

CARLOS EMMANUEL MONTANDON

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DA *Borrelia burgdorferi*
sensu lato, EM ÁREAS ENDÊMICAS PARA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA
NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO DOCE, ESTADO DE MINAS GERAIS,
BRASIL**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M764i
2012

Montandon, Carlos Emmanuel, 1984-

Investigação molecular e sorológica da *Borrelia burgdorferi* *sensu lato*, em áreas endêmicas para Febre Maculosa Brasileira na bacia hidrográfica do Rio Doce Estado de Minas Gerais, Brasil / Carlos Emmanuel Montandon. – Viçosa, MG, 2012.

x, 45f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 37-45

1. *Borrelia burgdorferi*. 2. Carrapato como transmissor de doença. 3. Epidemiologia molecular. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.429

CARLOS EMMANUEL MONTANDON

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DA *Borrelia burgdorferi*
sensu lato, EM ÁREAS ENDÊMICAS PARA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA
NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO DOCE, ESTADO DE MINAS GERAIS,
BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2012.

Leandro Licursi de Oliveira

Paulo Sérgio Gonçalves da Costa

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho:
à minha mãe, Lázara;
à minha avó, Francisca e;
à minha companheira Elaine.*

AGRADECIMENTOS

Foram muitos, os que me ajudaram a concluir este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos...

...a Deus, por tudo;

...à minha família, pela confiança e pelo apoio;

...aos meus amigos da República Piôka, em especial ao Pedro Meloni, Pedro III, João Gabriel Neves, Arthur Sirot e Augusto Lorenzato, pela força e pela amizade;

...a todos meus amigos do Laboratório de Epidemiologia e Parasitologia Molecular, em especial ao Rafael, ao Gabriel, ao Bruno, à Natasha e ao Higo, pelas conversas e pelo auxílio;

...ao Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari pela orientação nas realizações das análises sorológicas de Borrelia e por ceder seu laboratório para realização destas e à Dra. Elenice Mantovani pela ajuda na concretização da sorologia;

...ao Prof. Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira, por aceitar a orientação deste estudo e conduzir seu desenvolvimento, com muita sabedoria e paciência e também pelas conversas e ensinamentos e;

...à Universidade Federal de Viçosa, à FAPEMIG e ao CNPq, pelo suporte para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O GÊNERO <i>Borrelia</i>	3
2.2. A DOENÇA DE <i>LYME</i> E A DOENÇA DE <i>LYME-SÍMILE</i> BRASILEIRA	6
2.2.1 Histórico	6
2.2.2. Sintomatologia.....	8
2.2.3. Diagnóstico	9
2.2.4. Transmissão	11
2.2.5. Reservatórios	13
2.3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	13
2.3.1. Santa Cruz do Escalvado	15
2.3.2. Pingo D'Água	16
2.3.3. Caratinga.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. CAPTURA DE ANIMAIS E OBTENÇÃO DO SORO	19
4.1.1. Animais Silvestres	19

4.1.2. Animais Domésticos.....	20
4.2. COLETA DOS VETORES, IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E CONDICIONAMENTO DOS ECTOPARASITAS	21
4.3. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Borrelia burgdorferi</i>	22
4.4. PESQUISA DE DNA DE <i>Borrelia burgdorferi</i>	23
4.4.1. Extração de DNA	23
4.4.2. <i>Nested-PCR</i>	24
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS	26
5.1. ANIMAIS E ECTOPARASITAS CAPTURADOS	26
5.2. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA	27
5.3. AVALIAÇÃO MOLECULAR.....	28
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	36
8. BIBLIOGRAFIA	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> (FONTE: www.microbelibrary.org)	4
Figura 2: Eritema Migratório (FONTE: CDC)	8
Figura 3: a (<i>Ixodes ricinus</i> ; FONTE: Naturfotografie), b (<i>Amblyomma cajennense</i> ; FONTE: B. Thomas Photo Research)	13
Figura 4: Bacia Hidrográfica do Rio Doce com os municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga indicados em amarelo (FONTE: Singe)	14
Figura 5: Município de Santa Cruz do Escalvado, vista da Sede do Município e da Usina Hidroelétrica Risoleta Neves (FONTE: Google Earth)	15
Figura 6: Município de Pingo D'Água, vista da Sede do Município e do Parque Estadual do Rio Doce (FONTE: Google Earth)	16
Figura 7: Município de Caratinga (FONTE: Google Earth).....	17
Figura 8: a (Armadilha tipo <i>live trap</i> 20x20x40 cm), b (Armadilha tipo <i>live trap</i> de 10x10x22cm), c (Coleta de carrapatos do corpo dos animais), d (Punção cardíaca) .	20
Figura 9: a (Coleta de sangue através da venocentese da cefálica em cães) (Figura 9a), b (Coleta de sangue através da jugular em equinos).....	21
Figura 10: Gél de agarose, onde são indicados o peso molecular de 100 pares de base, o controle positivo (C+), o controle negativo (C-) e 18 amostras de DNA de ectoparasitas trabalhados com resultado negativo	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ectoparasitas capturados nos municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga, Estado de Minas Gerais, Brasil	27
Tabela 2: Títulos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> das amostras dos animais capturados nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, Brasil	28
Tabela 3: Amostras de soros positivas em relação Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, Brasil	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Relação dos animais capturados em Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, Brasil	26
--	----

RESUMO

MONTANDON, Carlos Emmanuel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2012. **Investigação molecular e sorológica da *Borrelia burgdorferi sensu lato*, em áreas endêmicas para Febre Maculosa Brasileira na bacia hidrográfica do Rio Doce, Estado de Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientadores: Bruno Silva Milagres e Natalino Hajime Yoshinari.

As borrelioses caracterizam-se como sendo uma desordem infecciosa multi-sistêmica, provocadas pela infecção com espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato*. A mais conhecida destas enfermidades, a Doença de Lyme, é transmitida pela picada de carrapatos ixodídeos, acometendo seres humanos e animais domésticos, tendo como reservatórios naturais os animais silvestres, sendo considerada uma zoonose de ampla distribuição geográfica. O objetivo do presente foi avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em animais silvestres (gambás e roedores), domésticos (cães e equinos) e ectoparasitas (carrapatos e pulgas), visando aprofundar o conhecimento quanto a esta enfermidade no Estado de Minas Gerais, Brasil, para suporte ao desenho de estratégias para vigilância epidemiológica. Foram selecionados três municípios do Estado de Minas Gerais, Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga. Estes municípios, pertencentes à Bacia Hidrográfica do Rio Doce, abrigam áreas endêmicas bem conhecidas para zoonoses transmitidas por carrapatos, caracterizando-se por intensa pressão antrópica. As amostras de soro coletadas foram triadas para pesquisa de anticorpos anti-*B. burgdorferi* por ELISA. Das 370 amostras de soro de animais silvestres e domésticos coletadas nas duas localidades, 31 reconheceram antígenos da *B. burgdorferi*, sendo 23 destas oriundas de Santa Cruz do Escalvado e oito de Pingo D'Água. Das 3.821 amostras de DNA de ectoparasitas analisadas provenientes dos municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga, nenhuma foi positiva para *B. burgdorferi*. Nas amostras de soros analisadas, a frequência de anticorpos anti-*B. burgdorferi* encontrada recomenda a implantação de um programa de vigilância epidemiológica específico e permanente nos municípios estudados, bem como em seu entorno. Estas recomendações também podem ser consideradas para outras localidades com situações epidemiológicas similares.

ABSTRACT

MONTANDON, Carlos Emmanuel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Molecular and Serological Investigation of the *Borrelia burgdorferi sensu lato*, in areas endemic for Brazilian spotted fever in the Doce River Basin, Minas Gerais State, Brazil.** Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Advisers: Bruno Silva Milagres and Natalino Hajime Yoshinari.

Borrelioses are characterized as a multi systemic infectious disorders resulted from infection by spirochetes from the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex. The best known of these diseases, Lyme disease, is transmitted by the bite of ixodid ticks and affects humans and domestic animals, having as natural reservoirs wild animals. It is considered as a zoonosis of broad geographic distribution. At present, these diseases are under investigation by several groups in Brazil, in an attempt to understand their natural history in this country. This study aimed to evaluate the occurrence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in wild (skunks and rodents) and domestic animals (dogs and horses), and the occurrence in ectoparasites (ticks and fleas), seeking to increase knowledge about this disease in Minas Gerais State, Brazil, to support the design of strategies for epidemiological surveillance. We selected three municipalities in Minas Gerais State, Brazil: Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água and Caratinga. These municipalities belong to the Doce River Basin, an endemic area for tick-borne zoonosis, which are characterized by intense human pressure. Sera samples were collected and screened to verify the occurrence of antibodies anti *B. burgdorferi* by ELISA test. Among 370 serum samples obtained from wild and domestic animals collected in the studied locations, 31 recognized *B. burgdorferi* antigens, out of which 23 were from Santa Cruz do Escalvado and eight from Pingo D'Água. Of the 3.821 samples analyzed DNA of parasites from the municipalities of Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água and Caratinga, none was positive for *B. burgdorferi*. By the detection of antibodies against *B. burgdorferi* in the sera samples in wild and domestic animals analyzed, we recommended the establishment of a specific and permanent epidemiological surveillance program in the studied regions and its surroundings, due the likely occurrence of cases in humans in situations of natural invasion of wild locations or due to the spread of potential reservoirs and vectors into (new) urban and rural areas. These recommendations also can be considered to other regions with similar epidemiological conditions.

1. INTRODUÇÃO

As borrelioses são enfermidades causadas por microrganismos do gênero *Borrelia*, os quais são bactérias multiflageladas da família Spirochetaceae (Krupka *et al.*, 2007). Dentre as infecções ocasionadas por estes organismos, temos a Doença de Lyme (DL), a qual é uma desordem infecciosa humana e animal multi-sistêmica, caracterizada por alterações cutâneas, articulares, neurológicas e cardíacas, sendo a principal doença causada por bactérias do gênero *Borrelia*, o qual compreende um grupo de 12 espécies constituindo o complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Joppert, 1995; Ranka *et al.*, 2004).

Considerada a zoonose emergente de maior importância dos EUA e Europa, esta enfermidade é transmitida ao homem pela picada de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* (Krupka *et al.*, 2007). No Brasil, uma variante dessa doença é transmitida por carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* (Fonseca *et al.*, 2005). Baseado na diferença quanto ao vetor transmissor, bem como por outras peculiaridades epidemiológicas, clínicas e laboratoriais e ao fato de seu agente etiológico ainda não ter sido isolado no Brasil, esta zoonose é referida como Doença de Lyme-símile Brasileira (DLSB) ou Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) (Yoshinari, 2009).

Ao contrário do observado no Hemisfério Norte, até então não se conseguiu cultivar e isolar, *in vitro*, em meio Barbour-Stommer-Kelly (BSK) o agente etiológico da DLSB. Estudo de microscopia em amostras de soro de pacientes brasileiros com DLSB tem relatado a presença de espiroquetas aflageladas e estruturas semelhantes às clamídias (Mantovani *et al.*, 2007). Além disso, estudos norte-americanos têm relatado que algumas espécies do gênero *Borrelia* não são cultiváveis em meio BSK, tradicionalmente utilizado para cultivo de bactérias deste gênero (Wang *et al.*, 2003). Tais estudos não permitem descartar a possibilidade de que o agente etiológico da DLSB seja uma espiroqueta do gênero *Borrelia*, visto diversos casos de pacientes diagnosticados para DLSB apresentaram sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Yoshinari *et al.*, 1993).

Nos últimos anos, vários casos de pacientes com sorologia positiva e sintomatologia típica da DLSB têm sido reportados em todo país, incluindo relatos da sua ocorrência no Estado de Minas Gerais. Neste Estado, conhecido por apresentar diversas regiões endêmicas para a Febre Maculosa Brasileira (FMB), uma grave enfermidade também veiculada por carrapatos, observam-se características comuns para

a disseminação e manutenção de ambas as enfermidades no ambiente, sendo o carrapato *A. cajennense* seu principal vetor, tendo mamíferos silvestres e domésticos como reservatórios de seus agentes etiológicos (Fonseca *et al.*, 2005). Estas características também são observadas em outras regiões endêmicas para enfermidades veiculadas por carrapatos em todo país, com destaque ao alto índice de desmatamento e a proximidade de residências e de empreendimentos agro-industriais de áreas de mata, dentre outras alterações antrópicas (Mafra *et al.*, 2011).

Como em outras enfermidades veiculadas por carrapatos que apresentam vertebrados silvestres e domésticos como membros de seu ciclo de transmissão, o conhecimento da frequência de soropositivos em amostras de animais silvestres e domésticos é de grande valia no estudo epidemiológico da zoonose em uma região, visto algumas espécies animais atuarem como sentinelas para a enfermidade (Lemos *et al.*, 2001; Cardoso, 2004). Dados sorológicos quanto à frequência de amostras positivas de DNA em ectoparasitas tornam-se assim extremamente relevantes para o suporte ao desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica nas áreas de riscos e a ação de profissionais da Saúde, na avaliação de áreas geográficas de risco para o surgimento de potenciais infecções transmitidas por carrapatos.

