

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



FACULDADE DE MEDICINA



ENFERMAGEM

Pesquisa molecular de *Borrelia* spp. em carrapatos

Elen Cristina dos Santos

Uberlândia-MG

Junho-2019

Elen Cristina dos Santos

Pesquisa molecular de *Borrelia* spp. em carrapatos

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Enfermagem da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia a ser utilizado como Trabalho de conclusão de curso sob orientação do Professor Dr. Jonny Yokosawa.

Uberlândia-MG

Junho-2019

ELEN CRISTINA DOS SANTOS

Pesquisa Molecular de *Borrelia* spp. em carrapatos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao COTCC do curso de graduação em Enfermagem FAMED-UFU como exigência parcial para obtenção do grau de bacharelado e licenciado em Enfermagem.

Orientador Professor Dr. Jonny Yokosawa.

A banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso, em sessão pública realiza em 26 de junho de 2019, considerou a aluna aprovada.

Examinador 1: Jonny Yokosawa

Examinador 2: Ana Paula Mendes Muniz

Examinador 3: Bruno Toledo

Agradeço ao meu orientador Professor Dr.
Jonny Yokosawa por toda colaboração e
paciência durante o desenvolvimento deste
trabalho.

RESUMO

Borrelioses são doenças infecciosas causadas por bactérias do gênero *Borrelia* que são transmitidas aos animais e humanos por inoculação pela picada de carrapatos. No Brasil, a doença ficou conhecida como Síndrome de Baggio-Yoshinari ou doença de Lyme-símile, devido a algumas diferenças observadas nas manifestações clínicas com relação à doença de Lyme, que ocorre na América do Norte. Apesar dos relatos de casos da doença detectados em humanos e animais por testes sorológicos no país, ainda não há registros de identificação dos vetores transmissores do patógeno. Devido à ausência de estudos que confirmem os vetores da doença, bem como o genótipo de seu agente causador, fazem-se necessários mais estudos na tentativa de identificar as espécies dos potenciais vetores além do patógeno bem como maior conhecimento da distribuição endêmica da borreliose no Brasil e do perfil genotípico de *Borrelia*. Assim, o principal objetivo do presente estudo foi realizar a pesquisa molecular da presença de *Borrelia* spp. em carrapatos coletados no período de março de 2012 a setembro de 2015 no município de Araguapaz, GO. Amostras de DNA desses carrapatos foram obtidas e testadas por meio de PCR, realizada em dois *rounds*, para pesquisa de *Borrelia* spp. e os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Das amostras de DNA nenhuma apresentou amplificação de tamanho esperado nos produtos da segunda PCR. No entanto, 12 apresentaram amplificação de tamanho próximo ao esperado após a primeira PCR, porém com pouco produto de PCR além da observação de arraste. Combinações diferentes de primers foram testadas na segunda PCR (seminested-PCR) com essas amostras, mas amplificação de tamanho diferente do esperado foi observado em somente uma amostra, sugerindo tratar-se de amplificação inespecífica. Outras condições serão testadas para melhorar a qualidade da PCR e possibilitar o sequenciamento nucleotídeo dos produtos amplificados, possibilitando a identificação da espécie de *Borrelia*.

Palavras chave: Borreliose de Lyme, doença de Lyme, síndrome Baggio-Yoshinari, carrapatos, *Borrelia*.

ABSTRACT

Borrelioses are infectious diseases caused by bacteria of the genus *Borrelia*, which are transmitted to animals and humans by inoculation by tick bites. In Brazil, the disease was known as Baggio-Yoshinari Syndrome or Lyme Disease, due to some differences found in clinical manifestations and vectors present in the region. In Brazil, this disease, known as Brazilian Lyme disease or Baggio-Yoshinari syndrome, has been poorly studied. Therefore, its prevalent epidemiology and genotypes are not well defined. Although there are already cases of the disease detected in humans and animals by serological tests, we still do not have records of identification of the vectors. Due to the absence of studies confirming the disease vector, Lyme-simile, as well as the causative agent genotype, further studies are necessary in order to identify and confirm the pathogen vector as well as a better knowledge of the endemic distribution of borreliosis in Brazil and genotypic profile. Samples of tick DNA from the municipality of Araguapaz, GO were tested by PCR, performed in two rounds according to protocol described by Barbour et al. (1996) for *Borrelia* sp. PCR products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis in 0.5X TBE buffer and RedView DNA Gel Stain (Genecopoeia) at 1:10,000 dilution using 1 Kb Plus Ladder as the molecular weight standard. Samples that had expected size for borrelia in the first round of the PCR or in the second, will be purified and characterized to identify their genotypic profile. In the case of DNA confirmation of *Borrelia* spp. in the tick samples, it will be possible to identify the genotypic profile of the bacteria, their vector and potencies host, as well as the demographic distribution.

