

**CULTURA VS PCR: QUE APOIO AO
DIAGNÓSTICO DE BORRELIOSE DE LYME?**

**Sofia Couceiro, Susana Baptista
Isabel da Franca, Lígia Gonçalves,
Maria Luísa Vieira, Margarida Collares-Pereira**

**Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical,
Universidade Nova de Lisboa, Lisboa
Unidade de Clínica das Doenças Tropicais,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical,
Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.**

RESUMO

No diagnóstico de borreliose de Lyme, infecção sub-diagnosticada em Portugal, o apoio laboratorial é crucial para o tratamento atempado dos doentes, sob risco destes evoluírem para fases crónicas, resistentes à terapêutica. A difícil confirmação do agente etiológico através da cultura, aliada ao conhecimento actual sobre as elevadas taxas de falsos negativos nos testes serológicos de rastreio, bem como de casos seronegativos de doença, torna da maior importância a implementação da nova tecnologia de amplificação (PCR) de DNA borreliano no diagnóstico de rotina desta patologia. Tratando-se de uma técnica mais rápida e sensível tem-se revelado de maior sucesso do que a cultura. O presente trabalho compara a sensibilidade destas duas técnicas de detecção directa dos agentes do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, em 96 doentes com suspeita clínica desta afecção e em 569 vectores (ixodídeos) capturados em território nacional. Obteve-se o isolamento de borrelíias em 1,3% das biópsias cutâneas e em 1,2% dos ixodídeos (carrasças) não se tendo registado isolados noutros materiais biológicos humanos. A aplicação da técnica de *nested* PCR confirmou a presença de DNA de *B. burgdorferi* sensu lato em 24,8% das amostras analisadas. A identificação dos agentes patogénicos, por técnicas de hibridação (*Reverse Line Blot*), sequenciação e/ou RFLP, revelou a presença de quatro espécies genómicas: *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* e *B. afzelii*. Em conclusão, a amplificação de DNA borreliano permite uma resposta mais rápida e sensível do que a cultura, contribuindo para um diagnóstico laboratorial mais eficaz da borreliose de Lyme humana.

Palavras-chave: Borreliose de Lyme; Cultura; PCR; Valor Diagnóstico.

ABSTRACT

Lyme borreliosis (LB) is an under-diagnosed zoonosis in Portugal, specially due to the absence of specific clinical signs. The role of the laboratory diagnosis, together with an epidemiological information, is extremely important for the correct treatment of patients with this pathology. The sensitivity of two laboratory techniques (culture and DNA amplification by nested PCR) for direct detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex agents was evaluated in samples from 96 clinically suspected patients, as also in 569 vector ticks collected throughout Portugal. *Borrelia* genospecies were identified in 1.3% of the skin biopsies and in 1.2% of the vectors, after growth in selective culture medium (BSK). No growth was obtained from other type of samples. *B. burgdorferi* sensu lato DNA was present in 24.8% of analyzed samples, as per intergenic rRNA 5S-23S (*rrf-rrl*) spacer amplification by nested PCR. Four genomic species (*B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* and *B. afzelii*) were identified by DNA hybridization (Reverse-Line-Blot), sequencing and/or RFLP. In conclusion and taking into account the results found in this study, it seems that *Borrelia* DNA amplification technique is quicker and present higher sensitivity than culture, providing a more effective laboratory diagnosis of LB in human populations and in vectors.

Key-words: Lyme borreliosis, culture, Nested PCR, sensitivity.

CULTURA VS PCR: QUE APOIO AO DIAGNÓSTICO DE BORRELIOSE DE LYME?

Sofia Couceiro*, Susana Baptista*, Isabel da Franca**,
Lígia Gonçalves*, Maria Luísa Vieira*, Margarida Collares-Pereira***

Introdução

A borreliose de Lyme (BL) é uma infecção causada por espiroquetas do género *Borrelia*^{1,2}. Apesar de uma crescente diversidade de vectores ser reconhecida na transmissão destas bactérias dos animais ao homem, as carraças do género *Ixodes*, em particular *Ixodes ricinus*, são consideradas o principal vector na Europa Ocidental³⁻⁷. Até ao momento, seis genoespécies do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato foram já detectadas na Europa: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* e *B. bissettii*. Destas, apenas a última não foi ainda reconhecida em Portugal, tanto ao nível do vector como dos hospedeiros⁸.

