

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Borreliose de Lyme em Portugal:
(novos) aspectos clínico-laboratoriais
do diagnóstico da infecção humana**

Filipa Margarida Fernandes Marta

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Borreliose de Lyme em Portugal:
(novos) aspectos clínico-laboratoriais
do diagnóstico da infecção humana**

Filipa Margarida Fernandes Marta

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada pela Inv^a. Doutora Maria Luísa Jorge Vieira (Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa, Portugal) e pela Prof. Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

“Its significance is shown by the frequency of publications in medical journals that focus on infectious conditions. From this point of view, Lyme’s disease has assumed a position just behind acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in recent decades.”
(Krupka *et al.*, 2007)

AGRADECIMENTOS

À Inv.^a Doutora Maria Luísa Vieira, orientadora desta tese de Mestrado, por me ter integrado no seu grupo, me ter orientado e apoiado ao longo deste ano e por todos os ensinamentos e paciência demonstrada.

À Prof.^a Doutora Lélia Chambel, por ter aceite ser minha co-orientadora, pela ajuda, preocupação e disponibilidade mostrada e por tudo o que aprendi com ela durante as nossas conversas ao longo deste ano.

Às minhas colegas da ULBL, Teresa Carreira, Mónica Nunes, que contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular à Maria do Céu Mateus por estar sempre quando era preciso e pela disponibilidade. À Daniela Dib, que apesar da curta estadia na ULBL e da distância actual, valeram a sincera amizade, ensinamentos e partilha.

À minha amiga Miriam Maia da Silva, da unidade das DST, pelas amostras de sífilis gentilmente cedidas.

A todos aqueles que de alguma forma ou outra contribuíram para que este trabalho fosse possível, em particular, à Inês Gato, à Clara Sampaio, aos meus pais.

Parte dos resultados incluídos nesta Dissertação foram aceites para apresentação sob a forma de painel, no próximo congresso Microbiotec 2009:

Fernandes-Marta F.M.*, Nunes M., Carreira T., Vieira M.L. and Collares-Pereira M. (2009). The polyphasic approach in the diagnosis of human Lyme borreliosis. Microbiotec 2009 Congress, Clinical Microbiology and Epidemiology, Vilamoura, Portugal.

**primeiro autor*

RESUMO

A Borreliose de Lyme (BL) é uma zoonose de reconhecida importância médica a nível mundial, principalmente no Hemisfério Norte. Esta infecção continua sub-diagnosticada em Portugal devido ao acentuado polimorfismo e à complexa confirmação laboratorial dos agentes causais, espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato. O diagnóstico de BL é essencialmente clínico, baseado nos sinais, sintomas e história de contacto com o vector, sendo complementado por confirmação laboratorial.

Este trabalho visou a aplicação de uma abordagem laboratorial polifásica com o fim de pesquisar: *i*) anticorpos específicos, utilizando um teste de rastreio por imunofluorescência indirecta (IFA - com um conjugado polivalente), e o teste confirmatório western blot (WB-IgM e -IgG); *ii*) a presença de DNA borreliano pela amplificação, por nested-PCR, do espaço intergénico 5S(*rrf*)-23S(*rrf*); e *iii*) as genoespécies patogénicas de *Borrelia* por PCR-RFLP.

Analisaram-se 166 amostras, 125 de soros e 41 de Líquido cefalo-raquidiano (LCR), de 146 doentes portugueses com suspeita clínica de BL. Por IFA detectou-se reactividade em 61 e 2% das amostras de soro e LCR, respectivamente. De 62 soros reactivos, o WB confirmou 39% (24⁺/62) como casos positivos ($n_{\text{IgM}}=9$; $n_{\text{IgG}}=11$; $n_{\text{IgM,G}}=4$); de 16 soros não reactivos, o WB revelou como positivos 31% (5⁺/16) dos casos ($n_{\text{IgM}}=1$; $n_{\text{IgG}}=3$; $n_{\text{IgM,G}}=1$). Do ponto de vista molecular obteve-se DNA borreliano em 20⁺/125 soros e 5⁺/41 amostras de LCR, tendo sido identificada a respectiva genoespécie em 88% dos amplicões obtidos com a seguinte distribuição: *B. garinii* (55%), *B. afzelii* (23%), *B. lusitaniae* (13%) e *B. burgdorferi* sensu stricto (9%). Dos 20 doentes considerados positivos por PCR, 12 (60%) foram também positivos por WB.

Os resultados moleculares deste estudo enfatizaram a importância da utilização de técnicas baseadas em PCR, a par de uma serologia específica, visando o sucesso do diagnóstico e tratamento clínico de doentes com suspeita clínica de BL, e simultaneamente contribui para o melhor conhecimento da epidemiologia da doença no País.

Palavras-chave: Borreliose de Lyme, diagnóstico imunológico, diagnóstico molecular, genotipagem.

ABSTRACT

Lyme Borreliosis (LB) is a zoonosis of medical importance recognized worldwide, particularly in the Northern Hemisphere. This infection remains under-diagnosed in Portugal due to the marked polymorphism and complex laboratory confirmation of causative agents, spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. The diagnosis of LB is essentially clinical, based on signs, symptoms and contact history with the vector, being complemented by laboratory confirmation.

This work aimed at the application of a polyphasic laboratory approach, in order to search: *i*) specific antibodies, using the screening indirect-immunofluorescent assay (IFA – with a polyvalent conjugate) and the confirmatory western blotting (WB–IgM and IgG); *ii*) the presence of spirochetal DNA through a nested-PCR targeting the 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) intergenic spacer; and *iii*) identification of *Borrelia* genospecies by PCR-RFLP.

A total of 166 samples, 125 sera and 41 Cerebrospinal fluids (CSF) from 146 Portuguese patients with a clinical suspicion of LB was analyzed. The IFA results showed reactivity in 61 and 2%, of sera and CSF samples, respectively. From 62 reactive sera, WB confirmed 39% (24⁺/62) LB cases ($n_{\text{IgM}}=9$; $n_{\text{IgG}}=11$; $n_{\text{IgM,G}}=4$); from 16 non-reactive sera (IFA), WB detected 31% (5⁺/16) of positive cases ($n_{\text{IgM}}=1$; $n_{\text{IgG}}=3$; $n_{\text{IgM,G}}=1$). *Borrelia* DNA was detected in 20⁺/125 sera and 5⁺/41 CSF samples, and the genospecies identification was successful in 88% of the amplicons obtained, presenting the following distribution: *B. garinii* (55%), *B. afzelii* (23%), *B. lusitaniae* (13%) and *B. burgdorferi* sensu stricto (9%). From the 20 positive samples by PCR, 12 (60%) were also positive by WB.

The molecular findings seen in this study emphasized the importance of using PCR-based techniques, together with a specific serology, seeking the success of diagnosis and clinical treatment in suspected Lyme Borreliosis patients, while contributing to a better knowledge of the disease's epidemiology in the country.

Keywords: Lyme Borreliosis, immunological diagnosis, molecular diagnosis, genotyping.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE TABELAS	xi
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
1. BORRELIOSE DE LYME – CONHECIMENTO ACTUAL	3
1.1. CONTEXTO HISTÓRICO	3
1.2. EPIDEMIOLOGIA	3
1.3. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO - <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	4
1.3.1. <i>Taxonomia e distribuição geográfica</i>	4
1.3.2. <i>Características biológicas, morfológicas e bioquímicas</i>	4
1.3.3. <i>Características genómicas, moleculares e antigénicas</i>	5
1.4. VECTOR, TRANSMISSÃO E HOSPEDEIROS	7
1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA BORRELIOSE DE LYME	8
1.5.1. <i>Estádio I – Infecção localizada (Fase aguda)</i>	9
1.5.2. <i>Estádio II – Infecção disseminada</i>	9
1.5.3. <i>Estádio III – Doença tardia (Fase crónica)</i>	10
1.6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E TRATAMENTO	11
1.6.1. <i>Diagnóstico Clínico</i>	11
1.6.2. <i>Tratamento</i>	11
1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	11
1.7.1. <i>Métodos indirectos (imunológicos)</i>	12
1.7.2. <i>Métodos directos (moleculares)</i>	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. AGENTES DO COMPLEXO <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	13
2.2. MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	13
2.3. AMOSTRAS BIOLÓGICAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	14
2.4. DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO	15
2.4.1. <i>Técnica de Imunofluorescência indirecta (IFA)</i>	15
2.4.2. <i>Técnica de Western blot (WB)</i>	17
2.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	18
2.5.1. <i>Extracção de DNA</i>	18
2.5.2. <i>Amplificação de DNA por nested-PCR</i>	19
2.5.3. <i>Amplificação de DNA por PCR convencional (protocolos alternativos)</i>	20
2.6. GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	21
2.7. TRATAMENTO DE DADOS	23
3. RESULTADOS	23

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO PROBLEMA	23
3.2. ANÁLISE IMUNOLÓGICA DA AMOSTRA	24
3.2.1. <i>Técnica por imunofluorescência indirecta (IFA)</i>	24
3.2.2. <i>Técnica por Western blot (WB)</i>	26
3.3. ANÁLISE MOLECULAR DA AMOSTRA	30
3.3.1. <i>Amplificação de DNA por nested-PCR</i>	30
3.3.2. <i>Genotipagem por PCR-RFLP</i>	32
3.4. ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS MOLECULARES COM OS IMUNOLÓGICOS	33
4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
6. ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 (A e B) – Representação esquemática de um espiroquetídeo do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.: bactéria inteira, mostrando o flagelo e estrutura interna e pormenor do flagelo.	5
Figura 1.2 - Expressão de diferentes genes codificantes de proteínas de superfície da espiroqueta durante a evolução da infecção.	6
Figura 1.3 (A e B) - Dimensões comparativas das carraças da espécie <i>I. ricinus</i> e esquema das fases do ciclo de vida do <i>I. ricinus</i> .	7
Figura 1.4 – Evolução da Borreliose de Lyme desde a infecção do vector até à infecção humana, onde se evidenciam diferentes manifestações clínicas no decurso das três fases evolutivas.	9
Figura 1.5 (A-E) – Exemplos das principais manifestações clínicas de Borreliose de Lyme.	10
Figura 2.1 – Microfotografia de um poço numa lâmina preparada com lisado antigénico de <i>B. burgdorferi</i> s.l. (diluição 1:40). Observação a 200x num microscópio de fundo-escuro.	16
Figura 2.2 – Microfotografias exemplificando uma reacção de imunofluorescência positiva (ampliação 1000x).	17
Figura 2.3 – Representação de um “blot” (membrana de nitrocelulose) com antigénios recombinantes purificados de <i>B. burgdorferi</i> s.l. usados em WB (Mikrogen®).	17
Figura 2.4 - Representação esquemática da amplificação da região intergénica 23S(<i>rrl</i>)-5S(<i>rrf</i>) por nested-PCR (<i>esquema original do autor</i>).	19
Figura 3.1 (A e B) – Representação gráfica da proveniência dos doentes de acordo com os Hospitais e Centros de Saúde por região e respectivos Serviços de internamento.	24
Figura 3.2 – Representação da sensibilidade da técnica de nested-PCR do espaço intergénico do rRNA 23S(<i>rrl</i>)-5S(<i>rrf</i>) de <i>B. burgdorferi</i> s.l. a partir de diluições seriadas de culturas de estirpes seleccionadas de <i>B. lusitaniae</i> e de <i>B. garinii</i> .	31
Figura 3.3 - Exemplo de amplificação de DNA por nested-PCR do espaço intergénico do rRNA 23S(<i>rrl</i>)-5S(<i>rrf</i>) de <i>B. burgdorferi</i> s.l. em amostras biológicas problema.	31
Figura 3.4 - Exemplo de padrões de restrição com enzima <i>Msel</i> do fragmento correspondente à região intergénica <i>rrl-rrf</i> de <i>B. burgdorferi</i> s.l., amplificado por nested-PCR, em diferentes soros problema.	32
Figura 3.5 - Representação gráfica resultante da comparação dos resultados positivos obtidos pelas técnicas moleculares (nested-PCR e RFLP) e os respectivos resultados pelas técnicas imunológicas (IFA e WB).	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Reagentes utilizados em nested-PCR.	19
Quadro 2.2 – Condições de amplificação de nested-PCR.	20
Quadro 2.3 – Descrição dos protocolos A, B e C de PCR.	21
Quadro 2.4 – Descrição da composição de cada gel (resolução e concentração) e o papel de cada reagente envolvido.	22
Quadro 2.5 – Cálculo do teste “Kappa” de acordo com Thursfield (1990) ¹²⁰ .	23
Quadro suplementar 1 - Estirpes de <i>B. burgdorferi</i> s.l. utilizadas neste estudo.	48
Quadro suplementar 2 - Ficha clínico-epidemiológica de Borreliose de Lyme.	48
Quadro suplementar 3 - Critérios de avaliação do teste WB fornecidos pelo fabricante do “kit”.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Distribuição dos resultados globais (positivos, duvidosos e negativos) obtidos por IFA na população problema e controlo (Grupo 1 e 2).	25
Tabela 3.2 – Distribuição dos resultados obtidos por IFA na população problema e população controlo (Grupo 1 e 2), por antígeno com base nas estirpes Pbi (<i>B. garinii</i>), PGau (<i>B. afzelii</i>) e B102 (<i>B. lusitaniae</i>).	26
Tabela 3.3 – Distribuição dos resultados confirmados por WB, em função do conjugado utilizado (IgM e IgG) na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada como seroreactiva por IFA.	27
Tabela 3.4 – Distribuição das combinações de fracções antigénicas detectadas contra <i>B. burgdorferi</i> s.l. em cada teste WB-IgM e -IgG positivos, na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada previamente como seroreactiva por IFA.	27
Tabela 3.5 (A e B) – Distribuição dos doentes da população problema (indicados como seroreactivos por IFA) que foram positivos nos testes WB-IgM e -IgG para as fracções antigénicas OspC e p18, analisados segundo a divisão por espécie de <i>B. burgdorferi</i> s.l. destes antígenos.	28
Tabela 3.6 – Distribuição dos resultados confirmados por WB, em função do conjugado utilizado (IgM e IgG) na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada como não reactiva por IFA.	29
Tabela 3.7 – Distribuição das combinações de fracções antigénicas detectadas contra <i>B. burgdorferi</i> s.l. por cada teste WB-IgM ou -IgG positivos, na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada como não reactiva por IFA.	29
Tabela 3.8 – Distribuição dos doentes da população problema (indicados como não reactivos por IFA) positivos por WB-IgM e -IgG para as fracções antigénicas OspC observadas segundo a divisão por espécie de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	30
Tabela 3.9 – Padrões de restrição gerados pela enzima <i>MseI</i> correspondentes ao fragmento da região intergénica <i>rrl-rrf</i> do complexo <i>B. burgdorferi</i> s.l. amplificada por nested-PCR.	33
Tabela suplementar 1 - “Primers” utilizados nas reacções de PCR.	49
Tabela suplementar 2 - Análise estatística da reactividade da população problema vs controlo do Grupo 2 (dadores de sangue), comparativamente à estirpe B102 (<i>B. lusitaniae</i>), estudada por IFA.	49
Tabela suplementar 3 - Análise estatística da reactividade demonstrada contra o antígeno OspC no WB-IgM e -IgG, quanto às diversas genoespécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l., nos doentes confirmados por WB.	50
Tabela suplementar 4 - Análise estatística da reactividade demonstrada contra o antígeno p18 no WB-IgG, quanto às diversas genoespécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l., nos doentes confirmados por WB.	50
Tabela suplementar 5 - Análise estatística dos resultados globais para o teste PCR-RFLP correspondente aos polimorfismos identificados entre as diversas genoespécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	50
Tabela suplementar 6 - Concordância entre os resultados obtidos por nested-PCR e WB.	50

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A Borreliose de Lyme (BL), também conhecida por doença de Lyme, caracteriza-se por ser uma zoonose provocada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.)^{15,54}, cuja transmissão ao Homem é geralmente acidental, resultando da mordedura de carraças sobretudo do género *Ixodes*, o seu principal vector^{43,55}.

É uma doença de grande distribuição geográfica, em particular, na América do Norte, mas também em diversos países da Europa e Ásia, tendo vindo a expandir-se igualmente para a África do Sul¹⁰ e Austrália⁹. Os climas temperados favorecem as condições bioecológicas dos vectores e, por consequência, contribuem para a transmissão das espiroquetas responsáveis pela BL. Em Portugal, por exemplo, verifica-se um pico sazonal dos principais vectores, carraças do género *I. ricinus*, na Primavera e no início do Verão. Actualmente, com o acentuar das alterações climáticas, prevê-se que a transmissão ao Homem dos referidos agentes etiológicos possa aumentar na região central e norte da Península Ibérica¹⁹, admitindo-se que daí venham a resultar sérios problema de Saúde Pública.

A BL é identificada como uma doença multissistémica complexa, reactiva, infecciosa e crónica, susceptível de apresentar três fases no decurso da sua evolução, as quais se traduzem, geralmente, por manifestações clínicas na pele (sob a forma de eritema migrante, linfocitoma borreliano e acrodermatite crónica atrofica), no coração (cardite de Lyme), no sistema nervoso central (neuroborreliose) e articulações (artrite de Lyme)^{38,114}. De referir que órgãos como os olhos, o fígado e os pulmões, apesar de poderem igualmente ser afectados, são localizações onde esta patologia é menos frequente. Alguns autores referem ainda a possível associação de BL com outras síndromes, tais como, sarcoidose^{53,72}, síndrome de fadiga crónica¹²² e doenças neurodegenerativas tal como Alzheimer^{67,68}.

Em Portugal, o primeiro caso clínico de BL foi descrito há duas décadas³⁰ e, desde então, têm-se registado diversos contributos científicos para um melhor conhecimento da doença, de entre os quais se destacam, a obtenção, na década de noventa, de isolados da espécie *B. lusitanae* (no vector, *I. ricinus*)⁸³ e em 2004, por Collares-Pereira²⁴ e colaboradores, a obtenção de um isolado da mesma espécie, mas a partir de material biológico de um doente, o que constituiu um facto pioneiro no País e no mundo, além de outros importantes isolados, representantes de outras espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l.^{6,31,59,60}, que têm vindo a ser obtidos no País, a partir dos vectores.

No entanto, apesar deste considerável conhecimento da Borreliose de Lyme humana no nosso País, bem como dos seus agentes causais e respectivos vectores, não se conhece a verdadeira prevalência da doença, que continua a ser sub-diagnosticada, não obstante uma crescente e reconhecida importância a nível mundial e os alertas sucessivos para que seja

considerada uma doença emergente ⁶⁶. Por um lado, uma possível explicação para este facto reside na ausência de um quadro clínico específico associado à BL, que acaba muitas vezes por ser mimetizado por outras doenças e situações clínicas ^{23,131} e, por outro, os doentes portugueses apresentarem também uma seroreactividade fraca e inespecífica, dificultando a avaliação imunológica laboratorial, mesmo perante um diagnóstico clínico e confirmação molecular positivos para BL, contrariando o que se verifica no resto da Europa onde essa resposta é muito mais exuberante ^{25,27}.

Do ponto de vista do diagnóstico, este é essencialmente clínico, contudo, a informação dada pelo laboratório, com base em testes serológicos e/ou moleculares, constitui um apoio fundamental contribuindo para que o tratamento destes doentes seja o mais adequado e atempado possível, ao mesmo tempo que ajuda a limitar o risco de surgirem resistências à terapêutica, ou que ocorra uma evolução para situações crónicas incapacitantes, que se traduzem em elevados custos para o próprio e para a comunidade.

Face ao exposto, o presente trabalho tem plena justificação dada a permanente necessidade de se conhecerem e actualizarem os aspectos clínico-laboratoriais do diagnóstico da infecção humana por Borreliose de Lyme.

Assim, o principal objectivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica e molecular de doentes portugueses com suspeita clínica de BL e contribuir para o conhecimento das espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l., mais frequentes na amostra populacional estudada. De modo a melhor materializar o presente objectivo, foram ainda definidos os seguintes objectivos específicos:

- Optimizar o diagnóstico laboratorial da BL, através de métodos **imunológicos**, de rastreio (Imunofluorescência Indirecta) e de referência (Western blot), e **moleculares** (nested-PCR) mais sensíveis e específicos;
- Identificar as genoespécies circulantes por análise dos polimorfismos de restrição (PCR-RFLP);
- Definir o espectro dos agentes patogénicos *versus* manifestações associadas à BL, nos casos de confirmação laboratorial.