Assim, objetivou-se o estudo da possível circulação de bactérias do gênero *Borrelia*, pesquisando-se anticorpos e DNA para *Borrelia burgdorferi*, em animais silvestres e domésticos, e em seus ectoparasitas, capturados no perímetro periurbano e rural em duas regiões endêmicas para FMB, no Estado de Minas Gerais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O GÊNERO *Borrelia*

As borrelíias são bactérias da ordem Spirochaetales pertencentes à família Spirochaetaceae, a qual é constituída de três gêneros: *Borrelia*, *Leptospira* e *Treponema* (Krupka *et al.*, 2007). As bactérias patogênicas do gênero *Borrelia* são responsáveis por uma série de doenças distintas que acometem tanto o homem quanto os animais (Fonseca *et al.*, 2005), a saber: Febre Recorrente Epidêmica Humana, causada por *Borrelia recurrentis*; Febre Recorrente Endêmica, causada por mais de 20 espécies do gênero *Borrelia*; Borreliose Aviária, a qual é determinada por uma única espécie, *Borrelia anserina*, ocasionando anemia, febre, apatia e altas taxas de morbidade nas aves; Borreliose Bovina, causada por *Borrelia theileri*, a qual determina um discreto processo que gera anemia em ruminantes e equinos, sendo considerada pouco patogênica; Aborto Enzoótico Bovino, enfermidade que acomete bovinos e cervídeos, provocada por *Borrelia coriaceae*; Borreliose de Lyme (BL) ou DL e BLSB as quais são causadas pelo grupo da *B. burgdorferi sensu lato* (Soares *et al.*, 2000). Ainda, uma nova espécie, *Borrelia lonestari*, tem sido associada à transmissão da DL pela picada de carrapatos infectados, da espécie *Amblyomma americanum*, no sul dos EUA (Barbour *et al.*, 1996).

Sabe-se que existem diferentes espécies do gênero *Borrelia* que causam a DL, compondo o grupo *B. burgdorferi sensu lato*, o qual abrange 12 espécies, sendo quatro destas de maior importância epidemiológica: *B. burgdorferi sensu stricto* (Figura 1), *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* e *Borrelia japonica*. Nos EUA, a espécie *B. burgdorferi sensu stricto* é a principal causadora da DL. As *B. garinii* e *B. afzelii*, por sua vez, são responsáveis pela doença tanto na Europa quanto na Ásia, ao passo que *B. japonica* tem sido relatada como a causadora da BL no Japão (Krupka *et al.*, 2007).

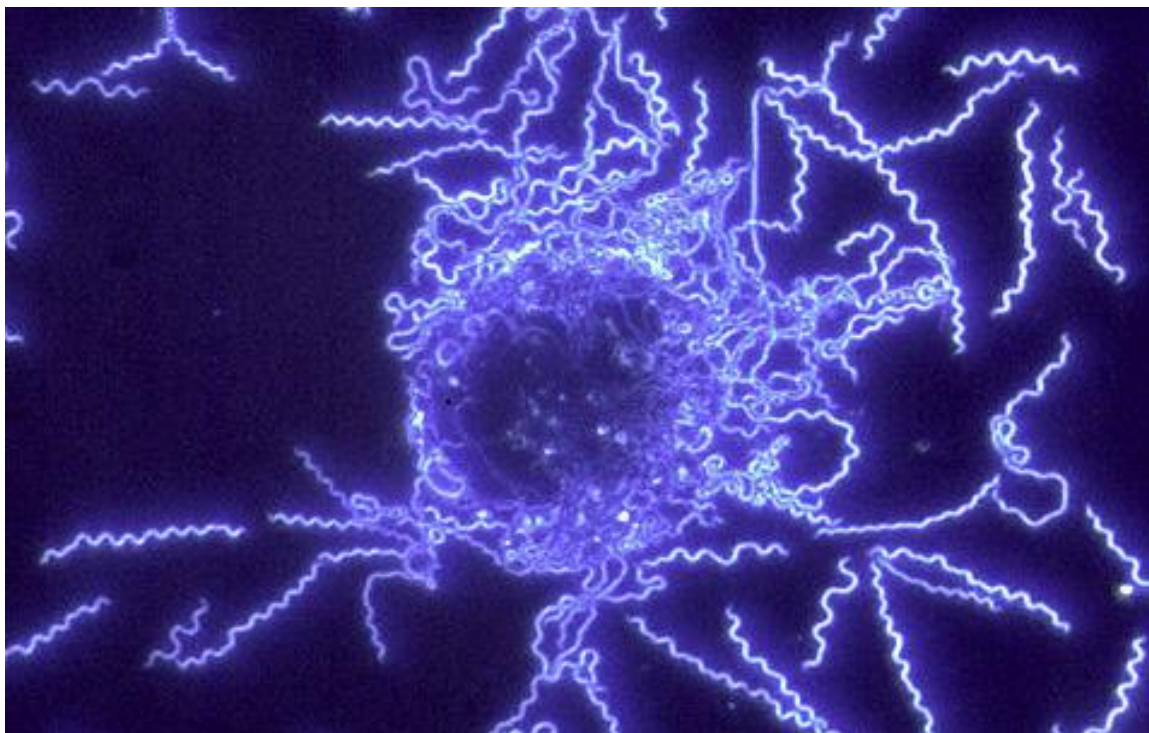


Figura 1: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (FONTE: www.microbelibrary.org)

O gênero *Borrelia* abrange bactérias de formato espiralado, sem parede celular rígida, cujas dimensões variam de 10-30 μ m de comprimento e 0,2-0,3 μ m de diâmetro (Steere *et al.*, 2004; Krupka *et al.*, 2007), possuindo de 7 a 14 flagelos em cada extremidade, o que confere mobilidade a esses microrganismos. Tais flagelos são constituídos basicamente por dois tipos de flagelinas (Fla): uma menor, FlaA, de 38kDa e outra maior, FlaB, de 41kDa, sendo estas proteínas conservadas nas espécies do complexo *B. burgdorferi sensu lato*. No entanto, tem-se verificado que as borrelíias perdem os flagelos e o formato espiralado quando cultivadas *in vitro* (Krupka *et al.*, 2007).

A composição do envelope celular da *Borrelia* é similar ao encontrado em bactérias Gram-negativas, destacando-se algumas diferenças, como a ausência de lipopolissacarídeos (Takayama *et al.*, 1987) e a abundância de lipoproteínas na membrana externa (Fraser *et al.*, 1997; Bergstrom *et al.*, 2002). Dentre estes lipídios, os principais encontrados nas membranas das borrelíias são a fosfatidilcolina, o fosfatidilglicerol e dois glicolipídios atípicos: o 1-O-palmitoil-2-O-Oleoil-3-O- α -D-galactopiranosilglicerol e o Colesteril-6-O-palmitoil- β -D-galactopiranosídeo. Ambos glicolipídios são capazes de estimular produção de anticorpos específicos em ratos. No entanto, foi verificada a existência de reação cruzada entre esses anticorpos e os

gangliosídeos presentes na membrana dos neurônios, o que sugere uma possível causa para as disfunções neurológicas verificadas em quadros avançados da DL (Hossain *et al.*, 2001; Bem-Menachem *et al.*, 2003; Pozsgay & Kubler-Kielb, 2007).

Quanto aos aspectos genéticos da bactéria, o genoma da espécie *B. burgdorferi sensu stricto*, cepa B31 foi totalmente sequenciado, sendo composto de um pequeno cromossomo linear, de aproximadamente 1Mpb (Fraser *et al.*, 1997) e 21 plasmídeos, com nove circulares e 12 lineares, o que corresponde à 40% do DNA total da bactéria (Casjens *et al.*, 2000). O principal aspecto do genoma de *B. burgdorferi* é o grande número de seqüências codificadoras de lipoproteínas, incluindo proteínas de superfície da membrana externa (*Outer membrane protein* - Osp) que se subdividem em OspA até OspF (Fraser *et al.*, 1997). Em contraste, o genoma codifica poucas enzimas necessárias para as vias de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e cofatores (Krupka *et al.*, 2007). Isso explica a dependência da espiroqueta em relação às biomoléculas produzidas pelas células do hospedeiro (Steere *et al.*, 2004). O genoma de *B. burgdorferi* também não codifica toxinas contra a célula hospedeira. Em vez disso, esse patógeno extracelular causa infecção pela sua migração através dos tecidos, aderindo-se às células e desviando-se da defesa imune (Steere *et al.*, 2004).

No que diz respeito aos marcadores moleculares, vale ressaltar o gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*), o qual é altamente conservado na família Spirochaetaceae (gêneros *Borrelia*, *Treponema* e *Leptospira*) e o espaçador 16S-23S de DNA ribossômico (rDNA) que, ao contrário do gene *rpoB*, é bastante divergente entre as espécies do complexo *B. burgdorferi sensu lato*, permitindo uma melhor diferenciação entre espécies próximas (Renesto *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). No entanto, a utilização do gene 16S-23S rDNA não tem gerado resultados satisfatórios, uma vez que esta região possui tamanho maior que 3Kb, o que dificulta a sua amplificação por PCR, visto como limitação a baixa processividade das Taq DNA polimerases. Entretanto, tem-se reconhecido o *rpoB* como um marcador molecular conveniente para detecção de bactérias do gênero *Borrelia* em amostras ambientais (Renesto *et al.*, 2000).

2.2. A DOENÇA DE *LYME* E A DOENÇA DE *LYME-SÍMILE* BRASILEIRA

2.2.1 Histórico

Analisando o histórico da DL, pode-se dizer que esta enfermidade, apesar de ser emergente, é certamente muito antiga (Steere *et al.*, 2004). Os primeiros relatos sobre os sintomas da foram descritos por Buchwald, em 1883, na Alemanha. Em 1910, Afzelius demonstrou a relação entre esses sintomas e a picada de carrapatos do gênero *Ixodes* (Lipschutz, 1913). Em 1922, os neurologistas Garin, Bujadoux & Bannwarth descreveram um quadro de meningoencefalite, posteriormente conhecido como paralisão por carrapato ou síndrome de Bujadoux-Garin-Bannwarth (GBB), hoje considerada uma forma típica de manifestação neurológica da DL (Garin & Bujadoux, 1922). No entanto, a doença só foi identificada em 1976, na região de Lyme, Connecticut, EUA, onde vários casos de artrite aguda entre adolescentes levaram à descoberta médica da doença, sendo, por isso, denominada de DL ou BL (Steere *et al.*, 1977).

Em 1981, Burgdorfer e colaboradores isolaram uma espiroqueta desconhecida de carrapatos da espécie *Ixodes scapularis*, coletados na região de Lyme (Burgdorfer *et al.*, 1982). O material do intestino dos carrapatos foi semeado em meio BSK e após cinco dias observou-se crescimento de espiroqueta, a qual foi designada como cepa B31 (Barbour, 1984). Burgdorfer reexaminou esfregaços de intestino de *I. ricinus*, coletados na Suíça, corados com Giemsa, encontrando espiroquetas similares às de *I. scapularis* (Burgdorfer *et al.*, 1983). Posteriormente, as mesmas espiroquetas foram encontradas em lesões de pele e em amostras de sangue de pacientes, o que forneceu forte evidência de que tal organismo seria o agente etiológico da DL (Benach *et al.*, 1983; Berger *et al.*, 1983; Steere *et al.*, 1983).

Após vários estudos, a espiroqueta B31 foi caracterizada e denominada *B. burgdorferi* (Johnson *et al.*, 1984), possibilitando o início de uma intensa pesquisa sobre a DL e os casos de eritema migratório (EM), artrites e distúrbios cardíacos e neurológicos associados à picada de carrapatos. Algum tempo depois, vários casos da doença foram relatados no continente Europeu e na Ásia, onde espiroquetas da espécie *B. garinii* e *B. afzelli* foram descritas como os agentes etiológicos responsáveis pela enfermidade nestas regiões (Baranton *et al.*, 1992; Canica *et al.*, 1993).

Na América do Sul, relatos de sorologia positiva para bactérias do gênero *Borrelia* em humanos foram descritos na Argentina (Stanchi & Balagui, 1993) e na Bolívia (Ciceroni *et al.*, 1994). No Brasil, os primeiros relatos de manifestações cutâneas relacionadas à picada de carrapatos ocorreram em 1987, em Manaus, estado do Amazonas, durante o XLII Congresso Brasileiro de Dermatologia (Talhari *et al.*, 1987). Em 1989, novos casos de acometimento cutâneo foram relatados no Rio de Janeiro (Filgueira, *et al.*, 1989). Em 1991, Azulay e cols. utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta e *B. burgdorferi* como alvo, evidenciaram soropositividade em pacientes apresentando Eritema Migratório Crônico (EMC). Em 1992, Yoshinari e cols. descreveram casos de pacientes com manifestações extra-cutâneas e sorologia positiva, utilizando *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) e *Western Blotting*, tendo *B. burgdorferi* como alvo. Novos casos de pacientes com acometimento cutâneo e sorologia positiva foram relatados no Estado de São Paulo, não tendo sido possível o isolamento e a caracterização do agente etiológico responsável por estes casos (Yoshinari *et al.*, 1993).

O primeiro caso de meningite associado à picada de carrapatos foi descrito no Estado do Mato Grosso do Sul (Costa *et al.*, 1996). Ainda no Estado do Mato Grosso do Sul, foram identificados possíveis reservatórios e vetores de borrelíias na região, com a visualização de espiroquetídeos semelhantes à *Borrelia* spp. em cultura de amostras de sangue de animais silvestres e de macerados de carrapatos do gênero *Amblyomma* sp. (Costa *et al.*, 2002). Em 2000, espiroquetas que apresentavam similaridade antigênica com *B. burgdorferi sensu stricto* foram observadas em amostras de sangue de pequenos mamíferos coletados no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro (Abel *et al.*, 2000). Além disso, diferentemente do que é observado nos casos de DL nos EUA e na Europa, nos casos brasileiros é verificada uma elevada frequência de recorrência dos sintomas, mesmo após a realização do tratamento (Mantovani *et al.*, 2007). Por este motivo, foi proposto que a infecção por organismos do gênero *Borrelia* no Brasil deve ser referida como DLSB ou SBY.