A infecção por estes espiroquetídeos conduz a uma diversidade de manifestações que podem envolver a pele, o sistema nervoso – central e periférico –, o coração, e o aparelho músculo-esquelético, bem como inúmeros outros órgãos e sistemas⁹, sendo responsáveis por um espectro clínico tão amplo que obriga hoje à investigação sistemática de BL, face aos casos de diagnóstico menos preciso.

Em Portugal, o primeiro caso clínico de BL reporta-se a 1989⁹ e, dez anos mais tarde, foi considerada uma doença de declaração obrigatória (código A69.2)¹⁰.

Embora seja amplamente aceite que o diagnóstico de borreliose de Lyme é essencialmente clínico¹¹, o acentuado polimorfismo dos sintomas e o número crescente de formas por vezes sobreponíveis a manifestações de outros quadros de diagnóstico complexo, nomeadamente a esclerose múltipla e o lúpus eritematoso sistémico, impõem uma resposta laboratorial inequívoca que obriga ao recurso a testes laboratoriais sensíveis e específicos.

Um outro aspecto é a discussão actual da impli-

cação etiológica do agente da borreliose de Lyme em diversas afecções para as quais não existe uma terapêutica definitiva mas, cuja alternativa antibiótica, eventualmente curativa, carece, uma vez mais, de confirmação laboratorial. Tal é o caso de algumas dermatoses desfigurantes ou até, mutilantes, como a morfeia, o líquen escleroso e atrófico, ou a hemiatrofia facial progressiva de Parry-Romberg, referidas hoje como manifestações “inespecíficas” da borreliose de Lyme, pela sua frequente associação com esta patologia¹². Também aqui se incluem outros quadros clínicos que, tendo possibilidade de tratamento, o mesmo pode, no entanto, revelar-se insuficiente, se não for excluída a infecção por bactérias do complexo *B. burgdorferi* sensu lato. Referimo-nos aos casos de fasceite eosinofílica e de nódulos fibróticos justa-articulares, cuja associação à borreliose de Lyme tem sido largamente referida na literatura¹³⁻¹⁵, bem como à dermatopolimiosite, igualmente já relacionada com esta infecção e cuja terapêutica antibiótica complementar é mandatória nestes casos¹⁶⁻¹⁷.

Finalmente a artrite de Lyme, que começou por ser tão limitada na sua caracterização inicial, ainda antes da descoberta do agente etiológico, revela hoje um leque de manifestações de tal forma vasto que, já em 1989, a O.M.S. dava indicações sobre a impossibilidade da sua definição¹⁸, entendendo-se, por isso, a designação reumatismo de Lyme como mais abrangente e correcta⁸. Estes factos vêm, uma vez mais, reforçar a extrema importância da oferta, por parte do Laboratório, de uma abordagem múltipla, tanto mais que é certo que os casos seronegativos são actualmente uma evidência que pode tornar ainda mais complexo o diagnóstico desta afecção.

Neste contexto consideram-se duas abordagens possíveis: i) os *métodos indirectos* para rastreio imunológico (imunofluorescência e ELISA) e posterior confirmação da presença de imunoglobulinas IgM e/ou IgG específicas (Western Blot); e ii) os *métodos directos*, “convencionais”, que incluem microsscopia, cultura e imunohistoquímica e, mais re-

* Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

** Unidade de Clínica das Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

centemente, os testes de amplificação de DNA borreliano por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e de análise do DNA amplificado por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e por sequenciação, para a identificação dos agentes patogénicos. A opção por uma e/ou outra abordagem prende-se, em particular, com a informação sobre o tipo de manifestações observadas e o respectivo tempo de evolução, face ao ciclo biológico da bactéria no organismo.

