

Pesquisa de Anticorpos Anti-*Borrelia* e Anti-*Babesia* em Soro de Crianças com Manifestações Clínicas e Epidemiologia Compatíveis com a Doença de *Lyme-Simile* no Estado de Mato Grosso do Sul

Detection of Anti-Borrelia and Anti-Babesia Antibodies in the Serum of Children with Clinical Manifestations and Compatible Epidemiology with Lyme-Like Disease in the State of Mato Grosso do Sul

Erica Naomi Naka⁽¹⁾, Izaias Pereira da Costa⁽²⁾, César Augusto Brandão Arão⁽³⁾, Cleber Oliveira Soares⁽⁴⁾, Natalino Hajime Yoshinari⁽⁵⁾

RESUMO

A ocorrência de manifestações clínicas e laboratoriais semelhantes às encontradas na doença de Lyme e da coinfeção com a babesiose já foi demonstrada em trabalhos anteriores em adultos, porém não existem estudos desta natureza em crianças. **Objetivo:** Caracterizar o perfil clínico-epidemiológico da síndrome de Lyme-Símile em crianças do Estado de Mato Grosso do Sul e avaliar a prevalência dos anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* e anti-*Babesia bovis* no soro de pacientes que preencheram os critérios estabelecidos. **Métodos:** 100 pacientes entre 9 meses e 16 anos de idade foram submetidos à pesquisa dos anticorpos pela técnica de ELISA e a soroprevalência foi comparada com um grupo-controle. **Resultados:** Positividade para anticorpos anti-*B. burgdorferi* ocorreu em 27% dos pacientes com suspeita clínica, sendo 17% IgM e 12% IgG. As manifestações articulares ocorreram em 21 pacientes, as manifestações cutâneas em três pacientes e as manifestações neurológicas em três pacientes. A prevalência de anticorpos contra *B. burgdorferi* nos pacientes do grupo-controle foi de 15% ($p < 0,05$). Os anticorpos anti-*B. bovis* estiveram presentes em 24% dos pacientes suspeitos e em 3% do grupo-controle ($p < 0,05$). Concomitância dos anticorpos ocorreu em 10 pacientes com suspeita clínica e em nenhum controle. **Conclusão:** Os resultados deste estudo evidenciam a etiologia de caráter infeccioso e reacional das manifestações clínicas encontradas

ABSTRACT

The occurrence of clinical and laboratory manifestations similar to the Lyme disease and the coinfection with babesiosis was already demonstrated in previous researches with adult patients. However, there are no studies in children. **Objective:** To identify the clinical-epidemiological profile of the Lyme Simile Syndrome in children of the State of Mato Grosso do Sul and to evaluate the prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Babesia bovis* in the serum of patients that had fulfilled the established criteria. **Methods:** One hundred patients (age range: 9 months and 16 years-old) were screened for the presence of those antibodies, using ELISA, comparing to a control group. **Results:** Antibodies against *B. burgdorferi* were found in 27% of the patients with a clinical picture. The articular manifestations occurred in 21 patients, cutaneous in 3 and neurological in 3. The prevalence in the control group was 15% ($p < 0.05$). The antibodies for *Babesia bovis* were present in 24% of suspect patients and in 3% of the control group ($p < 0.05$). Concomitance of the two antibodies occurred in 10 patients with clinical suspect and no one of control group. **Conclusion:** The results found in this study suggest the infective and reactive character of the clinical manifestations of the patients, which can characterize a Syndrome, which possibly occurs in the presence of multiple

Recebido em 6/2/2007. Aprovado, após revisão, em 16/3/2008. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

Este estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa (Fape) da Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR).

Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Famed-UFMS).

1. Mestre e reumatologista pediatra responsável pela Unidade de Reumatologia Pediátrica do Serviço de Reumatologia e de Pediatria do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

2. Doutor e professor-associado do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina (Famed)/UFMS, coordenador do Programa de Residência Médica em Reumatologia da UFMS e chefe do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário da UFMS.

3. Mestre e farmacêutico bioquímico do Laboratório Central de Saúde Público do Estado de Mato Grosso do Sul (Lacen-MS).

4. Doutor e chefe adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Corte de Campo Grande-MS.

5. Doutor e professor livre docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), responsável pelo Laboratório de Imunologia (LIM17) da FMUSP e pela pesquisa da síndrome de *Lyme-Simile* no Brasil.