Key words: Lyme borreliosis, Lyme disease, Baggio-Yoshinari syndrome, ticks, *Borrelia*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR utilizando DNA de <i>Borrelia anserina</i> como controle.....	17
Figura 2: Amplificação de DNA por nested-PCR.....	18
Figura 3: Produtos de 1ºPCR demonstrando amplificação.....	18
Tabela 1: características das amostras.....	16
Tabela 2: características das amostras.....	18

SUMÁRIO

1. Introdução	09
2. Justificativa	09
3. Objetivos	10
4. Referencial teórico	10
5. Materiais e métodos	14
6. Resultados	16
7. Discussão e conclusão	19
8. Referências bibliográficas	22

INTRODUÇÃO

Borreliose de Lyme ou doença de Lyme é uma inflamação sistêmica não contagiosa provocada pela introdução de espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* no hospedeiro pela picada de carrapatos do gênero *Ixodes*. O quadro inicial da borreliose inclui sintomas como febre baixa, calafrios, mialgia, artralgia, cefaleia, adenomegalia e podem aparecer novas lesões na pele. No quadro secundário, pode haver alterações neurológicas, cardíacas, articulares e oftalmológicas. A doença, no Brasil, ficou conhecida como síndrome Baggio-Yoshinari ou Lyme-símile, com vários registros de ocorrências em animais domésticos e selvagens e em humanos. Estudos realizados nos estados de Rio de Janeiro e Minas gerais demonstraram por testes sorológicos a presença de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em animais selvagens e domésticos, o que evidencia a circulação de espécies de *Borrelia* na região (YOSHINARI et al 2010, SANTOS et al 2010)

Devido à escassez de estudos, o objetivo do presente projeto será realizar a pesquisa da presença de DNA de *Borrelia* sp., por meio de PCR, em carrapatos coletados de Araguapaz/GO. Caso o seu DNA seja detectado, a identificação da espécie será realizada por meio de sequenciamento do produto de PCR e análise por ferramentas de bioinformática da sequência nucleotídica obtida. Além disso, caso encontrada será analisada em qual(is) espécie(s) de carrapato o DNA de *Borrelia* foi encontrado para avaliar o risco de transmissão a humanos e outros hospedeiros.

JUSTIFICATIVA

Há relatos de infecção por borreliose em humanos e animais no país e há relatos de dois casos de identificação molecular de *Borrelia* sp. em humanos. Nestes casos a sequência de DNA mostrou alta similaridade com *B. burgdorferi* sensu lato, que possui 21 espécies, incluindo *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzeli* e *B. garinii*, que causam a doença de Lyme na América do Norte, Europa e Ásia (MANTOVANI et al., 2012; LOPES et al., 2017; STONE et al., 2017).

Apesar destas duas identificações moleculares da bactéria, não houve a identificação da(s) espécie(s) dos carrapatos que possivelmente transmitiram o patógeno aos pacientes e os estudos sobre identificação de patógeno, vetores e hospedeiros são poucos. Por este motivo, a necessidade de se realizar mais estudos na tentativa de se identificar a(s) espécie(s) de *Borrelia* sp. presentes no país e identificar as possíveis espécies de

carrapatos associadas com a transmissão do patógeno ao hospedeiro animal ou humano. Para isso, será realizada a pesquisa do DNA de *Borrelia* sp., por meio de PCR, em amostras de DNA obtidas de carrapatos coletados em Araguapaz/GO.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Identificar a presença de *Borrelia* spp. em carrapatos coletados em Araguapaz/GO

Objetivos Específicos

- Realizar PCR com amostras de DNA de carrapatos do gênero *Ixodes* e *Amblyomma* para investigar a presença de *Borrelia* sp.;
- No caso de sua detecção, realizar o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos com os testes de DNA dos carrapatos, afim de identificar a espécie de *Borrelia*
- Associar a distribuição da *Borrelia* sp. com as espécies de carrapatos coletados em ambos locais.
- Associar a espécie de *Borrelia* sp. aos vetores e locais onde a bactéria foi encontrada.

REFERENCIAL TEÓRICO

Borrelioses são doenças infecciosas causadas pelas bactérias do gênero *Borrelia*, que são transmitidas aos animais e humanos por inoculação pela picada de carrapatos. O agente causador da Borreliose de Lyme é a *Borrelia burgdorferi* sensu lato, que é um grupo que engloba 14 espécies. Entre essas, quatro estão associadas a doença de Lyme a *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. spielmanii*. Atualmente são conhecidas cinco doenças causadas pelas bactérias do gênero *Borrelia*: febre recorrente, espiroqueta aviária, borreliose bovina, aborto epizootico bovino e doença de Lyme (SOCOLOVSCHI et al 2009, , SANTOS et al 2010, YOSHINARI et al 2010, LORENZO et al 2012).

As primeiras ocorrências registradas são da Suécia, em 1910, por Arvid Afzelius e da Áustria, em 1914, por Benjamin Lipschutz que relataram pacientes com eritema migratório crônico caracterizado por placas eritematosas de crescimento centrífugo. (SANTOS et al., 2010).

Após esses primeiros casos, foram registradas novas ocorrências em diferentes países da Europa. Nos EUA, diversos casos de pacientes jovens com artrite e lesões cutâneas equivalentes ao eritema migratório crônico (EMC) foram registrados em 1977 na cidade de Lyme, Connecticut. A ligação entre artrite e EMC foi intitulada de doença de Lyme, artrite de Lyme ou borreliose de Lyme (SANTOS et al 2010; YOSHINARI et al 2010).