1. BORRELIOSE DE LYME – CONHECIMENTO ACTUAL

1.1. CONTEXTO HISTÓRICO

O nome “Borrelia” surge pela primeira vez no trabalho realizado pelo bacteriologista francês, Amedée Borrel em **1907** ¹³⁵. Em **1909** o clínico sueco Arvid Afzelius observou, pela primeira vez, uma lesão dermatológica provocada por uma mordedura de carraça, à qual chamou “erythema migrans” ¹. No entanto, o termo “Lyme” só foi atribuído em **1975** pelo médico americano Allen Steere, após a ocorrência de um surto de artrite reumatóide juvenil em crianças da cidade com o mesmo nome, no estado de Connecticut - EUA. Mais tarde, em **1982** também na América, Willy Burgdorfer ¹⁵ isolou o agente etiológico da doença de Lyme, espiroquetas do género *Borrelia*, a partir de carraças da espécie *Ixodes scapularis*. Em **1983**, a bactéria foi isolada de carraças da espécie *Ixodes ricinus* na Europa, mais especificamente na Suíça. Finalmente, **um ano depois**, o investigador norte-americano Russel Johnson e colaboradores ⁵⁴, com base na morfologia, estrutura de DNA e perfil antigénico do primeiro isolado, definiram uma nova espécie – “*Borrelia burgdorferi*”.

Em Portugal, o primeiro caso clínico foi diagnosticado em **1989** por David de Moraes e colaboradores ³⁰ na região de Évora e, **10 anos mais tarde**, a BL passou a ser considerada uma doença de declaração obrigatória ³³. Nos últimos anos, o termo “Borreliose de Lyme” passou ao léxico médico comum dado ser um termo mais abrangente do que o então usado “doença de Lyme”, englobando as muitas e variadas manifestações causadas pelas diferentes espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l. ⁴⁶.

1.2. EPIDEMIOLOGIA

A incidência de BL na Europa varia de País para País, sendo mais elevada na região Central e Norte com realce para a Alemanha, Áustria, Eslovénia, Holanda e Suécia ^{46,49,52,76,118}. Estima-se que na Europa existam cerca de 50.000 casos/ano com alguns países a registar, por exemplo, incidências na ordem de 155 casos/100.000 habitantes no caso da Eslovénia ou 0,6 casos/100.000 habitantes como na Irlanda ⁶⁵. Em Portugal, segundo os dados da Direcção-Geral de Saúde ³³, registaram-se 14 casos de BL em 2007 com uma taxa de incidência de 0,13 casos/100.000 habitantes e um índice epidémico acumulado de 4,0. Admite-se, no entanto, que estes dados não correspondam à realidade nacional, que se estima bastante mais elevada, apesar da BL ser uma doença de declaração obrigatória ³³.

De acordo com alguns autores europeus, a frequência de ocorrência da doença é, geralmente, mais elevada no sexo masculino, afectando pessoas de qualquer idade com destaque para as crianças sendo, porém, muito baixa a taxa de mortalidade ^{35,49}.

A população de risco ^{12,35,65} com maior predisposição para contrair BL são indivíduos que habitam e/ou trabalham em regiões endémicas, nomeadamente em zonas florestais, tais como militares, caçadores, agricultores, pastores ou ainda todos os que mantêm actividades ao ar livre como jardinagem, “jogging”, campismo e piqueniques/passeios.

1.3. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO - *Borrelia burgdorferi* sensu lato

1.3.1. TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O género *Borrelia* pertence à família *Spirochaetaceae*, ordem *Spirochaetales* e difere das restantes espiroquetas (*Treponema* spp. e *Leptospira* spp.) pela análise do gene *rrs* (rRNA 16S). Até à data estão descritas no mundo **14 genoespécies** do complexo *B. burgdorferi* s.l. sendo elas: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) (EUA, Europa, Ásia) ⁷, *B. afzelii* (Europa) ¹⁸, *B. andersonii* (EUA) ⁷⁰, *B. bissettii* (Europa, EUA) ⁹³, *B. californiensis* (EUA) ⁹¹, *B. garinii* (Europa, Ásia) ⁷, *B. japonica* (Japão) ⁵⁷, *B. lusitaniae* (Europa) ^{24,62,83}, *B. sinica* (China) ⁷³, *B. spielmanii* (Europa) ⁹⁷, *B. tanukii* (Japão) ⁴¹, *B. turdi* (Japão) ⁴¹, *B. valaisiana* (Europa, Ásia) ¹³², *B. carolinensis* (EUA) ¹⁰¹.

A distribuição geográfica das diversas espécies na Europa difere de região para região, e apenas quatro são consideradas patogénicas ^{9,36,126,131}: *B. afzelii* (Europa ocidental), *B. garinii* (Europa central, oriental, ocidental e nórdica), *B. burgdorferi* s.s. (oeste europeu) e *B. spielmanii*. As genoespécies *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* e *B. bissettii* já foram isoladas no Homem, no entanto, ainda não se conhece totalmente a sua patogenicidade ^{24,34}. Na América do norte a espécie *B. burgdorferi* s.s. é a única patogénica conhecida e estudos recentes, envolvendo a análise “multilocus sequence typing”, sugerem uma origem ancestral europeia para estas espiroquetas, o que parece traduzir uma teoria mais consistente com a história evolutiva do complexo borreliano ^{71,95}.

1.3.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

As bactérias do género *Borrelia* são intracelulares facultativas ⁵⁶ e caracterizam-se por ser Gram-negativas sem lipopolissacáridos na membrana celular ¹¹⁹. São constituídas por dois componentes lipídicos *major* - fosfolípidos (fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol) e glicolípidos atípicos (“1-O-palmitoyl-2-O-oleyl-3-O- α -D-galactopyranosyl-sn-glycerol” e Cholesteryl 6-O-palmitoyl- β -D-galactopyranoside”) - e várias lipoproteínas imunogénicas na membrana externa, as “outer surface protein” (Osp’s) estando já identificadas diversas com a designação de “A a F” (ex. OspA, OspB...) ⁵⁸. Estas proteínas de superfície são variáveis nas espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l., sendo responsáveis pela activação de

macrófagos, neutrófilos, células B e células endoteliais durante a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, e estão directamente relacionadas, por exemplo, com a inflamação inicial no eritema migrante^{11,13,20,131}.

A ultra-estrutura destas bactérias demonstra que são formadas por um cilindro protoplasmático composto por protoplasma, membrana e parede celular e uma túnica externa trilaminar envolvida por peptidoglicano (Fig. 1.1). Morfologicamente são espiraladas, longas (10-30 µm de comprimento), finas (0,2-0,3 µm de diâmetro) e flexíveis^{8,49,113}. A mobilidade por rotação-flexão deve-se à presença de 7-14 flagelos (endoflagelos) periplasmáticos bipolares imunogénicos inseridos na membrana externa que se cruzam na região central da célula, permitindo a movimentação em soluções viscosas como nos tecidos do vector e do hospedeiro¹⁰⁴.

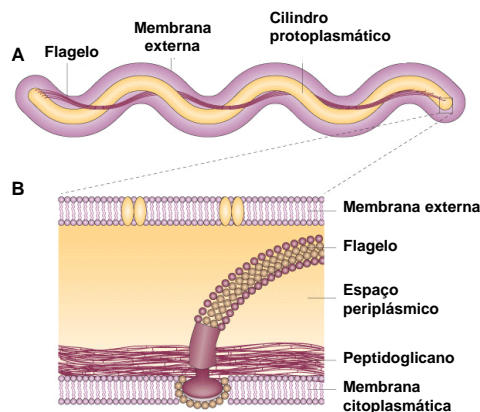


Figura 1.1 (A e B) – Representação esquemática de um espiroquetídeo do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l.: bactéria inteira, mostrando o flagelo (A); estrutura interna e pormenor do flagelo (B) (adaptado de Rosa *et al.*, 2005⁹⁹).

Estas espiroquetas são microaerófilas e de difícil cultura *in vitro*, exigindo um meio de cultura muito específico, designado por “Barbour-Stoenner-Kelly” (BSK), temperatura óptima e 33-35°C e baixa tensão de oxigénio¹¹⁵. A glucose é a maior fonte de energia e o ácido láctico é o produto final do metabolismo⁸. A longo prazo a cultura potencia perda de plasmídeos, alterações no perfil de expressão proteica e na capacidade de infectar animais de laboratório^{81,108,136}. O tempo de geração *in vitro* destas espiroquetas situa-se entre as 12-24 h, podendo ser observadas a fresco por microscopia óptica de fundo escuro ou de contraste de fase.

1.3.3. CARACTERÍSTICAS GENÓMICAS, MOLECULARES E ANTIGÉNICAS

A espécie original, *B. burgdorferi* s.s., a que pertence a estirpe B31 (referência ATCC 35210), apresenta um genoma total de 1.521.419 pb (pares de bases), constituído por um

cromossoma linear de 910.725 pb com 28,6% de teor G+C e por 21 plasmídeos (12 lineares e nove circulares) num total de 610.694 pb ^{20,40,136}. Estes elementos extracromossomais transportam genes que contribuem para a variabilidade de capacidade na sobrevivência apresentada durante o ciclo de vida da espiroqueta - hospedeiro vertebrado (sangue-quente) vs carraça (sangue-frio) - mas variam nas diferentes genoespécies de *Borrelia* e são perdidos durante a sua propagação ⁵⁸.

O nível de homologia de DNA no complexo *B. burgdorferi* s.l. é cerca de 48-70% ⁷, com o enfoque no “cluster” *rrn* ²⁷ usado na detecção molecular no âmbito do diagnóstico laboratorial, que possui uma cópia única de rRNA 16S (gene *rrs*) e uma sequência em “tandem repeat” de rRNA 23S (genes *rrlA* e *rrlB*) e rRNA 5S (genes *rrfA* e *rrfB*), estando posicionado a meio do cromossoma linear pela seguinte ordem: *rrs-rrlA-rrfA-rrlB-rrfB*.

Os genes reguladores/mediadores da expressão proteica (*ospA*, *ospC*, *bmp*, *dbpA* e *visE*) apresentam uma actividade heterogénea no vector/hospedeiro, tanto a nível temporal da expressão antigénica, como a nível da expressão de lipoproteínas na membrana externa, contribuindo também para a persistência da infecção ⁴⁸. As duas principais lipoproteínas de superfície são a OspA (31 kDa) e a OspC (22 kDa), alvo de investigação para potenciais vacinas ¹²⁵. O gene *ospA* é expresso durante a colonização do vector, cessando durante a refeição sanguínea deste, enquanto o gene *ospC* é induzido durante a mesma (Fig. 1.2), e crucial durante a fase inicial e tardia de infecção do hospedeiro, eritema migrante e neuroborreliose, respectivamente ^{58,107,111}. A proteína OspC não é necessária à persistência bacteriana no hospedeiro, cabendo esse papel à lipoproteína VisE, induzida quando a expressão do gene *ospC* termina ^{5,29,121}.

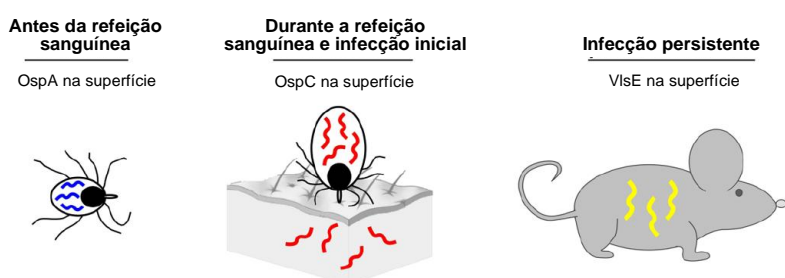


Figura 1.2 - Expressão de diferentes genes codificantes de proteínas de superfície da espiroqueta (linha espiralada) durante a evolução da infecção (adaptado de Tilly *et al.*, 2008 ¹²¹).

Uma outra proteína, designada por p18 (equivalente a “Decorin binding protein A” [DbpA] ou Osp17) liga-se à matriz extracelular do hospedeiro, permitindo a migração bacteriana nos tecidos e persistindo nas articulações e/ou na pele ⁴⁵. A p41, também conhecida por flagelina é a proteína, como o nome indica, constituinte do flagelo e indutora

de reações-cruzadas com outros microrganismos ^{21,42,134}. Por seu lado, a OspC é necessária à sobrevivência bacteriana durante o ataque do sistema imune inato (Imunoglobulina M - IgM) enquanto a VlsE e p18 têm um papel importante durante a resposta do sistema imune adquirido (IgG) ¹²¹.

1.4. VECTOR, TRANSMISSÃO E HOSPEDEIROS

Na Europa, o principal vector na transmissão do agente etiológico de BL é uma carraça de corpo duro e de dimensões reduzidas, pertencente à espécie *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) ^{15,129}. Este aracnídeo é um ecto-parasita, hematófago obrigatório, pertencente ao género *Ixodes*, família *Ixodidae*, ordem *Ixodida*. O seu ciclo de vida após a oviposição apresenta-se dividido em três fases (Fig. 1.3 A e B): larva, ninfa e adulto. O ciclo de vida das carraças tem uma duração muito variável e depende, não só da abundância de hospedeiros e das condições climáticas, como também da espécie considerada. Em climas quentes, por exemplo, a duração de todo o ciclo pode ir de dois a quatro meses, enquanto que em climas temperados ou frios, pode durar de três a cinco anos ^{128,130}.

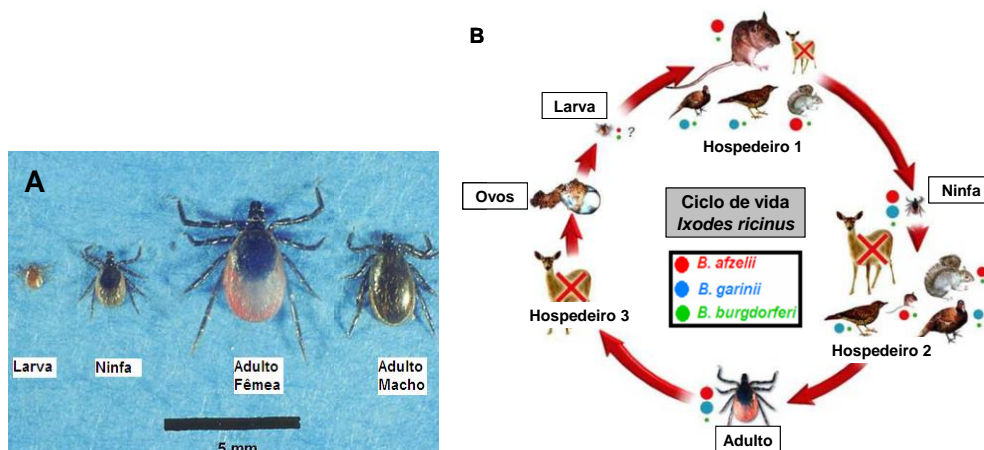


Figura 1.3 (A e B) - Dimensões comparativas das carraças da espécie *I. ricinus* (A); Esquema das fases do ciclo de vida do *I. ricinus* (B) (adaptado de EUCALB, 2009 ³⁵).

As carraças da espécie *I. ricinus* conseguem localizar um possível hospedeiro vertebrado num espaço de um metro de distância por possuírem células epiteliais fotossensíveis e quimiorreceptoras que captam estímulos, vibrações, calor e odores do referido vertebrado ^{85,89,124}. A carraça fixa-se à pele do hospedeiro por meio das peças bucais, criando uma lesão no local, sugando o sangue e outros fluidos do hospedeiro. A refeição sanguínea ocorre apenas uma vez por cada fase e demora alguns dias a completar-se. A transmissão das espiroquetas por estes ixodídeos ocorre durante a refeição sanguínea pela salivação, geralmente após um período de 17-29 h, dependendo da espécie da espiroqueta envolvida ^{35,51}. Na Península Ibérica, por exemplo, as espécies

B. garinii, *B. afzelii*, *B. valaisiana* e *B. lusitaniae* são reconhecidas como as mais frequentes nas quais o referido período temporal parece aplicar-se, de acordo com os autores referidos^{24,31}.

Outro aspecto relevante que importa considerar é o facto das secreções salivares do vector possuírem substâncias anticoagulantes e analgésicas a par de outros componentes químicos que suprimem em parte a acção do sistema imunitário do hospedeiro (com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras), impedindo a morte das espiroquetas durante a transmissão^{15,32,61}. Após a refeição sanguínea, a carraça solta-se do hospedeiro e no solo sofre nova metamorfose, evoluindo para o estágio seguinte e, no caso das fêmeas, atingida a fase adulta, há lugar à oviposição (constituída por mais de 2.000 ovos)³⁵. As larvas e/ou ninfas são infectadas com espiroquetas ao parasitarem os hospedeiros-reservatórios e cabe às ninfas e/ou adultos efectuarem a transmissão horizontal das mesmas. Podem também ocorrer infecções mistas no vector por este se ter alimentado em diversos hospedeiros, infectados com espiroquetídeos diferentes, ou o mesmo hospedeiro estar infectado por várias espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l.^{59,131}.

Em Portugal, embora com uma distribuição heterogénea, o vector *I. ricinus* pode ser encontrado de Norte a Sul durante todo o ano, predominantemente nas regiões e/ou locais que apresentem uma cobertura vegetal considerável, com elevado nível de humidade relativa (acima de 90%) e variedade de hospedeiros¹⁷. Esta é, assim, uma espécie muito dependente do estado higrométrico do ar e da temperatura, cujo equilíbrio é indispensável à sua sobrevivência.

Os reservatórios-hospedeiros dos agentes veiculados por carraças da espécie *I. ricinus* são animais vertebrados tais como aves, lagartos, veados e pequenos mamíferos (roedores, lebres, esquilos), sendo que a abundância destes, nos vários habitats, é o factor mais importante no estabelecimento de populações de carraças infectadas^{47,51,60}.

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA BORRELIOSE DE LYME

A doença pode ser assintomática ou apresentar inúmeras manifestações clínicas, de acordo com os tecidos ou órgãos envolvidos, duração da infecção e imunidade do hospedeiro (Fig. 1.4). A BL compreende três estádios delimitados pelo tempo que decorre após a mordedura da carraça, o aparecimento de manifestações clínicas (sinais e sintomas) e resultados laboratoriais específicos^{13,49,96}. No decurso da fase aguda da doença, os testes laboratoriais específicos evidenciam anticorpos do tipo M, mas após alguns meses de evolução os principais anticorpos detectados são sobretudo do tipo G (fase crónica). No entanto, as espiroquetas podem persistir no organismo durante anos sem que, aparentemente, dêem manifestações clínicas. A persistência ao nível de alguns órgãos e

sistemas acarreta sérias complicações relacionadas com a cronicidade, como é o caso dos compromissos neurológicos, articulares e cardíacos ^{113,131,133}.

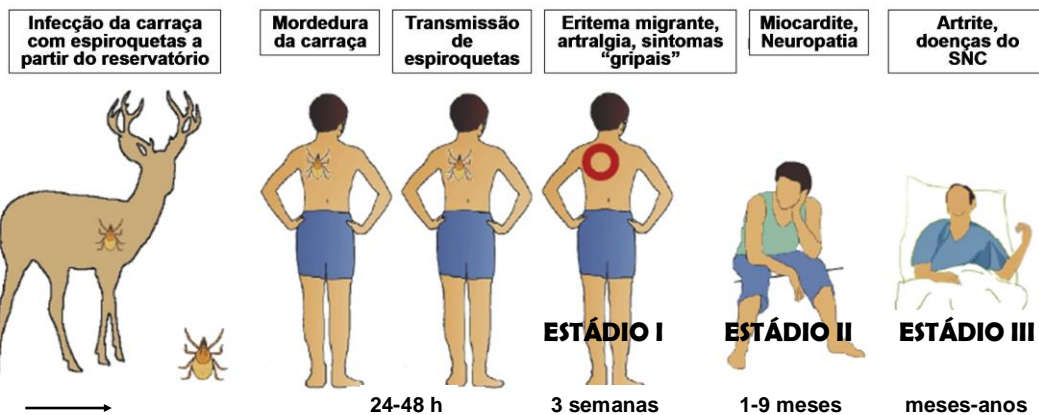


Figura 1.4 – Evolução da Borreliose de Lyme desde a infecção do vector até à infecção humana, onde se evidenciam diferentes manifestações clínicas no decurso das três fases evolutivas (adaptado de Krupka *et al.*, 2007 ⁵⁸).