Relativamente à serologia, o seu valor diagnóstico é tido como insatisfatório, o que se prende com razões de diversa ordem. Por um lado, na fase recente da doença, a sensibilidade dos testes é particularmente mais baixa, a ocorrência de reacções cruzadas possível e não existe forma de distinguir entre uma infecção activa e uma infecção residual, dada a persistência de anticorpos após terapêutica¹⁹⁻²¹. Por outro lado, embora se admita que, em princípio, a sensibilidade dos testes imunológicos (ex. ELISA e Western Blot) aumenta com o tempo de infecção, nem sempre é possível a confirmação da presença de imunoglobulinas específicas, devido à acentuada variabilidade individual dos doentes na resposta imune e à diversidade antigénica das estirpes utilizadas, entre outros factores. Acresce ainda a constatação de que o perfil de seroreactividade da população portuguesa observado pelos autores corresponde, de um modo geral, a um padrão de fraca imunoreactividade pelo Western Blot (técnica de referência), quanto ao número e à nitidez de bandas consideradas «diagnósticas» noutros países da Europa²¹.

Por todos estes motivos, a aplicação da técnica de PCR, como método de diagnóstico mais rápido e sensível do que os métodos bacteriológicos e imunológicos convencionais, tem vindo a adquirir uma importância crescente, condicionando a sua recente introdução no diagnóstico de rotina da BL desenvolvido na ULBL/IHMT. Esta mesma técnica tem sido utilizada com sucesso na identificação molecular de agentes patogénicos nos vectores^{6,22,23}, confirmando a sua detecção em território nacional e permitindo, quer a determinação das respectivas taxas de infecção ao nível dos vectores quer a identificação de potenciais áreas de risco.

Objectivos

No presente trabalho, proceder-se-á à avaliação do valor diagnóstico da amplificação do DNA pela

técnica de PCR *versus* cultura, não só em doentes com suspeita clínica de BL como em carraças *Ixodes ricinus* capturadas em diferentes regiões do País.

Material e Métodos

Seleção da amostragem. *i) População humana:* doentes com suspeita clínica e/ou epidemiologia sugestiva de infecção por *Borrelia* examinados entre 1999 e 2002, no âmbito de consultas ambulatoriais efectuadas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical e em diversos Hospitais, Centros Dermatológicos, Centros de Saúde e consultas particulares, a saber: da região Norte – Porto e Braga; da região Centro – Viseu, Santarém e Vila Franca de Xira; da região Sul – Lisboa, Almada, Barreiro e Setúbal. Foram obtidas as seguintes amostras biológicas: biópsias cutâneas ($n=79$), líquido céfalo-raquidiano (LCR) ($n=16$) e líquido sinovial ($n=1$). Todos os doentes foram analisados do ponto de vista imunológico pelas técnicas de imunofluorescência indirecta (IFI) e Western Blot (WB). *ii) População animal:* carraças *Ixodes ricinus* ($n=569$) capturadas no parque florestal da Tapada de Mafra, entre Março/1999 e Dezembro/2001.

Colheita, processamento e cultura das amostras biológicas. A) As biópsias de pele (4-6mm) foram colocadas em tubos secos e estéreis, para pesquisa de DNA por PCR, e cultura em meio semi-sólido de Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK-H) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.), contendo rifampicina (40mg/ml), fosfomicina (20mg/ml) e anfotericina B (2,5mg/ml). Sempre que possível, as biópsias cutâneas foram colocadas directamente em meio líquido de BSK-H, antes de serem processadas no meio definitivo. As amostras de LCR (2 ml) e do líquido sinovial (2 ml) foram recolhidas em tubo seco e estéril, e processadas, logo que possível, para cultura e pesquisa de DNA. B) A captura de carraças da vegetação foi efectuada pelo método da bandeira. Os espécimes foram guardados em tubo seco até serem identificados por observação em estereomicroscópio e finalmente processados. Cada espécime foi previamente desinfectado (5 min. em Tween 80, 5 min. em etanol 70% e 5 min. em hipoclorito de sódio diluído, seguindo-se três lavagens com H₂O destilada estéril) antes de ser seccionado longitudinalmente e cultivado (metade do exemplar) em meio semi-sólido BSK-H. As culturas foram incubadas a 32°C,

sendo observadas semanalmente em microscópio de fundo escuro. A outra metade da carraça foi conservada em etanol a 70%, à temperatura ambiente, até à extracção do DNA.

Extracção do DNA. Utilizaram-se dois métodos de extracção distintos: um «kit» de purificação de DNA QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), apenas para as amostras humanas processadas em 2002, e o método da hidrólise alcalina para as carraças e amostras humanas manipuladas até ao final de 2001. Este último método consiste em submeter os fragmentos à acção de uma solução de hidróxido de amónia diluída (1:20), após o que são macerados, sujeitos a ebulição durante 15 min. e guardados a -20°C até à realização da técnica de PCR.

