



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Comunicação breve

Evidência molecular de *Borrelia burgdorferi sensu lato* em pacientes no centro-oeste brasileiro



Fernando Aguilar Lopes^{a,b,*}, Jania de Rezende^c, Danielly Beraldo dos Santos Silva^d,
Fernanda de Cássia Gonçalves Alves^e, Carina Elisei de Oliveira^c
e Izaías Pereira da Costa^{a,b}

^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina (Famed), Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil

^b Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (Humap), Campo Grande, MS, Brasil

^c Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Campo Grande, MS, Brasil

^d Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, Jaboticabal, SP, Brasil

^e Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), Campo Grande, MS, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 22 de novembro de 2016

Aceito em 14 de abril de 2017

On-line em 5 de maio de 2017

Palavras-chave:

Borrelia burgdorferi

Doença de Lyme

flgE

Síndrome de Baggio-Yoshinari

Brasil

R E S U M O

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

© 2017 Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: fernando.lopes@ufms.br (F.A. Lopes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2017.04.001>

0482-5004/© 2017 Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients in Brazilian central-western region

A B S T R A C T

Keywords:

Borrelia burgdorferi
Lyme disease
flgE
Baggio-Yoshinari syndrome
Brazil

We aimed to detect DNA of *Borrelia burgdorferi* in whole blood and serum samples of patients with clinical symptoms and epidemiology compatible with Brazilian Lyme-like disease. Four patients with positive epidemiological histories were recruited for the study. Blood samples were collected, screened by serologic testing by ELISA and Western blotting and molecular identification of *B. burgdorferi* by amplifying a fragment of the conserved gene that synthesizes the hook flagellar (*flgE*). The results showed positive serology and for the first time, the presence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in humans in the Midwest region of Brazil. The resulting sequences were similar to GenBank corresponding sequences of *Borrelia burgdorferi flgE* gene. By neighbor-joining the phylogenetic analysis, the *flgE* sequence of the Brazilian strain clustered in a monophyletic group with the sequence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* under 100% bootstrap support. This study opens up promising perspectives and reinforces the need for additional studies to determine the epidemiological characteristics of the disease, as well as the impact of the prevalence of Brazilian borreliosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil.

© 2017 Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A doença de Lyme (DL) é uma zoonose emergente de caráter multissistêmico, causada por espiroquetas do grupo *Borrelia burgdorferi sensu lato* e transmitida por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*.¹

A distribuição geográfica da doença é ampla e as manifestações clínicas variam conforme a espécie do complexo *B. burgdorferi sensu lato* encontrada em determinada localidade geográfica.^{2,3} A diversidade etiológica e antigênica explica o organotropismo e o aparecimento de quadros clínicos e laboratoriais distintos nas diferentes regiões e representa um crescente desafio ao manejo dessa zoonose emergente.¹

No Brasil, os primeiros casos foram descritos no Estado de São Paulo em 1992⁴ e, desde então, outros casos têm sido descritos com técnicas sorológicas e moleculares em diversos estados brasileiros: Mato Grosso do Sul,⁵⁻⁷ Amazonas,⁸ Tocantins⁹ e Paraná,¹⁰

Diferenças observadas nas características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais em relação à DL descrita no hemisfério norte permitiram caracterizar a doença de Lyme-símile brasileira (DLSB) ou síndrome de Baggio-Yoshinari,^{11,12} que, apesar do clássico eritema migratório e das habituais complicações sistêmicas encontradas na DL, cursa com grande frequência de recorrências e produção de autoanticorpos ao longo da prolongada evolução clínica.¹³

Estudos com métodos moleculares a partir de amostras de humanos com sintomatologia compatível com a DLSB têm reforçado a existência de casos de borreliose no Brasil.^{10,14} Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar a presença de DNA de *Borrelia burgdorferi* em amostras de pacientes com diagnóstico clínico e sorológico de borreliose no Mato Grosso do Sul, Brasil.

