusão

diagnóstica, assim como o acompanhamento da evolução da doença e do tratamento.

**FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSINTÊNCIA:** O acompanhamento após a confirmação ou exclusão diagnóstica será realizado pelo profissional médico que solicitou o exame, iniciando o tratamento ou dando sequência com outros procedimentos para estabelecer o diagnóstico diferencial.

**GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Está livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Sua identidade será tratada com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames de sangue estarão disponíveis a você e ao médico responsável e permanecerão confidenciais. O nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação científica que resultante deste estudo.

**CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:** A participação no estudo não acarretará custos para você. Também não há nenhuma compensação financeira adicional relacionada a sua participação.

**COMPROMISSO DO PESQUISADOR:** Utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa. O professor orientador Dr. Izaías Pereira da Costa certifica que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

**GARANTIA DE ACESSO:** Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador responsável Fernando Aguiar Lopes poderá ser localizado no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian no telefone (67) 3345-3165 (fernando.lopes@ufms.br). Se tiver alguma consideração ou dúvida ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética

em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, telefone 3345-7187.

### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu, \_\_\_\_\_, após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidade ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Concordo que o material coletado seja guardado para estudo parecido futuro, mediante meu novo consentimento. Se não for possível me encontrar, concordo se o pesquisador garantir que vai guardar segredo sobre de quem vem o material. Diante do exposto expresse minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo e recebo uma cópia deste termo de consentimento.

Campo Grande-MS, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável pela Pesquisa: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

### PROTOCOLO PARA DOENÇA DE LYME-SÍMILE BRASILEIRA SÍNDROME DE BAGGIO YOSHINARI

N.º \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Município/UF: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Nome do médico responsável: \_\_\_\_\_

#### **Epidemiologia:**

Local possível do contágio: Área urbana ( ) Área rural ( )

Picada por carrapatos: ( S ) ( N )

Presença de carrapatos na localidade: ( S ) ( N )

Frequentou áreas com carrapatos: ( S ) ( N )

Mata: ( S ) ( N )

Animais silvestres: ( S ) ( N )

Animais domésticos: ( S ) ( N )

- Cachorro ( S ) ( N )

- Cavalo ( S ) ( N )

- Bovino ( S ) ( N )

Outros \_\_\_\_\_ ( S ) ( N )

Animais infectados por carrapatos: ( S ) ( N )

Animal doente: ( S ) ( N )

Morte recente de animais: ( S ) ( N )

Casos humanos semelhantes na ( S ) ( N )

localidade:

#### **Dados Clínicos do Paciente:**

Intervalo presumível entre contato e doença: \_\_\_\_\_ anos/ meses/dias.

Estágio Primário (<3m) ( ) Estágio Secundário ou Recorrente (> 3m) ( ).

Sintomas Atuais: Febre ( ), Mialgia ( ), Artralgia ( ), Fadiga ( ), Cefaléia ( ),

Gânglios( )

**Lesão de pele:** ( S ) ( N ), Expansiva ( S ) ( N ), >5cm ( S ) ( N ),  
 Lesões múltiplas ( S ) ( N ). Borda Eritematosa ( S ) ( N ). Duração: \_\_\_\_\_ dias.  
 Outras lesões: morbiliforme (   ), petéquias ou púrpuras (   ), escleroderma-like (   ),  
 linfocitoma (   ), eritema nodoso (   ), \_\_\_\_\_

**Neurológico:** Meningite ( S ) ( N ), Neurite craniana ( S ) ( N )

Qual queixa? \_\_\_\_\_

Neurite periférica ( S ) ( N ) Qual queixa? \_\_\_\_\_

Queixa psiquiátrica ( S ) ( N ) Qual sintoma? \_\_\_\_\_

Queixas cognitivas ( S ) ( N ), Fadiga crônica ( S ) ( N )

**Articular:**

Artralgia ( S ) ( N ), Artrite ( S ) ( N ) Local: \_\_\_\_\_

Miopatia ( S ) ( N )

**Cardíaco:**

Cardiomegalia ( S ) ( N ), ICC ( S ) ( N ), Arritmia ( S ) ( N )

Qual? \_\_\_\_\_

**Laboratório:** Anemia (   ), Leucopenia (   ), Plaquetopenia (   )

↑ Transaminases (   ), ↑ Bilirrubinas (   ), Uréia: \_\_\_\_\_, Creatinina: \_\_\_\_\_