Nested PCR. As amplificações do espaço intergénico do rRNA 5S-23S (*rrf-rrl*) do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato*⁶ foram efectuadas num termociclador Eppendorf®, utilizando dois pares de *primers* (Quadro I). O volume final de cada reacção foi de 25ml, contendo 2,5mM MgCl₂, 100mM de desoxinucleotidos trifosfato (dNTP), 5pmol de cada *primer*, 5ml de DNA de cada amostra e 0,025U de *Taq* polimerase (AmpliTaQ® DNA Polymerase, Applied Biosystems). A primeira amplificação consistiu numa desnaturação inicial (1' a 94,5°C) seguida de 25 ciclos a 94°C durante 30", a 52°C durante 30", a 72°C durante 1' e de um período a 72°C durante 5'. Na segunda amplificação, cada amostra foi de novo desnaturada (1' a 94,5°C) e amplificada após 40 ciclos com repetição do mesmo perfil de temperaturas da primeira reacção com excepção para a temperatura de emparelhamento (55°C). A ausência de contaminação foi confirmada pela utilização de um painel de quatro controlos negativos de 1º nível (extracção), três de 2º nível (1ª amplificação) e três de 3º nível (2ª

amplificação). Como controlos positivos foram utilizadas culturas de estirpes não patogénicas, com duas densidades diferentes, cujo DNA foi também extraído por «kit» ou utilizado directamente nas misturas de reacção de PCR. Os produtos amplificados, incluindo controlos e amostras (5ml cada), bem como o marcador (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus Fermentas), foram sujeitos a electroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% [1,5g agarose (FMC) em 100ml de tampão TBE 0,5× (0,045M Tris-borato, 0,001M EDTA)], ao qual se adicionou 5ml de brometo de etídio. A electroforese foi efectuada a 125 Volts durante 30 minutos, após o que se submeteu o gel à acção de radiação ultra-violeta e se fotografou com um equipamento adequado (EagleEye® equipado com um *software* próprio). As amostras positivas foram testadas em triplicado para confirmação dos resultados obtidos.

Técnicas de identificação das estirpes isoladas e do DNA de *B. burgdorferi sensu lato*. Procedeu-se à identificação dos oito isolados obtidos e de um número limitado de produtos de PCR amplificados, por técnicas de hibridação (*Reverse-Line-Blot*) (RLB), sequenciação e/ou análise dos polimorfismos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (RFLP), de acordo com metodologia anteriormente descrita^{6, 22, 23}.

Resultados

Os agentes do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* foram isolados de 1 em 79 (1,3%) biópsias cutâneas e de 7 em 569 (1,2%) ixodídeos, não se tendo registado culturas positivas ao nível das amostras de LCR e de líquido sinovial. A identifi-

Quadro I. Sequências dos *primers* utilizados no nested PCR para detecção de *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Primer	Sequência nucleotídica	Posição no espaço intergénico	Produto de PCR
23SN1 (1º PCR)	5'- ACCATAGACTCTTACTTTGAC-3'	469-446	380 pb
23SC1 (1º PCR)	5'- TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3'	92-115	
23SN2 (2º PCR)	5'- ACCATAGACTCTTACTTTGACCA-3'	469-444	230 pb
5SCB (2º PCR)	5'-biotina-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG-3'	243-263	

Quadro II. Resultados da pesquisa de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, por cultura, em 96 doentes e no vector

Amostra biológica	Nº positivos/ Nº analisados	Identificação do isolado (Sequenciação e/ou Reverse Line Blot)
Biópsia cutânea	1 ⁺ /79 (1,3%)	<i>Borrelia lusitaniae</i> *
LCR	0 ⁺ /16 (0,0%)	-
Líquido sinovial	0 ⁺ /1 (0,0%)	-
<i>Ixodes ricinus</i> (vector)	7 ⁺ /569 (1,2%)	<i>B. garinii</i> (4), <i>B. lusitaniae</i> (1), <i>B. valaisiana</i> (1), <i>B. afzelii</i> (1)
Total	8⁺/665 (1,2%)	<i>B. garinii</i> (4), <i>B. lusitaniae</i> (2), <i>B. valaisiana</i> (1), <i>B. afzelii</i> (1)