Os primeiros estudos sugeriram comprovações epidemiológicas de que a doença se espalhava por picadas de inseto pelos relatos dermatológicos de EMC. No ano de 1958, Holltron alcançou melhora de seus pacientes utilizando penicilina procaína, determinando que a etiologia da doença seria de origem bacteriana. Em 1982 a bactéria foi cultivada por Willy Burgdorferi e Allan Barbour a partir de carrapatos do gênero *Ixodes* e, em 1984, Johnson denominou a bactéria como *Borrelia burgdorferi* (SANTOS et al 2010; LORENZO et al 2012; SANTOS et al 2010; YOSHINARI et al 2010;).

Nos Estados Unidos, pássaros e camundongos foram identificados como os reservatórios mais importantes (STONE *et al.*, 2017). No Brasil, anticorpos anti *B. burgdorferi* foram encontrados em cães, cavalos, pequenos mamíferos e búfalos, porém não se sabe ao certo a importância desses animais na transmissão da *Borrelia* (SANTOS *et al* 2010; LORENZO *et al* 2012).

Durante a picada o carrapato inocula sua saliva contendo as bactérias no hospedeiro antes de iniciar o repasto sanguíneo, com a finalidade de suprimir, a partir de proteínas presente na saliva, a resposta imune, inata e adaptativa, do hospedeiro. Os sintomas da infecção dependem do estágio da doença. No quadro inicial há sintomas como febre, calafrios, mialgia, artralgia, cefaleia, adenomegalia, e podem aparecer lesões na pele. No quadro secundário pode haver alterações neurológicas, cardíacas, articulares e oftalmológicas (HOVIUS, 2009; SCHOOLL DC *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2010; YOSHINARI *et al.*, 2010).

Os primeiros sintomas costumam aparecer até dez dias após a picada do carrapato, período de incubação média, porém em alguns casos podem aparecer entre três dias e semanas. O eritema costuma permanecer na pele por até trinta dias, porém pode persistir até meses. Durante a fase de disseminação aparecem sintomas como febre, calafrios, cefaleia, entre outros podendo aparecer também novas lesões na pele. (YOSHINARI *et al.*, 2010).

Os carrapatos do gênero *Ixodes* são os principais vetores da espiroqueta e se infectam ao se alimentarem de animais infectados. Apesar dos carrapatos de gênero

Ixodes serem conhecidos como os principais vetores da *B. burgdorferi* as espécies *Amblyomma americanum*, *A. cajennense* e *Dermacentor variabilis* já foram associadas a transmissão de *B. burgdorferi*. No Brasil há relatos de *Amblyoma* e *Rhipicephalus* com ocorrência de *Borrelia* spp. porém não a registros de sua participação na transmissão da doença (SOARES *et al.*, 2010, SANTOS *et al.*, 2010, LORENZO *et al.*, 2012, HAMMER *et al.*, 2009).

A doença de Lyme tem sido registrada em vários países, demonstrando uma distribuição ampla, sendo endêmica em diversos países da Europa e nos EUA, que registram cerca de 20.000 casos por ano. Cento e oitenta mil casos foram registrados nos Estados Unidos entre 2001 e 2016. No Brasil e outros países da América, apesar de não ser endêmica, há relatos de casos. (SOARES *et al.*, 2000; MONTIEL; BAUMGARTEN; SINHA 2002; O'DWYER *et al.*, 2004; BACON; KUGELER 2008; EISENDLE; ZELGER 2009; SANTOS *et al* 2010; YOSHINARI *et al* 2010; CDC 2016).

No Brasil, os primeiros registros são de 1992, no estado de São Paulo. Após esse registro, vários outros casos foram relatados com achados histológicos e sorológicos compatíveis com a doença de Lyme. Conforme novos casos foram registrados verificaram-se divergências entre a doença de Lyme nos EUA e a encontrada no Brasil. Os sintomas são similares, porém há divergência em relação a epidemiologia e agente causador. (ALVES *et al* 2004; SANTOS *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2005; YOSHINARI *et al.*, 2010, DALL'AGNOL *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2017; MANTOVANI *et al.*, 2012). A doença no Brasil ficou conhecida como síndrome Baggio-Yoshinari ou Lyme-símile, com vários registros de ocorrências em animais domésticos e selvagens e em humanos (ALVES *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2005; YOSHINARI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; NETO, GAUDITANO, YOSHINARI 2014; MONTANDON *et al.*, 2014).

Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) é causada por espiroquetas de morfologia incompleta e latente, parecidas com *Mycoplasma* spp, *Chlamidia* spp e bacterioides. A espiroqueta apresenta alterações de membrana externa, o que a torna mais resistente à antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro, sendo capazes de levar à sintomas recorrentes (MONTAVANI *et al.*, 2007; YOSHINARI *et al.*, 2010).