Endereço para correspondência: Erica Naomi Naka, Rua Paulo Freire, 224, Jardim América, CEP 79080-140, Campo Grande, MS, e-mail: nakaerica@yahoo.com.br

nos pacientes, podendo caracterizar uma síndrome, que possivelmente ocorra na presença de múltiplos microrganismos e está relacionada com carrapatos. Foi encontrada frequência superior de anticorpos contra *Borrelia* e *Babesia* nos pacientes em relação aos controles. Embora pequena, essa diferença foi estatisticamente significativa. Este achado não atesta que o quadro clínico dos pacientes seja causado por espécies de *Borrelia* ou *Babesia*, mas levanta a possibilidade de participação de algum agente infeccioso que possa estar relacionado a esses microrganismos. Os estudos devem prosseguir para melhorar a delimitação desta síndrome em nosso meio, assim como isolar o agente etiológico.

Palavras-chaves: *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Lyme-simile*, crianças.

INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme é uma infecção multissistêmica causada por diferentes espécies do gênero *Borrelia*, denominadas de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, e transmitida por picadas de carrapatos da família *Ixodidae* e similares^(1,2). É uma doença infecciosa emergente de distribuição mundial⁽³⁻⁶⁾, e na Europa foram identificados outros agentes etiológicos, como a *Borrelia garinii* e a *Borrelia afzelii*, sendo a última isolada também no continente asiático⁽⁴⁾. Nos Estados Unidos (EUA), a *Borrelia burgdorferi stricto sensu* é o principal agente etiológico⁽³⁾.

Em virtude do caráter multissistêmico da doença, convencionou-se chamar esta entidade clínica como doença de Lyme (DL) ou borreliose de Lyme (BL)⁽²⁾. Anteriormente foi denominada artrite de Lyme, pois em 1977 ocorreu uma epidemia com manifestações clínicas semelhantes a uma doença infecciosa, caracterizada por artrite oligoarticular e eritema migratório (EM), em uma zona rural da cidade de Lyme (Connecticut, EUA)⁽⁷⁾.

Em vista do desconhecimento da ocorrência da DL no Brasil, criou-se um projeto para a pesquisa da doença. Foi formada uma equipe multidisciplinar para a investigação da DL no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com a estruturação de um laboratório específico para o diagnóstico, realização de exames sorológicos e cultivo de *Borrelia burgdorferi*⁽⁸⁾. Os primeiros casos de DL com manifestações extracutâneas e sorologia positiva foram descritos em 1992⁽⁹⁾. Em 1993, a doença foi descrita em dois irmãos que haviam viajado para o município de Cotia, no Estado de São Paulo, e apresentaram quadro típico de EM crônico (EMC), além de envolvimento articular e muscular, com sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi* e boa resposta à antibioticoterapia⁽¹⁰⁾. A partir daquele ano, foram relata-

microorganisms that can be associated with tick-borne. It was found a higher frequency of antibodies against borrelia and babesia in patients in relation to the controls. Although small, this difference was statistically significant. This finding does not certify that the clinical features of patients is caused by species of borrelia or babesia, but raised the possibility of involvement of some infectious agent that could be related to these microorganisms. The studies should continue in order to improve the delineation of this syndrome and to try the isolation of the etiologic agent in our State.

Keywords: *borrelia burgdorferi*, *babesia bovis*, *lyme-like*, children.

dos novos casos de DL e preconizada a técnica de *western blotting* (WB), com a utilização da *Borrelia burgdorferi* como substrato⁽¹¹⁻¹³⁾.

Em 1998, 16 pacientes com manifestações clínicas típicas da DL apresentaram positividade para anticorpos contra *Borrelia burgdorferi sensu lato* por meio de ensaio imunoenzimático e WB em Mato Grosso do Sul⁽¹⁴⁾. E em 1996 havia sido descrito neste Estado o primeiro caso de meningite de Lyme no Brasil⁽¹⁵⁾. Foram identificados possíveis reservatórios e vetores dessa borreliose na região, com a visualização de espiroquetídeos semelhantes ao gênero *Borrelia* sp. em cultura de amostras de sangue de animais silvestres (marsupiais e roedores) e de macerado de carrapatos do gênero *Amblyomma* sp.⁽¹⁶⁾.