FAN positivo (   ), Látex positivo (   ), VHS \_\_\_\_\_, PCR positivo (   ),

Hematúria (   ), Leucocitúria (   ), Proteinúria (   )

Líquor:

Celularidade: \_\_\_\_\_leucócitos/mm<sup>3</sup> Linfo-mono? ( S ) ( N ), Proteína: \_\_\_\_\_mg/dl

Outros dados laboratoriais: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

**HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS E JUSTIFICATIVA DO(S) EXAME(S):**

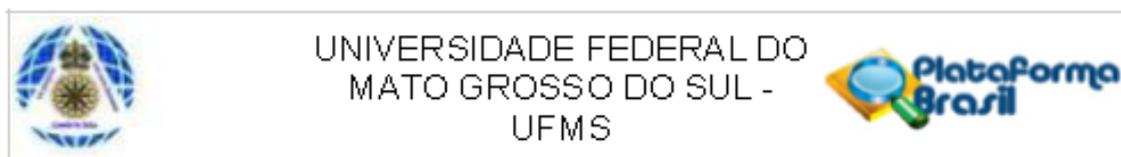
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO A



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR DO AGENTE ETIOLÓGICO DA SÍNDROME DE BAGGIO-YOSHINARI (DOENÇA DE LYME-SÍMILE BRASILEIRA)

Pesquisador: FERNANDO AGUILAR LOPES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42325815.1.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.065.681

Data da Relatoria: 15/05/2015

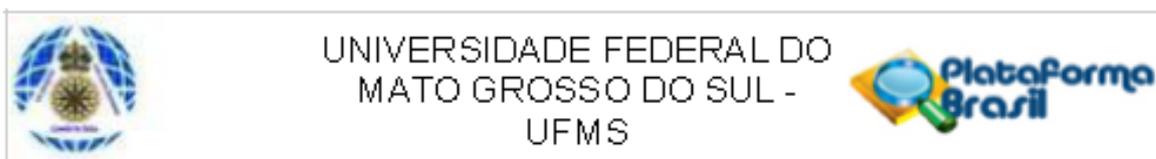
#### Apresentação do Projeto:

A Doença de Lyme (DL) é uma zoonose emergente de caráter multisistêmico, causada por espiroquetas do grupo *Borrelia burgdorferi* sensu lato e transmitida por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*. Evolui em estágios e o diagnóstico baseia-se na presença dos sintomas clínicos, história epidemiológica compatível e sorologia positiva para *B. burgdorferi*. No Brasil, a DL ainda é pouco conhecida e diagnosticada. Apresenta algumas características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais diferentes que permitem caracterizar uma Doença de Lyme-Símile Brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY). A descrição do agente etiológico da SBY é recente e, devido às particularidades do agente etiológico identificado, *B. burgdorferi* na apresentação morfológica atípica, diferente das conhecidas em outros continentes, a Doença de Lyme-Símile Brasileira ou SBY é uma zoonose emergente e de descrição restrita ao território brasileiro. O objetivo principal do estudo será realizar o diagnóstico sorológico e a caracterização por biologia molecular do agente etiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari (Doença de Lyme-Símile Brasileira). A Doença de Lyme raramente é fatal, porém de grande morbidade quando não adequadamente diagnosticada e tratada, devido às recorrências e complicações clínicas progressivas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Pólo Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 1549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: biblioteca@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.065.631

Realizar o diagnóstico sorológico e a caracterização por biologia molecular do agente etiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari (Doença de Lyme símile Brasileira).

Objetivo Secundário:

Para a consecução do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) padronizar a técnica de ELISA para diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari no Laboratório de Imunologia Clínica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS);
- b) padronizar a técnica de Western Blotting para o diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari no Laboratório de Imunologia Clínica do CCBS;
- c) padronizar a técnica de PCR para o diagnóstico da Síndrome de Baggio-Yoshinari no Laboratório de Imunologia Clínica do CCBS;
- d) avaliar a prevalência da Síndrome de Baggio-Yoshinari em amostras de soro estocadas de habitantes de quatro comunidades pantaneiras;
- e) realizar triagem sorológica em pacientes com suspeita clínica da Síndrome de Baggio-Yoshinari e identificar recidivas em pacientes com diagnóstico já confirmado, atendidos no Ambulatório de Reumatologia;
- f) identificar o agente etiológico pela técnica de PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como em qualquer exame de sangue, pode haver um pouco de dor no momento da picada da agulha ou ainda o risco mínimo de formação de um pequeno hematoma no local da coleta.