Fatores ambientais como biodiversidade de vetores e hospedeiros e diferenças climáticas, podem ter favorecido o surgimento de espiroquetas latentes, incluindo borrelias muito diferentes da encontrada na América do norte e Europa (YOSHINARI *et al.*, 2010)

Pesquisas realizadas nas áreas em que foi registrada a SBY, não encontraram carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, vetor comum da doença de Lyme nos EUA e Europa. Houve ocorrência, nas regiões onde foram relatadas a doenças, de carrapatos do complexo *Amblyomma sculptum* e carrapatos da espécie *Ixodes loricatus* (YOSHINARI *et al.*, 2010)

Nas áreas de ocorrência da SBY, foram encontrados espiroquetídeos que se assemelham com os encontrados nos pacientes, com diagnóstico de SBY, em roedores silvestres e marsupiais. No estado do Espírito Santo, há uma forte relação entre a presença de capivaras e ocorrência de SBY, sugerindo que talvez esse animal participe do ciclo epidemiológico da doença. Há suspeitas, também, do envolvimento de animais domésticos, como cachorro, cavalos e bovinos na manutenção da doença. (YOSHINARI *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2002).

No Brasil, entre os anos de 2009 e 2016, foram registrados 4.078 casos suspeitos de borreliose nos estados do Amazonas, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Tocantins. No estado do Paraná, uma sequência de DNA semelhante à de *B. burgdorferi* sensu lato foi detectada em carrapatos *Dermacentor nitens* em equinos, o primeiro relato da espiroqueta no país. (GONÇALVES *et al.*, 2013).

No quadro inicial da SBY os principais sintomas encontrados foram cutâneos, como eritema migratório, linfocitoma benigno, acrodermatite crônica atrófica e lesões pele semelhantes a esclerodemia no local da picada, febre, cefaleia e outros sintomas flu-like. Nos quadros secundários foram encontradas manifestações neurológicas, musculares e articulares (YOSHINARI *et al.*, 2010; YOSHINARI *et al.*, 1992).

O tratamento da doença é feito com antibióticos, a escolha do medicamento depende do estágio da doença. No quadro inicial é utilizado doxiciclina, caso em crianças recomenda-se o uso de azitromicina e amoxicilina. Em quadros avançados, que apresente sinais neurológicos, como encefalite, neurite e meningite, ou então sintomas articulares podem-se utilizar combinado ceftriaxona e doxiciclina. (YOSHINARI *et al.*, 2010; MONTOVANI *et al.*, 2007).

Os quadros iniciais de SBY respondem bem ao tratamento com antibióticos, não há consenso sobre o tratamento sobre os casos de evolução clínica prolongada ou episódios de recidivas. Mesmo no hemisfério norte, não há consenso sobre as diferentes formas de doença de Lyme e nem de tratamentos dos doentes (YOSHINARI *et al.*, 2010) Caso o tratamento com antibióticos não seja realizado a alguns dias ou semanas após a inoculação da bactéria, o quadro pode evoluir aparecendo sintomas neurológicos,

articulares e cardíacos. No Brasil, 35% dos casos apresentaram complicações neurológicas e articulares e 5% complicações cardíacas. (YOSHINARI *et al.*, 2010; YOSHINARI *et al.*, 1992).

O diagnóstico da infecção é feito através de achados clínicos, o HCFMUSP (Hospital de clínicas da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo) preconiza um guia diagnóstico na presença de parâmetros maiores e menores, é considerado positivo casos que apresentarem três parâmetros maiores ou dois maiores e dois menores. Os parâmetros maiores são epidemiologia compatível com o início da infecção, sorologia positiva e achados como eritema migratório ou complicações sistêmicas. Os parâmetros menores são episódios recorrentes, visualização da espiroqueta á microscopia de campo escuro e síndrome da fadiga crônica (YOSHINARI *et al.*, 2010; MONTOVANI *et al.*, 2007)

Para a detecção da espiroqueta são utilizados testes como ELISA, Western blotting, micrografia eletrônica de varredura e a identificação molecular através da ampliação de um gene específico por PCR. Na PCR, os produtos positivos são purificados, sequenciados e comparados com sequências do GenBank utilizando a ferramenta BLAST para a identificação e diferenciação das espécies de *Borrelia*. (DALL'AGNOL *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de carrapatos

Os carrapatos foram coletados de animais (caninos e equinos) e do ambiente, por técnica de arraste de flanela e com armadilha de CO₂ no período de 2012 a 2014 da região rural de Araguapaz, GO, e armazenados em etanol 70% à temperatura ambiente. Os carrapatos foram identificados de acordo com chaves dicotômicas (BARROS-BATTESTI, ARZUA, BECHARA, 2006; MARTINS *et al.* 2010) e por comparação com a coleção de referência do Museu de Carrapatos do Laboratório de Ixodologia da UFU.

Extração de DNA dos carrapatos

Os carrapatos foram seccionados ao meio, sendo uma metade reservada para futuras análises, enquanto a outra metade (individualmente ou em *pool* contendo até 20 metades de outros carrapatos da mesma espécie, do mesmo local de coleta e do mesmo hospedeiro) foi macerada para extração do DNA. Para isso, o DNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Sangioni *et al.* (2005). Um volume de 150µL de TE

modificado (Tris-HCl 10mM, EDTA 0,1mM, pH 8,0) foi adicionado ao macerado e, após breve centrifugação, 450µL de GT (tampão contendo isotiocianato de guanidina e fenol) foram adicionados. Após agitação e incubação, foram adicionados 100µL de clorofórmio, seguidos de nova agitação e centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e o DNA foi precipitado por adição de isopropanol. O tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a -4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após secagem do pellet por 5 a 10 min em temperatura ambiente, o DNA foi dissolvido com 40µL de TE modificado e armazenado a -20°C.