1.5.1. ESTÁDIO I – INFEÇÃO LOCALIZADA (FASE AGUDA)

Este estágio inicia-se, em média, decorridos três a 32 dias após a mordedura do ixodídeo, com desenvolvimento de um exantema característico - **eritema migrante (EM)** ou “bull’s-eye rash” - nesse local da pele (em 60-80% das infecções); esta manifestação é quase sempre acompanhada de sintomas típicos de uma síndrome gripal com cefaleias, febre, rigidez da nuca, fadiga, mialgias e mal-estar geral ^{49,115,117}. O EM é caracterizado por ter um diâmetro superior a cinco centímetros, com o centro claro, dando um aspecto de um “alvo” ⁸⁶, e áreas vermelhas circulares ou elípticas que se espalham de forma centrífuga, reflectindo o movimento das espiroquetas através dos vasos linfáticos da pele ⁵⁰ (Fig. 1.5A).

A lesão e os sintomas associados resolvem-se, geralmente, sem recurso ao uso de antibióticos (ao fim de quatro a 12 semanas), sendo sempre importante o seu tratamento de modo a prevenir uma futura progressão da infecção para um estágio tardio ^{39,100,106}. Muitos doentes podem ainda apresentar lesões múltiplas, sugerindo disseminação das espiroquetas ⁵⁰. Esta manifestação é comum em todas as situações clínicas causadas por qualquer uma das espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. ⁹⁸, apesar de na Europa estar mais relacionada com infecções por *B. afzelii* ^{4,84,137}.

1.5.2. ESTÁDIO II – INFEÇÃO DISSEMINADA

Este estágio desenvolve-se semanas-a-meses após a ocorrência da mordedura, resultando em 50% dos casos de uma progressão do estágio I ^{35,115}, e caracteriza-se por fadiga e letargia constantes e sintomas sistémicos severos como, complicações

neurológicas (**neuroborreliose**) em 15% dos casos ^{50,86,102,138}, complicações articulares (**artrite de Lyme**) em 10%, complicações cardíacas (**cardite de Lyme**) em 0,3-4,0% ⁶³, complicações dermatológicas (**eritema múltiplo** e **linfocitoma borreliano**) e ainda complicações oculares ^{37,77}, apesar de menos frequentes.

A neuroborreliose pode ocorrer na forma de meningopolirradiculonevrite (em 85% dos casos) com paralisia facial periférica especialmente em crianças ¹²⁷ (Fig. 1.5B) - síndrome “Garin-Bujadoux-Bannwarth”. A cardite de Lyme é identificada e tratada em 90% destes doentes ¹⁶ mas, apesar de ser considerada a manifestação mais rara, é a maior causa de morte em doentes com BL ^{63,115}. Por seu turno, a artrite de Lyme envolve maioritariamente os joelhos e a articulação temporo-mandibular ⁷⁸.

Sabe-se também que algumas espécies patogénicas de *Borrelia* estão associadas a determinadas patologias ¹²¹, sendo disso exemplo a reconhecida associação entre a espécie *B. burgdorferi* s.s. e a artrite de Lyme, entre *B. afzelii* e as afecções dermatológicas e entre *B. garinii* e doenças do foro neurológico.

1.5.3. ESTÁDIO III – DOENÇA TARDIA (FASE CRÓNICA)

Esta fase ocorre meses-a-anos após a mordedura do ixodídeo vector, com desenvolvimento de manifestações crónicas que se mantêm de forma recorrente ou persistente, sendo elas: artrite de Lyme crónica mono ou oligoarticular envolvendo as grandes articulações como o joelho ⁷⁸ (Fig. 1.5C), geralmente causada por *B. burgdorferi* s.s.; alterações psiquiátricas, encefalomielite ou neuroborreliose crónica por *B. garinii* ¹²⁷; acrodermatite atrófica crónica (ACA) por *B. afzelii* ¹¹⁷ (Fig. 1.5D); linfocitoma borreliano no local da mordedura (comum na Europa) ou na orelha (Fig. 1.5E), mamilo, escroto ²⁶.



Figura 1.5 (A-E) – Exemplos das principais manifestações clínicas de Borreliose de Lyme. Eritema migrante (A); Paralisia facial periférica (B); Artrite de Lyme no joelho (C); Acrodermatite crónica atrófica (D); Linfocitoma borreliano na orelha (E) (adaptado de Nau *et al.*, 2009 ⁷⁹).

1.6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E TRATAMENTO

1.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico de BL é essencialmente clínico, baseando-se nas manifestações e sintomas associados, história clínica do doente, dados epidemiológicos, história de exposição/mordedura de carrças, sendo que o eritema migrante, considerado uma manifestação *major* da infecção pode, apesar disso, passar despercebido em alguns doentes que não chegam a desenvolvê-lo. Esta primeira abordagem clínica deve ser, posteriormente, complementada com a realização de testes laboratoriais (imunológicos) para pesquisa de anticorpos específicos, úteis em todas as manifestações clínicas excepto nos estádios iniciais de doença (EM e ACA) onde podem ocorrer resultados falso-negativos. Neste caso, a opção deve passar por uma abordagem molecular a qual permitirá a pesquisa directa de DNA borreliano, método mais sensível (57-86%) e 100% específico^{2,123}. No caso de neuroborreliose inicial ou tardia é ainda necessário, e até mesmo recomendável, a demonstração da produção de anticorpos intratectais³⁵.

1.6.2. TRATAMENTO

O tratamento de doentes com evidência de BL é muito importante no estágio inicial para prevenir futuras progressões da infecção. No entanto, como a maioria das infecções é assintomática ou limitada pelo próprio sistema imunitário do doente não chega a ser feito o diagnóstico e, por consequência, não é instituída terapêutica^{35,79}. Os antibióticos usados variam de País para País, sendo os mais comuns as penicilinas, cefalosporinas e tetraciclina. Deste modo, a doxiciclina ou amoxicilina são as normalmente administradas, e como alternativa utiliza-se cefuroxime axetil ou eritromicina. Nos casos de infecção inicial ou mesmo tardia é necessário recorrer ao ceftriaxone intravenoso ou a penicilina G, geralmente, sob internamento hospitalar¹².

1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Vários exames laboratoriais têm vindo a ser desenvolvidos e adaptados para complementarem o diagnóstico clínico de BL. Estes testes envolvem pesquisa indirecta de anticorpos anti-*Borrelia* spp. (**métodos imunológicos**) e/ou pesquisa directa de DNA borreliano (**métodos moleculares**).

1.7.1. MÉTODOS INDIRECTOS (IMUNOLÓGICOS)

A pesquisa de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. em amostras séricas ou de Líquido cefalo-raquidiano (LCR) realiza-se por uma abordagem “two-step” em todas as manifestações clínicas excepto, como anteriormente referido (ver ponto 1.5.1.) na fase inicial da doença (possibilidade de resultados falso-negativos), de acordo com as recomendações internacionalmente definidas por “World Health Organization” (WHO), “Center for Disease Control” (CDC), “European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis” (EUCALB) e “Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie” (DGHM). Assim, numa primeira avaliação, a amostra biológica é submetida a um “screening” (sensível mas não específico) através de testes como “Indirect Fluorescent Assay” (IFA), “Enzyme Immunoassay” (EIA) ou “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA). Um resultado duvidoso em IFA (título igual a 1:128) ou positivo (título igual ou superior a 1:256) é posteriormente confirmado (2ª avaliação) por “immunoblot” ou “Western blot” (WB), não sendo, geralmente, efectuado na ordem inversa^{2,22,75,88,112}. O WB é, assim, uma técnica mais sensível e específica (aumento da fiabilidade quatro semanas após a mordedura da carraça) do que os testes de “screening”, permitindo a detecção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. do tipo IgM e/ou IgG (os quais persistem durante meses a anos não induzindo imunidade)⁴⁹. No entanto, é de referir que os testes europeus diferem dos testes (homólogos) americanos, exigindo-se uma maior especificidade considerando as diversas espécies de *B. burgdorferi* s.l. circulantes na Europa⁴⁹.

Importa também ter presente que resultados falso-positivos podem também ocorrer devido a reacções cruzadas com outras patologias, tais como a mononucleose infecciosa, doenças auto-imunes (presença do factor reumatóide) e infecção por outras espiroquetas como *Treponema pallidum*, agente etiológico da sífilis^{12,69}.

1.7.2. MÉTODOS DIRECTOS (MOLECULARES)

A detecção directa de DNA borreliano (com origem em espiroquetas viáveis ou não viáveis) por “Polymerase Chain Reaction” (PCR)^{28,80,86,109} em amostras biológicas como sangue, líquido sinovial (>50% dos casos), biopsia (50-70% dos casos) ou LCR (20-30% dos casos) é utilizada no diagnóstico do estágio inicial de infecção (estádio I). É um teste relativamente rápido, sensível e específico, porém dispendioso.

Na detecção de DNA borreliano pode ser usado PCR convencional ou nested-PCR, utilizando oligonucleótidos (“primers”) baseados no gene ribossomal 16S, na região intergénica dos genes ribossomais 5S e 23S, entre outros⁹⁸. O nested-PCR favorece um aumento na sensibilidade e especificidade por envolver dois ciclos de amplificação de DNA e dois pares de “primers” específicos. Mais recentemente, têm vindo também a ser

desenvolvidos protocolos de PCR em tempo real, “microarrays” de DNA, “Reverse Transcriptase PCR” (RT-PCR), e alguns outros PCR’s com “primers” específicos para alvos diferentes (ex. gene da flagelina).

Técnicas como a microscopia de fundo escuro e a cultura em meio selectivo também permitem detectar directamente a presença de espiroquetas em amostras biológicas, mas não são usadas na rotina do laboratório, embora a cultura de biopsia de pele em lesões como o EM possa ser considerada “gold standard” no diagnóstico laboratorial detectando *B. burgdorferi* s.l. (viável) em 80% dos casos e sendo 100% específica^{2,14,82}.

Na genotipagem de espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. são usadas múltiplas técnicas, tais como “PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP). Nesta técnica o amplicão gerado por PCR é caracterizado por enzimas (endonucleases) de restrição e o padrão obtido (devido à variação na sequência de DNA) é posteriormente analisado. O amplicão correspondente à região intergénica rRNA 5S(*rrfA*)–23S(*rrlB*) é bastante usado na identificação de genoespécies de *Borrelia*, após ser sujeito a restrição enzimática por enzimas seleccionadas, como por exemplo a *MseI* isolada de espécies de *Micrococcus*^{90,98,131}.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AGENTES DO COMPLEXO *Borrelia burgdorferi* sensu lato

No presente trabalho, foi utilizado um total de seis estirpes de *B. burgdorferi* s.l., representativas de três espécies de reconhecido carácter patogénico, nomeadamente as estirpes Pbi (*B. garinii*), PGau (*B. afzelii*), B31 e VS219 (*B. burgdorferi* s.s.) e ainda as estirpes B102 e P37 correspondentes a isolados nacionais (humano e do vector) de *B. lusitaniae*. A selecção destas estirpes teve por base as características patogénicas, a origem geográfica e a natureza do material biológico a partir do qual foram isoladas (Anexos – Quadro suplementar 1).

2.2. MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O desenvolvimento *in vitro* das referidas estirpes teve como finalidade a preparação de antigénios monovalentes para a técnica de imunofluorescência indirecta (IFA) e controlos positivos nos diversos ensaios moleculares realizados (PCR, nested-PCR e RFLP).

A fim de se obterem culturas suficientemente densas (10^7 e 10^8 bactérias/mL) foram realizadas ‘passagens’, de estirpes conservadas a -70°C , em meio selectivo líquido BSK-H (SIGMA[®]). Em tubos estéreis com 5 mL de meio de cultura foram inoculadas 6-12 gotas (1

gota = 33 µL) de 'passagens' recentes de cada uma das estirpes com a densidade já referida. As culturas foram incubadas a 34°C.

Diariamente, foi avaliada a presença/ausência de crescimento bacteriano por observação macroscópica de cada tubo de cultura, com particular atenção à mudança de cor do meio (de vermelho para amarelo) o que é, geralmente, um indicador de crescimento bacteriano. Semanalmente, a presença de espiroquetas das estirpes cultivadas foi confirmada por observação em microscopia de fundo escuro (microscópio Zeiss® Axiotec e Olympus® BH-2). Os tubos de cultura onde se verificou crescimento bacteriano foram conservados a 4°C para posterior utilização nas diversas fases deste trabalho.

2.3. AMOSTRAS BIOLÓGICAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- **População Problema**

Para a avaliação imunológica e molecular utilizaram-se 166 amostras biológicas problema: 125 soros e 41 amostras de líquido cefalo-raquidiano (LCR) provenientes de 146 doentes com indicação clínica de Borreliose de Lyme, obtidas entre Janeiro de 2006 e Maio e 2009. Estas amostras deram entrada na ULBL/IHMT no referido período, no âmbito da prestação de serviços à Comunidade da referida Unidade, enquanto um dos laboratórios de referência no País para a referida patologia. Este material biológico faz, assim, parte da seroteca da Unidade. Todos os soros problema foram submetidos a uma avaliação integrada que incluiu testes directos (nested-PCR e PCR convencional) e indirectos (IFA e WB). Por sua vez, as amostras de LCR foram, igualmente, sujeitas aos testes mencionados à excepção do WB e do PCR convencional.

Paralelamente foram ainda analisados, embora só por um teste directo (nested-PCR), outros produtos biológicos de doentes com a mesma suspeita clínica, dos quais, porém, não se dispôs de informação clínico-epidemiológica: 24 amostras de sangue total (obtidas entre 2004 e 2009), seis amostras de líquido sinovial (2004 a 2006) e 34 biopsias de diversos tecidos, nomeadamente de pele e de músculo (2001 a 2008).

No âmbito deste trabalho foi também construída uma base de dados com a informação disponível nas fichas clínico-epidemiológicas (*Anexos – Quadro suplementar 2*) dos respectivos doentes. Porém, considerando a escassez da informação fornecida, assumiu-se como critério para a selecção das amostras a estudar a existência nas fichas de, pelo menos, um a dois parâmetros, como por exemplo a idade e origem rural/urbana do doente.

- **População Controlo**

A população controlo foi constituída por dois grupos: **o Grupo 1** que incluiu soros de doentes diagnosticados com outras espiroquetoses, nomeadamente Leptospirose (**L**) e

Sífilis (**S**), 14 de cada, sendo que desta última patologia não se teve acesso a quaisquer dados clínico-epidemiológicos; e o **Grupo 2** constituído por 22 soros de doadores de sangue, representantes da população saudável.

As amostras correspondentes a estes dois grupos controlo foram sujeitos, nas mesmas condições, aos testes de IFA, WB e nested-PCR.

2.4. DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Nesta abordagem diagnóstica os soros foram submetidos a uma avaliação “two-step”, de acordo com o que é internacionalmente recomendado, que consiste na realização da técnica de imunofluorescência indirecta (IFA) como teste de rastreio, sendo as amostras positivas (título $\geq 1:256$) e duvidosas (título 1:128) posteriormente confirmadas pelo teste de Western Blot (WB ou “immunoblot”).

2.4.1 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA (IFA)

O antigénio usado nas lâminas de IFA foi produzido no laboratório da ULBL, a partir de culturas das estirpes de referência Pbi (*B. garinii*), PGau (*B. afzelii*) e B102 (*B. lusitanae*), conforme anteriormente descrito (cfr.2.2). A preparação propriamente dita foi efectuada, segundo o método descrito em 1992, por Gill & Johnson ⁴⁴, com algumas alterações introduzidas pela equipa e adoptadas na prática diária do laboratório. Inicialmente, foram centrifugados 50 mL de cada uma das estirpes (com densidade $\geq 10^7$ bactérias/mL) a 15°C, 13000 rpm durante 25 min. O “pellet” foi ressuscitado em igual volume de tampão salino de sódio (PBS) 0,01 M (pH~7,2), com agitação no vortex. Fez-se uma segunda centrifugação a 15°C, 13000 rpm durante 20 min, e o “pellet” foi ressuscitado nas mesmas condições, seguindo-se uma terceira centrifugação a 10°C, 12000 rpm, durante 15 min. O “pellet” foi ressuscitado em 1 mL de tampão PBS 0,01 M (pH~7,2), com agitação no vortex, obtendo-se assim o lisado antigénico total.

Para a preparação das lâminas foi escolhida de entre diversas diluições (1:20; 1:40; 1:80; 1:100) do lisado total, a que melhor garantia uma distribuição homogénea do antigénio nas lâminas. Foi então preparada uma lâmina ‘teste’ com a diluição seleccionada e observou-se ao microscópio de fundo escuro (Fig. 2.1). Escolhida a diluição ideal (no caso 1:40), distribuíram-se 5 μ L da mesma (por poço) nas lâminas, deixando-as secar à temperatura ambiente. As lâminas foram depois colocadas numa tina com acetona durante 10 min (sob agitação), de modo a fixar o antigénio nos diversos poços, procedendo-se, de seguida, a duas lavagens com água destilada de 10 min cada, sob agitação. Foi preparado um total de 250 lâminas, de 10 e 15 poços, que se guardaram, devidamente acondicionadas a -20°C, para serem usadas no presente trabalho e na rotina do laboratório.

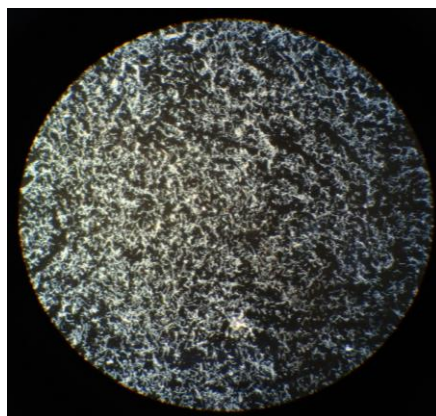


Figura 2.1 – Microfotografia de um poço numa lâmina preparada com lisado antigénico de *B. burgdorferi* s.l. (diluição 1:40). Observação a 200x num microscópio de fundo-escuro (fotografia original do autor).

Os soros problema e controlo (**Grupos 1 e 2**), conjuntamente com o controlo positivo, foram diluídos na razão 1:2 (1:32; 1:64; 1:128 e 1:256) numa microplaca em tampão PBS 0,01 M, e o controlo negativo diluído no mesmo tampão na razão 1:32. As amostras de LCR, e os respectivos controlos positivos, foram diluídas nas condições acima descritas mas na razão de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, à excepção do controlo negativo, que foi diluído apenas na razão 1:4.

Foram então aplicados 5 μ L/poço de cada uma das respectivas diluições de soro ou de LCR, nas lâminas revestidas com o antigénio. Os soros foram incubados a 37°C, durante 30 min numa câmara húmida, sendo depois lavadas duas vezes (10 min cada) com tampão PBS - 0,01 M, de modo a retirar o excesso de anticorpo não ligado. Entretanto, foi preparada, também em PBS, uma diluição de 1:40 do anticorpo secundário que é um conjugado fluorescente polivalente anti-humano IgA/IgG/IgM/kappa/Lambda, produzido em coelho (Dako[®]) e marcado com isotiocianato de fluoresceína. Aplicaram-se 4 μ L deste conjugado em cada poço da lâmina em questão, seguida de nova incubação nas condições anteriormente descritas. Procedeu-se a duas lavagens em PBS conforme procedimento anterior e, por último, água destilada.

A leitura das lâminas foi feita num microscópio de fluorescência (Motic[®]), num comprimento de onda entre 450 e 490 nm, utilizando a objectiva de imersão. Algumas observações microscópicas foram gravadas com recurso ao equipamento fotográfico “Moticam[®] 2300 3.0 MP” acoplado ao microscópio.