Pacientes e métodos

Selecionamos quatro pacientes com manifestações clínicas e epidemiologia compatível com a DLSB atendidos pelo Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Humap-UFMS). Todas as pacientes eram do sexo feminino com média de 33,3 (\pm 11,9) anos. Todas tinham histórico de picadas de carrapato e visitas a áreas de alto risco nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e também preenchiam os critérios brasileiros para o diagnóstico de borreliose, tal como adotados pelo Laboratório de Investigação em Reumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (LIM-17), centro de referência no Brasil.^{12,15}

Uma das pacientes estava na fase aguda (diagnosticada dentro de três meses do início da doença) e as outras três estavam na fase tardia (diagnosticados mais de três meses após o início da doença) da borreliose. A paciente que estava em fase de doença aguda apresentava sintomas *flu-like*, inclusive febre, cefaleia, mialgia e artralgia. As pacientes que estavam no estágio tardio da doença tinham desenvolvido artrite e apresentavam distúrbios cognitivos, manifestavam-se com sintomas inespecíficos, inclusive perda de memória, alterações do sono e alterações do humor, quadro depressivo com indiferença social e perda de apetite, além da recorrência de sintomas *flu-like* e fadiga crônica. Todas apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos para *B. burgdorferi* G39/40, de origem americana, com metodologias Elisa e WB¹⁶ de acordo com a padronização e interpretação recomendadas pelo laboratório de referência nacional LIM-17.^{12,15}

Quarenta indivíduos em bom estado geral, sem histórico de picada de carrapato ou de viagem recente a áreas de alto risco,

forneceram amostras de sangue e foram incluídos no grupo de controle. Trinta indivíduos eram do sexo feminino (75%) e dez eram do masculino (25%). A média foi de 34,6 (\pm 19,2) anos.

DNA foi extraído com kit QIAamp DNA Kit (QIAGEN[®]) a partir de amostras de 100 μ L de sangue periférico e de soro, de acordo com as instruções do fabricante. A pureza (260 nm/280 nm) e a concentração (ng/ μ L) total de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (BioDrop[®] Touch Duo Spectrophotometer by BioDrop England).

Os iniciadores usados foram desenhados por Rezende et al. (Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI – Processo BR 10 2016 021522 6) para amplificação de um fragmento de 262 pb da região de codificação do gene conservado que sintetiza o gancho flagelar (*flgE*) de *B. burgdorferi* descrito por Sal et al.¹⁷ Foram usados os seguintes primers: *flgE* 262 FW (5'-TCCTCCGGGATTTCATACAAG-3') e *flgE* 262 Rev (5'-TGGGTGCAAATGTAGGTGAA-3').

Amplificação foi feita em 25 μ L de volume final de reação com 17,55 μ L de H₂O ultrapura livre de DNase/RNase, 2,50 μ L de Tampão PCR 10x, 0,75 μ L de MgCl₂ (1,5 mM), 0,50 μ L de dNTP mix (10 mM), 0,25 μ L de cada primer (10 pmoles), 0,2 μ L de Platinum[™] TaqDNA Polymerase e 3 μ L de DNA extraído da amostra.

As condições de ciclos da PCR consistiram de uma desnaturação inicial durante 3 minutos a 95 °C, seguida de 45 ciclos repetitivos, consistiu em desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 62 °C por 25 segundos, extensão a 72 °C por 25 segundos, seguidos por uma extensão final durante 5 minutos a 72 °C. As boas práticas de laboratório foram seguidas para evitar a contaminação e, em cada reação, foi incluído um controle negativo (água) para descartar possibilidade de contaminação. *Borrelia anserina* foi usada como um controle positivo em todas as reações. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Gold (Invitrogen) e analisados por transiluminação de UV.