PCR

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados os *primers* descritos por Barbour *et al.* (1996) (Tabela 1). Foi realizada a mistura de reação para cada amostra contendo 1µL da amostra de DNA, tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50mM), *primers* FLA LL 10µM e FLA RL 0,8µM de cada, dNTPs 0,16mM de cada, *Taq* DNA polimerase 1 unidade, MgCl₂ 2,0mM, em volume de reação de 25µL. As condições da reação foram: 5min a 95°C, 35 ciclos de 94 °C por 30s, 55°C por 30s, e 72°C por 1 min, ao final dos ciclos uma fase de 72 °C por 7 min. Um µL da primeira PCR foi utilizada na *nested*-PCR, utilizando as mesmas condições da PCR anterior, porém utilizando os *primers* Fla LS e Fla RS nas concentrações de 0,3µM.

Tabela 1. Lista dos primers utilizados para realização da PCR foram os que codificam para o gene de flagelina. Sequencias:

	<i>Primers</i>
<i>1° PCR</i>	FlaLL: ACA TAT TCA GAT GCA GAC AGA GGT FlaRL: GCA ATC ATA GCC ATT GCA GAT TGT
<i>2° PCR</i>	FlaLS: AAC AGC TGA AGA GCT TGG AAT G FlaRS: CTT TGA TCA CTT ATC ATT CTA ATA GC

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de *Borrelia anserina* em concentração 1:1000

Após as reações de amplificação (ambos os *rounds*), 5µL dos produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X e *RedView* DNA Gel Stain (Genecopoeia) na diluição 1:10.000, utilizando 100bp DNA Ladder ou 1Kb Plus Ladder (Fermentas) como padrão de massa molecular. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado em sistema digital. Os tamanhos esperados dos produtos amplificados eram de 665pb para a primeira PCR e 354pb para a *nested*-PCR.

Sequenciamento nucleotídeo

O produto de PCR que apresentar tamanho próximo ao esperado sera purificado utilizando o kit GeneJet (Thermo Fisher) e a amostra sera sequenciada em equipamento ABI3730, utilizando-se BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems). Para edição, sera utilizado o software SeqMan Pro do pacote Lasergene versão 15 (DNASTAR, Inc) e a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizada para pesquisa de sequências similares depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

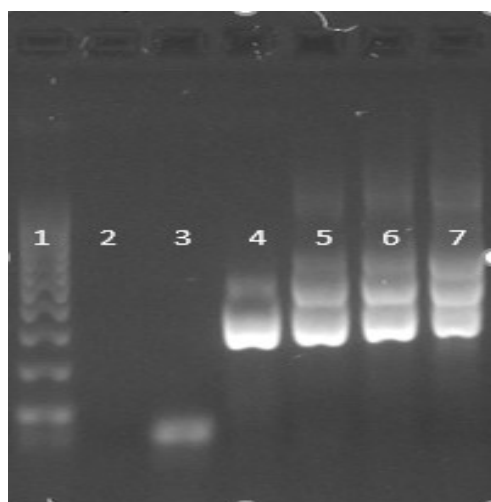
RESULTADOS

Foram utilizados no presente estudo 284 carrapatos adultos, sendo a maioria da espécie *Amblyomma sculptum* e coletados do ambiente (vida livre) (Tabela 2). Os equinos avaliados eram de diferentes fazendas e houve animais em que se encontrou mais de uma espécie de carrapatos. Foram obtidas 143 amostras de DNA, de carrapatos individuais ou de *pools* de carrapatos, que depois foram submetidas à PCR e *nested*-PCR para pesquisa molecular de *Borrelia*. No teste realizado com DNA de *Borrelia anserina*, utilizado como controle positivo, observou-se a formação de produto de tamanho próximo ao esperado, de 354pb, conforme figura 1.

Tabela 2: Informações dos carrapatos coletados em Araguapaz, GO, no período de março 2012 a setembro de 2014.

Espécie	Local de coleta ou hospedeiro	N (%)
<i>Amblyomma sculptum</i>	Ambiente	137 (48,2)
(n=236, 83,1%)	Caninos	91 (32,0)
	Equinos	8 (2,8)
<i>Dermacentor nittens</i>	Equinos	31 (10,9)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Caninos	16 (5,6)
<i>A. rotundatum</i>	Ambiente	1 (0,3)
	Total	284

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *nested*-PCR utilizando DNA de *Borrelia anserina* como controle. 1. padrão de peso molecular; 2. raia vazia; 3. controle negativo; 4 ao 7 diluições seriadas de DNA de *B. anserina*. A seta indica a banda de DNA com tamanho esperado (354 pb).