* Primeiro isolado patogénico humano (submetido para publicação: Collares-Pereira, M., S. Couceiro, I. Franca, K. Kurtenbach, L. Vitorino, L. Gonçalves, S. Baptista, M.L. Vieira, C. Cunha. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*)

Quadro III. Resultados da pesquisa de DNA de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, por nested PCR, em 96 doentes e no vector

Amostra biológica	Nº analisados	Nº positivos (%)
Biópsia cutânea	79	58 (73,4%)
LCR	16	6 (37,5%)
Líquido sinovial	1	1 (100,0%)
<i>Ixodes ricinus</i> (vector)	569	100 (17,6%)
Total	665	165 (24,8%)

cação dos isolados por RLB e/ou sequenciação revelou a presença de quatro espécies genómicas: *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* e *B. afzelii* (Quadro II). A pesquisa de DNA de *B. burgdorferi sensu lato* (Fig. 1) nas biópsias de pele e carraças confirmou a presença de DNA específico em 165 de 665 (24,8%) amostras analisadas (Quadro III). A genotipagem de alguns produtos de PCR por RFLP e/ou sequenciação revelou no vector, até ao momento, a presença das quatro espécies já referidas para os isolados^{6,22,23}, e nas amostras humanas a predominância de *B. garinii* e *B. lusitaniae* (dados não publicados).

As culturas positivas foram igualmente acompanhadas de um resultado positivo por PCR, mas a amplificação do DNA da maioria (157/165; 95%) das amostras positivas não resultou no isolamento do respectivo agente patogénico.

Discussão

Realizou-se um estudo comparativo entre a sensi-

bilidade de duas técnicas laboratoriais (cultura e *nested* PCR) para pesquisa directa dos agentes etiológicos da borreliose de Lyme, na população humana e na do vector *Ixodes ricinus*. A presente investigação veio confirmar a já reconhecida maior sensibilidade da técnica de *nested* PCR face à cultura, tornando possível a confirmação de uma taxa de positividade global (24,8%) muito superior à obtida por cultura das borrelíias (apenas 1,2%). Para o sucesso deste resultado, certamente contribuiu a reconhecida especificidade dos *primers* seleccionados para a região conservada do espaço intergénico 5S-23S do rRNA, para além do facto de se ter utilizado uma segunda amplificação, susceptível de ampliar até uma cópia de DNA do complexo *B. burgdorferi sensu lato* presente nas amostras²⁴.

Importa também referir a importância da genotipagem dos produtos de PCR amplificados, em particular através da análise de polimorfismos de restrição (PCR-RFLP), como complemento da informação obtida. Esta identificação molecular, aliás, já nos permitiu confirmar no vector^{6,22,23} e na população humana (dados não publicados), em Portugal, a presença de pelo menos duas das espécies patogénicas mais predominantes na Europa, *B. garinii* e *B. afzelii*, para além da espécie *B. lusitaniae*, recentemente isolada da pele de uma doente com lesões crónicas inespecíficas (submetido para publicação: Collares-Pereira, M., S. Couceiro, I. Franca, K. Kurtenbach, L. Vitorino, L. Gonçalves, S. Baptista, M.L. Vieira, C. Cunha. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol*).

Torna-se assim evidente, que a introdução de uma tecnologia tão sensível, como a amplificação de DNA por PCR, poderá ter um papel complementar na detecção dos agentes etiológicos. Com