2.2.2. Sintomatologia

Quanto aos aspectos clínicos da DL em humanos, os primeiros sintomas se caracterizam por apresentar lesões cutâneas, denominadas de EM (Figura 2), que se expandem a partir do local da picada do carrapato. O aparecimento do EM varia de 3 a 32 dias após a exposição aos carrapatos (Smith *et al.*, 2002; Steere *et al.*, 2003). Tem sido verificado em alguns trabalhos, através de biópsias dessas lesões, a presença de *B. burgdorferi sensu lato*, sugerindo que a expansão da lesão seja determinada pela migração da espiroqueta através do tecido subcutâneo (Malane *et al.*, 1991; Duray, 1993). Na fase de disseminação das espiroquetas também são verificados sintomas similares a um quadro de gripe, acompanhados por febre, calafrio, cefaléia e artralgia (Krupka *et al.*, 2007).



Figura 2: Eritema Migratório (FONTE: CDC)

O acometimento do sistema nervoso pode se manifestar como neuropatia difusa ou local, radiculopatia ou, em menor frequência, por meningite ou encefalomielite. Estas complicações neurológicas são frequentemente associadas com infecções causadas por *B. garinii*, predominantemente na Europa. Podem ser verificadas, também, neurites craniais, que resultam na perda da audição, paralisia facial e neurite óptica (Halperin, 1997), bem como inflamações intra-oculares provocadas pela infecção por

borrélias (Flach & Lavoie, 1990; Zrinscak *et al.*, 2005). Diante das manifestações neurológicas associadas à DL, vários autores têm sugerido a associação da infecção por borrélias com desordens neuro-degenerativas, como, por exemplo, o Mal de Alzheimer (MacDonald *et al.*, 2006a; MacDonald *et al.*, 2006b).

Quanto à sintomatologia, a DLSB exhibe basicamente os mesmos sintomas dos casos de DL observados no Hemisfério Norte, como eritema migratório, acometimento cardíaco e casos de complicações neurológicas, inclusive associadas à meningite, paralisia facial e surdez súbita bilateral (Pirana *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2005). No entanto, a DLSB se diferencia da DL principalmente pela recorrência dos sintomas e o desenvolvimento de distúrbios auto-ímmunes. Além disso, vale ressaltar, que, diferentemente da DL, onde carrapatos do complexo *I. ricinus* são apontados como os principais vetores no Hemisfério Norte, no Brasil, os casos de DLSB têm sido associados à picada de carrapatos da espécie *A. cajennense* (Fonseca *et al.*, 2005).

2.2.3. Diagnóstico

Do ponto de vista clínico, nas três primeiras semanas da DL, os pacientes apresentam sintomas inespecíficos, semelhantes a um quadro de gripe, associados à complicações cutâneas de coloração avermelhada, que se espalham pelo corpo a partir da região da picada do carrapato (Krupka *et al.*, 2007). Somente depois de alguns meses, quando a doença caminha para um estado crônico, os sintomas se tornam mais característicos, com complicações articulares, cardíacas e neurológicas (Steere *et al.*, 2004; Krupka *et al.*, 2007). Sendo assim, torna-se difícil e, até mesmo inviável, diagnosticar a DL de maneira precoce, baseando-se apenas em aspectos clínicos.

Uma alternativa ao diagnóstico da BL seria o isolamento de *B. burgdorferi sensu lato* a partir das lesões cutâneas de pacientes no estado inicial da doença. No entanto, apesar dos esforços realizados com o intuito de isolar e manter a *B. burgdorferi sensu lato* em cultura, a frequência de resultados positivos é muito baixa (Costa, 1998). Tal fato persiste ainda nos dias de hoje, sendo devido à exigência de um meio de cultura relativamente complexo para o cultivo de borrélias em laboratório, uma vez que estas espiroquetas não possuem genes que codificam algumas enzimas necessárias nas vias de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e cofatores. Esta dificuldade também tem sido encontrada nas tentativas de isolamento de borrélias a partir de

amostras de carrapatos e de soro e baço de possíveis animais reservatórios, como marsupiais e roedores, utilizando-se o meio complexo BSK (Krupka, *et al.*, 2007).

Diante disso, tem se tornado mais promissor a aplicação de técnicas imunológicas, como o ELISA, bem como daquelas baseadas em Biologia Molecular (*nested*-PCR e *Real-Time* PCR) para se diagnosticar precocemente a DL de maneira confiável (Millar *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Em muitos trabalhos onde foram relatados casos da doença da DLSB, se empregou o diagnóstico imunológico (Yoshinari *et al.*, 1993; Barros *et al.*, 1993). Tal diagnóstico baseia-se na pesquisa por anticorpos contra borrelíias no soro e no líquido de pacientes, através das técnicas de *imunoblotting*, ELISA e, ou, da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Costa, 1998).

O aprimoramento das técnicas baseadas em biologia molecular proporcionou o advento de métodos mais sensíveis, baseados na detecção de DNA de agentes patogênicos tanto em amostras ambientais como em amostras de pacientes, através da amplificação do DNA do patógeno alvo. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se revelado uma técnica muito promissora para este propósito, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, esta técnica apresenta certas vantagens sobre as técnicas imunológicas, uma vez que permite a obtenção de sequências de DNA do patógeno amplificadas, que após serem sequenciadas, podem ser utilizadas para análises *in silico* (Millar *et al.*, 2003) o que permite a comparação, em nível molecular, entre as diferentes características das espécies causadoras da DL, bem como, estabelecer relações filogenéticas entre essas espécies.

O *nested*-PCR, uma variação da técnica de PCR, tem se mostrado uma ferramenta mais sensível para fins de diagnóstico, através da detecção do DNA de agentes patogênicos de interesse. A técnica do *nested*-PCR baseia-se na utilização da PCR para a amplificação de uma sequência interna de um fragmento previamente amplificado. Este tipo de amplificação aumenta em muito a sensibilidade desta técnica, em relação ao PCR tradicional (Millar *et al.*, 2003). Também, vários trabalhos têm relatado o uso do *nested*-PCR para a detecção do agente etiológico da DL, tanto em pacientes, como em amostras ambientais (Morrison *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2004).

2.2.4. Transmissão

As borrelíias são transmitidas primordialmente pelos carrapatos, embora, em raros casos, ou experimentalmente, possam ser transmitidas por tabanídeos, culicídeos e sifonápteros (Magnarelli *et al.*, 1987). Dentro da família Spirochaetaceae, que abrange os gêneros *Borrelia*, *Leptospira* e *Treponema* (Krupka *et al.*, 2007) apenas as borrelíias são transmitidas por ectoparasitos hematófagos, embora Burgdorfer (1956) discuta a possibilidade dos carrapatos do gênero *Argas* transmitirem leptospiras na natureza.

Os carrapatos são importantes na biologia das borrelíias. Hoogstraal (1985), em memorável trabalho de revisão, reportou que essas bactérias desenvolvem-se como simbioses nos artrópodes e atuam como parasitas nos animais e no homem. Restrepo e cols. (1994), Schwan (1996) e Silva & Fikrig (1997) reportaram que sucessivas infecções por *Borrelia* sem o envolvimento do carrapato diminuem sua patogenicidade, podendo tornar-se não patogênica. Hoogstraal (1985), Schwan (1996) e Randolph e cols. (1996) verificaram que existe uma dependência bioquímica entre a espiroqueta e o vetor, o qual se dá principalmente ao nível do trato intestinal do carrapato, durante o desenvolvimento e multiplicação da *Borrelia*. Este fenômeno, bem como a quimiotaxia da espiroqueta por determinados sítios do trato digestivo do carrapato, estão relacionados à ativação de genes da *Borrelia* responsáveis por determinadas fases do ciclo biológico (Barbour, 1990; Fikrig *et al.*, 1992; Restrepo *et al.*, 1994; Silva & Fikrig, 1997).

O crescimento e multiplicação da *Borrelia* no carrapato também são influenciados pelo ciclo de vida deste. Muitas espiroquetas podem morrer logo após a mudança de estágio do vetor, como também o carrapato pode sucumbir devido a um número excessivo de espiroquetas, as quais podem ocasionar lesões em seus órgãos internos (Burgdorfer, 1956; Balashov, 1972; Smith *et al.*, 1978; Hoogstraal, 1985; Piesman *et al.*, 1990; Schwan, 1996).

Quanto ao modo de transmissão das borrelíias, este pode ser transovariano ou transestadial. Nas espécies de borrelíias transmitidas por argasídeos a transmissão se dá primordialmente de forma transovariana, o que é bem caracterizado no gênero *Argas* com *B. anserina* (Barbour & Hayes 1986). Contudo, sabe-se também que nestes carrapatos o modo de transmissão encontra-se intrinsecamente relacionado à cepa, à região fisiográfica, à espécie de *Borrelia* e ainda à associação com outros patógenos (Hoogstraal, 1985). Para os ácaros ixodídeos, podem ocorrer ambos os modos de

transmissão (Smith *et al.*, 1978, Randolph *et al.*, 1996), sendo este fenômeno mais bem compreendido a partir dos estudos da BL, partindo-se de *I. scapularis* (Oliver *et al.*, 1993) e demais espécies de *Ixodes* vetores de *B. burgdorferi lato sensu* (Burgdorfer *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1987; Mather & Mather, 1990; Ewing *et al.*, 1994).

Quanto à infecção do hospedeiro, o tempo de fixação dos carrapatos é considerado um fator relevante para a eficiência da transmissão de borrelíias, com estudos demonstrando que para os ixodídeos faz-se necessário um tempo de fixação superior a 48 horas (Piesman *et al.*, 1987; Falco *et al.*, 1995), enquanto que para os argasídeos este não é um parâmetro relevante para a transmissão do patógeno, uma vez que, nos representantes desta família, a transmissão se dá tanto pela saliva quanto pelo líquido coxal do carrapato, exceto na fase de larva onde o repasto sanguíneo dura poucos minutos (Hoogstraal, 1985).

Os argasídeos apresentam potencial para transmitir quase todas as borrelíias (Hoogstraal, 1985; Barbour & Hayes, 1986), enquanto que nos ixodídeos este fenômeno é mais restrito. Dos cinco grupos atualmente reconhecidos de borrelíias, todas são transmitidas por carrapatos, tendo cada grupo sua espécie de espiroqueta e os respectivos artrópodes vetores. No caso das espiroquetas do grupo *B. burgdorferi sensu lato*, causadoras da BL, a transmissão tem ocorrido principalmente por carrapatos do gênero *Ixodes* (Figura 3a), especialmente no norte dos EUA e Europa (Krupka *et al.*, 2007). No entanto, em regiões mais quentes, como no sul dos EUA, casos de DL são associados à infecção por *B. lonestari*, espiroqueta transmitida por carrapatos da espécie *A. americanum* (Barbour *et al.*, 1996).

No Brasil, tem sido relatada a ocorrência de Febre Maculosa (FM) em humanos, principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo, sendo o carrapato da espécie *A. cajennense* (Figura 3b) o principal transmissor, com a capivara, sendo considerado um dos reservatórios deste ácaro (Sexton *et al.*, 1993; Lemos *et al.*, 1994). Coincidentemente, a maioria dos casos de BL em humanos, bem como a presença de anticorpos em animais, foi reportada nas mesmas regiões, onde o *A. cajennense* foi apontado como potencial vetor da doença (Fonseca *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 1996; Yoshinari *et al.*, 1995 e 1997).

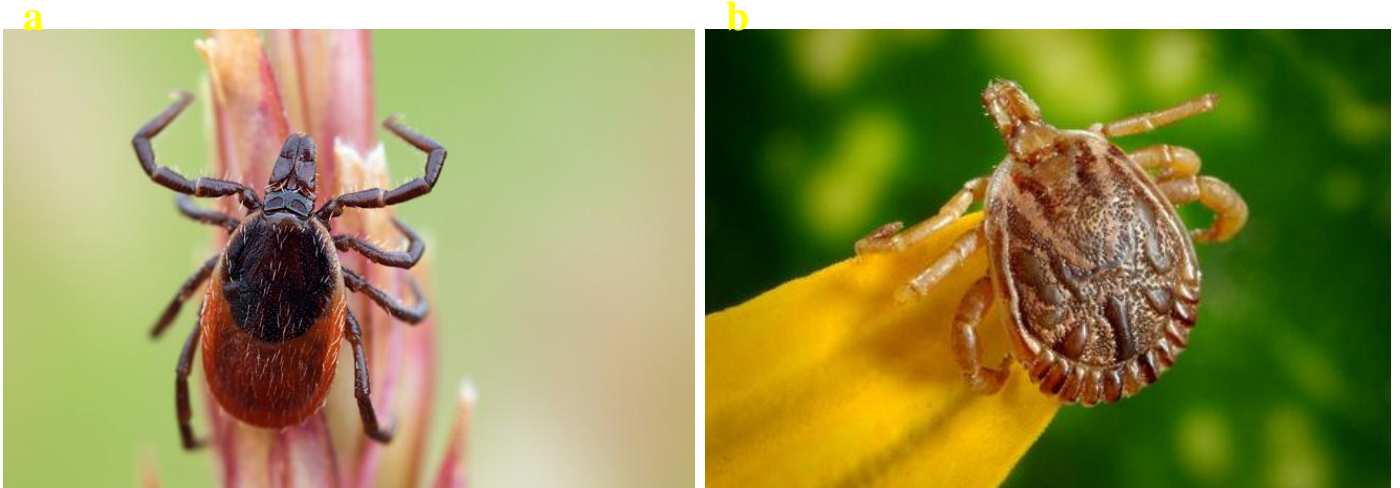


Figura 3: a (*Ixodes ricinus*; FONTE: Naturfotografie), b (*Amblyomma cajennense*; FONTE: B. Thomas Photo Research)

2.2.5. Reservatórios

Segundo Bosler (1993), Yoshinari e cols. (1997) e Costa (1998), os principais reservatórios naturais, encontrados em estudos epidemiológicos brasileiros, americanos e europeus, são marsupiais (gambás), roedores (ratos do mato, porco espinho, paca, cotia e capivara), canídeos, equinos, bovinos e cervídeos.