As amostras positivas foram purificadas com QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) e sequenciadas em sequenciador automático de DNA ABI Prism 3130 (Applied Biosystems[®]) em ambas as direções com BigDye Ready Reaction mix (ABI Corporation[®]). O alinhamento foi feito em software Clustal W2[®] com as sequências obtidas neste estudo e a sequência disponível no GenBank (Número de Acesso: CP009656.1). A análise filogenética foi inferida para o gene *flgE* com o programa MEGA 7.0[®] e um dendograma foi construído pelo método de Neighbor-Joining.¹⁸ Valores de confiança para os ramos individuais da árvore resultante foram determinados pela análise de bootstrap com 100 repetições.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) conforme indicado no protocolo de pesquisa número 1.065.681 de 15 de maio de 2015 – CAAE 42325815.1.0000.0021. Todos os controles e pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Tabela 1 – Resultado da sorologia para *B. burgdorferi* por Elisa e Western blotting e da PCR para o gene *flgE* em amostras de pacientes

Paciente	Elisa		Western blotting		PCR <i>flgE</i>
	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	
1	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

Resultados

A presença de anticorpos anti-*Borrelia* e a amplificação do DNA de *Borrelia burgdorferi sensu lato* para o gene *flgE* foram detectadas em todas as amostras analisadas (tabela 1).

Para a reação de PCR foram submetidas oito amostras (quatro sangue total e quatro soros) e 100% (4/4) das amostras de sangue total e 25% (1/4) das amostras de soro humano foram positivas (fig. 1).

As sequências obtidas neste estudo apresentaram homologia com sequências de *B. burgdorferi sensu lato* depositadas no GenBank e possibilitaram a identificação em nível de espécie. A extensão sequenciada e avaliada do gene *flgE* de acordo com as sequências disponíveis no GenBank foi de 228 pb, que codificam 76 aminoácidos.

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank com os números de acesso KU712208, KU712209, KU712210, KY073265 e KY073266. As sequências foram agrupadas em um grupo monofilético pela análise filogenética, pelo método de Neighbor-Joining, com 100% de suporte bootstrap (fig. 2).

Discussão

Nossos resultados fornecem evidência de *Borrelia burgdorferi sensu lato* em amostras de sangue total e a inédita detecção do DNA da espiroqueta amplificada para o gene *flgE* em amostra de soro humano em nossa região.

O gene que sintetiza o gancho flagelar (*flgE*) é um gene cromossômico único, de aproximadamente 1 kb, e que codifica para a proteína flagelina (41 kDa). Por ser altamente

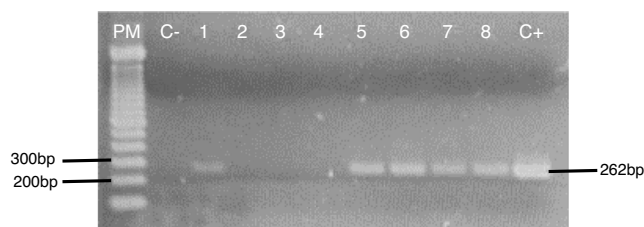


Figura 1 – PCR do gene *flgE* analisado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo: PM = peso molecular (100pb); C- = controle negativo; 1, 2, 3 e 4 = amostras de soro de pacientes com borreliose brasileira; 5, 6, 7 e 8 = amostras de sangue total de pacientes com borreliose brasileira; C+ = *Borrelia anserina*.

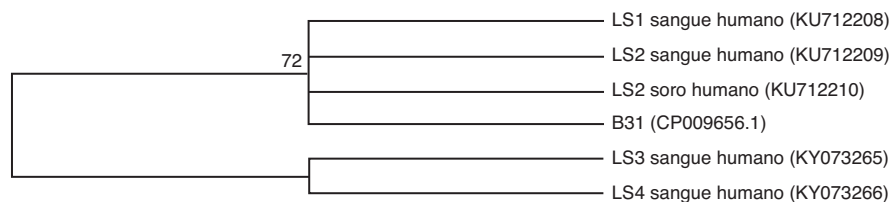


Figura 2 – Árvore filogenética baseada na comparação da região codificadora do gene *flgE* de *Borrelia burgdorferi*.

conservado, sua diversidade é valiosa para distinguir as espécies de *Borrelia*.^{19,20} A análise filogenética com a sequência de genes da flagelina confirmou a homologia entre os isolados.