Benefícios:

Ao aceitar participar do projeto, terá como benefício o auxílio na confirmação ou exclusão diagnóstica, assim como o acompanhamento sorológico e molecular da evolução da doença e do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, de caráter epidemiológico, infeccioso e terapêutico, com possibilidade de melhoria do diagnóstico por técnica de maior confiabilidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto referendada pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste/UFMS.

Termo de uso de informações de prontuário em projeto de pesquisa.

Declaração de uso de material biológico e dados coletados.

Endereço: P.O. Retortada Pesquisa e Pós-Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: biotica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 1.095.681

Ofício de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFMS do projeto vinculado à chamada FUNDECT/MS/CNPq/SES N° 07/2009.

Carta de autorização do responsável pelo projeto vinculado à chamada FUNDECT/MS/CNPq/SES N°07/2009, de uso de parte dos recursos disponíveis.

Carta de anuência da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS para o desenvolvimento da pesquisa.

TCLE e cronograma adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPO GRANDE, 15 de Maio de 2015

Assinado por:

PAULO ROBERTO HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS  
(Coordenador)

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 1549

CEP: 79.070-110

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: [bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)

**ANEXO B**

*Nº 45, segunda-feira, 20 de julho de 2015*

**Resolução nº 59, de 17 de Julho de 2015.**

O Presidente do Colegiado Executivo do HUMAP-UFMS, filial da Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares – **EBSEERH**, no uso de suas atribuições legais e regimentais, considerando a Lei nº 12550, de 15 de dezembro de 2011, art. 6º, o Regimento Interno da EBSEERH, artigos 46 e 47, conforme reunião do Colegiado Executivo realizada em 14 de Julho de 2015.

Considerando a CI nº 106/2015 da Gerência de Ensino e Pesquisa de 16 de Julho de 2015.

**RESOLVE:**

Aprovar o Projeto de pesquisa: Diagnóstico Sorológico e Caracterização por Biologia Molecular do Agente Etiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari (doença de Lyme-Símile Brasileira).

- 1) O presente projeto tem como pesquisador: **Fernando Aguilar Lopes.**
- 2) Orientador: **Prof. Dr. Izaías Pereira da Costa.**
- 3) Prazo de Execução: Julho de 2015 a Dezembro de 2016.

CLÁUDIO WANDERLEY LUZ SAAB.  
**Presidente do Colegiado Executivo HUMAP-UFMS.**

## ANEXO C

**XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA – SBP**  
**XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA – FLAP**  
**27 a 31 de outubro de 2015**  
**Salvador, Bahia, Brasil**

## CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

Caracterização molecular do gene *flgE* de *Borrelia* spp

Autores:

REZENDE, J.; OLIVEIRA, C. E.; ALVES, F. C. G.; MORENO, S. E.; LOPES, F. A.; COSTA, I. P.; CORDEIRO, M. D.; FONSECA, A. H.



## ANEXO D

## XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REUMATOLOGIA

24 a 27 de agosto de 2016

Brasília, Brasil

## CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

S27 – Linfocitoma cútis associado à Borreliose: um dilema diagnóstico

Autores:

COSTA, I. P.; LOPES, F. A.; REZENDE, J.



## ANEXO E

## Case Report

# Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Mato Grosso Do Sul, Brazil

Jania de Rezende<sup>1\*</sup>, Fernando Aguilar Lopes<sup>2,3</sup>, Fernanda de Cássia Gonçalves Alves<sup>4</sup>, Alexandre Rondon Bruno<sup>4</sup>, Susana Elisa Moreno<sup>1</sup>, Izaias Pereira da Costa<sup>2,3</sup>, Adivaldo Henrique Fonseca<sup>5</sup>, Matheus Dias Cordeiro<sup>5</sup>, and Carina Elisei de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Dom Bosco Catholic University, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisas Microbiológicas, Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>3</sup>Maria Aparecida Pedrossian University Hospital, Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil <sup>4</sup>Institutional Program for Scientific Initiation Scholarships, Dom Bosco Catholic University, Brazil <sup>5</sup>Instituto de Veterinária, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract**

In this study, *Borrelia burgdorferi* sensu lato was molecularly detected in a human being and in *Rhipicephalus microplus* ticks of cattle from the same farm in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil.