Se o soro a testar possuir anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l., estes vão reagir com o antigénio fixado na lâmina – reacção antigénio-anticorpo – sendo emitida fluorescência verde, como se exemplifica na Fig. 2.2.

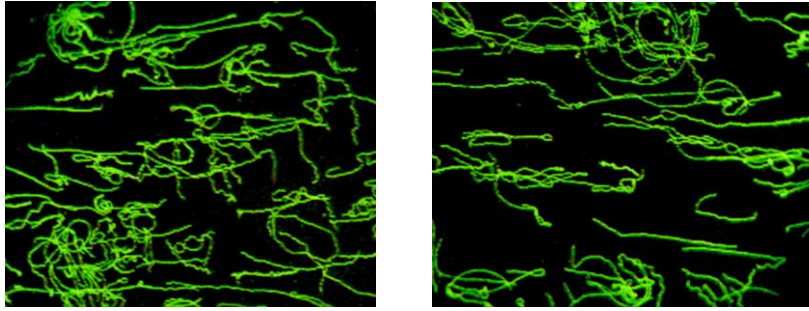


Figura 2.2 – Microfotografias exemplificando uma reacção de imunofluorescência positiva (ampliação 1000x) (fotografia original do autor).

O estudo imunológico foi desenvolvido a partir da diluição inicial de 1:32, tendo sido considerado como limiar de positividade (nos soros) um título igual ou superior a 1:256, comparativamente aos respectivos controlos (positivo e negativo). Um título igual a 1:128 foi considerado duvidoso, considerando-se negativo quando não foi observada fluorescência. Assim, os resultados foram expressos pelo título mais elevado dos soros diluídos para o qual a fluorescência foi, ainda, observada. O mesmo critério foi estabelecido para as amostras de LCR, considerando no entanto a diferença de diluição, sendo o limiar de positividade o título igual ou superior a 1:32, considerando-se duvidoso o título de 1:16.

2.4.2 TÉCNICA DE WESTERN BLOT (WB)

Os soros (positivos e duvidosos por IFA) foram submetidos a confirmação por WB, mediante a utilização de “kit’s” comerciais, “*recomLine Borrelia IgM*” e “*recomLine Borrelia IgG*”, ambos da Mikrogen®.

Estes testes indirectos qualitativos *in vitro* baseiam-se em antígenos recombinantes e altamente purificados (p100, VlsE, p58, p41, p39, OspA, OspC, p18) de *B. burgdorferi* s.s, *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. spielmanii*, aplicados numa membrana de nitrocelulose (Fig. 2.3) sob a forma de tiras (“blots”), as quais são incubadas com os soros problema. Se existirem anticorpos específicos, isto é, anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. ocorrerá uma reacção antígeno-anticorpo.

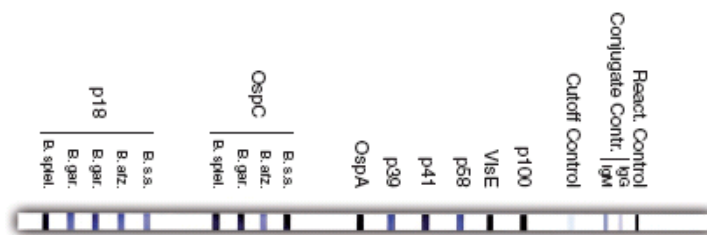


Figura 2.3 – Representação de um “blot” (membrana de nitrocelulose) com antígenos recombinantes purificados de *B. burgdorferi* s.l. usados em WB (Mikrogen®).

Os anticorpos que não se ligam aos antígenos são eliminados durante a lavagem das tiras, as quais são sujeitas a uma nova incubação, desta vez, com o anticorpo secundário, um conjugado anti-humano, imunoglobulinas do tipo M e do tipo G (IgM e IgG), ambos marcados com uma enzima (no caso, peroxidase). A visualização desta reacção é obtida através de uma solução de revelação que converte o substrato num precipitado cromogénico nos locais onde houve ligação específica antígeno-anticorpo.

A avaliação do teste foi feita por comparação da intensidade das bandas (fracções antigénicas) que mostraram reactividade específica com a do controlo “cut-off”, sendo o teste validado pela presença da banda controlo da reacção para os conjugados usados (IgM ou IgG). Apesar de se tratar de um teste qualitativo é possível, de acordo com os critérios fornecidos pelo fabricante do “kit” (*Anexos – Quadro suplementar 3*), atribuir um valor ‘quantitativo’ a cada uma das bandas reactivas evidenciadas nos “blots”, o qual é tanto mais elevado quanto a fracção antigénica em causa corresponda a proteínas consideradas *major* no diagnóstico de BL.

Um outro dado importante neste “kit” de WB, comparativamente a outros existentes no laboratório (não documentados no presente trabalho), é o facto de duas importantes fracções antigénicas (proteínas), OspC e p18, se encontrarem no mesmo “blot” de modo individualizado para algumas das principais espécies patogénicas de *B. burgdorferi* s.l. (**OspC** – *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*; e **p18** - *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* 1, *B. garinii* 2, *B. afzelii*, *B. spielmanii*), o que contribui para o incremento da sensibilidade do “kit”.

2.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.5.1. EXTRACÇÃO DE DNA

A extracção de DNA de estirpes representantes das diversas espécies de *B. burgdorferi* s.l. foi efectuada com recurso a um “kit” comercial “DNA Purification Protocol for 1-2 Million Cells” da Citogene®. Para extracção de DNA de fluidos biológicos humanos (sangue, soro, líquido cefalo-raquidiano e líquido sinovial) recorreu-se a outro “kit” comercial, o “DNA Purification Protocol for 100 µL Body Fluid” da Citogene®. O “kit” comercial “DNA Purification Protocol for 1-5 mg Solid Tissue”, também da Citogene®, foi usado para extrair o DNA de biopsias. Como controlos de extracção foi usada água ultra-pura em substituição das diversas amostras problema, igualmente submetida aos mesmos procedimentos.

2.5.2. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR NESTED-PCR

O DNA obtido através das extracções efectuadas, incluindo os controlos negativos, foi amplificado por nested-PCR com “primers” (oligonucleótidos) específicos para o espaço intergénico do rRNA 23S(*rrl*)-5S(*rrf*) de *B. burgdorferi* s.l. de acordo com o método descrito em Schwartz *et al.*, 1992¹¹⁰. A primeira amplificação dá origem a um fragmento com cerca de 380 pb e a segunda amplificação, a um outro de aproximadamente 230 pb (Fig. 2.4). Pretendeu-se com este procedimento testar a sensibilidade do nested-PCR e detectar a presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. nas amostras problema, contribuindo para o diagnóstico laboratorial directo de BL.

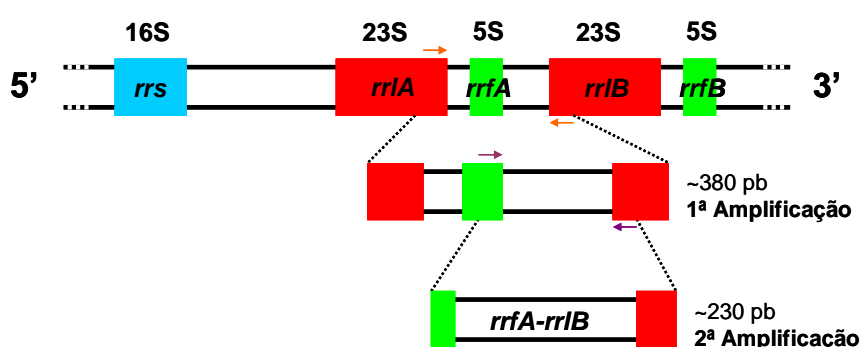


Figura 2.4 - Representação esquemática da amplificação da região intergénica 23S(*rrl*)-5S(*rrf*) por nested-PCR (esquema original do autor).

A sequência dos “primers” usados está descrita nos *Anexos – Tabela suplementar 1*. As concentrações finais de cada um dos reagentes usados estão indicadas no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 – Reagentes utilizados em nested-PCR.

Protocolo de Mix para nested-PCR com dois ciclos de amplificação		Fabricante
Mix da 1ª amplificação (25 µL)	Mix da 2ª amplificação (25 µL)	
H ₂ O ultra pura 1x Tampão PCR 2,5 mM MgCl ₂ 0,08 mM dNTP's 0,2 pmol/µL “primer” 1 (23SN1) 0,2 pmol/µL “primer” 2 (23SC1) 0,025 U/µL Taq DNA Polimerase 5 µL DNA “template”	H ₂ O ultra pura 1x Tampão PCR 2,5 mM MgCl ₂ 0,08 mM dNTP's 0,2 pmol/µL “primer” 3 (23SN2) 0,2 pmol/µL “primer” 4 (5SCB) 0,025 U/µL Taq DNA Polimerase 5 µL DNA “template”	VWR Bioline® Bioline® Bioline® MWG® MWG® Bioline®

Visando a validação da metodologia utilizada, foram também preparados dois controlos negativos, um por cada ciclo do nested-PCR, com substituição do DNA “template” por água ultra-pura, e um controlo positivo com DNA “template” de cultura de uma estirpe de *B. burgdorferi* s.l. Os procedimentos foram sempre efectuados em câmaras de fluxo laminar

distintas e separadas espacialmente, recorrendo a material esterilizado e micropipetas exclusivas às técnicas moleculares e ao uso de pontas com filtro. Todas as amplificações foram efectuadas num termociclador “MyCyCler Thermal Cycler” (Biorad®), de acordo com as condições indicadas no Quadro 2.2.

Quadro 2.2 – Condições de amplificação de nested-PCR.

Protocolo de condições para nested-PCR com dois ciclos de amplificação			
Condições da 1ª amplificação		Condições da 2ª amplificação	
1 ciclo	-Desnaturação inicial a 94,5°C, 1 min	1 ciclo	-Desnaturação inicial a 94,5°C, 5 min
25 ciclos	-Desnaturação a 94,0°C, 30 s	40 ciclos	-Desnaturação a 94,0°C, 30 s
	-Hibridação a 52,0°C, 30 s		-Hibridação a 55,0°C, 30 s
	-Extensão a 72,0°C, 1 min		-Extensão a 72,0°C, 1 min
1 ciclo	-Extensão final a 72,0°C, 5 min	1 ciclo	-Extensão final a 72,0°C, 5 min

A electroforese foi realizada em gel de agarose (Bioline®) 1,5% (p/v) em tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 1x, suplementado com 0,5 µg/mL de Brometo de Etídio (Biorad®), com uma voltagem constante de 125 V, durante 40 min, de modo a confirmar a presença/ausência de DNA. Foram aplicados 5 µL de cada um dos produtos amplificados (correspondentes às amostras problema e controlo, controlos positivos e negativos), diluídos com 5 µL de “Loading Buffer” (Biorad®), em cada um dos poços do gel. O marcador de massa molecular usado foi o “HyperLadder IV” da Bioline®. O gel foi fotografado sob radiação U.V. utilizando o equipamento de imagem “Dolphin-1D Gel Image Analysis Software” (Wealtec®). Os restantes 20 µL de produto amplificado foram devidamente acondicionados a -20°C para posteriores utilizações, nomeadamente a repetição dos ensaios para confirmação dos resultados obtidos.

2.5.3. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR CONVENCIONAL (PROTOS ALTERNATIVOS)

As amostras de soro e de LCR positivas por nested-PCR (*cfr.* 2.5.2) foram também submetidas a outros protocolos de PCR, de acordo com as condições descritas por Postic *et al.*, 1994⁹⁰ (**Protocolo A**) e Postic *et al.*, 2000⁹² (**Protocolo B**).

Esta abordagem foi efectuada como metodologia complementar para amplificação de DNA borreliano a utilizar posteriormente na técnica de PCR-RFLP para a identificação molecular dos produtos amplificados a par dos já amplificados por nested-PCR, de modo a assegurar-se o êxito do objectivo proposto (identificar as genoespécies de *B. burgdorferi* s.l., presentes nas amostras problema). Foram assim optimizados os referidos protocolos (A e B) recorrendo uma vez mais ao DNA extraído de estirpes de *B. burgdorferi* s.l. Complementarmente, foi ainda optimizado um terceiro protocolo de PCR (**Protocolo C**) que

resultou do ‘compromisso’ entre as condições de amplificação do protocolo A e da “mix” do protocolo B. As condições de PCR dos protocolos A, B e C estão indicadas no Quadro 2.3.

Quadro 2.3 – Descrição dos protocolos A, B e C de PCR.

Protocolo A (Postic et al., 1994⁹⁰)			
Mix (25 µL)		Condições de amplificação	
H ₂ O ultra pura	VWR®	1 ciclo	-Desnaturação inicial a 94,0°C, 5 min
1x Tampão PCR	Bioline®		-Desnaturação a 94,0°C, 1 min
1,5 mM MgCl ₂	Bioline®	30 ciclos	-Hibridação a 52,0°C, 1 min
0,2 mM dNTP's	Bioline®		-Extensão a 72,0°C, 2 min
1 pmol/µL “primer” int 1	MWG®	1 ciclo	-Extensão final a 72,0°C, 7 min
1 pmol/µL “primer” int 2	MWG®		
1,25 U/µL Taq DNA Polimerase	Bioline®		
5 µL DNA “template”			
Protocolo B (Postic et al., 2000⁹²)			
Mix (25 µL)		Condições de amplificação	
H ₂ O ultra pura	VWR®	1 ciclo	-Desnaturação inicial a 93,0°C, 3 min
1x Tampão PCR	Bioline®	20 ciclos	-Desnaturação a 93,0°C, 1 min
2 mM MgCl ₂	Bioline®		-Hibridação a 65,0°C, 2 min
2 mM dNTP's	Bioline®		-Extensão a 72,0°C, 2 min
1 pmol/µL “primer” int 1	MWG®	40 ciclos	-Desnaturação a 93,0°C, 1 min
1 pmol/µL “primer” int 2	MWG®		-Hibridação a 50,0°C, 2 min
0,01 pmol/µL “primer” SPA1	MWG®		-Extensão a 72,0°C, 2 min
0,01 pmol/µL “primer” SPA2	MWG®	1 ciclo	-Extensão final a 72,0°C, 7 min
1 U/µL Taq DNA Polimerase	Bioline®		
10 µL DNA “template”			
Protocolo C			
Mix (25 µL) (Postic et al., 2000⁹²)		Condições de amplificação (Postic et al., 1994⁹⁰)	
H ₂ O ultra pura	VWR®	1 ciclo	-Desnaturação inicial a 94,0°C, 5 min
1x Tampão PCR	Bioline®		-Desnaturação a 94,0°C, 1 min
2,5 mM MgCl ₂	Bioline®	30 ciclos	-Hibridação a 52,0°C, 1 min
2 mM dNTP's	Bioline®		-Extensão a 72,0°C, 2 min
1 pmol/µL “primer” int 1	MWG®	1 ciclo	-Extensão final a 72,0°C, 7 min
1 pmol/µL “primer” int 2	MWG®		
0,01 pmol/µL “primer” SPA1	MWG®		
0,01 pmol/µL “primer” SPA2	MWG®		
1 U/µL Taq DNA Polimerase	Bioline®		
10 µL DNA “template”			

As condições de electroforese em gel de agarose foram idênticas às descritas em 2.5.2. Os produtos amplificados foram posteriormente submetidos a genotipagem por PCR-RFLP.

2.6. GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Foram sujeitos a RFLP todos os produtos amplificados por nested-PCR e pelos diferentes PCR's (protocolo A, B e C), juntamente com os respectivos controlos positivos e negativos.

A técnica foi efectuada de acordo com a metodologia descrita por Postic e colaboradores em 2000⁹² e que, de forma sucinta, consiste na utilização de 10 µL de DNA que se submetem a restrição enzimática com 5 U/µL de *MseI* (Biolabs®), 100 µg/mL de BSA (Biolabs®) e 1x NE Buffer 4 (Biolabs®), num volume final de 25 µL, utilizando um banho térmico a 37°C, durante duas horas. A restrição do DNA com esta enzima produz um padrão característico de polimorfismos de dimensão, permitindo diferenciar geneticamente as diversas espécies de *Borrelia* spp.

Após o referido procedimento, cada uma das amostras foi sujeita a electroforese em gel de poliacrilamida (de 0,75 mm de espessura) que permitiu visualizar os referidos perfis de restrição. O gel de poliacrilamida é constituído por duas fases (Quadro 2.4), a de concentração (com 16% de acrilamida-bisacrilamida) e a de resolução (com 5% de acrilamida-bisacrilamida). Neste procedimento, as amostras são concentradas na 1ª fase do gel, sendo posteriormente separadas no gel de resolução com base na velocidade de migração e dimensão dos fragmentos.

Quadro 2.4 – Descrição da composição de cada gel (resolução e concentração) e o papel de cada reagente envolvido.

Reagentes	Gel de Resolução 16% V _f ~20 mL (n=2)	Gel de Concentração 5% V _f ~5 mL (n=2)
H ₂ O miliQ	9,9 mL	3,8 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 40% (19:1) (Biorad®)	8 mL	650 µL
TBE 10x	2 mL	500 µL
APS 10% (Biorad®)	150 µL	40 µL
TEMED (Biorad®)	17 µL	12 µL
Função dos reagentes utilizados		
Acrilamida-Bisacrilamida	Funciona como “cross-linker” na polimerização.	
APS (“ <u>A</u> mmonium <u>P</u> ersulfate”)	Peróxido catalisador (a reacção de polimerização da acrilamida é catalizada pela presença de radicais livres)	
TEMED (“N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine”)	Actua como iniciador da reacção de polimerização	

Após a colocação do primeiro gel (o de resolução) no respectivo suporte, adicionou-se isopropanol 100% para evitar o contacto do gel com o ar, garantindo a uniformidade da polimerização do mesmo, durante duas horas. No segundo gel (o de concentração) o contacto com o ar é evitado pela aplicação do pente, sendo a polimerização de uma hora. O pente foi depois retirado e o gel colocado numa tina de electroforese vertical “Mini-Protean II Cell” (Biorad®), à qual foi adicionado tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 1x (4°C). Cada poço do gel foi carregado com 10 µL do produto previamente digerido a que se adicionaram 3 µL de “loading buffer” (Biorad®). O marcador de massa molecular usado foi o “EZ Load 20 bp Molecular Ruler” (Biorad®). A electroforese foi realizada a uma voltagem constante de 100 V

durante 130 min. Terminada esta, o gel foi colocado num recipiente com uma solução corante (250 mL de TBE 1x e 12,5 µL brometo de etídio) durante 45 min, sendo depois fotografado sob radiação U.V. no equipamento de imagem anteriormente referido (cfr. 2.5.2).

2.7. TRATAMENTO DE DADOS

Para a apresentação dos resultados, e a melhor leitura dos mesmos, foram elaboradas tabelas e gráficos.

Sempre que considerado útil, foi avaliada a concordância entre os resultados obtidos nos diferentes testes utilizando o teste estatístico “kappa” (**k**), de acordo com o indicado no Quadro 2.5. Este teste é uma medida decimal que permite evidenciar a concordância existente entre dois testes distintos, especialmente na ausência de um padrão. Um valor de *k* igual ou superior a 0,81 indica que existe uma concordância favorável entre testes. O teste de Qui-quadrado (χ^2) foi usado para comparar variáveis qualitativas, sendo o nível de significância adoptado de $p < 0,05$. O cálculo destes dois testes foi efectuado pela utilização de um programa informático “Primer of Biostatistic, version 3.02” da “McGraw-Hill”.

Quadro 2.5 – Cálculo do teste “Kappa” de acordo com Thursfield (1990) ¹²⁰.