Das 143 amostras testadas nenhuma demonstrou *amplicon* com o tamanho esperado para *Borrelia anserina* na *nested*-PCR (Figura 2).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *nested*-PCR (em cima) A1 a B12 amostras de DNA de carrapatos, 21 raia vazia, 22 controle positivo DNA *Borrelia anserina*, 23 controle negativo água, 24 padrão de massa molecular.(em baixo) C21 ao D10 amostras de DNA de carrapatos, 19 controle positivo DNA *Borrelia anserina*, 20 controle negativo água, 21 padrão de massa molecular.



Testes de eletroforese foram feitos com 139 amostras de carrapatos produtos de 1ºPCR, conforme descritos na tabela 03, algumas amostras apresentaram resultados positivos, porém com tamanho de *amplicon* diferente do esperado para gene de flagelina de *Borrelia anserina*, 665pb. Se tratando de ampliações inespecíficas.

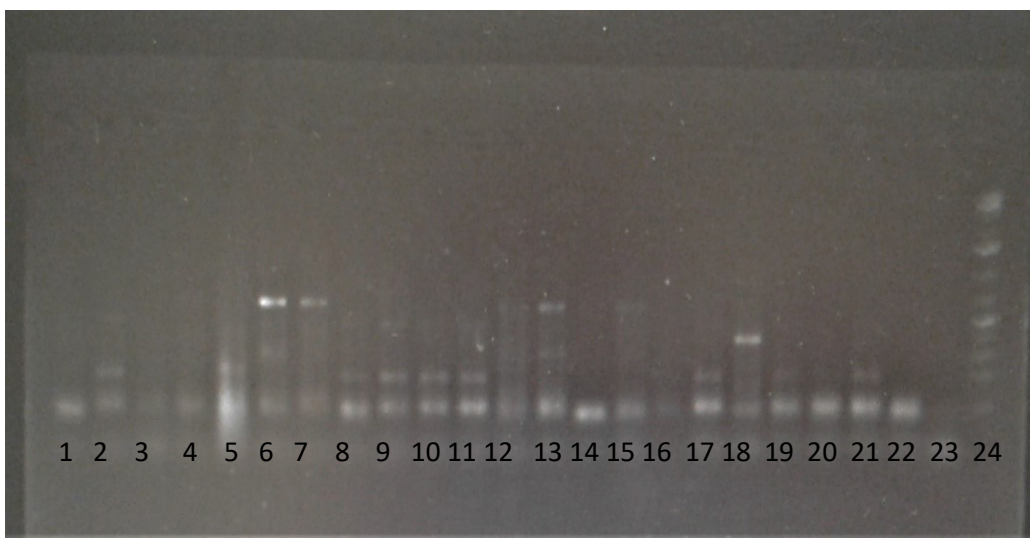
Tabela 3

TABELA 3: CARACTERÍSTICA DAS AMOSTRAS

Espécie	Período da Coleta	Local da coleta	Quantidade
<i>Dermacentor nittens</i>	2012-2014	Equinos de Araguapaz	31 carrapatos
<i>Amblyomma sculptum</i>	2013-2014	Araguapaz (ambiente)	101 carrapatos
<i>Amblyomma sculptum</i>	2014	Equinos de Araguapaz	08 carrapatos

As amostras que apresentaram ampliações inespecíficas serão sujeitas a novos testes para identificação do fragmento de DNA amplificado. Figura 03

Figura 3: Produtos de 1ºPCR demonstrando amplificação inespecífica. 1 ao 21 amostras de DNA de carrapatos; 22 controle positivo (diluição 1:1000 não aparece na primeira PCR); 23 controle negativo; 24 padrão de peso molecular.



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Borreliose de Lyme é uma doença causada por espiroquetas do complexo da *Borrelia burgdorferi*, que pode afetar animais e humanos. Essa doença apresenta diferentes manifestações clínicas e apresenta uma larga distribuição geográfica, sendo considerada uma zoonose emergente em vários países da Europa, América do norte e América do sul (LOPEZ *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2008; GONÇALVEZ *et al.* 2013)

No Brasil, os primeiros achados sorológicos foram encontrados em pacientes do estado de São Paulo com sintomas similares ao da doença de Lyme. A doença ficou conhecida com síndrome Baggio Yoshinari, devido à algumas diferenças encontradas na síndrome de Lyme presente na América do norte, tanto nas manifestações clínicas como no agente transmissor (YOSHINARI *et al.*, 2010; MONTAVANI *et al.*, 2012; GONÇALVEZ *et al.* 2013).

De acordo com alguns estudos a *Borrelia* tem sido encontrada em diferentes espécies de carrapatos nas Américas, Europa e Ásia. Os carrapatos do gênero *Ixodes* são os vetores mais frequentes, contudo pesquisadores de diversos países tem detectado *Borrelia burgdorferi* em carrapatos do gênero *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Rhipicephalus*, que parasita diversos animais inclusive humanos. (YOSHINARI *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2018).