2.3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Para este estudo, foram analisadas amostras de ectoparasitas e soros de animais silvestres e domésticos procedentes de áreas da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, no Estado de Minas Gerais, sendo estas o município de Santa Cruz do Escalvado, na mesorregião da Zona da Mata Mineira; o município de Pingo D'Água, localizado na microrregião de Caratinga, mesorregião do Vale do Rio Doce e o município de Caratinga. Na Figura 4 pode-se visualizar a Bacia Hidrográfica do Rio Doce e a localização dos municípios nela.



Figura 4: Bacia Hidrográfica do Rio Doce com os municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga indicados em amarelo (FONTE: Singe)

A Bacia Hidrográfica do Rio Doce possui uma enorme extensão territorial abrangendo aproximadamente 83.400Km², dentre os quais a maior parte (86%) está localizada no Estado de Minas Gerais e o restante no estado do Espírito Santo (CBH-DOCE, 2011). Esta bacia possui grande capacidade de geração de energia elétrica, sendo calculado em cerca de 4.055MW de energia, dos quais cerca de 10% já são produzidos por meio de usinas hidrelétricas instaladas, enquanto a infraestrutura do restante do potencial energético encontra-se em construção, projetos básicos, estudos de viabilidade, inventariados ou parcialmente aproveitados por meio das pequenas centrais hidroelétricas (PCH). A economia principal das regiões situadas nesta bacia está baseada na agricultura, indústria ou mineração (IBGE, 2011).

2.3.1. Santa Cruz do Escalvado

O município de Santa Cruz do Escalvado (Figura 5) está localizado na mesorregião da Zona da Mata, a 205Km de Belo Horizonte. Este município está localizado na Bacia Hidrográfica do Vale do Rido Doce, no Estado de Minas Gerais, tendo sido considerado como uma área endêmica para a FMB no final da década de 80, mantendo-se como foco silencioso desde então (Lemos, 1991, Pena 2007). Com uma área total de 258,34Km², possui 87 localidades e população estimada em 5.189 habitantes, com 80% dos mesmos vivendo na zona rural dedicado principalmente às atividades agropecuárias. A sede do município situa-se a 20°13'36" de latitude sul e 42°49'24" de longitude oeste, e altitude de 412m acima do nível do mar (IBGE, 2011).

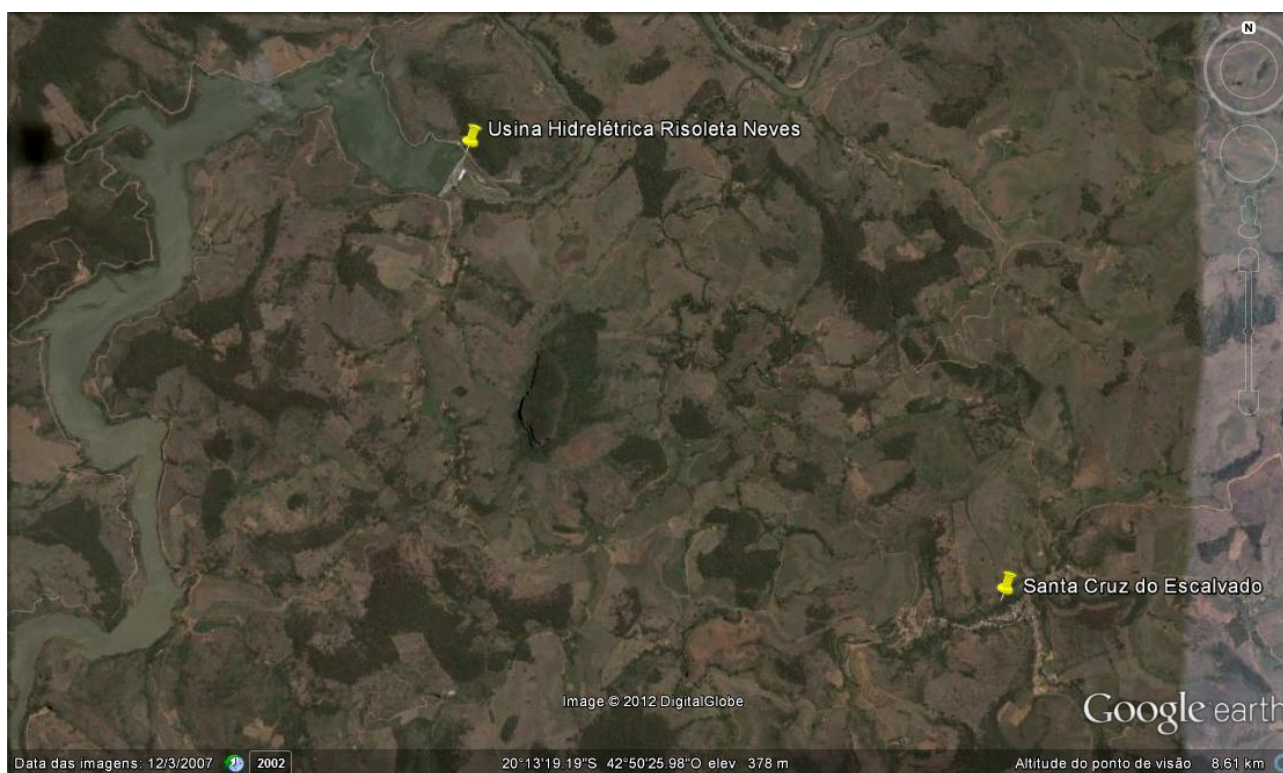


Figura 5: Município de Santa Cruz do Escalvado, vista da Sede do Município e da Usina Hidroelétrica Risoleta Neves (FONTE: Google Earth)

Em 2004 foi construída a Usina Hidroelétrica Risoleta Neves, a qual requereu a inundação de uma vasta área modificando os aspectos naturais do local. Por estar inserida na região da Zona da Mata, Santa Cruz do Escalvado possui uma vegetação de Mata Atlântica em alto estado de desmatamento, em associação com alguns pontos de mata secundária (Pena, 2007).

2.3.2. Pingo D'Água

O município de Pingo D'Água (Figura 6), situado na mesorregião do Vale do Rio Doce e na microrregião do município de Caratinga, estando a $19^{\circ}43'37''$ de latitude sul e $42^{\circ}24'28''$ de longitude oeste, possuindo uma área total de 66.820Km^2 e população de 4.169 habitantes, segundo dados do IBGE (2011).



Figura 6: Município de Pingo D'Água, vista da Sede do Município e do Parque Estadual do Rio Doce (FONTE: Google Earth)

Este município situa-se próximo à reserva do Parque Estadual do Rio Doce, conhecido como Mata do Parque, com 35 mil hectares de floresta nativa, sendo um dos últimos remanescentes do bioma Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais. O município de Pingo D'Água responde ao Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Doce (CBH-DOCE), rio este que deságua na margem esquerda do Rio Doce, destacando-se por ser seu principal afluente (IBGE, 2011). Por fazer parte da mesorregião do Vale do Rio Doce, segundo Galvão (1996), este município é considerado como área endêmica para zoonoses transmitidas por carrapatos, como a FMB.

2.3.3. Caratinga

O município de Caratinga (Figura 7) está localizado no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, latitude sul $19^{\circ}47'24''$ e longitude oeste $42^{\circ}08'20''$, local no qual ocorreram vários casos fatais de FMB em 1992. A população de Caratinga está estimada em 85.322 habitantes sendo o 35º município mais populoso do Estado. O município de Caratinga apresenta temperatura média anual de $21,1^{\circ}\text{C}$ com precipitação e média anual de umidade relativa de 1.192,5 mm e $80,5\pm 2,2\%$, respectivamente. A estação chuvosa ocorre entre os meses de outubro a março, com a estação seca se prolongando de maio a setembro, sendo o mês de abril considerado como um mês de transição entre a estação chuvosa e a estação seca (IBGE, 2011).

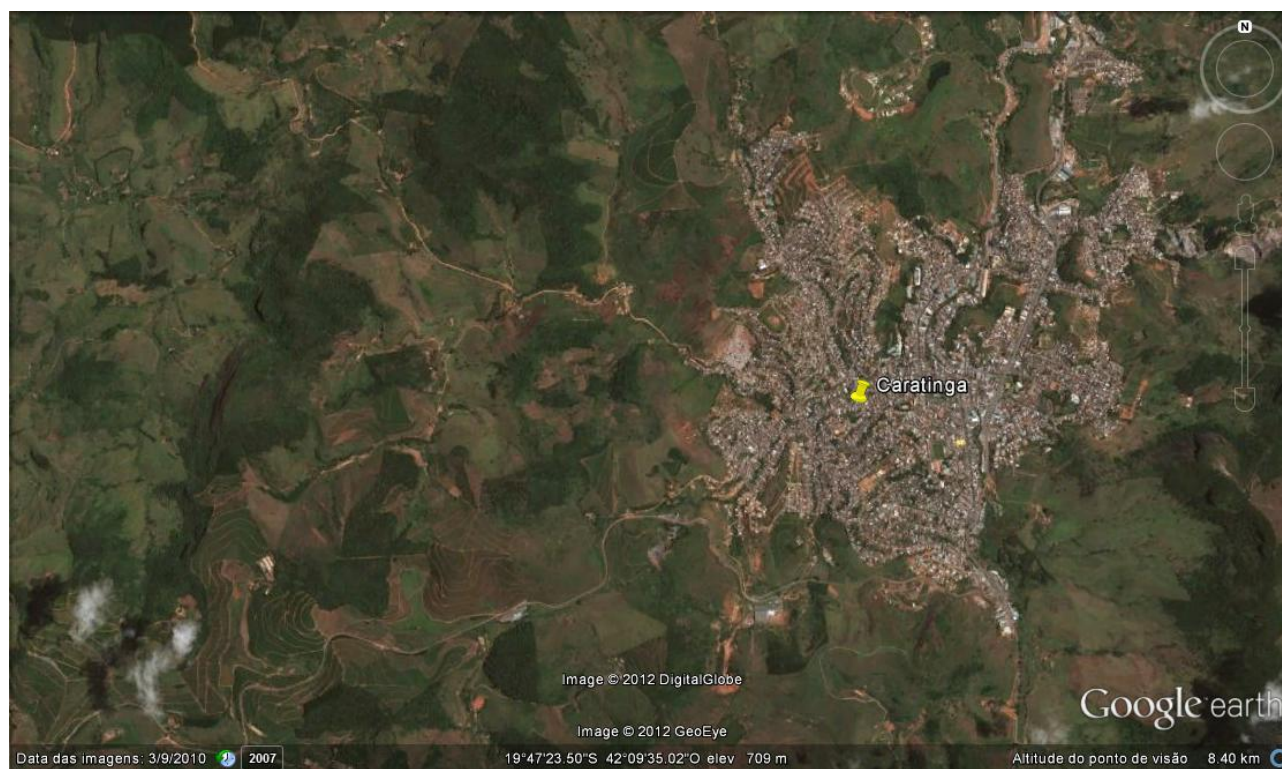


Figura 7: Município de Caratinga (FONTE: Google Earth)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a circulação de bactérias do gênero *Borrelia* entre possíveis animais reservatórios em regiões endêmicas para a FMB na Bacia Hidrográfica do Rio Doce.

3.2. Objetivos específicos

- Estudar o papel de animais silvestres (marsupiais, pequenos roedores), domésticos (cães e equinos) e de ectoparasitos (carrapatos e pulgas) como possíveis reservatórios e vetores das borrelioses nestas regiões;
- Verificar, através de técnica ELISA, a presença de anticorpos anti-*Borrelia* em amostras de soro coletadas de marsupiais, roedores, caninos e equinos, possíveis animais reservatórios de borrelias nas regiões em estudo, utilizando como alvo *B. burgdorferi sensu stricto*;
- Detectar, por estratégias da *nested*-PCR bactérias do gênero *Borrelia* e do complexo *B. burgdorferi sensu lato* em carrapatos e pulgas coletados nos animais silvestres e domésticos das regiões da estudadas;
- Fazer análise estatística dos dados encontrados, realizando as possíveis relações entre as localidades e os animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu na verificação da presença de anticorpos anti-*Borrelia* em soros de animais silvestres (gambás e roedores) e domésticos (cães e equinos) capturados nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, e da investigação molecular de DNA de *B. burgdorferi* em ectoparasitas (pulgas e carrapatos) coletados nos municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga, Estado de Minas Gerais.

4.1. CAPTURA DE ANIMAIS E OBTENÇÃO DO SORO

Para as análises sorológicas, foram testados os soros de marsupiais, roedores, cães e equinos das regiões de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, para verificação da presença de anticorpos anti-*Borrelia*, utilizando-se *Borrelia burgdorferi sensu stricto* como alvo. As coletas das amostras de soro dos animais ocorreram conforme descrito abaixo.