		Teste de referência	
		Positivo	Negativo
Teste em estudo	Positivo	a	b
	Negativo	c	d

a - verdadeiros positivos; b - falsos positivos;
c - falsos negativos; d - verdadeiros negativos

$$k = (a+d - P)/(1 - P); \text{ em que } P = (a+b)(a+c)+(c+d)(b+d)$$

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO PROBLEMA

Da análise das fichas clínico-epidemiológicas, que acompanham as amostras biológicas dos 146 doentes seleccionados para este estudo, ressaltou que os mesmos foram maioritariamente provenientes da região a Sul do Tejo, destacando-se os Hospitais do Espírito Santo de Évora (HESE) e de São Bernardo (HSB) em Setúbal que, no seu conjunto, contribuíram com cerca de 44% do total de amostras. Quanto aos Serviços de internamento verificou-se que, nos diversos hospitais, foram os Serviços de Medicina Interna (36,1%) e de Neurologia (15,1%) os que mais solicitaram o diagnóstico laboratorial como apoio ao diagnóstico clínico de Borreliose de Lyme. Estes resultados estão representados na Fig. 3.1.

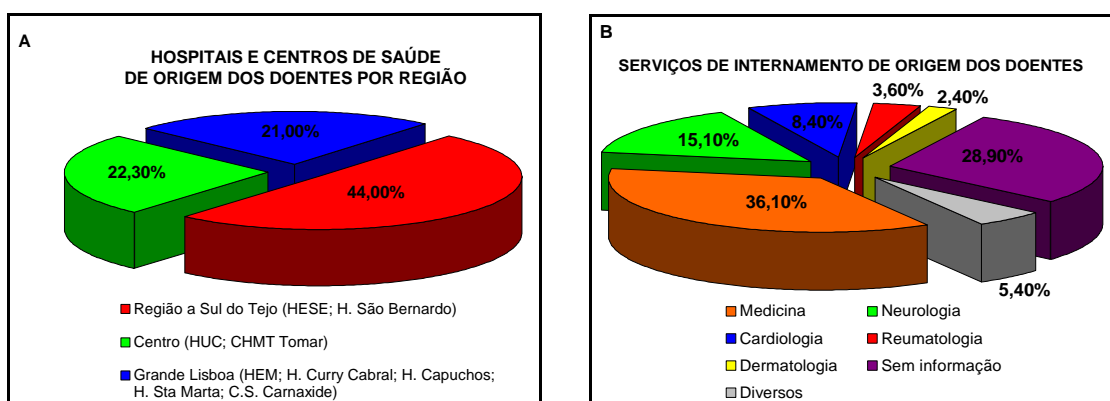


Figura 3.1 (A e B) – Representação gráfica da proveniência dos doentes de acordo com os Hospitais e Centros de Saúde por região (A) e respectivos Serviços de internamento (B). HESE - Hospital do Espírito Santo de Évora; H - Hospital; HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra; CHMT - Centro Hospitalar do Médio Tejo; HEM – Hospital Egas Moniz; CS – Centro Saúde.

No que respeita à distribuição por género e idade dos doentes, verificou-se um equilíbrio entre ambos - 74 mulheres e 72 homens - e uma média de idades situada nos 49 e 51 anos, respectivamente. Nas mulheres a idade esteve compreendida entre os 4 e os 88 anos e nos homens entre os 5 e os 95 anos. Infelizmente, o deficitário preenchimento das fichas clínico-epidemiológicas (*Anexos – Quadro suplementar 2*), apesar dos diversos apelos feitos nesse sentido às respectivas Instituições, não permitiu considerar outras importantes variáveis nomeadamente a referência a história de mordedura de carraça ou até ao tempo de evolução dos sintomas. Por consequência, não foi possível, face à ausência da referida informação clínica, conhecer com exactidão a fase evolutiva (precoce ou tardia) da maior parte das amostras estudadas.

3.2. ANÁLISE IMUNOLÓGICA DA AMOSTRA

3.2.1. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA (IFA)

A análise dos resultados por esta técnica foi realizada: *i*) considerando o número de doentes cujas amostras biológicas evidenciaram reactividade positiva ou duvidosa para *B. burgdorferi* s.l. obtida em, pelo menos, um dos três antigénios (Pbi de *B. garinii*, PGau de *B. afzelii* e B102 de *B. lusitaniae*) utilizados; *ii*) comparando a reactividade de cada doente (amostra) face aos diferentes antigénios utilizados mas de forma independente, o que permitiu aferir o valor diagnóstico de um antigénio em detrimento dos outros, conduzindo a resultados mais fidedignos, isto é, com menos falso positivos/negativos.

Assim, o resultado global, para o total de 125 soros de doentes clinicamente suspeitos de BL, revelou 44% de casos positivos (55⁺/125) e 21 soros (16,8%) com título considerado

duvidoso. No que respeita às amostras de LCR (n=41), também provenientes de doentes com a mesma indicação clínica, apenas uma amostra mostrou reactividade positiva (1⁺/41; 2,4%) por esta técnica. Relativamente à seroreactividade cumulativa (positiva e duvidosa) apresentada pela população controlo do **Grupo 1** (28 soros de doentes seropositivos para leptospirose e sífilis) obtiveram-se 6⁺/14 e 8⁺/14, respectivamente. Os soros controlo do **Grupo 2** (dadores de sangue) revelaram 7⁺/22, incluindo neste número também os soros com título considerado duvidoso. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Distribuição dos resultados globais (positivos, duvidosos e negativos) obtidos por IFA na população problema e controlo (Grupo 1 e 2).

Soros submetidos a IFA		N	Positivo (Título ≥1:256)		Duvidoso (Título 1:128)		Negativo	
			n	%	n	%	n	%
População problema (suspeita clínica de BL)		125	55	44,0	21	16,8	49	39,2
População controlo	Grupo 1 L (Leptospirose)	14	4	28,6	2	14,3	8	57,1
	Grupo 1 S (Sífilis)	14	7	50,0	1	7,1	6	42,9
	Grupo 2 (Dadores de sangue)	22	4	18,2	3	13,6	15	68,2

A análise da reactividade das amostras biológicas (soro ou LCR) de cada doente face aos três diferentes antígenos de *B. burgdorferi* s.l. utilizados permitiu aferir, de forma independente, a mesma amostra para cada um dos antígenos. Os resultados, no entanto, demonstraram uma reactividade semelhante entre eles (Tabela 3.2). Porém, uma apreciação mais detalhada revelou que o antígeno obtido da estirpe B102 (*B. lusitaniae*) foi o mais reactivo por parte dos soros da população problema com 64⁺/125 bem como nos da população controlo do **Grupo 1 S** (soros de doentes com sífilis) com 8⁺/14 reactivos. Em contrapartida, os soros da população controlo do **Grupo 1 L** (soros de doentes com leptospirose) mostraram uma maior reactividade para o antígeno da estirpe Pbi (*B. garinii*), enquanto os soros do **Grupo 2** (dadores de sangue) foram igualmente reactivos para os antígenos das estirpes Pbi (*B. garinii*) e PGau (*B. afzelii*).

Assim, a avaliação da seroreactividade da população problema vs a população controlo do **Grupo 2** mostrou existir uma diferença estatisticamente favorável à utilização da estirpe de *B. lusitaniae* (p=0,008), comparativamente às restantes estirpes utilizadas (Anexos – Tabela suplementar 2).

Tabela 3.2 – Distribuição dos resultados obtidos por IFA na população problema e população controlo (Grupo 1 e 2), por antigénio com base nas estirpes Pbi (*B. garinii*), PGau (*B. afzelii*) e B102 (*B. lusitaniae*).

Soros submetidos a IFA		Positivo/Estirpe (Título ≥1:256)						Duvidoso/Estirpe (Título 1:128)						Negativo/Estirpe						
		Pbi		PGau		B102		Pbi		PGau		B102		Pbi		PGau		B102		
N		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
População problema (suspeita clínica de BL)		125	44	35	37	30	45	36	12	10	18	14	19	15	69	55	70	56	61	49
População Controlo	Grupo 1 L (Leptospirose)	14	4	29	2	14	--	--	2	14	1	7	2	14	8	57	11	79	12	86
	Grupo 1 S (Sífilis)	14	6	43	6	43	7	50	--	--	--	--	1	7	8	57	8	57	6	43
	Grupo 2 (Dadores de sangue)	22	3	14	4	18	1	5	3	14	2	9	3	14	16	73	16	73	18	82

Nota: os valores mais elevados estão a negrito. Os valores correspondentes às percentagens (%) foram arredondados à unidade.

3.2.2. TÉCNICA DE WESTERN BLOT (WB)

Esta técnica foi utilizada para confirmar a seroreactividade (positiva e duvidosa) para *B. burgdorferi* s.l., indicada pelo rastreio levado a efeito por IFA nos soros problema e controlo, de acordo com os critérios internacionalmente recomendados. Considerando que a clínica é mandatória do diagnóstico de BL e que a ausência de reactividade específica no teste de rastreio pode não significar ausência de doença, avaliou-se também a possível reactividade, por WB, dos soros dados como negativos por IFA.

- Confirmação dos soros considerados positivos e duvidosos por IFA:

Dos 76 soros de doentes com suspeita clínica de BL (população problema) reactivos por IFA (76⁺/125; 60,8%) foram submetidos à técnica de WB apenas 62 (81,6%), por razões de ordem técnica (ex. escassez de volume). Destes, confirmou-se a seroreactividade em 38,7% com a seguinte distribuição face a cada um dos conjugados utilizados: n_{IgM}=9; n_{IgG}=11; n_{IgM,G}=4. No que diz respeito à reactividade obtida nos soros dos doentes com leptospirose e sífilis (**Grupo 1**), foi observado 1⁺/6 e 6⁺/8, respectivamente. Igualmente, os soros controlo do **Grupo 2** revelaram reactividade em 2⁺/7 amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Distribuição dos resultados confirmados por WB, em função do conjugado utilizado (IgM e IgG) na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada como seroreactiva por IFA.

Soros positivos/duvidosos por IFA com confirmação por WB		N	WB-IgM Positivo		WB-IgG Positivo		WB-IgM/IgG Positivo		TOTAL WB's Positivos	
			n	%	n	%	n	%	n	%
População problema (suspeita clínica de BL)		62	9	14,5	11	17,7	4	6,5	24	38,7
População controlo	Grupo 1 L (Leptospirose)	6	--	--	1	16,7	--	--	1	16,7
	Grupo 1 S (Sífilis)	8	4	50,0	2	25,0	--	--	6	75,0
	Grupo 2 (Dadores de sangue)	7	1	14,3	1	14,3	--	--	2	28,6

Para cada um dos testes WB-IgM ou -IgG positivos, analisaram-se as diversas combinações das fracções antigénicas presentes, verificando-se que nos soros problema o predomínio foi para a combinação constituída pelas fracções p41 e OspC, em ambos os testes WB, embora o teste -IgG tenha apresentado uma maior diversidade de combinações antigénicas, com destaque para a VlsE. Para o **Grupo 1**, nos soros de leptospirose a única combinação observada foi para as fracções OspA e OspC para -IgG, ao contrário dos soros de sífilis, onde a presença da combinação p41 e OspC predominou em ambos os testes de WB. No **Grupo 2** (dadores de sangue) a OspC foi o antigénio dominante nos dois testes. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Distribuição das combinações de fracções antigénicas detectadas contra *B. burgdorferi* s.l. em cada teste WB-IgM e -IgG positivos, na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada previamente como seroreactiva por IFA.

Fracções antigénicas específicas de <i>B. burgdorferi</i> s.l. presentes no "kit" de WB	População problema (suspeita clínica de BL)		População controlo					
			Grupo 1 L (Leptospirose)		Grupo 1 S (Sífilis)		Grupo 2 (Dadores de sangue)	
	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo
p41, OspC	10	5	--	--	3	2	--	1
p41, p100	3	1	--	--	1	--	--	--
p41, VlsE, OspA, OspC	--	2	--	--	--	--	--	--
p41, VlsE	--	1	--	--	--	--	--	--
p41, OspC, p18	--	1	--	--	--	--	--	--
p100, VlsE, p41, p18	--	3	--	--	--	--	--	--
p100, VlsE, p41, p18, p58, p39	--	1	--	--	--	--	--	--
p100, VlsE, p41, p18, p58, p39, OspC	--	1	--	--	--	--	--	--
OspA, OspC	--	--	--	1	--	--	--	--
OspC	--	--	--	--	--	--	1	--

Face à particularidade do “kit” de WB, adoptado no presente estudo, incluir duas fracções antigénicas - OspC e p18 – individualmente dirigidas, isto é, específicas para algumas espécies de *B. burgdorferi* s.l., foi possível avaliar, de modo presuntivo, os soros dos doentes problema anteriormente confirmados como positivos, agora quanto às referidas espécies, conforme indicado na Tabela 3.5 (A e B).

Deste modo, tornou-se evidente, na população problema, o predomínio de reactividade contra a **OspC** de *B. afzelii* no teste WB-IgM, enquanto que no teste -IgG essa reactividade foi partilhada, equitativamente, por *B. garinii* e *B. spielmanii*. Analisando estatisticamente o resultado da reactividade da fracção antigénica OspC contra as diversas espécies, verificou-se existir uma diferença significativa entre elas ao comparar as frequências obtidas com o conjugado WB-IgM ($p=0,004$), enquanto que no caso do -IgG a diferença não foi significativa ($p=0,173$) (Anexos – Tabela suplementar 3).

Quanto à reactividade demonstrada contra o antigénio **p18** no teste WB-IgG, o predomínio foi de *B. afzelii*, verificando-se existir uma diferença significativa quando se compararam as frequências obtidas ($p=0,011$) pelas diversas espécies (Anexos – Tabela suplementar 4).

Tabela 3.5 (A e B) – Distribuição dos doentes da população problema (indicados como seroreactivos por IFA) que foram positivos nos testes WB-IgM e -IgG para as fracções antigénicas OspC (A) e p18 (B), analisados segundo a divisão por espécie de *B. burgdorferi* s.l. destes antigénios.

A OspC/espécie	Doentes positivos por WB-IgM (doentes positivos/duvidosos por IFA)										Doentes positivos por WB-IgG (doentes positivos/duvidosos por IFA)								
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	b	l	m	h	n	o	j	p
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	-	-	-	+	±	-	±	+	±	-	-	±	-	-	±	±	±	±	±
<i>B. garinii</i>	±	-	-	+	+	±	±	+	+	-	+	±	-	-	+	±	+	±	+
<i>B. afzelii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	±	±	+	+	±
<i>B. spielmanii</i>	±	-	-	+	+	±	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	±	±	±

B p18/espécie	Doentes positivos por WB-IgG (doentes positivos/duvidosos por IFA)					
	q	r	s	n	p	t
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	-	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> 1	+	+	±	+	+	±
<i>B. garinii</i> 2	±	±	±	-	+	±
<i>B. afzelii</i>	+	+	+	-	+	+
<i>B. spielmanii</i>	-	-	-	+	±	-

- Confirmação dos soros considerados negativos por IFA:

Dos 49 soros de doentes com suspeita clínica de BL (população problema) não reactivos por IFA (49/125; 39,2%) somente 16 (32,7%) foram sujeitos à técnica WB, dos quais cinco

foram positivos (31,3%) para um dos conjugados ($n_{IgM}=1$; $n_{IgG}=3$) ou para os dois ($n_{IgM,G}=1$). No que diz respeito aos soros de leptospirose (**Grupo 1 L**) não reactivos por IFA, o teste de WB permitiu confirmar quatro positivos (4⁺/8). Dos soros controlo do **Grupo 2** apenas um apresentou reactividade (1⁺/15). Todos os resultados estão apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Distribuição dos resultados confirmados por WB, em função do conjugado utilizado (IgM e IgG) na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada como não reactiva por IFA.

Soros negativos para IFA com confirmação por WB		N	WB-IgM Positivo		WB-IgG Positivo		WB-IgM/G Positivo		TOTAL WB's Positivos	
			n	%	n	%	n	%	n	%
População problema (suspeita clínica de BL)		16	1	6,3	3	18,8	1	6,3	5	31,3
População controlo	Grupo 1 L (Leptospirose)	8	2	25,0	2	25,0	--	--	4	50,0
	Grupo 1 S (Sífilis)	6	--	--	--	--	--	--	--	--
	Grupo 2 (Dadores de sangue)	15	--	--	1	6,7	--	--	1	6,7

Para cada um dos testes WB-IgM ou -IgG positivos, à semelhança do que foi feito anteriormente, analisaram-se também as diversas combinações das fracções antigénicas reactivas, tendo-se observado que nos soros problema a combinação predominante foi constituída pelas fracções antigénicas p41 e OspC no WB-IgM, enquanto que no teste -IgG o número de combinações reactivas foi maior, com destaque para a VlsE. Para o **Grupo 1 L**, a única combinação observada correspondeu aos antígenos p41 e p18 para WB-IgG. No **Grupo 2** (dadores de sangue) predominou a combinação p41 e p100 no teste -IgG (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Distribuição das combinações de fracções antigénicas detectadas contra *B. burgdorferi* s.l. por cada teste WB-IgM ou -IgG positivos, na população problema e controlo (Grupo 1 e 2) indicada como não reactiva por IFA.

Fracções antigénicas específicas de <i>B. burgdorferi</i> s.l. presentes no "kit" de WB	População problema (suspeita clínica de BL)		População controlo			
	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo	Grupo 1 L (Leptospirose)		Grupo 2 (Dadores de sangue)	
	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo	WB-IgM Positivo	WB-IgG Positivo
p41, OspC	2	1	--	--	1	--
p41, p100	--	--	--	--	1	2
p41, OspA, OspC	--	1	--	--	--	--
p41, VlsE, OspC, p39, p18	--	1	--	--	--	--
p41, p18	--	--	--	1	--	--
p41, VlsE	--	1	--	--	--	--

A presença das já referidas fracções antigénicas, OspC e p18, dirigidas especificamente para algumas espécies de *B. burgdorferi* s.l., foram também avaliados, de modo presuntivo, quanto às referidas espécies, os soros positivos de doentes problema anteriormente confirmados, conforme indicado na Tabela 3.8 (A e B). Assim, observou-se no WB-IgM o predomínio de reactividade contra a OspC de *B. afzelii*, enquanto que para o teste -IgG foi, maioritariamente, a espécie *B. garinii* a mais reactiva. No único doente reactivo contra o antígeno p18 no -IgG, a espécie associada foi *B. burgdorferi* s.s.

Tabela 3.8 – Distribuição dos doentes da população problema (indicados como não reactivos por IFA) positivos por WB-IgM e -IgG para as fracções antigénicas OspC observadas segundo a divisão por espécie de *B. burgdorferi* s.l.

OspC/ espécie	Doentes positivos por WB-IgM (doentes negativos por IFA)			Doentes positivos por WB-IgG (doentes negativos por IFA)		
	u	v	x	u	y	v
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	±	+	+	±	±	+
<i>B. garinii</i>	±	+	+	+	+	+
<i>B. afzelii</i>	+	+	+	±	±	+
<i>B. spielmanii</i>	±	+	+	±	+	+

3.3. ANÁLISE MOLECULAR DA AMOSTRA

3.3.1. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR NESTED-PCR

Antes de se dar início à pesquisa de DNA de *B. burgdorferi* s.l. nas amostras biológicas em estudo, efectuou-se um estudo preliminar para determinar a sensibilidade da técnica (nested-PCR), tendo sido utilizadas diluições seriadas de estirpes de *B. garinii* e de *B. lusitanae* (Fig. 3.2). Os resultados da amplificação de DNA específico mostrou que o limite de sensibilidade da técnica foi 10^2 bactérias/mL, embora só tenham sido detectados os dois amplicões esperados (230 pb e 380 pb) até à concentração de 10^4 bactérias/mL.

Após este ensaio preliminar as amostras problema (soros, LCR, biopsias, líquido sinovial e sangue total) e os soros provenientes da população controlo (**Grupo 1 e 2**) foram então submetidas a uma avaliação molecular pela referida técnica. Verificou-se que no total de 146 doentes com suspeita clínica de BL houve positividade nas amostras biológicas de 25 dos mesmos, com a seguinte distribuição: 20 soros (20⁺/125; 16,0%) e em cinco amostras de LCR (5⁺/41; 12,2%). Os outros produtos biológicos (biopsias, líquido sinovial e sangue total), com análoga indicação clínica, não evidenciaram positividade em nenhuma amostra avaliada. Quanto à população controlo, não se verificou amplificação de DNA borreliano nas amostras do **Grupo 1** (soros de leptospirose e de sífilis), ao contrário das do **Grupo 2** onde foi confirmada a presença de DNA específico numa das amostra (1⁺/22).