Em 2005, após 15 anos de estudo, Yoshinari *et al.*⁽¹⁷⁾ consideraram que as manifestações clínicas e sorológicas, até então descritas no Brasil, constituíam uma síndrome clínica que exibiria aspectos clínicos compatíveis aos de infecções e enfermidades reacionais, cujas manifestações clínicas eram semelhantes às encontradas na DL. Seria transmitida por carrapatos e causada por microrganismos “latentes” constituídos de *Mycoplasmas*, *Chlamídias* e espiroquetas, observados laboratorialmente. Por essa razão, propôs-se as denominações de síndrome de *Lyme-simile* (SLS) ou complexo infecto-reacional do carrapato ou síndrome de Baggio-Yoshinari, em homenagem aos primeiros pesquisadores no Brasil⁽¹⁸⁾.

Em Mato Grosso do Sul, um projeto em rede foi realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Corte de Campo Grande, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela Universidade de São Paulo (USP) e pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foi observada grande proporção de bovinos das fazendas de seis municípios do interior de Mato Grosso do Sul com sorologia positiva, tan-

to para *B. burgdorferi* (68,8% a 99,2%) quanto para *Babesia bovis* (71,2% a 98,4%). Houve ainda coexistência de ambas em 54,5% a 97% nos bovinos⁽¹⁹⁾.

A partir da inoculação da bactéria na pele por meio da picada do carrapato, as manifestações clínicas da DL são caracterizadas por três estágios, conforme a classificação proposta pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC)^(20,21). O estágio primário é caracterizado por EMC^(22,23) e manifestações sistêmicas inespecíficas; o estágio secundário, após semanas a meses da infecção, é caracterizado com vários tipos de acometimentos: cardíaco, articular, do sistema nervoso central (SNC) e, ocasionalmente, comprometimento oftalmológico; e o estágio terciário, que aparece meses a anos após a infecção, é caracterizado frequentemente por artrite crônica⁽²⁴⁾, acrodermatite^(25,26) e encefalomielite^(27,28).

O procedimento mais empregado para o diagnóstico laboratorial é a pesquisa dos anticorpos contra *Borrelia burgdorferi*⁽²⁹⁻³¹⁾. O ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e WB são os mais utilizados. O WB tem sido empregado secundariamente para definição do resultado em casos de dúvida no método ELISA^(32,33). O Centro de Referência para a DL no Brasil, do Laboratório de Investigação da Interação entre Microorganismo e Artrite, da Disciplina de Reumatologia da FMUSP-SP^(8,9), preconizou os critérios clínicos e epidemiológicos para o diagnóstico da SLS: epidemiologia positiva com história de picada ou contato com carrapato ou exposição em áreas de mata (litorânea ou campo) e quadro clínico compatível (com a presença de EM ou acometimento de pelo menos um dos sistemas: nervoso, osteoarticular ou cardíaco); sorologia positiva no ELISA com títulos maiores que 1/100 para IgM e 1/400 para IgG ou presença de WB positivo (com pelo menos duas bandas específicas para IgM ou quatro bandas específicas para IgG, ou concomitância de uma banda IgM e duas IgG).

A coexistência de anticorpos para borreliose e babesiose humana têm sido observada em soros de pacientes de áreas de risco para estas enfermidades, sem significar reações cruzadas⁽³⁴⁾. A babesiose humana é uma zoonose que clinicamente assemelha-se à malária, causada por um protozoário intraeritrocítico do gênero *Babesia*, que afeta tanto o homem quanto diferentes animais domésticos e silvestres. O homem adquire a doença acidentalmente por meio da picada de carrapatos ou por transfusões sanguíneas^(35,36) e, na maioria dos casos, a infecção é assintomática, exceto em pacientes imunossuprimidos⁽³⁴⁾. A presença de anticorpos

em indivíduos assintomáticos tem sido encontrada em diferentes estudos sorológicos^(21,37).

A coinfeção entre os agentes da BL e da babesiose foi confirmada em 59 pacientes brasileiros com diagnóstico de BL quando o ELISA e o WB para *Babesia bovis* foram realizados nas amostras de sangue estocados. Foi demonstrada maior frequência de anticorpos contra *B. bovis* nesses pacientes em comparação com a população normal⁽³⁴⁾.