4.1.1. Animais Silvestres

Para captura de marsupiais na região em estudo, foram utilizadas 10 armadilhas do tipo *live trap* de captura viva, medindo 20x20x40cm, com malhas de 1cm² (Figura 8a) e para a captura dos roedores foram utilizadas também 10 armadilhas do tipo *live trap*, com medidas de 10x10x22cm, e malhas de 0,5cm² (Figura 8b), dispostas em semi-círculo em diversas regiões de mata. Como isca foram utilizadas fatias de bananas. A distância entre as armadilhas foi de aproximadamente sete metros, sendo estas vistoriadas diariamente. Os animais capturados foram capturados e anestesiados com halotane por via inalatória durante o manuseio, sendo liberados a seguir.

Os animais foram identificados, pesados e penteados no local da coleta, sobre uma cuba branca, para retirada de ectoparasitas (Figura 8c). Os que se encontraram fixos na pele foram arrancados com um pinça. Estes carrapatos foram separados de acordo com o local de coleta para as etapas de identificação e extração de DNA.

Com os animais ainda sob anestesia e com a utilização de material de segurança (luva e máscara) foi feita a coleta do sangue por punção cardíaca (Figura 8d) com seringa de 1ml. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos, devidamente

esterilizados, e identificadas de acordo com o animal, local e dia da coleta. O soro de cada amostra de sangue foi obtido, por centrifugação e armazenado a -20°C .



Figura 8: a (Armadilha tipo *live trap* 20x20x40 cm), b (Armadilha tipo *live trap* de 10x10x22cm), c (Coleta de carrapatos do corpo dos animais), d (Punção cardíaca)

4.1.2. Animais Domésticos

Os cães e equinos foram abordados, identificados por sexo e local de origem e inspecionados quanto à presença de ectoparasitas para posterior extração de DNA, seguida da coleta de cerca de 10ml de sangue de cada animal, através da venocentese da cefálica em cães (Figura 9a) e da jugular em equinos (Figura 9b), para avaliação sorológica conforme previamente descrito por Milagres (2010). O soro de cada amostra de sangue foi obtido por centrifugação e armazenado a -20°C .



Figura 9: a (Coleta de sangue através da venocentese da céfálica em cães) (Figura 9a), b (Coleta de sangue através da jugular em equinos)

4.2. COLETA DOS VETORES, IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E CONDICIONAMENTO DOS ECTOPARASITAS

Foi realizada a coleta dos vetores sob a forma de vida livre em Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga por meio de visitas a cada uma das localidades, seguindo o cronograma de coleta estabelecido de acordo com a variação sazonal da população de ectoparasitas. Estes vetores foram coletados em fase parasitária nos animais capturados.

Os ectoparasitas foram mantidos vivos, armazenados em embalagens plásticas devidamente fechadas, contendo pequenos orifícios para que ocorresse a oxigenação desse ambiente, sendo esses recipientes acondicionados em embalagens térmicas refrigeradas durante o trajeto até o laboratório, onde foram processados com descrito a seguir.

Os ectoparasitas foram taxonomicamente identificados por meio de observação morfológica ao microscópio estereoscópico, segundo chave dicotômica e pictórica descrita por Aragão & Fonseca (1961) e Linardi & Guimarães (2000). Posteriormente,

os ectoparasitas foram armazenados a 37°C, em estufa B.O.D. por 48 horas. Após este período, os ectoparasitas foram separados em *pools*, de acordo com a espécie e animal onde foi coletados e em seguida armazenados a -20°C para extração de DNA.

4.3. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Borrelia burgdorferi*

Nesta fase, foram testados para anticorpos anti-*Borrelia* as amostras de soro obtidas de marsupiais, roedores, cães e equinos das regiões de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água.

As análises por ELISA indireto foram executadas no Laboratório de Investigação em Reumatologia da FMUSP, conforme descrito a seguir:

- Sensibilização da placa: na placa de poliestireno, foram distribuídos 200µl do antígeno sonificado, na concentração de 15µg/ml de *B. burgdorferi sensu stricto* cepa G 39/40, diluído em tampão carbonato, pH 9, em cada um dos orifícios da placa. Em seguida, a placa foi incubada a 4°C, *overnight*;
- Bloqueio da placa: após desprezar o sobrenadante, lavou-se a placa três vezes com PBS-Tween 20 0,05% em pH 7,4, o bloqueio da placa foi feito, adicionando-se 200 µL da solução PBS-Tween 20 0,05% com leite desnatado à 5%, em pH 7,4, a cada um dos orifícios da placa, aguardando por 1 hora em câmara úmida. Decorrido o tempo de incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 0,05%;
- Incubação com amostras: como controle negativo da reação, foi adicionada à primeira coluna da placa, apenas a solução tampão (200µL). Utilizou-se também como controles positivos, soros previamente testados para *B. burgdorferi sensu stricto*, utilizado como padrão ouro no Laboratório de Investigação em Reumatologia da FMUSP. Foram feitas oito diluições seriadas, a partir de 1:100 para IgG de marsupiais e roedores e 1:400 para IgG de cães e equinos. Os soros controle-negativo utilizados como padrão no laboratório, foram adicionados à terceira coluna da placa, na diluição de 1:100 para roedores e marsupiais e 1:400 para cães e equinos. As demais colunas da placa foram utilizadas para as amostras suspeitas, sempre em duplicata, empregando-se os soros na diluição de 1:100 para roedores e marsupiais e 1:400 para cães e equinos;

- Incubação com anti-Imunoglobulina G (IgG) conjugados à fosfatase alcalina: foi acrescentado à placa 200µL de conjugados diluídos à 1:1.000 na solução de PBS-Tween 20 0,05% com leite desnatado 5% para roedores, cães e marsupiais, 1:15.000 para equinos. Após uma hora de incubação em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com a mesma solução tampão.

Revelação da reação: adicionou-se à placa 200µL de substrato revelador, *p*-nitrofenilfosfato (pnpp), na concentração de 1mg/ml, diluído no tampão glicina, pH 10,50, sendo incubada em câmara úmida por um tempo suficiente para que o controle positivo alcance a densidade óptica (D.O.) próxima de 1. A placa foi lida com auxílio de um espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 405nm.

O ponto de corte foi estabelecido com grau de confiança de 99,9%, obtido considerando-se a densidade óptica somada a três vezes o desvio padrão dos oito controles negativos. As D.O. maiores do que o ponto de corte foram consideradas positivas e os títulos foram estimados por uma curva de regressão.

4.4. PESQUISA DE DNA DE *Borrelia burgdorferi*

Para a investigação molecular de bactérias do gênero *Borrelia*, causadoras da DL, nas amostras de ectoparasitas foram utilizados, primeiramente, *primers* específicos para o complexo *B. burgdorferi sensu lato*. Com estes, foram empregadas as técnicas de *nested-PCR*. Os DNAs controles positivos para as PCRs foram disponibilizados pelo Professor Dr. Natalino Hajime Yoshinari.

4.4.1. Extração de DNA

Para extração de DNA dos ectoparasitas foi utilizado o método de maceração com bastão de vidro estéril, seguido da purificação com fenol/clorofórmio, de acordo com o protocolo descrito por Billings e cols. (1998) modificado, como descrito a seguir:

- Primeiramente, os *pools* de ectoparasitas foram colocados em microtubos. Feita a separação, os carrapatos foram lavados com hipoclorito de sódio 2%, por 5 minutos, etanol 70%, por 5 minutos e posteriormente com água ultrapura, por 5 minutos, duas vezes;

- Após a adição 100µl de tampão de lise os carrapatos foram macerados com bastão de vidro esmerilhado, estéril, para extração do DNA. Após a maceração, os tubos contendo os carrapatos foram incubados em banho-maria a 37°C, por 30 minutos;
- Os tubos foram centrifugados a 4.000g por 12 minutos. Feito isso, o sobrenadante em cada tubo foi transferido para tubos novos, para a adição de 0,5µl de proteinase K (100µg/ml). A incubação foi por 1 hora a 50°C. Após isso, foram adicionados 0,2µl de RNase em cada tubo, que foram incubados por 2 horas à 37°C;
- Após 2 horas, foi feita a desproteinização (purificação) do DNA pela adição de 100µl de fenol e 100µl de clorofórmio a cada tubo, que foram logo após, centrifugados a 5.000xg por 5 minutos. Esta etapa foi repetida de cinco vezes, para a máxima desproteinização da amostra. Na última etapa, foi utilizado apenas o clorofórmio para a extração do fenol residual, contido juntamente com o DNA. Foi feita a centrifugação para a retirada do sobrenadante;
- A partir do sobrenadante, o DNA foi precipitado pela adição de 10µl de cloreto de sódio 5M e 100µl de isopropanol 100%;
- Após a lavagem do *pellet* com etanol 70%, o DNA foi ressuscitado em 30µl de tampão de armazenamento TE;
- Para análise da qualidade do DNA extraído, foi feita a análise por espectrofotometria a 260nm;
- As amostras de DNA foram refrigeradas em nitrogênio líquido e estocadas a -20°C, até análises posteriores.

4.4.2. *Nested-PCR*

Com o objetivo de verificar a presença de borrelíias do complexo *B. burgdorferi sensu lato*, foi realizado *nested-PCR* utilizando dois conjuntos de *primers* da proteína do gancho flagelar da *Borrelia* (Sal *et al.*, 2008; Mantovani, 2010). O conjunto de *primers* flgE-470 externos e o segundo conjunto de *primers* flgE-262 internos.

As temperaturas e tempo de amplificação foram os seguintes: desnaturação inicial com temperatura à 95°C durante 3 minutos, desnaturação com temperatura à

95°C durante 45 segundos, anelamento à 64°C durante 45 segundos, extensão à 72°C durante 45 segundos (40 Ciclos); extensão final à 4°C durante 7 minutos (Mantovani, 2010).

Os produtos das PCR foram analisados em cuba de eletroforese horizontal a 80W por 1 hora em gel de agarose 1,5%, sendo a seguir corados com 0,3µg/ml brometo de etídio em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, e fotografados em luz ultravioleta (UV).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foi empregado o teste do Qui-quadrado adotando um intervalo de confiança de 95% para inferência da frequência de sororeatividade das zoonoses nos animais coletados. Com isso testamos as seguintes hipóteses:

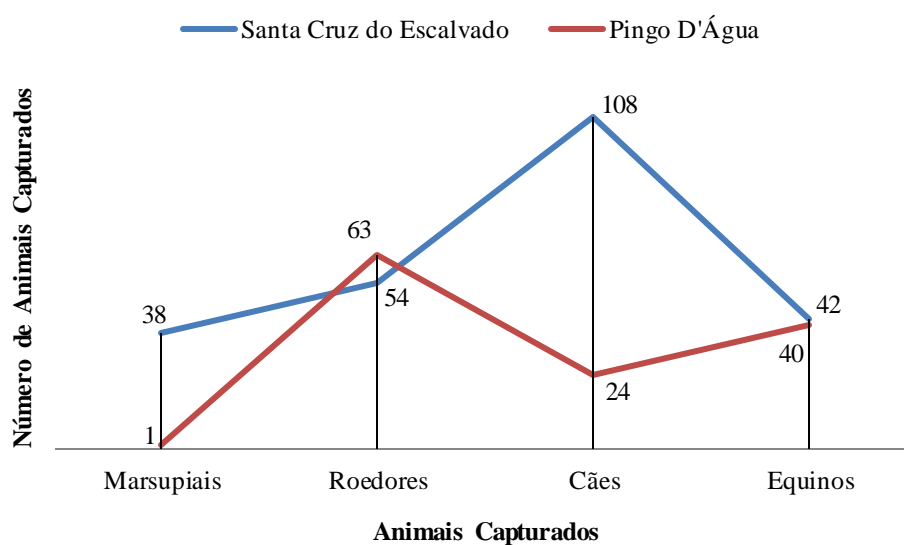
- A frequência de hospedeiros infectados por *Borrelia* não é diferente entre os municípios estudados;
- A frequência de hospedeiros infectados por *Borrelia* é diferente entre os municípios estudados;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* não é diferente;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* é diferente;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* não é diferente da frequência de hospedeiros domésticos em Santa Cruz do Escalvado;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* é diferente da frequência de hospedeiros domésticos em Santa Cruz do Escalvado;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* não é diferente da frequência de hospedeiros domésticos em Pingo D'Água e;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* é diferente da frequência de hospedeiros domésticos em Pingo D'Água.

5. RESULTADOS

5.1. ANIMAIS E ECTOPARASITAS CAPTURADOS

De um total de 370 amostras, 39 eram provenientes de marsupiais (*Didelphus aurita*), sendo uma do município de Pingo D'Água, e 38 de Santa Cruz do Escalvado; 117 de roedores, sendo 63 de Pingo D'Água e 54 de Santa Cruz do Escalvado; 132 de cães, sendo 24 de Pingo D'Água e 108 de Santa Cruz do Escalvado; e 82 de equinos, sendo 40 de Pingo D'Água e 42 de Santa Cruz do Escalvado (Tabela 1).