Todas as amostras de sangue total analisadas apresentaram positividade e apenas uma única amostra de soro foi positiva na reação de PCR. Coburn *et al.*²¹ demonstraram a capacidade de ligação de *B. burgdorferi* às plaquetas do hospedeiro e Goodman *et al.*²² afirmam que talvez esse seja o motivo da maior concentração de espiroquetas no plasma em relação ao soro e sugerem que o plasma seja a amostra preferencial para pesquisa.

No Brasil, pacientes diagnosticados com características sugestivas de borreliose apresentam histórico de exposição a carrapatos, quadro clínico sugestivo com frequentes recorrências, sorologia positiva mas com títulos baixos e pouco persistentes, inclusive a visualização de estruturas sugestivas de espiroquetas em amostras de sangue de pacientes com perfil clínico compatível.^{12,13}

A presença de anticorpos anti-*Borrelia* pelas técnicas de Elisa e WB tem sido demonstrada em pacientes sintomáticos e assintomáticos, com epidemiologia positiva de contato com carrapato, em diversas regiões do Brasil.^{5,6,8-10}

Entretanto, a observação de um padrão de reatividade sorológica diferente da DL com baixa sensibilidade e títulos variáveis levou à definição de critérios nacionais para interpretação dos testes sorológicos. O LIM-17, centro de referência no Brasil, adota um critério de avaliação do WB que se baseia não na presença de bandas específicas, mas no quantitativo de bandas, sendo considerado teste positivo a presença de duas bandas para IgM, quatro para IgG ou ainda um padrão combinado de uma banda IgM e duas bandas IgG.^{12,15}

A descrição de espiroquetas na sua forma L, conhecidas como bactérias deficientes em parede celular e que podem alterar sua morfologia quando as condições de sobrevivência não são favoráveis,¹² e a posterior detecção de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* por Mantovani *et al.*¹⁴ auxiliaram no entendimento da maioria das controvérsias da DLSB: longa permanência das espiroquetas no hospedeiro devido aos mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro,²³ dificuldades para cultivá-las nos meios tradicionais como o BSK, embora descrevam a visualização de estruturas sugestivas de espiroquetas em amostras de sangue humano de pacientes com perfil clínico compatível¹², baixa resposta imunológica contra a bactéria que ocasiona títulos baixos e pouco persistentes de anticorpos, desenvolvimento de autoimunidade¹² e resistência à sua eliminação dos hospedeiros, ocorrem recidivas clínicas e sorológicas.^{13,23-25}

Esses resultados confirmam a existência de borreliose causada por *B. burgdorferi sensu lato* no Estado de Mato Grosso do

Sul, Brasil, com sintomas semelhantes a DL clássica e sugerem a necessidade de prosseguir com os estudos epidemiológicos, sorológicos e moleculares a fim de melhor caracterizar essa zoonose emergente na região, que raramente é fatal, porém de grande morbidade quando não adequadamente diagnosticada e tratada, devido às recorrências e complicações clínicas progressivas.