**\*Corresponding author**

Jania de Rezende, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Avenida Tamandaré, 6000 Jardim Seminário, Campo Grande - MS, CEP 79117-900, Brasil, Tel: 55 67 3312-3300; E-mail: rezendejaniam@gmail.com

**Submitted:** 24 May 2016

**Accepted:** 01 August 2016

**Published:** 03 August 2016

**Copyright**

© 2016 de Rezende et al.

**OPEN ACCESS****Keywords**

- *Borrelia burgdorferi*
- Lyme disease
- FlgE

## ANEXO F

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	BJR_2016_25
<b>Title</b>	Evidência molecular de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato em pacientes no centro-oeste brasileiro
<b>Short title</b>	Evidência molecular de <i>B. burgdorferi</i> em humanos
<b>Article type</b>	Short Communication

**Abstract**

Este estudo promoveu a detecção de DNA de *Borrelia burgdorferi* sensu lato em amostras de sangue e soro de pacientes com manifestações clínicas e epidemiologia compatíveis com a Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari. Para tanto, foi realizada triagem sorológica pelos métodos de ELISA e Western blotting e a identificação molecular de *B. burgdorferi* por meio da amplificação de um fragmento do gene conservado que sintetiza o gancho flagelar (flgE). Os resultados demonstraram sorologia positiva e, pela primeira vez, a presença de DNA de *Borrelia burgdorferi* sensu lato em humanos na região Centro-Oeste do Brasil. A análise genética das sequências dos isolados mostrou similaridade às sequências disponíveis no GenBank. Pela análise filogenética inferida pela sequência parcial do gene flgE, a cepa brasileira agrupou-se com a sequência de *B. burgdorferi* sensu lato. Este estudo abre perspectivas promissoras e reforça a necessidade de estudos adicionais a fim de determinar as características epidemiológicas da doença, bem como o impacto da prevalência da borreliose brasileira no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

<b>Keywords</b>	<i>Borrelia burgdorferi</i> ; Doença de Lyme; flgE; Síndrome de Baggio-Yoshinari; Brasil
<b>Taxonomy</b>	Rheumatology, Infectious Disease, Diagnostics, Molecular Biology
<b>Corresponding Author</b>	Fernando Aguilar Lopes
<b>Corresponding Author's Institution</b>	HUMAP/UFMS
<b>Order of Authors</b>	Fernando Aguilar Lopes, Jania Rezende, Danielly Silva, Fernanda Alves, Carina Oliveira, Izaías Costa
<b>Suggested reviewers</b>	Natalino Hajime Yoshinari, Sandra Lucia Eusébio Ribeiro

## Submission Files Included in this PDF

**File Name [File Type]**

COVER LETTER.docx [Cover Letter]

AUTHOR AGREEMENT.pdf [Author Agreement]

MANUSCRIPT.docx [Manuscript File]

FIGURE 1.docx [Figure]

FIGURE 1.tif [Figure]

FIGURE 2.docx [Figure]

TABLE 1.docx [Table]

TITLE PAGE.docx [Title Page (with Author Details)]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

## ANEXO G

<b>BRASIL</b>	<b>Acesso à informação</b>	<b>Participe</b>	<b>Serviços</b>	<b>Legislação</b>	<b>Canais</b>
---------------	----------------------------	------------------	-----------------	-------------------	---------------

Instituto Nacional da  
**Propriedade Industrial**  
 Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

**Consulta à Base de Dados do INPI**

[\[ Início | Ajuda? \]](#)

---

**RESULTADO DA PESQUISA** (05/12/2016 às 14:46:09)

**Pesquisa por:**  
 Nº Pedido: 'BR 10 2016 021522 6' \

**AVISO:** Nº Pedido: 'BR 10 2016 021522 6' \ consta em nosso banco de dados. Por favor, acesse regularmente a Revista da Propriedade Industrial (RPI), a fim de acompanhar as publicações relativas ao pedido em questão.

O INPI disponibiliza ferramenta acessória de acompanhamento de processos. Caso deseje acompanhar publicações relativas a este pedido, a partir de hoje, siga os seguintes passos:

- 1º Retorne à página inicial da ferramenta de busca;
- 2º Entre com seu login e senha;
- 3º Busque novamente pelo processo; e
- 4º Clique em Meus pedidos.

O login e a senha são os mesmos utilizados para emitir Guias de Recolhimento da União. Mantenha o seu e-mail atualizado no cadastro do INPI

Dados atualizados até **29/11/2016** - Nº da Revista: **2395**

Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910 | Rua São Bento, 1 - Centro - RJ - CEP: 20090-010