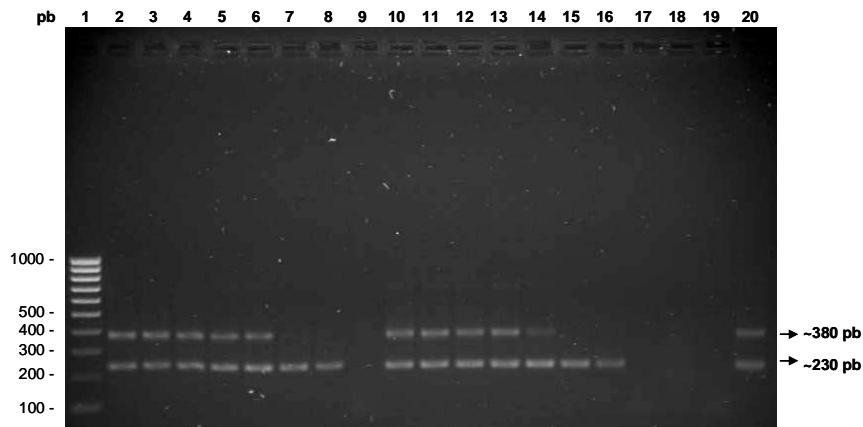


Figura 3.2 – Representação da sensibilidade da técnica de nested-PCR do espaço intergénico do rRNA 23S(*rrl*)-5S(*rrf*) de *B. burgdorferi* s.l. a partir de diluições seriadas de culturas de estirpes seleccionadas de *B. lusitaniae* e de *B. garinii*. Legenda: marcador de massa molecular 100 pb (poço 1); diluições de cultura (10^8 a 10 bactérias/mL) - *B. lusitaniae* (poços 2-9); diluições de cultura (10^8 a 10 bactérias/mL) - *B. garinii* (poços 10-17); controlo negativo de extracção de DNA (poço 18); controlo negativo de PCR (poço 19); controlo positivo com DNA de cultura de *Borrelia* spp. (poço 20).

De acordo com os resultados obtidos para os 20 soros problema positivos por nested-PCR e os níveis de sensibilidade estimados, 80% apresentavam uma concentração entre 10^3 e 10^2 bactérias/mL (poços 3, 6, 7, 10 e 13 da Fig. 3.3), seguido de 10% com uma concentração aproximadamente de 10^4 bactérias/mL e 10% $\geq 10^6$ bactérias/mL (poço 11 da Fig. 3.3). Das cinco amostras de LCR onde foi detectada a presença de DNA borreliano, 80% apresentaram também uma concentração entre 10^3 e 10^2 bactérias/mL enquanto que 20% apresentou um limiar entre 10^2 e 10 bactérias/mL. Da população controlo do **Grupo 2**, a concentração estimada, na única amostra positiva, foi aproximadamente de 10^4 bactérias/mL.

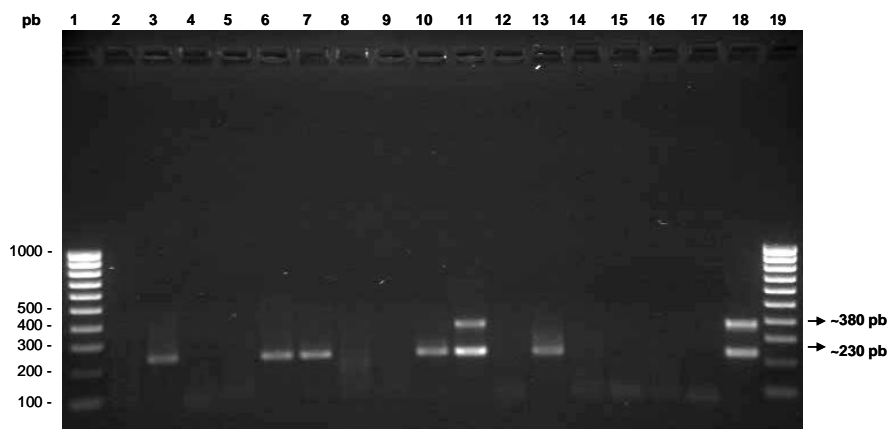


Figura 3.3 - Exemplo de amplificação de DNA por nested-PCR do espaço intergénico do rRNA 23S(*rrl*)-5S(*rrf*) de *B. burgdorferi* s.l. em amostras biológicas problema. Legenda: marcador de massa molecular 100 pb (poços 1 e 19); amostras de soros (poços 2-14); controlo negativo de extracção de DNA (poço 15); controlo negativo do primeiro ciclo de PCR (poço 16); controlo negativo do segundo ciclo de PCR (poço 17); controlo positivo com DNA de *Borrelia* spp. (poço 18).

3.3.2. GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP

Todas as amostras biológicas (soro e LCR) amplificadas por nested-PCR foram submetidas a genotipagem por RFLP, de modo a identificar as genoespécies prevalentes na população estudada (Fig. 3.4). Para o efeito, os resultados obtidos foram comparados com os padrões correspondentes a estirpes de referência que se encontram identificados na Tabela 3.9.

Assim, para os soros problema com DNA borreliano (n=20), foram identificados 11 (55%) genoespécies de *B. garinii* (padrão B), quatro (20%) de *B. afzelii* (padrão C), três (15%) de *B. lusitaniae* (padrão D) e duas (10%) de *B. burgdorferi* s.s. (padrão A). Para as amostras de LCR, igualmente positivas por nested-PCR (n=5), só foi possível realizar a identificação molecular em dois dos produtos amplificados, cuja identificação mostrou pertencerem um à genoespécie *B. garinii* (padrão B) e o outro a *B. afzelii* (padrão C). A análise global destes resultados correspondentes aos polimorfismos identificados mostrou a existência de uma diferença, com significado estatístico, entre as diversas genoespécies ($p=0,003$) (Anexos – Tabela suplementar 5).

No que respeita ao produto amplificado na única amostra positiva do **Grupo 2** não foi possível identificar a correspondente genoespécie. Quanto à utilização de RFLP nas amostras de soro e de LCR amplificadas por PCR convencional (protocolos A, B e C) também não foi possível a identificação das genoespécies (resultados não apresentados no presente trabalho).

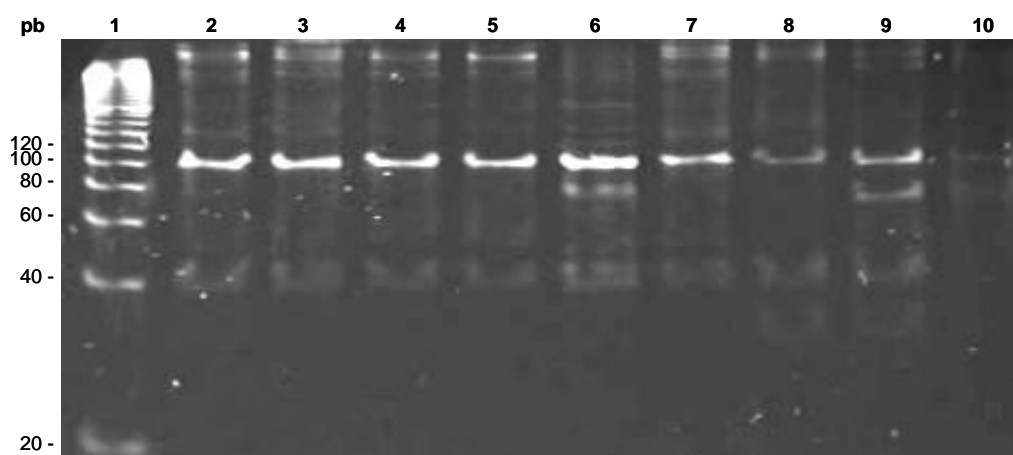


Figura 3.4 - Exemplo de padrões de restrição com enzima *MseI* do fragmento correspondente à região intergénica *rrl-rrf* de *B. burgdorferi* s.l., amplificado por nested-PCR, em diferentes soros problema. Legenda: marcador de massa molecular 20 pb (1); soro com padrão B (poços 2-5 e 7); soro com padrão C (poço 6); soro com padrão A (poço 8); soro com padrão D (poço 9); soro com padrão indeterminado (poço 10). Os fragmentos de dimensões mais reduzidas não se distinguem no gel mas a sua dimensão exacta foi determinada a partir das sequências (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Padrões de restrição gerados pela enzima *MseI* correspondentes ao fragmento da região intergénica *rrl-rrf* do complexo *B. burgdorferi* s.l. amplificada por nested-PCR.

Genospecie	Estirpe	Origem	Amplicação (pb)	Fragmentos gerados por restrição com <i>MseI</i> (pb)	Número de acesso GenBank (<i>rrf-rrl</i>)	Padrão de RFLP
<i>B. burgdorferi</i> s.s	B31	<i>I. scapularis</i> (EUA)	228	95, 38 (x2), 29, 28	L30127	A
	VS219	Humana (França)	228	95, 38 (x2), 29, 28	AY032919	A
<i>B. garinii</i>	Pbi	Humana (Áustria)	227	95 (x2), 37	Z77175	B
<i>B. afzelii</i>	PGau	Humana (Alemanha)	220	95, 68, 37, 20	DQ111066	C
<i>B. lusitaniae</i>	PoHL1	Humana (Portugal)	230	95, 67, 39, 29	AY209179	D
<i>B. valaisiana</i>	PoTiBV6	<i>I. ricinus</i> (Portugal)	219	161, 37, 14, 7	AY463165	E
<i>B. japonica</i>	Cow611C	<i>I. ovatus</i> (Japão)	210	95, 78, 37	L30125	F

3.4. ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS MOLECULARES COM OS IMUNOLÓGICOS

Por último, foram comparados os resultados obtidos pelos diversos métodos (directos e indirectos) utilizados no decurso deste trabalho com vista a estabelecer o diagnóstico laboratorial da população problema com indicação clínica de Borreliose de Lyme.

Assim, os soros (n=20) nos quais se detectou DNA de *B. burgdorferi* s.l., por nested-PCR, foram avaliados considerando os respectivos resultados fornecidos pelas técnicas imunológicas tendo-se verificado que a técnica IFA foi capaz de fornecer uma prévia indicação de positividade em 75% dos mesmos (15⁺/20) e destes, onze foram positivos por WB (n_{IgM}=4; n_{IgG}=5; n_{IgM,G}=2). Por outro lado, também se verificou que dos soros negativos por IFA (5⁻/20), a técnica de WB permitiu identificar um caso positivo com reactividade IgG. Na Fig. 3.5, mostra-se ainda a distribuição das genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. identificadas por RFLP e presentes nas amostras dos doentes onde foi detectada a presença de DNA específico.

Dos resultados obtidos nos testes nested-PCR e WB (em amostras dos mesmos doentes) concluiu-se também existir uma concordância entre ambas as abordagens diagnósticas traduzida por um valor *k* de 0,98¹²⁰ (Anexos – Tabela suplementar 6).

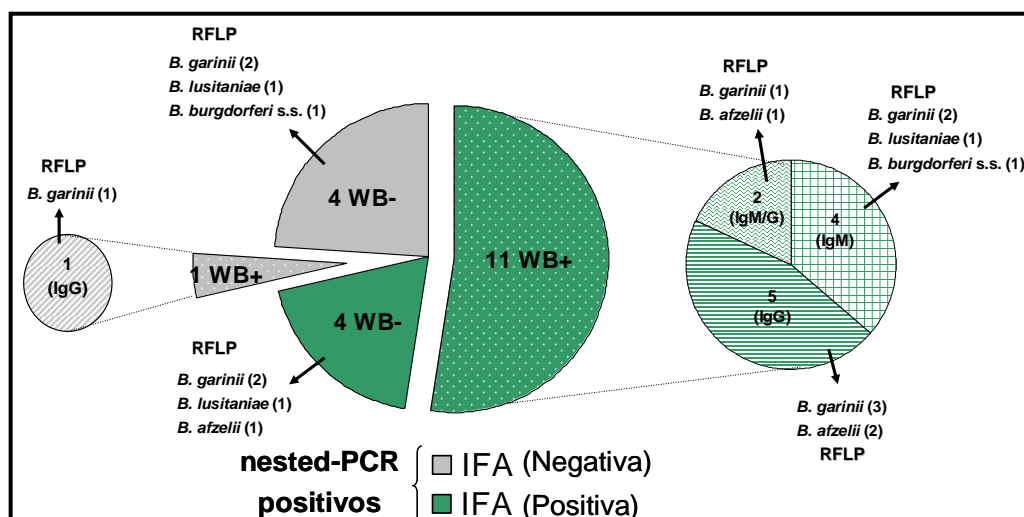


Figura 3.5 - Representação gráfica resultante da comparação dos resultados positivos obtidos pelas técnicas moleculares (nested-PCR e RFLP) e os respectivos resultados pelas técnicas imunológicas (IFA e WB).

Considerados os resultados fornecidos através de todas as técnicas utilizadas importa ainda referir que foram identificados quatro soros **positivos** por WB de doentes considerados **negativos** por IFA e nested-PCR e, em contrapartida, 13 outros soros igualmente **negativos** por IFA foram **positivos** por WB e nested-PCR. Esta última técnica permitiu também, e de forma exclusiva, identificar DNA específico em cinco amostras de LCR.

Assim, da integração de todos os resultados (imunológicos e/ou moleculares) resultou o diagnóstico laboratorial em 29% (42⁺/146) dos doentes da população problema sobre a qual recaía a suspeita clínica de Borreliose de Lyme.

4. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em Portugal, nos últimos anos, o interesse pela Borreliose de Lyme tem vindo a aumentar, em parte devido à diversidade de características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais apresentadas, as quais constituem um permanente desafio tanto para a comunidade médica como para os investigadores; ambos na busca da necessária e prioritária clarificação de que carece enquanto entidade clínica presente na nossa população.

Desta forma, a realização do presente trabalho procurou contribuir para um maior grau de conhecimento desta doença, das genoespécies de *B. burgdorferi* s.l. circulantes na população portuguesa e a respectiva resposta imunológica. Consequentemente, foram optimizadas e comparadas técnicas de diagnóstico laboratorial, a par da integração de (novos) dados.

No entanto, importa salientar que este trabalho foi confrontado, no seu decurso, com algumas limitações decorrentes da impossibilidade de enquadrar, como desejável, os diversos dados relativos aos doentes e que são solicitados nas fichas clínico-epidemiológicas para BL. Exemplos desses, nomeadamente, a indicação da ocorrência de mordedura de carraça, a residência em espaço rural ou urbano, sinais e sintomas clínicos compatíveis com BL, a indicação da evolução da doença, entre outros critérios, imprescindíveis para uma melhor e mais consequente interpretação dos dados laboratoriais obtidos. Por consequência, face à ausência da referida informação clínica, não foi possível caracterizar na íntegra a amostra populacional problema em relação às referidas variáveis em particular no contexto das manifestações clínicas *versus* fase evolutiva (precoce ou tardia). No que respeita aos dadores de sangue, naturalmente por imperativos éticos todos os dados são anónimos.

Assim, e do ponto de vista sócio-demográfico, a análise efectuada na população problema, mesmo considerando tratar-se de uma amostra reduzida, identificou como principais áreas de residência destes doentes a região a sul do Tejo e a região Centro, com particular enfoque para as zonas rurais (indicações não apresentadas neste trabalho). Dos dados disponíveis, verificou-se também que a distribuição dos doentes referenciados para diagnóstico laboratorial de BL foi equitativa quanto ao género e que a maioria dos doentes se encontra em idade activa.

Inicialmente, no contexto do laboratório, a população em estudo - problema e controlo - foi sujeita a um **rastreio imunológico** efectuado por Imunofluorescência Indirecta (IFA). Verificou-se que para cada uma das populações não houve, globalmente, uma diferença significativa entre o uso de um dos três antígenos obtidos de estirpes de *B. garinii* (Pbi), *B. afzelii* (PGau) e de *B. lusitaniae* (B102) uma vez que a reactividade evidenciada para cada um deles foi muito semelhante. No entanto, ao comparar-se a população problema vs população controlo do **Grupo 2** (dadores de sangue), face aos três antígenos, foi verificado que a estirpe obtida de *B. lusitaniae* mostrou ser mais reactiva, comparativamente às outras espécies do género *Borrelia*. Desta observação podem inferir-se dois aspectos: *i*) o facto da espécie *B. lusitaniae* ter uma distribuição no País com um significado epidemiológico que importa considerar, como já salientado em estudos anteriores efectuados no vector que mostraram taxas muito significativas de infecção por esta mesma espécie⁶, demonstrando o risco que pode constituir a exposição accidental da população às espiroquetas da referida espécie; *ii*) importa considerar a inclusão de estirpes desta espécie (isolados nacionais) como 'alvo' antigénico dos testes laboratoriais, nomeadamente ao nível do rastreio (IFA), pelo contributo que poderá dar à sensibilidade do teste.

Em relação às amostras de LCR testadas pela IFA confirmou-se, utilizando os três diferentes antígenos, que não é fácil evidenciar reactividade por esta técnica, sendo sempre aconselhável dispor simultaneamente de uma amostra sérica do mesmo doente, de forma a fazer uma avaliação conjunta dos anticorpos intratecais (IgM e IgG) envolvidos. Deste modo, torna-se indispensável a informação prévia (hospitalar) de outros parâmetros analíticos, tais como as concentrações sanguíneas de albumina e das IgM, G e A. Porém, face à ausência destes elementos mantém-se relevante a utilização deste fluido orgânico no diagnóstico por métodos directos como o nested-PCR.

Ainda no que respeita à seroreactividade revelada pela IFA na população controlo (**Grupo 1 e 2**), no âmbito geral, os resultados foram os expectáveis, uma vez que esta técnica não é 100% específica para *B. burgdorferi* s.l., como já referido em estudos anteriores²⁵, em parte devido às reacções-cruzadas com outras patologias, nomeadamente as auto-imunes, mononucleose infecciosa e ainda as causadas por outras espiroquetas de importância médicas como as dos géneros *Treponema* e *Leptospira*, agentes etiológicos de sífilis e de leptospirose, respectivamente.

Outra **técnica imunológica** utilizada foi o Western blot (**WB**) para confirmação da reactividade (positiva e duvidosa) da população problema e controlo indicada pelo rastreio por IFA. Observou-se que mais de 50% dos soros problema considerados como reactivos pela técnica de rastreio não obtiveram a confirmação da referida reactividade por WB. Uma possível explicação para este facto está ligada, como anteriormente referido, à presença de reacções-cruzadas com outras patologias de que a IFA não está isenta. Relativamente à população controlo (**Grupo 1 e 2**), reactiva pela imunofluorescência, verificou-se que o WB veio confirmar o carácter positivo de algumas destas amostras indicando que: **i)** podem ter tido contacto com o(s) vector(s) responsáveis pela transmissão dos agentes causais da BL, independentemente do respectivo estatuto (doentes das referidas patologias e dadores de sangue), ocasionando a produção de anticorpos anti-*Borrelia* spp., facto que pode ter ocorrido simultaneamente com as outras situações clínicas. Porém, esta é apenas uma hipótese de explicação dado não ter sido possível aceder à respectiva informação clínico-epidemiológica dos envolvidos; **ii)** a concepção do próprio “kit” usado no WB que, apesar de constituir o teste confirmatório por excelência, não é (ainda) totalmente específico para BL, o que permite uma margem de incerteza apesar do avanço tecnológico de que se reveste na actualidade, nomeadamente a integração de um número considerável de fracções antigénicas recombinantes e altamente específicas dentro do complexo *B. burgdorferi* s.l.; **iii)** a presença de reacção-cruzada de antígenos ‘residuais’ comuns a outras espiroquetas que se encontram no mesmo grupo filogenético do género *Borrelia*.

De acordo com todas estas hipóteses, os resultados obtidos pelos representantes do **Grupo 1** parecem indicar que o agente da sífilis está mais 'próximo' do complexo *B. burgdorferi* s.l., uma vez que foram confirmadas 75% das amostras por WB. Quanto aos dadores de sangue (**Grupo 2**), a confirmação de 9% dos mesmos, como positivos, vem demonstrar que na realidade não se pode excluir, pelas razões já apresentadas, a ocorrência de um eventual contacto com o(s) agente(s) de BL, mesmo tratando-se de indivíduos considerados 'teoricamente' saudáveis, aos quais não se realiza um exame microbiológico de exclusão destes agentes aquando da dádiva de sangue.