Financiamento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À equipe do LIM-17 pelo treinamento e a cooperação durante este estudo e aos professores Dra. Susana Elisa Moreno (UCDB), Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro (UFMS) e Dr. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho (UCDB) pela inestimável colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Steere AC. Lyme Disease. *N Engl J Med.* 2001;345:115-25.
2. Qiu WG, Bruno JF, McCaig WD, Xu Y, Livey I, Schriefer ME, et al. Wide distribution of a high-virulence *Borrelia burgdorferi* clone in Europe and North America. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1097-104.
3. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2:123-8.
4. Yoshinari NH, Oyafoso LK, Monteiro FGV, Barros PJJ, Cruz FCM, Ferreira LGE, et al. Doença de Lyme: relato de um caso observado no Brasil. *Rev Hosp Clin.* 1993;48:170-4.
5. Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Perfil clínico e laboratorial da doença de Lyme-símile no Estado de Mato Grosso do Sul: análise de 16 pacientes. *Rev Bras Reumatol.* 2001;41:142-50.
6. Naka EM, Costa IP, Arão CAB, Soares CO, Yoshinari NH. Pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* em soro de crianças com manifestações clínicas e epidemiologia compatíveis com a Doença de Lyme-Símile no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Reumatol.* 2008;48:74-85.

7. Rezende J, Lopes FA, Alves FCG, Bruno AR, Moreno SE, Costa IP, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *JSM Trop Med Res*. 2016;1:1003.
8. Talhari S, Santos MNS, Talhari C, de Lima Ferreira LC, Silva RM Jr, Zelger B, et al. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Brazil: occurrence confirmed by immunohistochemistry and focus floating microscopy. *Acta Trop*. 2010;115:4-200.
9. Carranza-Tamayo CO, Costa JNG, Bastos WM. Lyme disease in the state of Tocantins, Brazil: report of the first cases. *Braz J Infect Dis*. 2012;16:586-9.
10. Gonçalves DD, Moura RA, Nunes M, Carreira T, Vidotto O, Freitas JC, et al. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in humans in a rural area of Paraná State, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2015;46:571-5.
11. Gauditano G, Bonoldi VLN, Costa IP, Barros-Battesti DM, Barros PJJ, Fonseca AH. Síndrome de Lyme-símile ou complexo infecto-reacional do carrapato – Síndrome de Baggio-Yoshinari. *Rev Paul Reumatol*. 2005;4:16-7.
12. Mantovani E, Costa IP, Gauditano G, Bonoldi VLN, Higuchi ML, Yoshinari NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:443-56.
13. Yoshinari NH. Uma longa jornada para entender a *Borrelia burgdorferi* no Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 2009;49:483-6.
14. Mantovani E, Marangoni RG, Gauditano G, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Amplification of the *flgE* gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2012;54:153-7.
15. Yoshinari NH, Mantovani E, Bonoldi VL, Marangoni RG, Gauditano G. Brazilian Lyme-like disease or Baggio-Yoshinari Syndrome: exotic and emerging Brazilian tick-borne zoonosis. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56:363-9.
16. Barros PJJ. Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e reação em cadeia de polimerase [PhD Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000. p. 163.
17. Sal MS, Li C, Motalab MA, Shibata S, Aizawa SI, Charon NW. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook basal body structure. *J Bacteriol*. 2008;190:1912-21.
18. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4:406-25.
19. Picken RN. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme Disease and North-American Relapsing Fever. *J Clin Microbiol*. 1992;30:99-114.
20. Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, Sato Y. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:898-905.
21. Coburn J, Leonh JM, Erban JK. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:7059-63.
22. Goodman JL, Bradley JF, Ross AE, Goellner P, Lagus A, Vitale B, et al. Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. *Am J Med*. 1995;99:6-12.
23. Berende A, Oosting M, Kullberg BJ, Netea MG, Joosten LAB. Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. *Eur Cytokine Netw*. 2010;21:7-18.
24. Yoshinari NH, Bonoldi VLN, Barros-Battesti DM, Schumaker TTS. Doença de Lyme-símile no Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 1999;39:57-8.
25. Shinjo SK, Gauditano G, Marchiori PE, Bonoldi VLN, Costa IP, Mantovani E, et al. Manifestação neurológica na Síndrome de Baggio-Yoshinari (Síndrome brasileira semelhante à doença de Lyme). *Rev Bras Reumatol*. 2009;49:492-505.