Em 2013, um estudo realizado por Gonçalves e colaboradores, identificou *Borrelia burgdorferi* B31 em carrapatos do gênero *Dermacentor nitens*, no estado do Paraná. Os carrapatos foram coletados de equinos e, para a identificação da borrelia no teste de amplificação na PCR foi marcado os espaços intergenicos 5S (*rrf*) 23S (*rrl*) rRNA (Gonçalves *et al.*, 2013). Queiroz e colaboradores, encontraram espiroquetas no exame de hemolinfa em *Rhipicephalos micropolus*, no estado do Mato Grosso do Sul em um estudo performado em 2018, análises filogenéticas com genes 16s ribossomal *rrs*, de flagelina *Flab* e glicerosfodiester fosfodiesterase *glpQ*, mostrou proximidade das espiroquetas com *Borrelia turicatae* (Queiroz *et al.*, 2018).

No presente estudo, foram feitos teste com carrapatos das espécies *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Rhipicephalos*. O *Amblyomma sculptum* é comumente encontrado parasitando capivaras e cavalos, porem é um carrapato de baixa especificidade parasitaria, sendo encontrado também em aves, cervos, roedores, cães e humanos. E é a espécie conhecida pela transmissão de *Rickettsia rickettsi* agente causador da febre maculosa (OLIVEIRA, 2004; LABRUNA *et al.*, 2006).

Um estudo feito com setecentos e cinco carrapatos do Parque do Iguaçu, coletados de hospedeiros e ambiente, demonstrou resultado positivo de uma amostra de ninfa de *A. brasiliense*. A análise de sua sequência nucleotídica revelou 99% de identidade com sequência de *Candidatus B. ivorensis* identificada no carrapato da espécie *A. variegatum* na Costa do Marfim (SANTOS *et al.*, 2018)

Os testes de *PCR* e *Nested* foram feitos com amplificação para gene de flagelina *flaB*. A ausência de resultados positivos nesse trabalho, pode indicar prevalência baixa de espiroquetas ou a ausência das mesmas nas populações de carrapatos testados. No Brasil, há também poucos relatos da doença, o que demonstra, também, baixa presença das bactérias e/ou baixa taxa de infecção.

Um estudo feito no estado de São Paulo, por Ataliba, 2006, em carrapatos do gênero *Amblyomma*, usando marcação para amplificação nos genes de flagelina *flaB* também tiveram resultados negativos de 349 amostras.

Vários estudos feitos no Brasil com o intuito de amplificar genes específicos para *B. burgdorferi*, incluindo superfície de proteína A (OspA) e genes para flagelina A e B, tem falhado. Estudos utilizando genes que codificam gene de proteína estrutural *flgE*, tem mostrado resultados positivos em testes de PCR em pacientes brasileiros com suspeita da doença (LOPES *et al.*, 2017; ATALIBA 2006; MONTAVANI *et al.*, 2012; MUNOZ-LEAL *et al.*, 2018).

Novos estudos devem ser feitos para identificação dos vetores e hospedeiros da borrelia no Brasil, bem como o perfil genotípico da bactéria em circulação. E, também, com o intuito de se padronizar testes para diagnóstico seguro e confiável da síndrome de Lyme.

REFERENCIAS

ALVES, A L; MADUREIRA, R C; SILVA, R A; CORRÊA, F N *et al* .Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro Frequency of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs from the metropolitan region of Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* vol.24 no.4. 2004.

ATALIBA, A. C. Estudo de *Borrelia spp.* no Brasil. [Study of *Borrelia spp.* in Brazil]. 2006 61 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006

BACO, Rendi Murphree; KUGELER, Kiersten J.; MEAD, Paul S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Lyme disease - United States, 1992-2006. *MMWR Surveil Summ.* v.57:1 p.9. 2008.

C.A SANTOS *et al* DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULARES DE *Borrelia spp.* EM CARRAPATOS DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, BRASIL. III Congresso Latino-americano de Acarologia e VI Congresso Brasileiro de Acarologia; 2018

COSTA IP, BONOLDI VLN, YOSHINARI NH. Search for *Borrelia sp.* in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the State of Mato Grosso do Sul,

DALL'AGNOL B, MICHEL T, WECK B *et al.* (2017) *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa. *Ticks and Tick-borne Diseases*: 8, 928-932.

EISENDLE, K; ZELGER, B. The expanding spectrum of cutaneous borreliosis. *G Ital Dermatol Venereol.* v.144 p.157-71. 2009.

FONSECA, A H; SALLES, R S; SALLES, S A N; MADUREIRA, R C; YOSHINARI, Natalino Hajime. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *An. Bras. Dermatol.* vol.80 no.2 Rio de Janeiro Mar./Apr. 2005.

GONÇALVES D D, CARREIRA T, NUNES M, *et al.* 2013. First Record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana (Brazil). Brazilian Journal of Microbiology: 44, 3, 883-887.

GONÇALVES, D. D.; MOURA, R. A.; NUMES, M. *et al.* *Borrelia burgdorferi* sensu lato in humans in a rural area of Paraná State, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 46, 2, 571-575 (2015) ISSN 1678-4405

HAMER, S A.; TSAO, J I.; WALKER, E D.; MANSFIELD, L S.; FOSTER, E S.; HICKLING, G J. Use of tick surveys and serosurveys to evaluate pet dogs as a sentinel species for emerging Lyme disease. Am J Vet Res. v.70(1) p.49-56. 2009.