Neste estudo também foram confirmadas algumas amostras (problema e controlo) por **WB**, indicadas como negativas por IFA, demonstrando que a ausência de reactividade pode não significar ausência de doença como já referido por outros autores^{25,35}.

Foram identificados por WB os antigénios OspC e a VlsE como marcadores de fase aguda e crónica, respectivamente, tanto nas amostras reactivas e não reactivas por IFA. Este facto corrobora o já referido por Tilly e colaboradores (2008)¹²¹. A individualização das fracções antigénicas - OspC e p18 - nas principais genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. é uma vantagem acrescida deste teste, pois permitiu, na população problema reactiva por IFA e para a primeira das referidas fracções antigénicas, a observação do maior envolvimento de *B. afzelii* detectada por WB-IgM, o que também se registou para p18 no teste -IgG. Não obstante o défice de informação clínica admite-se, pelo menos no verificado para a OspC que é um importante marcador de fase aguda, que possa existir alguma correlação de *B. afzelii* com manifestações clínicas ao nível da pele, o que está de acordo com estudos prévios de outros autores^{18,38,98}.

Na **análise molecular** efectuada por **nested-PCR** para o espaço intergénico do rRNA 23S(*rrl*)-5S(*rrf*) de *B. burgdorferi* s.l., em 17% das amostras problema (LCR e soros) estudadas, obteve-se a amplificação de DNA específico. Porém, o mesmo não sucedeu nas amostras referentes a biopsias, líquido sinovial e sangue total, onde não se verificou amplificação de DNA borreliano.

Admite-se que uma justificação plausível para este facto possa estar associada a factores extrínsecos, como a congelação/descongelação da amostra, o tempo de armazenamento, incluindo a necrose do tecido, e que terá inviabilizado estas amostras destruindo qualquer presença da espiroqueta¹⁰⁵. Outro factor que pode ter contribuído para uma possível inibição da amplificação de DNA no decurso do PCR tem a ver com a presença de substâncias no sangue (ou soro), como moléculas heme residuais e quelantes para o MgCl₂ envolvido na estabilização da DNA polimerase¹⁰⁹. No entanto, neste trabalho foram utilizados "kits" específicos que pretendiam minimizar esta acção inibitória.

Outra possível justificação pode estar relacionada com a reduzida concentração das bactérias, na própria amostra biológica. Esta situação, embora favorável para o doente, aumenta a incapacidade de resposta a nível laboratorial, uma vez que é necessário dispor de métodos directos extremamente sensíveis capazes de detectarem concentrações bacterianas mesmo residuais. A técnica nested-PCR responde a esta lacuna ao nível do diagnóstico molecular; no entanto, não consegue detectar, de um modo totalmente fiável, concentrações inferiores a 10^2 bactérias/mL, o que está muitas vezes dependente de condições extrínsecas, como as já referidas, a que as amostras podem estar sujeitas^{64,94}. Por outro lado, os amplicões foram visualizados após electroforese em gel de agarose o que constitui, por si só, um factor também limitante, dado ser um método que carece de algum poder de detecção, podendo vir a afectar os resultados pela introdução de falso-negativos¹⁰⁶. Além disso, não se deve descuidar que mesmo na presença de um resultado positivo por nested-PCR esse facto não é sinónimo de que a infecção esteja activa, podendo essa reactividade dever-se a bactérias inviáveis, DNA solúvel e porções dispersas de espiroquetas onde se encontra DNA^{87,105,112}.

Apesar dos deficits descritos, conseguiram identificar-se por **RFLP**, em 88% do total de amostras problema (LCR e soros) amplificadas por nested-PCR, algumas genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l., sendo que a predominante foi *B. garinii* com 55%, seguindo-se por ordem decrescente, *B. afzelii* (23%), *B. lusitaniae* (13%) e *B. burgdorferi* s.s. (9%). Estes dados mostram que *B. garinii* foi a genoespécie mais prevalente na amostra populacional estudada. Porém, a extrapolação deste importante facto a nível do País exige que esta amostra fosse mais significativa o que, no entanto, não invalida o êxito obtido com a presente confirmação que corrobora estudos anteriores realizados, no vector, por diversos investigadores, incluindo a equipa da ULBL, os quais têm vindo a evidenciar a presença efectiva destas espiroquetas em Portugal^{6,31,71,83}. Foi também relevante perceber a relação causa-efeito entre a distribuição das várias genoespécies e a proveniência dos doentes, maioritariamente focalizada em duas regiões onde é reconhecida a frequência de carraças do género *I. ricinus*, potencialmente transmissoras das referidas bactérias.

Por outro lado, a identificação de *B. lusitaniae* em três doentes reforça o já mencionado em 2004 por Collares-Pereira e colaboradores²⁴ aquando da obtenção do primeiro isolado de espiroquetas da referida espécie numa biopsia cutânea de um doente. Mais recentemente, outros trabalhos^{66,71} têm evidenciado a presença desta genoespécie cuja importância epidemiológica e clínica é da maior importância para a compreensão da Borreliose de Lyme no nosso País.

Nas amostras estudadas, não foi identificada nenhuma infecção mista o que não pode ser considerado sinónimo da sua ausência, admitindo-se como possível justificação o facto

da presença de DNA borreliano identificado como *B. burgdorferi* s.l. se ter 'sobrepuesto' ao de outras espécies (no decurso da amplificação) contribuindo para tornar mais evidente o respectivo padrão. Não obstante esta realidade, entende-se como útil, nestes casos, a realização de uma outra amplificação do 2º ciclo do nested-PCR com os mesmos "primers", aumentando deste modo a concentração do fragmento presente. Este seria, então, submetido posteriormente a restrição, excluindo com este procedimento a hipótese de co-infecção.

Futuramente, será interessante incluir outros alvos moleculares, entre os quais, os genes *osp*, *rRNA 16S*, ou utilizar outras técnicas moleculares de genotipagem (ex. "Reverse Line blot") visando outras alternativas para a identificação das principais espécies patogénicas de *B. burgdorferi* s.l., por quanto isso se reflectirá, a curto ou médio prazo, na exigível e constante melhoria da resposta laboratorial a esta importante doença no nosso País.

Por último, importa fazer ainda uma referência à amplificação por **PCR convencional** (protocolo A, B e C)^{90,92} prévia à genotipagem por RFLP que não foi totalmente concretizada na amostra populacional seleccionada, devido à limitação de tempo que inviabilizou a optimização das referidas abordagens (quer nas condições do laboratório quer nas próprias amostras em estudo). Esta abordagem foi (parcialmente) iniciada mas, naturalmente, carece de continuidade o que não impede que se considere como uma alternativa concreta ao nested-PCR-RFLP, dada a sua utilização noutros laboratórios de referência internacionais, além de apresentar vantagens acrescidas de que se destacam o controlo de contaminação, a rapidez de execução e inclusive os custos materiais, aspecto sempre de grande relevo quando estas tecnologias são transpostas da investigação para o contexto quotidiano do apoio aos doentes e à comunidade onde se inserem.

Face aos resultados obtidos e à respectiva avaliação, pode dizer-se que o objectivo principal foi cumprido atendendo a que: **i)** estabeleceu-se o diagnóstico laboratorial de Borreliose de Lyme, através de técnicas imunológicas e moleculares, em 42 doentes (29%) da amostra populacional estudada com suspeita clínica da referida patologia; e **ii)** contribuiu-se para o conhecimento das genoespécies mais frequentes, o que foi possível em 15% dos doentes com diagnóstico molecular positivo para Lyme.

Por último, a realização do presente estudo permitiu, entre outros aspectos, expressar uma recomendação que se traduz na atitude de não se dever privilegiar o uso das técnicas moleculares em detrimento das imunológicas (e vice-versa), uma vez que, para além do alvo de pesquisa ser diferente (DNA vs anticorpos), também as fases evolutivas da doença condicionam o melhor método a aplicar. Deste modo, o diagnóstico de BL continua a ser essencialmente clínico e para o laboratório será sempre fundamental o contributo da anamnese, bem como da correspondente informação clínico-epidemiológica, essencial para

a orientação da melhor técnica a realizar, assumindo o laboratório o seu papel fulcral no apoio ao referido diagnóstico.

A concretização prática destes aspectos a par de uma investigação permanente e actualizada destas espiroquetas ao nível da sua biologia e bio-ecologia, impacte das alterações climáticas sobre os principais vectores e ainda (novas) abordagens clínico-laboratoriais capazes de tornar as técnicas já existentes mais rápidas, sensíveis e específicas, contribuirão seguramente para um tratamento mais adequado e atempado dos doentes infectados e, por consequência, permitirá conhecer a real incidência da Borreliose de Lyme em Portugal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Afzelius A.** 1921. Erythema chronicum migrans. *Acta dermato-venereologica, Stockholm.*, 2:120–125.
2. **Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., and Wormser G.P.** 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.*, 18:484–509.
3. **Alekseev A.N., Dubinina H.V., Antykova L.P., Dzhivanyan T.I., Rijpkema S.G., Kruijff N.V., and Cinco M.** 1998. Tick-borne borreliosis pathogen identification in Ixodes ticks (Acarina, Ixodidae) collected in St. Petersburg and Kaliningrad Baltic regions of Russia. *J Med Entomol.*, 35:136-42.
4. **Antoni-Bach N., Jaulhac B., Hansmann Y., Limbach F., and Lipsker D.** 2002. *Borrelia* strains that cause erythema migrans in Alsace, France. *Ann Dermatol Venereol.*, 129:15–18.
5. **Bankhead T., and Chaconas G.** 2007. The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. *Mol Microbiol.*, 65:1547–1558.
6. **Baptista S., Quresma A., Aires T., Kurtenbach K., Santos-Reis M., Nicholson M., and Collares-Pereira M.** 2004. Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol.*, 293:109–116.
7. **Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., and Grimont P.A.** 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol.*, 42:378–383.
8. **Barbour A., and Hayes S.F.** 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev.*, 50:381–400.
9. **Bennett C.E.** 1995. Ticks and Lyme disease. *Adv Parasitol.*, 36:343-405.
10. **Berger S.A., Samish M., Kletter Y., Tinghitella T., Hering S., and Edberg S.C.** 1993. Lyme disease acquired in Israel: report of a case and studies of serological cross reactivity in relapsing fever. *Isr J Med Sci.*, 29:464-465.
11. **Bergstrom S., Noppa L., Gylge A., and Ostberg Y.** 2002. Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane, G. Stanek (Eds): Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. CAB International;. p. 47 – 90.
12. **Bratton R.L., Whiteside J.W., Hovan M.J., Engle R.L., and Edwards F.D.** 2008. Diagnosis and treatment of Lyme disease. *Mayo Clin Proc.*, 83:566–71.
13. **Brown J.P., Zachary J.F., Teuscher C., Weis J.J., and Wooten R.M.** 1999. Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. *Infect Immun.*, 67:5142–5150.
14. **Bunikis J., and Barbour A.G.** 2002. Laboratory testing for suspected Lyme disease. *Med Clin North Am.*, 86:311-340.
15. **Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., and Davis J.P.** 1982. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319.
16. **Cadavid D., Bai Y., Hodzic E., Narayan K., Barthold S.W., and Pachner A.R.** 2004. Cardiac involvement in non-human primates infected with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lab Invest.*, 84:1439–50.
17. **Caeiro V.** 1999. General review of tick species present in Portugal. *Parassitol.*, 41:11-5.
18. **Canica M.M., Nato F., du Merle L., Mazie J.C., Baranton G., and Postic D.** 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis.*, 25:441–448.
19. **Casimiro E., Calheiros J., Santos F.D., and Kovats S.** 2006. National assessment of human health effects of climate change in Portugal: approach and key findings. *Environ Health Perspect.*, 114:1950-6.
20. **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., and Fraser C.M.** 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.*, 35:490–516.
21. **Charon N.W., and Goldstein S.F.** 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet.*, 36:47–73.

22. **Christova I.** 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescent assay, and recombinant immunoblotting in the serodiagnosis of early Lyme borreliosis. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 16:261-8.
23. **Collares-Pereira M., and Franca I.** 2000. Borreliose de Lyme: Ocorrência em Portugal. *Trab Soc Port Dermatol Venereol.*, 58(Suppl):107-116.
24. **Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schafer S.M., Vitorino L., Gonçalves L., Baptista S., Vieira M.L., Cunha C.** 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol.*, 42:1316–1318.
25. **Collares-Pereira M., and Vieira M.L.** 2000. O laboratório face à Borreliose de Lyme – que intervenção? *Suplemento dos Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia.*, 58:85-92.
26. **Colli C., Leinweber B., Müllegger R., Chott A., Kerl H., and Cerroni L.** 2004. *Borrelia burgdorferi*-associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. *J Cutan Pathol.*, 31:232–40.
27. **Couceiro S., Baptista S., Franca I., Gonçalves L., Vieira M.L., and Collares-Pereira M.** 2003. Cultura vs PCR: que apoio ao diagnóstico de Borreliose de Lyme? *Acta Reumatol Port.*, 28:77-82.
28. **Courtney J.W., and Massung R.F.** 2003. Multiplex Taqman PCR assay for rapid detection of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci.*, 990:369-70.
29. **Crother T.R., Champion C.I., Whitelegge J.P., Aguilera R., Wu X.Y., Blanco D.R., Miller J.N., and Lovett M.A.** 2004. Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin. *Infect Immun.*, 72:5063–5072.
30. **David de Morais J.A., Filipe A.R., Núncio M.S.** 1989. Doença de Lyme em Portugal: caso clínico. *Rev Port Doenç Infec.*, 12:261-274.
31. **De Michelis S., Sewell H.-S., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Schouls M.L., Benes V., Holmes E.C., and Kurtenbach K.** 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol.*, 38:2128-2133.
32. **De Silva A.M., Zeidner N.S., Zhang Y., Dolan M.C., Piesman J., and Fikrig E.** 1999. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect Immun.*, 67:30-5.
33. **Direcção-Geral da Saúde (DGS), Direcção de Serviços de Epidemiologia e Estatísticas de Saúde, Divisão de Estatísticas de Saúde, Centros de Saúde e Hospitais - Recursos e Produção do SNS - 2007** (<http://www.dgs.pt/>).
34. **Escudero R., Barral M., Pérez A., Vitutia M.M., García-Pérez A.L., Jimenez S., Sellek R.E., and Anda P.** 2000. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol.*, 38:4026–4033.
35. **European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB)**. 2009. <http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php>
36. **Fingerle V., Schulte-Spechtel U.C., Ruzic-Sabljić E., Leonhard S., Hofmann H., Weber K., Pfister K., Strle F., and Wilske B.** 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol.*, 298:279–90.
37. **Flach A.J., and Lavoie P.E.** 1990. Episcleritis, conjunctivitis, and keratitis as ocular manifestations of Lyme disease. *Ophthalmology.*, 97:973–5.
38. **Franca, I.** 2000. Borreliose de Lyme: uma introdução à doença. *Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia.* 58(Supl):11-39.
39. **Franz J. K., and Krause A.** 2003. Lyme disease (Lyme borreliosis). *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 17:241–64.
40. **Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K.A., Dodson R., Hickey E.K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.F., Fleischmann R.D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A.R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M.D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fuji C., Cotton M.D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H.O., and Venter J.C.** 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.*, 390:580–586.

41. **Fukunaga M., Hamase A., Okada K., and Nakao M.** 1996. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol.*, 40:877–881.
42. **Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C.A., and Charon N.W.** 1998. Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.*, 180:2418–25.
43. **Gern L., Hu C.M., Kocianova E., Vyrostekova V., and Rehacek J.** 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol.*, 15:665-669.
44. **Gill S.J., and Johnson R.C.** 1992. Immunologic Methods for the Diagnosis of Infections by *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease). In Rose R.N., De Macario E.C., Fahey J.L., Friedman H., Penn G.M. (eds), *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Fourth ed, Washington, D.C., pp 452-458.
45. **Guo B.P., Brown E.L., Dorward D.W., Rosenberg L.C., and Höök M.** 1998. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.*, 30:711–723.
46. **Gustafson R.** 1994. Epidemiological studies of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement.*, 24:181-188.
47. **Hanincová K., Taragelová V., Koci J., Schäfer S.M., Hails R., Ullmann A.J., Piesman J., Labuda M., and Kurtenbach K.** 2003. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol.*, 69:2825-30.
48. **Hefty P.S., Jolliff S.E., Caimano M.J., Wikel S.K., and Akins D.R.** 2002. Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.*, 70:3468-78.
49. **Hengge U.R., Tannapfel A., Tying S.K., Erbel R., Arendt G., and Ruzicka T.** 2003. Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis.*, 3:489–500.
50. **Hildenbrand P., Craven D.E., Jones R., and Nemeskal P.** 2009. Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 30:1079-87.
51. **Humair P., and Gern L.** 2000. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect.*, 2:915-22.
52. **Huppertz H.I., Böhme M., Standaert S.M., Karch H., and Plotkin S.A.** 1999. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 18:697-703.
53. **Ishihara M., Ohno S., Ono H., Isogai E., Kimura K., Isogai H., Aoki K., Ishida T., Suzuki K., Kotake S., and Hiraga Y.** 1998. Seroprevalence of anti-*Borrelia* antibodies among patients with confirmed sarcoidosis in a region of Japan where Lyme borreliosis is endemic. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, 236:280–4.
54. **Johnson R.C., Schimd G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., and Brenner D.J.** 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol.*, 34:496-497.
55. **Kahl A., Schmidt K., Schonberg A., Laukammjosten U., Knulle W., and Bienzle U.** 1989. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Berlin (West). *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig* 270:434-440.
56. **Kantor F.S.** 1994. Disarming Lyme disease. *Sci Am.*, 271:34-9.
57. **Kawabata H., Masuzawa T., and Yanagihara Y.** 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol.*, 37:843–848.
58. **Krupka M., Raska M., Belakova J., Horynova M., Novotny R., and Weigl E.** 2007. Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 151:175-86.
59. **Kurtenbach K., De Michelis S., Sewell H.S., Etti S., Schäfer S.M., Hails R., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Hanincová K., Labuda M., Bormane A., and Donaghy M.** 2001. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol.*, 67:4926-9.
60. **Kurtenbach K., De Michelis S., Sewell H.S., Etti S., Schäfer S.M., Holmes E., Hails R., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Hanincová K., Labuda M., Bormane A., and Donaghy M.** 2002. The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol.*, 291(Suppl) 33:152-4.