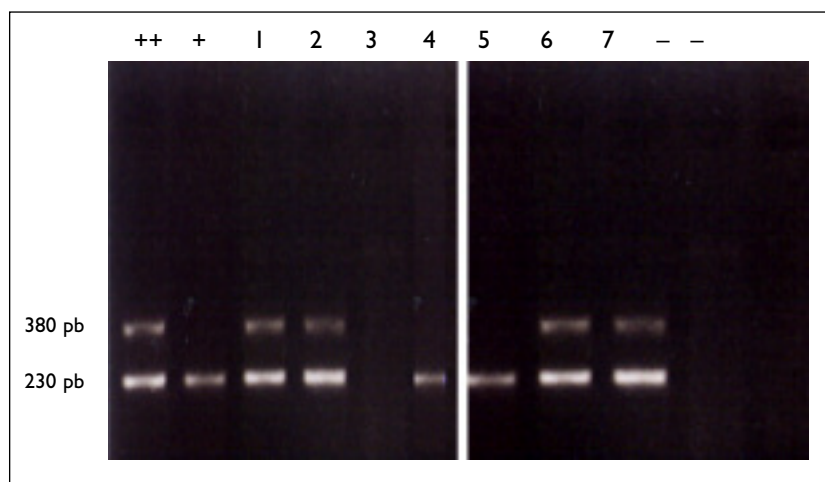


Figura 1. Pesquisa de DNA borreliano por *nested* PCR (5S-23S) em biópsias cutâneas (1- 4) e no vector *Ixodes ricinus* (5-7); controlos positivos (++) e (+) e negativos (-).

efeito, o número de organismos nas amostras clínicas é extremamente reduzido na borreliose de Lyme, pelo que o recurso sistemático à respectiva cultura (como método de referência) é considerado um método laborioso (de algumas semanas) e de reduzida eficácia no diagnóstico de rotina desta patologia^{24,25}. Além disso, os materiais biológicos a cultivar (pele, LCR, líquido sinovial ou outros) são obtidos, maioritariamente, por técnicas invasivas e dolorosas para os doentes, sendo por isso, em regra, preteridos relativamente à colheita de sangue para estudos imunológicos.

A utilização do método da hidrólise alcalina para extracção do DNA das amostras humanas, até 2002, poderá ter contribuído para uma possível redução da taxa de positividade. Na realidade, apesar deste método ser reconhecidamente adequado para a extracção de DNA das carraças, pela degradação eficaz da camada externa de quitina, é provavelmente demasiado agressivo para o número diminuto de espiroquetas no material humano. Esta última limitação na detecção de DNA borreliano pode igualmente ficar a dever-se a uma concentração desigual de borrélias ou do seu DNA nas respectivas amostras (falsos negativos).

A pesquisa directa em meio de cultura selectivo apresentou inúmeras desvantagens, quer em termos de recursos humanos e financeiros, quer em resultados práticos, como foi evidenciado. Acresce ainda, a enorme limitação decorrente da acentuada taxa de contaminação do meio, parcialmente obviada com a adição de antibióticos e antifúngi-

cos que, por outro lado, significam uma dificuldade acrescida à sobrevivência de borrélias, especialmente sensíveis à composição do meio de cultura.

A amplificação por PCR, em particular, por *nested* PCR, apesar de ser um teste igualmente dispendioso, permite a rápida detecção da presença de DNA borreliano independentemente da viabilidade das bactérias e evita a necessidade de borrélias activas para a sua detecção^{24,25}. Por outro lado, é uma técnica muito mais sensível do que a cultura, pois pode detectar apenas uma bactéria, como já foi

referido.

A ausência de contaminação no PCR é confirmada pela utilização de um painel de controlos negativos nos vários níveis de execução da técnica. Assim, uma vez optimizada esta tecnologia, importa ainda salientar: i) a sua potencial utilização na identificação precoce de culturas contaminadas por outras bactérias ou fungos, nas quais as borrélias têm dificuldade em sobreviver, e ii) a confirmação da presença de DNA em situações de silêncio imunológico ou de atraso na produção de anticorpos específicos, no soro e no LCR, meses ou anos após a infecção^{26, 27}.

Em conclusão, este trabalho confirma a importância da utilização da técnica de *nested* PCR, seguida de genotipagem, no diagnóstico laboratorial da borreliose de Lyme, como método de maior sensibilidade face à cultura, tanto ao nível da população humana como da do vector. Contudo, a necessidade de se obter em cultura estirpes patogénicas, obriga à tentativa de isolamento dos agentes, sempre que possível, por forma a caracterizar esta doença infecciosa em Portugal.

Endereço para correspondência:

Margarida Collares Pereira
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Rua da Junqueira, 96
1349-008 Lisboa, Portugal
Tel. 21 3652600 • Fax. 21 3632105
E-mail. mcp@ihmt.unl.pt

Agradecimentos

O trabalho contou com o apoio de uma bolsa da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia (SPDV 2000) para o estudo dos casos clínicos e de uma bolsa de doutoramento da FCT (SFRH/BD/996/2000) para a investigação no vector.