Gráfico 1: Relação dos animais capturados em Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, Brasil



A identificação taxonômica dos ectoparasitas coletadas foi realizada segundo chaves taxonômicas descritas por Aragão & Fonseca (1961) e Linardi & Guimarães (2000). Assim identificaram-se os carrapatos *A. cajennense* (1926), *Amblyomma braziliensis* (1), *Amblyomma dubitatum* (1), *Amblyomma sp.* (74), *Rhipicephalus microplus* (198), *Rhipicephalus sanguineus* (659), *Dermacentor nitens* (133), e pulgas *Ctenocephalides canis* (691), *Ctenocephalides felis* (80), *Xenopsylla cheopis* (19), *Pulex irritans* (1) e *Rhopalopsyllus sp.* (38) parasitando gambás, roedores, cães e equinos (Tabela 1).

Tabela 1: Ectoparasitas capturados nos municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga, Estado de Minas Gerais, Brasil

ESPÉCIE	LOCAL Santa Cruz do Escalvado	Pingo D'Água	Caratinga	TOTAL
<i>Amblyomma cajennense</i>	250	40	1636	1926
<i>Amblyomma brasiliense</i>	1	0	0	1
<i>Amblyomma dubitatum</i>	0	1	0	1
<i>Amblyomma sp.</i>	64	10	0	74
<i>Boophilus microplus</i>	193	5	0	198
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	139	5	515	659
<i>Dermacentor nitens</i>	43	0	90	133
<i>Ctenocephalides canis</i>	288	24	379	691
<i>Ctenocephalides felis</i>	45	35	0	80
<i>Xenopsylla cheopis</i>	8	11	0	19
<i>Pulex irritans</i>	0	1	0	1
<i>Rhopalopsyllus sp.</i>	38	0	0	38
TOTAL	1.069	132	2.620	3.821

5.2. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA

Das 38 amostras de soros de marsupiais analisadas provenientes do município de Santa Cruz do Escalvado, três foram positivos para *B. burgdorferi* com títulos de 1:100, 1:200 e 1:400, respectivamente. Dentre as 54 amostras de soros de roedores coletadas no município de Santa Cruz do Escalvado, duas apresentaram positividade para *Borrelia*, com ponto de corte de 1:100 e 1:400, respectivamente. No município de Pingo D'Água, foi verificada positividade para *Borrelia* com título de 1:100 em apenas um dos 63 roedores testados. Das 108 amostras de soros de cães provenientes do município de Santa Cruz do Escalvado, verificou-se reatividade ao ELISA com títulos de 1:400 em quatro, 1:800 em três e 1:3.200 em uma delas respectivamente. Das 24 amostras de soros de cães provenientes do município de Pingo D'Água, observou-se reatividade em apenas uma delas, com título de 1:100. Em relação as 42 amostras coletadas de equinos provenientes do município de Santa Cruz do Escalvado, quatro apresentaram positividade com título de 1:400, três com título de 1:800, duas com título de 1:1.600 e uma com título de 1:3.200, respectivamente. Das 40 amostras de soros de equinos de Pingo D'Água testadas, quatro apresentaram positividade a 1:400 e duas a 1:800, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Títulos anti-*Borrelia burgdorferi* das amostras dos animais capturados nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, Brasil

ESPÉCIE	MUNICÍPIO	SOROS TESTADOS	TÍTULOS SOROLÓGICOS PARA <i>Borrelia</i>						TOTAL
			1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200	
Marsupiais	Santa Cruz do Escalvado	38	1	1	1	0	0	0	3
	Pingo D'Água	1	0	0	0	0	0	0	0
Roedores	Santa Cruz do Escalvado	54	0	1	1	0	0	0	2
	Pingo D'Água	63	1	0	0	0	0	0	1
Cães	Santa Cruz do Escalvado	108	0	0	4	3	0	1	8
	Pingo D'Água	24	0	0	0	1	0	0	1
Equinos	Santa Cruz do Escalvado	42	0	0	4	3	2	1	10
	Pingo D'Água	40	0	0	4	2	0	0	6
TOTAL		370	2	2	14	9	2	2	31

5.3. AVALIAÇÃO MOLECULAR

Pela *nested*-PCR utilizando os *primers* flgE-470 e flgE-262, das 3.821 amostras de DNA de ectoparasitas analisadas provenientes dos municípios de Santa Cruz do Escalvado, Pingo D'Água e Caratinga, nenhuma foi positiva para *B. burgdorferi* (Figura 10).

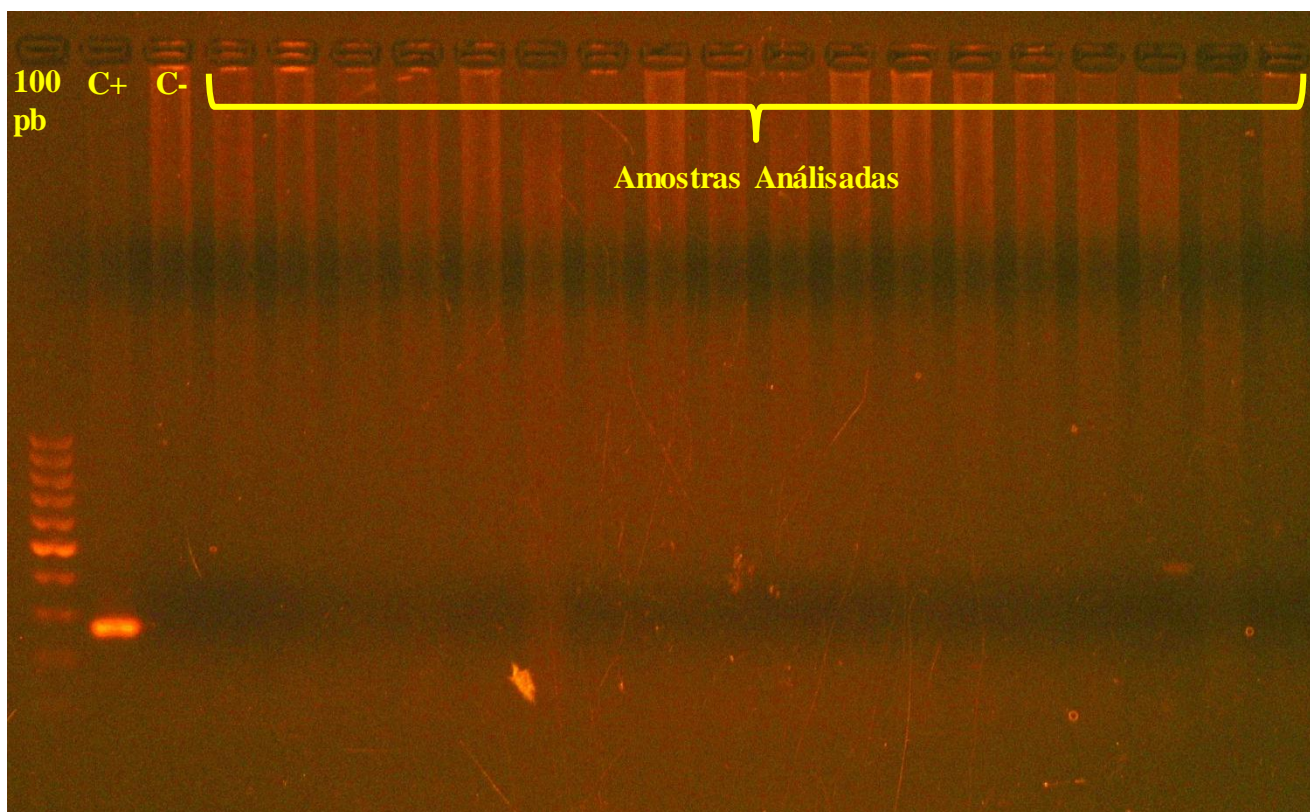


Figura 10: Gél de agarose, onde estão indicados o peso molecular de 100 pares de base, o controle positivo (C+), o controle negativo (C-) e 18 amostras de DNA de ectoparasitas trabalhados com resultado negativo

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise através teste do Qui-quadrado adotando um intervalo de confiança de 95%, utilizou-se os seguintes dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Amostras de soros positivas em relação Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, Brasil

	SANTA CRUZ DO ESCALVADO		PINGO D'ÁGUA		TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS (%)	Valor-p
	NÚMERO DE SOROS	<i>Borrelia</i> (%)	NÚMERO DE SOROS	<i>Borrelia</i> (%)		
Gambá	38	3 (7,90)	1	0 (0,00)	3 (7,70)	0,76
Roedores	54	2 (3,70)	63	1 (1,59)	3 (2,56)	0,47
TOTAL DE ANIMAIS SILVESTRES	92	5 (5,43)	64	1 (1,56)	6 (3,85)	0,21
Cães	108	8 (7,41)	24	1 (4,17)	9 (6,82)	0,56
Equinos	42	10 (23,81)	40	6 (15,00)	16 (19,51)	0,31
TOTAL DE ANIMAIS DOMÉSTICOS	150	18 (12,00)	64	7 (10,94)	25 (11,68)	0,82
TOTAL	242	23 (9,50)	128	8 (6,25)	31 (8,39)	0,28

Observou-se a significância das seguintes hipóteses levantadas:

- A frequência de hospedeiros infectados por *Borrelia* não é diferente entre os municípios estudados;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* é diferente entre os municípios estudados;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* não é diferente da frequência de hospedeiros domésticos infectados no município de Santa Cruz do Escalvado e;
- A frequência de hospedeiros silvestres infectados por *Borrelia* é diferente da frequência de hospedeiros domésticos infectados no município de Pingo D'Água.

6. DISCUSSÃO

Em diversas regiões do Brasil tem sido relatada a ocorrência de enfermidades veiculadas por carrapatos em humanos, em especial a FMB, principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (Sexton *et al.*, 1993; Lemos *et al.*, 1994), e a ehrlichiose no Estado de Minas Gerais (Calic *et al.*, 2004). Da mesma maneira, tem sido reportados casos de DLSB em humanos, bem como a presença de anticorpos anti-*Borrelia* em animais domésticos e silvestres (Fonseca *et al.*, 1994, 1995, 1996; Yoshinari *et al.*, 1995, 1997). Nesta questão, conseguimos neste trabalho de maneira inédita demonstrar a presença de anticorpos específicos em soros de animais silvestres (marsupiais e roedores) e domésticos (cães e equinos), coletados em duas áreas endêmicas para outras enfermidades zoonóticas emergentes veiculadas por carrapatos, entretanto isso não comprova a circulação de *B. burgdorferi* nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, uma vez que não foi possível a detecção molecular do agente causador da DL.

Nos animais silvestres testados, a positividade encontrada em soros de marsupiais foi de 7,7% em Santa Cruz do Escalvado e em Pingo D'Água. Esses dados positivos também foram encontrados por Abel e cols. (2000), os quais relataram uma frequência de 23,2% em gambás capturados no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, estado do Rio de Janeiro, com a utilização do exame direto do sangue por microscopia de campo escuro e por contraste de fase como métodos de detecção. Nos roedores, verificamos uma proporção de 2,6% em ambos os municípios estudados, frequência esta relativamente baixa quando comparada aos dados de encontrados por Battesti (1998), a qual verificou uma soropositividade de 9,7% em animais capturados em um condomínio residencial no município de Itapevi, estado de São Paulo. Mesmo com os valores encontrados, esses achados são preocupantes, visto os roedores serem relatados como os principais reservatórios e carreadores de algumas espécies de borrelíias (Brumpt 1927; Pavlovsky 1965; Barbour & Hayes 1986).

Em cães, a frequência observada foi de 6,8% nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água. Achados positivos foram obtidos no município de Londrina, estado do Paraná, onde se verificou uma frequência de 15,5% em 199 amostras de soro, com os títulos de anticorpos anti-*B. burgdorferi* pela ELISA variaram entre 1:400 e 1:1.600 (O'Dwyer *et al.*, 1999). Em equinos, a soropositividade verificada nas duas localidades mineiras em estudo foi de 19,5%, sendo esta elevada como o

observado nos dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro (Madureira *et al.*, 2007), comparando-se a alta frequência nos Estados Unidos da América. Neste país, onde a DL é considerada um agravo de saúde bem definido, observam-se a frequência variando entre 12% a 75% nos animais que não apresentam sintomas (Marcus *et al.*, 1985; Bernard *et al.*; 1990, Parker & White 1992).

Se comparada às espécies animais, como realizado neste estudo, a flutuação entre altas e baixas frequências de soropositividade para *B. burgdorferi* pode estar relacionada a diversos mecanismos com fatores variados de acordo com cada localidade. Entre essas características destacam-se os fatores distintos de eco-epidemiologia relacionados a cada espécie e cepa de *Borrelia* spp., a presença de ectoparasitas e a interação destes ectoparasitas com o agente causador da DL (Baraton *et al.*, 1992; Coyle, 1993; Yoshinari *et al.*, 1997). Como a transmissão de *Borrelia* spp. ocorre principalmente devido a picada do artrópode vetor (Hoogstraal, 1979; Steere *et al.*, 1983), a frequência de animais soropositivos dependerá fundamentalmente da população de seus vetores infectados. Outros fatores também podem influenciar nesta relação, dentre os quais realçamos características intrínsecas aos hospedeiros e os procedimentos de manejo aos quais os animais são submetidos. Estas circunstâncias requerem a execução de estudos epidemiológicos no sentido de se estabelecer a situação regional do patógeno em cada localidade (Soares *et al.*, 2000).