61. **Kuthejlová M., Kopecký J., Stepánová G., and Macela A.** 2001. Tick Salivary Gland Extract Inhibits Killing of *Borrelia afzelii* Spirochetes by Mouse Macrophages. *Inf Immun.*, 69:575-578.
62. **Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Peter O., and Baranton G.** 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.*, 47:921–925.
63. **Lelovas P., Dontas I., Bassiakou E., and Xanthos T.** 2008. Cardiac implications of Lyme disease, diagnosis and therapeutic approach. *Int J Cardiol.*, 129:15–21.
64. **Liebisch G., Sohns B., and Bautsch W.** 1998. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. *J Clin Microbiol.*, 36:3355-8.
65. **Lindgren E., and Jaenson T.G.T.** 2006. Lyme Borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
66. **Lopes de Carvalho I., and Nuncio M.S.** 2006. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis at the Portuguese National Institute of Health (1990-2004). *Euro Surveill.*, 11:257-60.
67. **MacDonald A.B.** 2006a. Spirochetal cyst forms in neurodegenerative disorders, hiding in plain sight. *Med Hypotheses.*, 67:819–32.
68. **MacDonald A.B.** 2006b. Plaques of Alzheimer's disease originate from cysts of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Med Hypotheses.*, 67:592–600.
69. **Magnarelli L.A., Miller J.N., Anderson J.F., and Riviere G.R.** 1990. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microbiol.*, 28:1276-1279.
70. **Marconi R.T., Liveris D., and Schwartz I.** 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol.*, 33:2427-34.
71. **Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincova K., Terekhova D., Vollmer S.A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M.A., Feil E.J., Fish D., Casjens S., Wormser G.P., Schwartz I., and Kurtenbach K.** 2008. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8730-8735.
72. **Martens H., Zollner B., Zissel G., Burdon D., Schlaak M., and Muller-Quernheim J.** 1997. Anti-*Borrelia burgdorferi* immunoglobulin seroprevalence in pulmonary sarcoidosis: a negative report. *Eur Respir J.*, 10:1356–8.
73. **Masuzawa T., Takada N., Kudeken M., Fukui T., Yano Y., Ishiguro F., Kawamura Y., Imai Y., and Ezaki T.** 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 51:1817–1824.
74. **Mathiesen M.J., Holm A., Christiansen M., Blom J., Hansen K., Ostergaard S., and Theisen M.** 1998a. The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface-exposed conserved structural motif. *Infect Immun.*, 66:4073-9.
75. **Mathiesen M.J., Christiansen M., Hansen K., Holm A., Asbrink E., and Theisen M.** 1998b. Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.*, 36:3474-9.
76. **Mejlon H.** 2000. Host-seeking activity of *Ixodes ricinus* in relation to the epidemiology of Lyme borreliosis in Sweden. *Acta Univers. Uppsal.*, 42pp.
77. **Mikkila H.O., Seppala I.J., Viljanen M.K., Peltomaa M.P., and Karma A.** 2000. The expanding clinical spectrum of ocular lyme borreliosis. *Ophthalmology.*, 107:581–7.
78. **Nardelli D.T., Callister S.M., and Schell R.F.** 2008. Lyme arthritis: current concepts and a change in paradigm. *Clin Vaccine Immunol.*, 15:21-34.
79. **Nau R., Christen H.J., and Eiffert H.** 2009. Lyme disease--current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int.*, 106:72-81.
80. **Niścigorska J., Skotarczak B., and Wodecka B.** 2003. *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers - assessed with an immunoenzymatic method (ELISA), PCR and correlated with the clinical state of the patients. *Ann Agric Environ Med.*, 10:15-9.

81. **Norris S.J., Howell J.K., Garza S.A., Ferdows M.S., and Barbour A.G.** 1995. High- and low-infectivity phenotypes of clonal populations of in vitro-cultured *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.*, 63:2206–2212.
82. **Nowakowski J., Schwartz I., Liveris D., Wang G., Agüero-Rosenfeld M.E., Girao G., McKenna D., Nadelman R.B., Cavaliere L.F., and Wormser G.P.** 2001. Lyme Disease Study Group. Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin Infect Dis.*, 33:2023-7.
83. **Núncio M.S., Péter O., Alves M.J., Bacellar F., and Filipe A.R.** 1993. Isolamento e caracterização de borrelíias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Port Doenç Infec.*, 16:175-179.
84. **Ornstein K., Berglund J, Nilsson I., Norrby R., and Bergström S.** 2001. Characterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in southern Sweden. *J Clin Microbiol.*, 39:1294–8.
85. **Osterkamp J., Wahl U., Schmalfuss G., and Haas W.** 1999. Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. *J Comp Physiol A.*, 185:59-67.
86. **Pachner A.R., and Steiner I.** 2007. Lyme neuroborreliosis: infection, immunity, and inflammation. *Lancet Neurol.*, 6:544–52.
87. **Pachner A.R., Zhang W.F., Schaefer H., Schaefer S., and O'Neill T.** 1998. Detection of active infection in nonhuman primates with Lyme neuroborreliosis: comparison of PCR, culture, and a bioassay. *J Clin Microbiol.*, 36:3243-7.
88. **Panelius J., Lahdenne P., Heikkilä T., Peltomaa M., Oksi J., and Seppälä I.** 2002. Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii* in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Med Microbiol.*, 51:731-9.
89. **Perret J.L., Guerin P.M., Diehl P.A., Vlimant M., and Gern L.** 2003. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol.*, 206:1809-15.
90. **Postic D., Assous M.V., Grimont P.A., and Baranton G.** 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol.*, 44:743-52.
91. **Postic D., Garnier M., and Baranton G.** 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates-Description of *Borrelia californiensis* sp. Nov., and *genomospecies* 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297:263–271.
92. **Postic D., Merien F., Perolat P., and Baranton G.** 2000. Diagnostic biologique: Leptospirose - Borréliose de Lyme. Série "Méthodes de Laboratoire", Commission des Laboratoires de Référence et d'Expertise (CLRE), Institut Pasteur, Paris, 2e Edition. 216-242 p.
93. **Postic D., Ras N.M., Lane R.S., Hendson M., and Baranton G.** 1998. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol.*, 36:3497–3504.
94. **Priem S., Rittig M.G., Kamradt T., Burmester G.R., and Krause A.** 1997. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol.*, 35:685-90.
95. **Qiu W.G., Bruno J.F., Mccaig W.D., Xu Y., Livey I., Schriefer M.E., and Luft B.J.** 2008. Wide distribution of a high-virulence *Borrelia burgdorferi* clone in Europe and North America. *Emerg Infect Dis.*, 14:1097-1104.
96. **Reed K.D.** 2002. Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. *J Clin Microbiol.*, 40:319-24.
97. **Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., and Baranton G.** 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56:873-81.
98. **Rijkema S.G., Tazelaar D.J, Molkenboer M.J., Noordhoek G.T., Plantinga G., Schouls L.M., and Schellekens J.F.** 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect.*, 3:109–16.
99. **Rosa P.A., Tilly K., and Stewart P.E.** 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat Rev Microbiol.*, 3:129-43.

100. **Rostoff P., Gajos G., Konduracka E., Gackowski A., Nessler J., and Piwowarska W.** 2009. Lyme carditis: Epidemiology, pathophysiology, and clinical features in endemic areas, *Int J Cardiol.*, [Epub ahead of print]
101. **Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., and Oliver J.H.Jr.** 2009. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. *J Clin Microbiol.*, 47:134-41.
102. **Rupprecht T.A., Koedel U., Fingerle V., Rupprecht T.A., Koedel U., Fingerle V., and Pfister H.W.** 2008. The pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol Med.*, 14:205–12.
103. **Ruzic-Sabljić E., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Jurca T., Logar M., Pikelj-Pecnik A., and Strle F.** 2002. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr.*, 114:544–50.
104. **Sadziene A., Rosa P.A., Thompson P.A., Hogan D.M. and Barbour A.G.** 1992. Antibody-resistant mutants of *Borrelia burgdorferi*: in vitro selection and characterization. *J Exp Med.*, 176:799–809.
105. **Schmidt B.L.** 1997. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev.*, 10:185-201.
106. **Schnarr S., Franz J.K., Krause A., and Zeidler H.** 2006. Infection and musculoskeletal conditions: Lyme borreliosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 20:1099–118.
107. **Schwan T.G., and Piesman J.** 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol.*, 38:382–388.
108. **Schwan T.G., Burgdorfer W., and Garon C.** 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect Immun.*, 56:1831–1836.
109. **Schwartz I., Varde S., Nadelman R.B., Wormser G.P., and Fish D.** 1997. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am J Trop Med Hyg.*, 56:339-42.
110. **Schwartz J.J., Gazumyan A., and Schwartz I.** 1992. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.*, 174:3757-65.
111. **Siddharth Y.S., and de Silva A.M.** 2008. Reciprocal Expression of *ospA* and *ospC* in Single Cells of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.*, 190:3429–3433.
112. **Smismans A., Goossens V.J., Nulens E., and Bruggeman C.A.** 2006. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clin Microbiol Infect.*, 12(7):648-55.
113. **Stanek G., and Strle F.** 2003. Lyme borreliosis. *Lancet.*, 362:1639-47.
114. **Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferitsch W., Granstrom M., Guy E., and Gray J.** 1996. European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr.*, 108: 741-747.
115. **Steere A.C.** 2001. Lyme disease. *N Engl J Med.*, 345:115–25.
116. **Steere A.C., Batsford W.P., Weinberg M., Alexander J., Berger H.J., Wolfson S., and Malawista S.E.** 1980. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Intern Med.*, 93:8–16.
117. **Stonehouse A., Studdiford J.S., and Henry C.A.** 2007. An update on the diagnosis and treatment of early Lyme disease: “focusing on the bull’s eye, you may miss the mark.” *J Emerg Med.*, [Epub ahead of print]
118. **Strle F.** 1999. Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentralbl Bakteriol.*, 289:643-52.
119. **Takayama K., Rothenberg R.J., and Barbour A.G.** 1987. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.*, 55:2311–3.
120. **Thursfield M.** 1990. Epidemiologia veterinária. *Acribia Zaragoza.*, 339 pp.
121. **Tilly K., Rosa P.A., and Stewart P.E.** 2008. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am.*, 22:217-34.
122. **Treib J., Grauer M.T., Haass A., Langenbach J., Holzer G., and Woessner R.** 2000. Chronic fatigue syndrome in patients with Lyme borreliosis. *Eur Neurol.*, 43:107–9.


123. **Tugwell P., Dennis D.T., Weinstein A., Wells G., Shea B., Nichol G., Hayward R., Lightfoot R., Baker P., and Steere A.C.** 1997. Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med.*, 127:1109–23.
124. **Uspensky I.** 2002. Preliminary observations on specific adaptations of exophilic ixodid ticks to forests or open country habitats. *Exp Appl Acarol.*, 28:147-54.
125. **Van Dam A.P.** 2002. Diversity of Ixodes-borne *Borrelia* species: clinical, pathogenetic, and diagnostic implications and impact on vaccine development. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2:249–54.
126. **Van Dam A.P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B.M., Spanjaard L., Ramselaar A.C., Kramer M.D., and Dankert J.** 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17:708–717.
127. **Vanzieleghem B., Lemmerling M., Carton D., Achten E., Vanlangenhove P., Matthys E., and Kunnen M.** 1998. Lyme disease in a child presenting with bilateral facial nerve palsy: MRI findings and review of the literature. *Neuroradiology.*, 40:739–42.
128. **Varma M.R.G.** 1993. Ticks and mites (Acari) in *Medical Insects and Arachnids*, pg. 597-655. Edited by Richard P.L. and Roger W. C., Chapman Hall London.
129. **Vassallo M., and Pérez-Eid C.** 2002. Comparative behavior of different life-cycle stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) to human-produced stimuli. *J Med Entomol.*, 39:234–236.
130. **Vieira M.L.** 1997. Contribuição para o conhecimento da Fauna Ixodideológica das Ilhas de São Miguel, Terceira e Pico (Açores). Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 220 pp.
131. **Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., and Dankert J.** 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.*, 12:633–653.
132. **Wang G., van Dam A.P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., and Dankert J.** 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol.*, 47:926-32.
133. **Weber K.** 2001. Aspects of Lyme borreliosis in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 20:6-13.
134. **Wolgemuth C.W., Charon N.W., Goldstein S.F., and Goldstein R.E.** 2006. The Flagellar Cytoskeleton of the Spirochetes. *J Mol Microbio Biotechnol.*, 11:221-227.
135. **Wright D.J.M.** 2009. Borrel's accidental legacy. *Clin Microbiol Infect Dis.*, 15:397-9.
136. **Xu Y., Kodner C., Coleman L., and Johnson R.C.** 1996. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect. Immun.*, 64:3870–3876.
137. **Zore A., Ruzic-Sabljić E., Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., Pikelj A., Jurca T., Logar M., and Strle F.** 2002. Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans. *Wien Klin Wochenschr.*, 114:606–9.
138. **Zrinscak O., Masnec-Paskvalin S., Corak M., Bacani B., and Mandić Z.** 2005. Paralytic strabismus as a manifestation of lyme borreliosis. *Coll Antropol.*, 29:137–9.

6. ANEXOS

Quadro suplementar 1 – Estirpes de *B. burgdorferi* s.l. utilizadas neste estudo.

Espécie de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	Estirpe	Origem do isolado	País de origem	Referência GenBank
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	B31	<i>I. scapularis</i> (vector)	EUA	L30127
	VS219	Humana	França	AY032919
<i>B. garinii</i>	Pbi	Humana	Áustria	Z77175
<i>B. afzelii</i>	PGau	Humana	Alemanha	DQ111066
<i>B. lusitaniae</i>	B102	Humana	Portugal	AY209179
	P37	<i>I. ricinus</i> (vector)	Portugal	L30131

Quadro suplementar 2 – Ficha clínico-epidemiológica de Borreliose de Lyme (adoptada pela ULBL/IHMT/UNL).



UNIDADE DE LEPTOSPIROSE E BORRELIOSE DE LYME
 Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Rua da Junqueira 96
 1349-008 Lisboa – Portugal

(Tel. 213652600 / Fax: 213632105 / E-mail: mcp@ihmt.unl.pt)

Diagnóstico Laboratorial da Borreliose de Lyme

Data de Recepção: ___/___/200__ **Nº Lab:** B___/0__ (___ª amostra)
Data da colheita: ___/___/200__

Material enviado: Soro Líquor Biópsia outros _____

Colheitas anteriores? **Sim** - Nº Lab B___/___ ; **Não**

Nome do doente: _____

Idade: _____ **Tel.** _____

Morada: _____

Código Postal: _____ - _____ **Concelho:** _____

Data da consulta/ Internamento: ___/___/200__

Hospital: _____ Serviço: _____ Cama: _____

Médico assistente: _____

Informação clínica relevante

Início da doença: _____ dias ; meses ; anos

Sinais e Sintomas: febre ; quadro gripal ; cefaleias ; meningismo ; paralisia ; artralgias ; artrite ; cardite ; outros _____

Exantema? **Sim** nº lesões _____ ; tamanho médio _____ cm ; duração _____ dias ; **Não**

Antibioterapia? **Sim** (_____), início: _____ dias ; **Não**

Diagnóstico(s) clínico(s): _____

Informação epidemiológica relevante

Ocupação profissional: _____ **Actividades de lazer:** _____ ; outras: _____

Exposição a zonas florestadas ou arbustivas: **Sim** onde? _____ **Não**

Mordeduras de carraça: **Sim** (há _____ dias) **Não** **Não sabe**

Origem do doente: zona urbana zona rural

Contacto com: animais domésticos quais _____ ; roedores _____

outros animais _____

Viagens recentes: _____

Quadro suplementar 3 – Critérios de avaliação do teste WB fornecidos pelo fabricante do “kit”.

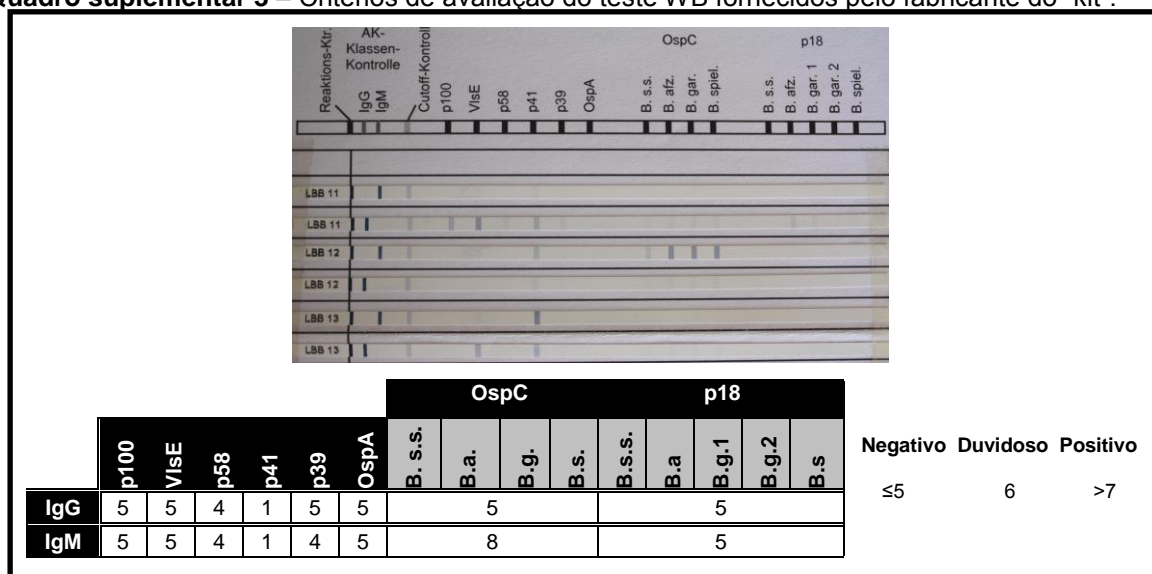


Tabela suplementar 1 – “Primers” utilizados nas reacções de PCR.

Sequências dos Oligonucleótidos usados para a região intergénica <i>rrf-rrl</i>			
Designação atribuída	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Posição no espaço intergénico	Dimensão amplificação (pb)
“Primer” 1 (23SN1)	ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC	469-446	380
“Primer” 2 (23SC1)	TAAGCTGACTAATACTAATTACCC	92-115	380
“Primer” 3 (23SN2)	ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA	469-444	230
“Primer” 4 (5SCB)	biotina-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG	243-263	230
“Primer” int 1	CTGCGAGTTCGCGGGAGA	77-95	250
“Primer” int 2	TCCTAGGCATTCACCATA	38-20	250
“Primer” SPA1	TAAGCTGACTAATACTAATTACCCGTATCT	2890-2919	250
“Primer” SPA2	AATCTTGGGATCAATAAATGTTTGCTTCTC	113-84	250

Tabela suplementar 2 - Análise estatística da reactividade da população problema vs controlo do Grupo 2 (dadores de sangue), comparativamente à estirpe B102 (*B. lusitaniae*), estudada por IFA.

População estudada	IFA com <i>B. lusitaniae</i>		$\chi^2=6,929$ com 1 g.l. $p=0,008$
	Positivo	Negativo	
População Problema	64	61	
População Controlo (Grupo 2)	4	18	

Tabela suplementar 3 - Análise estatística da reactividade demonstrada contra o antígeno OspC no WB-IgM e -IgG, quanto às diversas genoespécies de *B. burgdorferi* s.l., nos doentes confirmados por WB.

Subdivisão do Ag OspC nas genoespécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	WB-IgM		$\chi^2=13,935$ com 3 g.l. $\rho=0,004$
	Positivo	Negativo	
<i>B. garinii</i>	4	6	
<i>B. afzelii</i>	10	0	
<i>B. spielmanii</i>	5	5	
<i>B. burgdorferi</i> s.s	2	8	

Subdivisão do Ag OspC nas genoespécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	WB-IgG		$\chi^2=5,629$ com 3 g.l. $\rho=0,173$
	Positivo	Negativo	
<i>B. garinii</i>	4	5	
<i>B. afzelii</i>	3	6	
<i>B. spielmanii</i>	4	5	
<i>B. burgdorferi</i> s.s	0	9	

Tabela suplementar 4 – Análise estatística da reactividade demonstrada contra o antígeno p18 no WB-IgG, quanto às diversas genoespécies de *B. burgdorferi* s.l., nos doentes confirmados por WB.

Subdivisão do Ag p18 nas genoespécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	WB-IgG		$\chi^2=11,657$ com 3g.l. $\rho=0,011$
	Positivo	Negativo	
<i>B. garinii</i>	4	2	
<i>B. afzelii</i>	5	1	
<i>B. spielmanii</i>	1	5	
<i>B. burgdorferi</i> s.s	0	6	

Tabela suplementar 5 - Análise estatística dos resultados globais para o teste PCR-RFLP correspondente aos polimorfismos identificados entre as diversas genoespécies de *B. burgdorferi* s.l.

Genoespécies identificadas	PCR-RFLP		$\chi^2=14,788$ com 3 g.l. $\rho=0,003$
	Positivo	Negativo	
<i>B. garinii</i>	12	10	
<i>B. afzelii</i>	5	17	
<i>B. lusitaniae</i>	3	19	
<i>B. burgdorferi</i> s.s	2	20	

Tabela suplementar 6 – Concordância entre os resultados obtidos por nested-PCR e WB¹²⁰.

WB		nested-PCR		TOTAL	$k=0,98$
		Positivo	Negativo		
WB	Positivo	12	17	29	
	Negativo	8	41	49	
	TOTAL	20	58	78	