Bibliografia

- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216: 1317-1319.
- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1984; 34: 496-497.
- Kahl A, Schmidt K, Schonberg A, Laukammjosten U, Knulle W, Bienzle U. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Berlin (West). *Zentbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene* 1989; 270: 434-440.
- Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis and emerging tick-borne diseases in Europe. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110: 847-849.
- Sterle F. Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentbl Bakteriologie* 1999; 289: 643-652.
- De Michelis S, Sewell H.-S, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Schouls LM, Benes V, Holmes EC, Kurtenbach K. Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from Mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2128-2133.
- Gern L, Hu CM, Kocianova E, Vyrostekova V, Rehacek J. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 665-669.
- Franca I. Borreliose de Lyme: uma introdução à doença. *Trab. Soc. Port. Dermatol. Venereol. (Supl.)* 2000; 58: 11-39.
- Morais JA, Filipe AR, Nuncio MS. Doença de Lyme em Portugal: caso clínico. *Rev Port Doenç Infec* 1989; 12: 261-274.
- Direcção Geral de Saúde. Doenças Transmissíveis de Declaração Obrigatória. Portaria nº 1071/98, Diário da República – I SÉRIE-B, pp. 7381-7382.
- Stanek G, O'Connell S, Cimmino M, Aberer E, Kristoferitsch W, Granström M, Guy E, Gray J. European Union concerted action on risk assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 1996; 108/23: 741-747.
- Franca I. Manifestações cutâneas da Borreliose de Lyme: estado da questão. *Trab Soc Port Dermatol Venereol (Supl.)* 2000; 58: 41-83.
- Hirai K, Takemori N, Yanagawa N, Namiki M, Iizuka H, Miyamoto K. *Borrelia burgdorferi* and Shulman syndrome. *Lancet* 1992; 340: 1472.
- Granter SR, Barnhill RL, Hewins ME, Duray PH. Identification of *Borrelia burgdorferi* in diffuse fasciitis with peripheral eosinophilia: borrelial fasciitis. *JAMA* 1994; 272: 283-285.
- Marsh WC, Wolter M, Mayet A. Juxta-articular fibrotic nodules in *Borrelia* infection—ultrastructural details of therapy-induced regression. *Clin Exp Dermatol* 1994; 19: 394-398.
- Horowitz HW, Sanghera K, Goldberg N, Pechman D, Kamer R, Duray P, Weinstein A. Dermatomyositis associated with Lyme Disease: case report and review of Lyme myositis. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 166-171.
- Hoffman JC, Stichtenoth DO, Zeidler H, Follmann M, Brandis A, Stanek G, Wollenhaupt J. Lyme Disease in a 74-year-old forest owner with symptoms of dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1157-1160.
- WHO-Workshop: European Seminar on Lyme Borreliosis; Prague, Czechoslovakia; 14-17 Nov 1989. In: Stanek (ed.). *Lyme Borreliosis II*. Stuttgart-New York, Gustav Fisher: 352-361.
- Cooper JD, Schoen RT. Lyme disease: difficulties in diagnosis. *Infect Med* 1994; 11: 509-514.
- Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of tests. *J Infect Dis* 1984; 149: 789-795.
- Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western Blots (Immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J C Microbiol* 1999; 37(7):2241-47.
- Kurtenbach, K, De Michelis S, Sewell H-S, Etti S, Schäfer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Haninçová K, Labuda M, Bormane A and Donaghy M. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (10): 4926-4928.
- Kurtenbach, K, De Michelis S, Sewell H-S, Etti S, Schäfer SM, Holmes E, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Haninçová K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M. The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol* 2002; 291 (suppl. 33): 152-154.
- Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 185-201.
- Guy EC, Stanek G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by polymerase chain-reaction. *J Clin Pathol* 1991; 44: 610-611.
- Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svenungsson B, Stiernstedt G. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 473-479.
- Pacher AR, Zhang W-F, Schaefer H, Schaefer S, O'Neill T. Detection of active infection in nonhuman primates with Lyme neuroborreliosis: comparison of PCR, culture, and a bioassay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3243-3247.