Um ponto a ser levado em consideração nesse trabalho seria a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas entre a *B. burgdorferi*, outras espécies de *Borrelia* e mesmos outros organismos filogeneticamente próximos nos ensaios sorológicos realizados. Em estudo realizado por Rogers e cols. (1999), foi observado que bezerros infectados com *B. theileri* produzem anticorpos que fazem reação cruzada com antígenos totais de *B. burgdorferi* e *B. coriaceae*, quando usado o teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), no entanto sem a ocorrência de reações falso-positivas quando do uso do ensaio de ELISA. Estes autores advertem quanto à possibilidade da ocorrência de reações cruzadas em locais onde esses agentes coexistam, principalmente quando se utiliza extrato de célula total de *B. burgdorferi* como antígeno para a reação. Como exemplo, estes autores apresentam os achados de *B. theileri* acometendo bovinos e equinos no Brasil, tendo-se como principal vetor o carrapato *R. microplus*, o qual é amplamente disseminado por todo o país.

Quando comparados os resultados aqui obtidos com resultados de trabalhos com outros gêneros de espiroquetas, investigações sorológicas em animais não têm demonstrado semelhanças entre os títulos de anticorpos contra *B. burgdorferi* e *Leptospira sp.* que leve a ocorrência de reação cruzada entre estes organismos. Nos casos em que isto foi registrado, este não se mostrou significativo (Magnarelli *et al.*, 1984; May, 1990; Joppert, 1995; Bennett, 1995; Ishikawa, 1996; Soares *et al.*, 1999). Magnarelli *et al.* (1987) verificaram diferentes situações em dois experimentos distintos, sendo observadas três amostras sorológicas sororeativas a *B. burgdorferi* em uma avaliação de 15 soros positivos para *Treponema sp.*, e nenhuma reação de soropositividade dentre 17 soros positivos para *Leptospira*. Magnarelli & Anderson em 1998, reportaram que reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *Treponema sp.* não foram significativas.

Apesar dos achados sorológicos em animais silvestres e domésticos provenientes dos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água as análises para a detecção de *B. burgdorferi* nas 3.821 amostras de DNA de ectoparasitas realizadas por *nested-PCR* utilizando os *primers* *flgE* (Sal *et al.*, 2008; Mantovani, 2010), mostraram ser todas negativas. Resultado semelhante foi verificado por Ataliba (2006), o qual investigou por *nested-PCR* a ocorrência de *Borrelia sp.* em um total de 349 carrapatos *A. cajennense* adultos coletados em áreas com suspeita de DLSB, nove amostras de sangue de pacientes humanos com diagnóstico clínico e sorológico de DLSB, duas amostras de caldas de meio BSK previamente inoculado com tecidos ou sangue de pacientes com suspeita de DLS, e três amostras de caldas de meio BSK previamente inoculado com carrapatos coletados de áreas com suspeita de DLSB, sendo todas as análises negativas.

Estes resultados podem ser devido ao fato que a aplicação da PCR ou *nested-PCR* para fins de investigação de DLSB ainda possuir algumas limitações. Após uma amplificação exponencial da amostra de DNA avaliada a detecção de fragmentos de material amplificado muitas vezes não será possível, uma vez que os géis de agarose ou poliacrilamida ou até mesmo corantes convencionais, como o brometo de etídio, não possuem resolução e sensibilidade suficientes para a detecção dessas bandas de DNA amplificado devido a utilizando-se os *primers* e protocolos disponíveis até o momento para organismos do gênero *Borrelia*. Isso aumenta o risco de resultados falsos

negativos, limitando o potencial de aplicação da PCR para fins de diagnóstico molecular (Smith & Osborn, 2008).

Pelas análises estatísticas realizadas com os resultados de sorologia obtidos dentre os animais avaliados neste trabalho, verificamos que além da circulação de organismos do gênero *Borrelia* estar aparentemente presente em diferentes espécies animais, os títulos de soropositividade mais elevados ocorreram entre os animais domésticos do que entre os animais silvestres, com os equinos apresentando os maiores valores de soropositividade. Observou-se também uma maior prevalência de anticorpos anti-*Borrelia* nas amostras provenientes de animais domésticos do que nos animais silvestres do município de Pingo D'Água. No entanto, a diferença de frequência entre hospedeiros domésticos e silvestres infectados por *Borrelia* não foi considerada estatisticamente significante dentre os municípios avaliados. A mesma observação também se aplica aos resultados de frequência de hospedeiros silvestres e hospedeiros domésticos infectados por *Borrelia* no município de Santa Cruz do Escalvado.

Os resultados obtidos demonstraram ainda que os municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água na Bacia Hidrográfica do Rio Doce, Estado de Minas Gerais, oferecem condições ambientais favoráveis para o estabelecimento do ciclo epidemiológico da DLSB, com a presença de *B. burgdorferi strictu sensu*. Tal fato sustenta-se pelos dados obtidos no presente trabalho, sendo modulada pelas distinções da reorganização por fluxos migratórios, pelas atividades de renda desenvolvidas pelos moradores destas regiões e pelo acentuado desmatamento de ambas as localidades, características estas comuns quando da presença da enfermidade ocasionada por estes organismos em outras regiões do Brasil (Yoshinari *et al.*, 1992).

Estes achados, a se repetirem em outros municípios do Estado de Minas Gerais, sustentam os relatos recentes de casos clínicos de DLSB. Estudos realizados pelo LIM-17 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Mantovani, 2010), indicam que as borrelioses no Brasil, além de serem transmitidos por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*, tem participação importante dos animais domésticos como cães, equinos e bovinos no ciclo de transmissão desta enfermidade, como foi demonstrado no presente trabalho, onde a frequência de soropositividade para *B. burgdorferi* foi maior nos animais domésticos. Estudos realizados por Corrêa (2007) em búfalos no município de Arari, Ilha do Marajó, estado do Pará, fortalecem a importância de animais domésticos no ciclo epidemiológico da DLSB, uma vez que a

frequência de anticorpos homólogos IgG anti-*Borrelia* encontrados nos soros analisados foi consideravelmente alta, demonstrando que espécies domésticas podem atuar como bons reservatórios do agente causador dessa enfermidade.

7. CONCLUSÕES

Verificou-se que o diagnóstico sorológico aplicado neste estudo é relativamente rápido, eficiente e de baixo custo para uso em estudos epidemiológicos de borrelioses em animais domésticos e silvestres quando na triagem inicial de um grande número de indivíduos.

O diagnóstico por *nested*-PCR não foi eficaz nesse estudo, podendo este fato ser devido às limitações que esse diagnóstico ainda apresenta na avaliação de borrelioses, uma vez que não foi detectada nenhuma amostra de DNA positiva para *Borrelia* em contraste aos resultados positivos verificados na ELISA na detecção de anticorpos contra *Borrelia*.

Esse achado sorológico é pioneiro nas regiões estudadas, mostrando que as características eco-epidemiológicas dessas localidades são semelhantes a outras regiões nas quais também é reportada a circulação da *B. burgdorferi* entre vetores e hospedeiros vertebrados competentes.

Embora não tenham sido verificados resultados positivos de *nested*-PCR para as análises de DNA dos ectoparasitas coletados, os resultados obtidos na investigação sorológica alertam-nos para a necessidade de ampliarem-se os estudos a respeito desta enfermidade zoonótica emergente potencial, representando um alerta para ocorrência de *Borrelia* spp. nas regiões estudadas.

8. BIBLIOGRAFIA

- 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95:621-4, 2000.
- AFZELIUS A. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. **Arch. Derm. Syph.**, 101:404-406, 1910.
- ANDERSON J.F., DURAY P.H., MAGNARELLI L.A. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in white-footed mice and *Ixodes dammini* at Fort McCoy, Wis. **J. Clin. Microbiol.**, 25:1495-1497, 1987.
- ARAGÃO H.B., FONSECA, F. Notas de ixodologia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 59:119-129, 1961.
- ATALIBA A.C. **Estudo de *Borrelia* spp. no Brasil. Dissertação.** (Mestrado em Medicina Veterinária) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 2006.
- AZULAY R.D., ABULAFIA L., SODRE C.S., AZULAY R.A., AZULAY M.M. Lyme disease in Rio de Janeiro. **Int. J. Dermatol.**, 30:569-571, 1991.
- BALASHOV Y.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. **Misc. Publicat. Entomol. Soc. Am.**, 8:159-376, 1972.
- BARANTON G., POSTIC D., GIROS I.S., BOERLIN P., PIFFARETTI J., ASSOUS M., GRIMONT P.A.D. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with Lyme borreliosis. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 42:378-83, 1992.
- BARBOUR A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale J. Biol. Med.**, 57:521-525, 1984.
- BARBOUR A.G., HAYES S.F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiol. Rev.**, 50:381-400, 1986.
- BARBOUR A.G. Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. **Annu. Rev. Microbiol.**, 44:155-171, 1990.
- BARBOUR A.G., MAUPIN G.O., TELTOW G.J., CARTER C.J., PIESMAN J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. **J. Infect. Dis.**, 173:403-409, 1996.
- BARROS P.J.L., LEVY L.H., MONTEIRO F.G.V., YOSHINARI N.H. Doença de Lyme: acometimento cutâneo e tratamento das fases iniciais. **Revta Assoc. Med. Brasil**, 39:170, 1993

- BATTESTI D.M.B. **Estudos de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à *Borrelia*, no município de Itapevi, Estado de São Paulo.** Tese (Doutorado) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 1998.
- BEN-MENACHEM G., KUBLER-KIELB J., COXON B., YERGEY A., SCHNEERSON R. A newly discovered cholesteryl galactiside from *Borrelia burgdorferi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100:7913-7918, 2003.
- BENACH J.L., BOSLER E.M., HANRAHAN J.P., COLEMAN J.H., HABICHT G.S., BAST T.F., CAMERON D.J., ZIEGLER J.L., BARBOUR A.G., BURGDORFER W., EDELMAN R., KASLOW R.A. Spirochetes Isolated from the blood of two patients with Lyme disease. **New Engl. J. Med.**, 308:740, 1983.
- BENNETT C.E. Ticks and Lyme disease. **Advances in Parasitology**, 36:343-405, 1995.
- BERGER B.W., CLEMMENSON O.J., ACKERMANN A.B. Lyme disease is a spirochetosis: a review of the disease and evidence of its cause. **Am. J. Dermatopathol.**, 5:111, 1983.
- BERGSTROM S., NOPPA L., GYLGE A., OSTBERG Y. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. **J. Gray. O. Kahl.**, 47-90, 2002.
- BERNARD W.V., COHEN D., BOSLER E., ZAMOS D. Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses referred to a mid-Atlantic veterinary teaching hospital. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 196:1255-1258, 1990.
- BILLINGS A.N., YU X., TEEL P.D., WALKER D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **J. Med. Entomol.**, 35:474-478, 1998.
- BOSLER E.M. **Tick vectors and hosts.** In: Coyle, P. K., ed., Lyme disease, Mosby Year Book, p.18-25, 1993.
- BRUMPT E. **Précis de parasitologie.** Paris: Collection de Précis Médicaux Masson & Cie, Éditeurs, p.1452, 1927.
- BUCHWALD A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. **Derm. Vierteljahresschr.**, 10:553-554, 1983.
- BURGDORFER W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae. I. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. **Exp. Parasitol.**, 5:571-579, 1956.
- BURGDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S.F. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? **Science**, 216:1317-1319, 1982.
- BURGDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S.F., PETER O., AESCHLIMANN A. Erythema chronicum migrans - tickborne spirochetosis. **Acta Trop.**, 40:79-83, 1983.

- CALIC S.B., GALVÃO M.A.M., BACELLAR F., ROCHA C.M.B.M., MAFRA C., LEITE R.C., WALKER, D.H. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. Brazil. **J. Infect. Dis.**, 8:259-262, 2004.
- CANICA M.M., NATO F., MERLE L.D., MAZIE J.C., BARANTON G., POSTIC D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelli* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. **Scand. J. Infect. Dis.**, 25:441-448, 1993.
- CARDOSO L.D. **Detecção e Caracterização de *Rickettsia* Spp. Circulante em Foco Inativo Peri-Urbano do Município De Caratinga-MG.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Ouro Preto, Universidade de Ouro Preto, 2004.
- CASJENS S., PALMER N., VAN-VUGT R., HUANG W.M., STEVENSON B., ROSA P., LATHIGRA R., SUTTON G., PETERSON J., DODSON R.J., HAFT D., HICKEY E., GWINN M., WHITE O., FRASER C.M. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosome DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Mol. Microbiol.**, 35: 490-516, 2000.
- CICERONI L., BARTOLONI A., GUGLIELMETTI P., PARADISI F., BARAHONA H. G., ROSELLI M., CIARROCCHI S., CACCIAPUOTI B. 1994. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* in human settlements of the Codillera Province, Bolivia. **J.Trop. Med. Hyg.**, 97:13-17, 1994.
- CLARK K., HENDRICKS A., BURGE D. Molecular Identification and Analysis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in lizards of Southeastern United States. **Am. Soc. Microbiol.**, 71:2616-2625, 2005.
- COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO DOCE. Bacia hidrográfica do Rio Doce. **Disponível em:** <http://www.riodoce.cbh.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- CÔRREA F.N. **Pesquisa de Anticorpos Homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Pará.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- 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 clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de *Lyme* no Brasil. **Revist. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 51:253-257, 1996.
- COSTA I.P. **Pesquisa de Antocorpos anti-*Borrelia* e do agente etiológico, em soro e líquido de pacientes com manifestações clínicas compatíveis com a Doença de *Lyme*, no estado do Mato Grosso do Sul.** Tese (Doutorado em Medicina) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 1998.
- 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97:631-635, 2002.
- COYLE P.K. **Lyme disease.** In: Mosby Year Book. Boston. 235p, 1993.