HOVIUS, JWR. Spitting Image: Tick Saliva Assists The Causative Agent Of Lyme Disease in Evading Host Skin's Innate Immune Response. Journal of Investigative Dermatology. October, 2009. Vol 129. Issue 10. Pag 2337-2339.

LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH (eds) Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 155–164, 2006.

LOPES FA *et al.* Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients in Brazilian central-western region. Rev Bras Reumatol. 2017.

LORENZO, O H; FERRER, J I; REYES, C R, HERNÁNDEZ, H L. Lyme disease: history, microbiology, epizootiology and epidemiology. Rev Cubana Hig Epidemiol. v.5 p.50. 2012.

MANTOVANI E, COSTA IP, GAUDITANO G, BONOLDI VL, 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.

MANTOVANI E, MARANGONI RG, GAUDITANO G, BONILDI VLN & YOSHINARI NH – Amplification of the *flgE* gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 54(3): 153-7, 2012.

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R. G.; BONOLDI V. N. L.; YOSHINARI N. H. Amplification of the *flgE* gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 54(3): 153-7, 2012

MONTADON, Carlos Emmanuel; YOSHINARI, Natalino Hajime; MILAGRES, Bruno Silva; MAZIOLI, Rafael; GOMES, Gabriel Guimarães; MOREIRA, Igor Nasser; PADILHA, Amanda de Freitas; WANDERLEY, Guido Gomes; MONTOVANI, Elenice;

GAVÃO, Marcio Antonio Moreira; LANGONI, Elio; MAFRA, Claudio, Evidência de *Borrelia* em mamíferos silvestres e domésticos no Estado de Minas Gerais, Brasil, Rev. Bras. Parasitol. Vet. vol.23 no.2 Jaboticabal Apr./June 2014

MONTIEL, Norma J.; BAUMGARTEN, Joni M; SINHA, Animesh A. Lyme disease: clinical features and treatment. *Cutis*. v.69 p.443-8. 2002.

MUNÔZ-LEAL, S.; FACCINI-MARTINEZ, A. A.; COSTA, F. B *et al.*; Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rudi*s in Brazil. *Tick and tick-borne diseases* 9 (2018) 864-871

NETO, Nilton Salles Rosa; GAUDITANO, Giancarla; YOSHINARI, Natalino Hajime, Meningoencefalite linfomonocitária crônica, oligoartrite e eritema nodoso: relato de síndrome de Baggio-Yoshinari de longa e recorrente evolução, Rev. Bras. Reumatol. vol.54 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2014.

OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.23, p. 118-122, 2004.

O'DWYER, Lucia Helena; SOARES, Cleber Oliveira; MASSARD, Carlos Luiz; SOUZA, José Carlos Pereira de; FLAUSINO, Walter; FONSECA, Adivaldo Henrique da. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* latu sensu associated with dog ticks in rural areas of the Rio de Janeiro State, Brazil. *Ciência Rural*. v.34 p.201-5. 2004.

QUEIROZ, N. A.; MASSAKI, S. H.; OLIVEIRA, J. V. M.; ALBRES, B. F. *et al.* Identificação morfológica da espiroqueta *Borrelia* spp. no exame da hemolinfa de *Rhipicephalus microplus*. *Braz. J. Anim. Environ. Res.*, Curitiba, v. 1, n. 2, p. 414-419, out./dez. 2018.

SANTOS, Mônica; JÚNIOR, Vidal Haddad; RIBEIRO-RODRIGUES, Rodrigo; TALHARI, Sinésio. Borreliose de Lyme. *An. Bras. Dermatol.* vol.85 no.6 Rio de Janeiro Nov./Dec. 2010.

SCHOLL DC, EMBERS ME, CASKEY JR *et al.*, Immunomodulatory effects of tick saliva on dermal cells exposed to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Parasites & Vectors* (2016) 9:394.

SOARES, C O; ISHIKAWA, M; FONSECA, A H; YOSHINARI, N H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesq. Vet. Bras.* vol.20 n.1 Rio de Janeiro Jan./Mar. 2000.

SOCOLOVSKIA, C; MEDIANNIKOV, O M; RAOULTA, D; PAROLA, P. Update on tick-born bacterial diseases in Europe. *Parasite*. v.16 p.259-73. 2009.

STONE BL, TOURAND Y, BRISSETTE C. Brave New Worlds: The Expanding Universe of Lyme Disease. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* (2017) Vol 17(9).

WANG G, LIVERIS D, MUKHERJEE P *et al.*, 2015. Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi*. *Curr Protoc Microbiol.*; 34; 12C.5.1-12C.5.31.

YOSHINARI NH, MANTOVANI E, BONOLDI VLN *et al*, 2010. Doença de Lyme-Símile Brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari: Zoonose Exótica e Emergente Transmitida por Carrapatos; *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(3): 363-9.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J.; YASSUDA, P. BAGGIO, D.; STEERE, A. C.; PAGLIARINE, R. C.; COSSERMELLI, W. Epidemiological study of Lyme disease in Brazil. *Revista do Hospital das clinicas Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 47, p. 71-75, 1992.