- DURAY P.H. **Histopathology of human borreliosis.** In: Lyme Disease Mosby Year Book. Coyle P.K. (ed.). Boston, P. 49-58, 1993.
- EWING C., SCORPIO A., NELSON D.R., MATHER T.N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. **J. Clin. Microbiol.**, 32:755-758, 1994.
- FALCO C.R., DANIELS T.J., FISH D. Increase in abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in an emergent Lyme disease endemic area. **J. Med. Entomol.**, 32:522-526, 1995.
- FIKRIG E., TELFORD S.R.I., BARTHOLD S.W., KANTOR F.S., SPIELMAN A., FLAVELL R.A. Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 89:5418-5421, 1992.
- FILGUEIRA A.L., TROPPE B. M., GONTIJO P.P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, 2:1, 1989.
- FLACH A.J., LAVOIE P.E. Episcleritis, conjunctivitis, and keratitis as ocular manifestations of Lyme disease. **Ophthalmology**, 97:973-975, 1990.
- FONSECA A.H., SOARES C.O., CRUZ F.C.M., YOSHINARI N.H. **Doença de Lyme em bovinos e caninos no estado do Rio de Janeiro.** In: XXIII CONGR. BRAS. MED. VET, 1994, Recife.
- FONSECA A.H., SOARES C.O., ISHIKAWA M.M., MASSARD C.L., YOSHINARI N.H. Detection of *Borrelia sp.* in opossum (Marsupialia: Didelphidae) in Brazil. In: XX CONGR. WORLD SMALL ANIMAL, 1995, Yokohama.
- FONSECA A.H., ISHIKAWA M.M., SOARES C.O., MASSARD C.L., YOSHINARI N.H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Rev. Univ. Rural.**, 18:85-89, 1996.
- FONSECA A.H., SALLES R.S., SALLES S.N., MADUREIRA R.C., YOSHINARI N.H. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, 80:171-178, 2005.
- FRASER C.M., CASJENS S., HUANG W.M., SUTTON G.G., CLAYTON R., LATHIGRA R., WHITE O. Genomic sequence of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, 390: 580-586, 1997.
- GALVÃO M.A.M. **Febre Maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano.** Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 1996.
- GARIN C., BUJADOUX A. Paralyse par les tiques. **J. Med. Lyon**, 71:765-767, 1922.
- HALPERIN J.J. Neuroborreliosis: Central Nervous System involvement. **Semin. Neurol.**, 17:19-24, 1997.
- HOOGSTRAAL H. Ticks and spirochetes. **Acta Tropica**, 36:133-136, 1979.

- HOOGSTRAAL H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv. Parasitol.**, 24:135-238, 1985.
- HOSSAIN H., WELLENSIEK H.J., GEYER R., LOCHNIT G. Structurally analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*. **Biochemie**, 83:683-692, 2001.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Bacia Hidrográfica do Rio Doce. **Disponível em:** <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Caratinga. **Disponível em:** <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Pingo D'Água. **Disponível em:** <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Santa Cruz do Escalvado. **Disponível em:** <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- ISHIKAWA M.M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico.** Dissertação (Mestrado) – Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.
- JOHNSON R.C., SCHIMID G.P., HYDE F.W., STEIGERWALT A.G., BRENNER D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 34:496, 1984.
- JOPPERT A.M. **Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 1995.
- KRUPKA M., RASKA M., BELAKOVA J., HORYNOVA M., NOVOTNY R., WEIGL E. Biological aspects of Lyme disease spirochetes. Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ.**, 151:175-186, 2007.
- LEMOS E.R.S. **Aspectos epidemiológicos da riquetsiose do Grupo de Febre Maculosa em área endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil.** Dissertação (Mestrado) - Rio De Janeiro, 1991.
- LEMOS E.R.S, MACHADO R.D., COURA J.R. Rocky mountain spotted fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89:497-501, 1994.
- LEMOS E.R.S., ALVARENGA F.B., CINTRA M.L., RAMOS M.C., PADDOCK C.D., FEREBEE T., ZAKI S.R., FERREIRA F.C., RAVAFNANI R.C., MACHADO R.D., GUIMARAES M.A., COURA J.R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in a endemic area in the state of São Paulo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65:329-334, 2001.
- LINARDI P.M., GUIMARÃES L.R. **Sifonápteros do Brasil.** São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, FAPESP, 29p. 2000.

- LIPSCHULTZ B. Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). **Arch. Derm. Syph.**, 118:349, 1913.
- MACDONALD A.B. Spirochetal cyst forms in neurodegenerative disorders, hiding in plain sight. **Med. Hypothesis**, 67:819-832, 2006. a
- MACDONALD A.B. Plaques of Alzheimer`s disease originate from cyst of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. **Med. Hypothesis**, 67:592-600, 2006. b
- MADUREIRA R.C., CORRÊA F.N., CUNHA N.C., GUEDES 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. **R. bras. Ci. Vet.**, 14:43-46, 2007.
- MAFRA C.L., YOSHINARI N.H., FAMADAS K.M., CALIC S.B., CUNHA N.C., PINTER A., BARROS-BATTESTI D.M. Rickettsiosis and other tick and flea-borne emerging diseases under the perspective of the Brazilian biomes. **Biomedica**, 31:11-73, 2011.
- MAGNARELLI L.A., MEEGAN J.M., ANDERSON J.F., CHAPPELL W.A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. **J. of Clinic. Microbiol.**, 20:181-184, 1984.
- MAGNARELLI L.A., ANDERSON J.F., SCHREIER A.B., FICKE C.M. Clinical and serologic studies of canine borreliosis. **J. Am. Vet Med. Assoc.**, 191:1089-1094, 1987.
- MAGNARELLI L.A., ANDERSON J.F. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. **Am. J. Epidemiol.**, 127:818-825, 1998.
- MALANE M.S., GRANT-KELS J.M., FEDER H.M., LUGER S.W. Diagnosis of Lyme disease based on dermatologic manifestations. **Ann. Med.**, 11:90-98, 1991.
- 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 new tick borne disease or Lyme disease variation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 40:443-456, 2007.
- MANTOVANI E. Identificação do agente etiológico da doença *de Lyme-símile* brasileira (Síndrome de Baggio-Yoshinari). Tese (Doutorado em Ciências) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 2010.
- MARCUS L.C., PATTERSON M.M., GILFILLAN R.E. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses. **Am. J. Vet. Res.** 46:2570, 1985.
- MATHER T.N., MATHER M.E. Intrinsic competence of three ixodid ticks (Acari) as vectors of the Lyme disease spirochete. **J. Med. Entomol.**, 27:646-650, 1990.
- MAY C., BENNET D., CARTER S.D. Lyme disease in the dogs. **Veterinary Record**, 126:293, 1990.

- MILAGRES B.S. **Pesquisa de *Rickettsia* em animais sinantrópicos e domésticos e em seus ectoparasitas em duas áreas de baixa endemicidade para Febre Maculosa Brasileira da região leste de Minas Gerais, de 2005-2007.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.
- MILLAR B.C., XU J. MOORE J.E. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 9:21-40, 2003.
- MORRISON T.B., MA Y., WEIS J.H., WEIS J.J. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 37:987-992, 1999.
- O'DWYER L.H., SOARES C.O., SOUZA L.C.P., FLAUSINO W., MASSARD C.L., FONSECA A.H. ***Borrelia* spp. associada à fauna ixodológica em cães de áreas rurais no Estado do Rio de Janeiro.** In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, Salvador, 1999. Anais. Salvador: 1999b. p.234.
- PARKER J.L., WHITE K.W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet.* 82:253-274, 1992.
- PAVLOVSKY E.N. **Natural Nidality of Transmissible Diseases.** Moscow: Peace Publishers, 250p, 1965.
- PENA D.C.H. **Epidemiologia das Riquetsioses em área de foco silencioso para Febre Maculosa Brasileira, Município de Santa Cruz do Escalvado, Minas Gerais, 2005-2006.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.
- PIESMAN J., MATHER T.N., SINSKY R.J., SPIELMAN A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J. Clin. Microbiol.*, 25:557-558, 1987.
- PIESMAN J., OLIVER J.R., SINSKY R.J. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in the vector tick (*Ixodes dammini*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 42:352-357, 1990.
- PIRANA S., BENTO R.F., BOGAR P., SILVEIRA J.A.M., YOSHINARI N.H. Paralisia facial e surdez súbita bilateral na doença de Lyme. *Rev Bras Otorrinol.*, 62:500-502, 1996.
- POZSGAY V., KUBLER-KIELB J. Synthesis of an experimental glycolipoprotein vaccine against Lyme disease. *Carbohydr. Res.*, 342:621-626, 2007.
- RANDOLPH S.E., GERN L., NUTTALL P.A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today*, 12:472-479, 1996.
- RANKA R., SALMINA K., BAUMANUS V. Identification of three clinically relevant *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S-23S ribosomal DNA spacer amplicons. *J. Clin. Microbiol.*, 42:1444-1449, 2004.

- RENESTO P., LORVELLEC-GUILLON K., DRANCOURT M., RAOULT D. *rpob* Gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. **J. Clin. Microbiol.**, 38:2200-2203, 2000.
- RESTREPO B.I., CARTER C.J., BARBOUR A.G. Activation of a *vmp* pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. **Mol. Microbiol.**, 13:287-299, 1994.
- ROGERS A.B., SMITH R.D., KAKOMA I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia coriaceae* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, 60:694-697, 1999.
- SAL M.S., LI C., MOTOLAB 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. **J. Bacteriol.**, 190:1912-1921, 2008.
- SCHWAN T.G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infect. Agents Dis.**, 5:167-181, 1996.
- SEXTON D.J., MUNIZ M., COREY G.R., BREITSCHWERDT E.B., HEGARTY B.C., DUMLER S., WALKER D.H., PECANHA P.M., DIETZE R. Brazilian spotted fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 49:222-226, 1993.
- SILVA A.M., FIKRIG E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. **Parasitol. Today**, 13:267-270, 1997.
- SIGAL L.H. Early disseminated Lyme disease: cardiac manifestations. **Ann. J. Med.**, 98:25-29, 1995.
- SMITH R.D., BRENER J., OSORNO M., RISTIC M. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. **J. Invertebr. Pathol.**, 32:182-190, 1978.
- SMITH R.D., SCHOEN R.T., RAHN D.W., SIKAND A.K., NOWAKOWSKI J., PARENTI D.L., HOLMAN M.S., PERSING D.H. Clinical Characteristics treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically erythema migrans. **Ann. Intern. Med.**, 136:421-428, 2002.
- SMITH C.J., OSBORN A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 67:6-20, 2008.
- 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. **Ver. Bras. Med. Vet.**, 21:111-114, 1999.
- SOARES C.O., ISHIKAWA M.M., FONSECA A.H., YOSHINARI N.H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesq. Vet. Brasil.**, 20:1-19, 2000.
- STANCHI N.O., BALAGUE L.J. Lyme disease: antibodies against *Borrelia burgdorferi* in farm workers in Argentina. **Rev. Saúde Pública**, 27:305-307, 1993.

- STEERE A.C., MALAWISTA S.E., SNYDMAN D.R., SHOPE R.E., ANDIMAN W.A., ROSS M.R., STEERE R.M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arth. Rheum.**, 20:7, 1977.
- STEERE A.C., GRODZICKI R.L., KORNBLATT A.N. The spirochetal etiology of Lyme disease. **N. Engl. J. Med.**, 308:733-740, 1983.
- STEERE A.C., DHAR A., HERNANDEZ J., FISCHER P.A., SIKAND V.K., SCHOEN R.T., NOWAKOWSKI J., MCHUGH G., PERSING D.H. Systemic symptoms without erythema migrans as the presenting picture of early Lyme disease. **Am. J. Med.**, 114: 58-62, 2003.
- STEERE A.C., COBURN J., GLICKSTEIN L. The emergence of Lyme disease. **J. Clin. Invest.**, 113:1093-1101, 2004.
- TAKAYAMA K., ROTHENBERG R.J., BARBOUR A.G. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **Infect. Immun.**, 55:2311-2513, 1987.
- TALHARI, S., SCHETTINI, A.P.M., PARREIRA, V.J. **Eritema crônico migrans. Doença de Lyme: estudo de três casos.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DERMATOLOGIA, 1987, Manaus.
- YOSHINARI N.H., BARROS P.J.L., YASSUDA P., BAGGIO D., STEERE A.C., PAGLIARINE R.C., COSSERMELLI W. Estudo epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, 47:71-75, 1992.
- 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 Brasil: report of five cases. **Rev. Esp. Reumat.**, 20:6, 1993.
- YOSHINARI N.H., BARROS P.J.L., FONSECA A.H., BONOLDI V.L.N., BATESTI D.M., SCHUMAKER T.S. & COSSERMELLI W. Borreliose de Lyme - zoonose emergente de interesse multidisciplinar. **News Lab**, 3:90-104, 1995.
- YOSHINARI N.H., BARROS P.J.L., BONOLDI V.L.N., ISHIKAWA M.M., BATESTI D.M.B., PIRANA S., FONSECA A.H., SCHUMAKER T.T. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Ver. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, 52:111-117, 1997
- YOSHINARI N.H. Uma longa jornada para entender a *Borrelia burgdorferi* no Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, 49:483-186, 2009.
- WANG G., LIVERIS D., BREI B., WU H., FALCO R.C., FISH D., SCHWARTZ I. Real-Time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the Northeastern United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, 12:4561-4565, 2003.
- ZRINCAK O., MASNEC-PASKVALIN S., CORAK M., BACANI B., MANDIC Z. Paralytic strabismus as a manifestation of Lyme borreliosis. **Coll. Antropol.**, 29:137-139, 2005.