O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta todas as condições favoráveis de clima, fauna e flora para a presença e disseminação da SLS. A intensa atividade agropecuária, o convívio do homem com os animais domésticos e a valorização de atividades ao ar livre favorecem a disseminação de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, propiciando o surgimento e o ressurgimento de diferentes agentes etiológicos^(14,16).

Como não existem estudos dessa natureza em crianças, este estudo propõe-se a caracterizar o perfil clínico e epidemiológico da SLS e a ocorrência de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* e anti-*Babesia bovis* em crianças do estado de Mato Grosso do Sul e comparar a soroprevalência destes anticorpos com um grupo-controle normal.

PACIENTES E MÉTODOS

Ampla divulgação foi realizada nos meses de janeiro e fevereiro de 2004, com esclarecimentos sobre a pesquisa e solicitação da colaboração dos profissionais de saúde para o encaminhamento de crianças e adolescentes com os critérios clínicos e epidemiológicos para a SLS atendidos em postos de saúde, pronto-socorros e consultórios privados da capital e do interior do Estado de Mato Grosso do Sul. A seleção dos pacientes ocorreu no período compreendido entre os meses de março de 2004 e junho de 2005 (15 meses).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As crianças e os adolescentes com idade até 16 anos com suspeita clínica foram encaminhadas ao Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital Universitário da UFMS, para avaliação dos critérios clínicos e epidemiológicos preconizados pelo Centro de Referência para a DL no Brasil^(8,9). Depois de explicação detalhada da pesquisa, foram realizadas a leitura e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aos responsáveis legais dos pacientes. O consentimento livre e esclarecido foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres

Humanos da UFMS. Um protocolo especialmente criado para a pesquisa foi preenchido, no qual constaram dados como sexo, idade, procedência (urbana ou rural), história de picada de carrapato ou contato previamente ao início dos sintomas, manifestações clínicas e duração, assim como diagnósticos e tratamentos anteriores.

Para o controle normal dos ensaios laboratoriais, 100 amostras de soros de crianças e adolescentes normais sem manifestações clínicas, doenças intercorrentes e epidemiologia compatível com a SLS foram selecionadas. Estes pacientes procuraram o ambulatório geral de pediatria do Hospital Universitário da UFMS para acompanhamento de rotina, e foram escolhidos para constituir uma amostra pareada em relação à idade e ao sexo dos pacientes já selecionados com suspeita clínica. Foram submetidos ao mesmo protocolo e exames.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A presença de patologias intercorrentes que poderiam interferir na avaliação sorológica, como doenças auto-imunes, neoplasias malignas, sífilis, toxoplasmose, tuberculose, blastomicose ou outras doenças infecciosas crônicas foram critérios de exclusão, assim como os pacientes que apresentaram positividade para anticorpo antinuclear (FAN), fator reumatóide (FR), antiestreptolisina O (ASLO), sorologia para toxoplasmose e sífilis.

Os exames complementares do protocolo incluíram ainda hemograma completo, provas de fase aguda – velocidade de hemossedimentação (VHS) e/ou mucoproteínas e/ou proteína C reativa e/ou eletroforese de proteínas. Outros exames específicos foram solicitados nos casos em que foi necessário o diagnóstico diferencial com outras doenças. As amostras de soro foram congeladas a -20°C e transportadas em gelo ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte de Campo Grande, para a realização de pesquisa de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* e *Babesia bovis*, pelo método de ELISA.

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-BORRELLIA BURGDORFERI IGG E IGM POR ELISA

Foram utilizados como substratos antigênicos sonicados totais da *Borrelia burgdorferi stricto sensu* cepa americana G 39/40 na concentração de 4,8 mg/ml, mantidas no Centro de referência para a BL, no Brasil. As análises por ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* foram procedidas segundo protocolo de Yoshinari *et al.*⁽⁹⁾:

Foram sensibilizadas duas placas de 96 orifícios (Immulon I), uma para IgG e outra para IgM com o antígeno (sonicado total de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, na concentração de 15 µg/ml) diluído em tampão carbonato pH 9,6 e adicionado 100 µl em cada orifício. A placa foi incubada em câmara úmida, a 4°C *overnight*. No dia seguinte, depois de desprezado o sobrenadante, a placa foi lavada por três vezes com PBS Tween (PBST) 0,05% pH 7,4. Bloqueada a placa com a adição da solução proteica feita com leite desnatado a 5% diluído em PBST 0,05% e distribuído 100 µl em cada orifício da placa. A placa foi incubada em câmara úmida, por 1 hora, à temperatura ambiente. Neste intervalo, foi preparada a diluição do soro padrão positivo, controles negativos e soros teste, utilizando-se o mesmo tampão. Após 1 hora, foi retirada a placa da câmara úmida e lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4. Na primeira coluna da placa, foi adicionado o soro padrão positivo em oito diluições crescentes a partir de 1:400 (IgG) ou 1:100 (IgM), em PBST 0,05% com 5% de leite desnatado pH 7,4. Na segunda e terceira coluna, os oito controles negativos em duplicata na mesma diluição. Nos dois primeiros orifícios da quarta coluna, foi adicionado apenas 200 µl do tampão (branco). O restante da placa foi utilizado para os soros suspeitos na diluição de 1/100 para IgM ou 1/400 para IgG. A placa foi incubada novamente em câmara úmida, por 1 hora, à temperatura ambiente e após esse período, lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4 e adicionado o conjugado, soro de cabra antiimunoglobulina específica humana (anti-IgM ou anti-IgG) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), diluído a 1:1000 em PBST com leite desnatado pH 7,4 e distribuído 100 µl por poço. A placa foi novamente incubada em câmara úmida, por 1 hora, à temperatura ambiente e retirada após esse período e lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4. A solução substrato revelador – para-nitro-fenil-fosfato (PNPP), na concentração de 1 mg/ml, diluído em tampão glicina pH 10,5 – foi distribuído, sendo 100 µl em cada orifício. Realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm no momento em que o primeiro controle positivo atingiu a densidade óptica (DO) de 0,5 para IgM e 1,0 para IgG. Interpretação dos resultados: uma amostra foi considerada positiva se apresentasse uma DO (densidade óptica) igual ou maior ao valor do *cut-off*, que foi obtido pela média dos valores de DOs dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão desses valores, garantindo um nível de confiança

de 99,8%. Os valores em DOs expressos pelo espectrofotômetro para as microplacas foram convertidos em títulos, utilizando-se, para esse fim, um gráfico de calibração do título, em papel milimetrado. O título considerado positivo para IgG foi maior ou igual a 1/400 e para IgM maior ou igual a 1/100.

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-BABESIA

BOVIS IGG E IGM POR ELISA

O antígeno de *Babesia bovis* foi obtido segundo metodologia descrita por Madruga *et al.*⁽²⁹⁾. As análises por ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *B. bovis* foram procedidas segundo o protocolo de Yoshinari⁽³⁴⁾:

Foram sensibilizadas duas placas de 96 orifícios (Immulon I), uma para IgG e outra para IgM com o antígeno de *Babesia bovis*, na concentração de 7,5 µg/ml diluído em tampão carbonato pH 9,6 e adicionado 100 µl em cada orifício. A placa foi incubada em câmara úmida, a 4°C *overnight*. No dia seguinte, a placa foi lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4 e adicionada a solução bloqueio na placa – solução protéica feita com soro equino a 1% diluído em PBST 0,05% – e distribuído 100 µl/poço. A placa foi incubada novamente em câmara úmida, por 1 hora, à temperatura ambiente e, enquanto se aguardava, foram diluídos os soros testes e oito controles negativos na diluição de 1/100 para a placa de IgM e 1/400 para IgG. Foi diluído 1,25 µl de soro teste em 500 µl de PBST com 1% de soro equino para a placa de IgG e 5 µl de soro teste em 500 µl de PBST com 1% de soro equino para a placa de IgM. Após 1 hora, foi retirada a placa da câmara úmida e lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4 e foram distribuídos 100 µl de cada soro-teste previamente diluído em cada poço da placa, a partir da quarta coluna, após dois poços brancos (somente com soro equino a 1% diluído em PBST 0,05%). Os oito soros-controle negativos foram distribuídos em duplicata na segunda e terceira colunas. O controle positivo foi diluído na primeira coluna da placa, em oito diluições crescentes a partir de 1:400 (IgG) ou 1:100 (IgM), em PBST 0,05% com soro equino a 1% pH 7,4. A placa foi incubada novamente em câmara úmida, por duas horas, à temperatura ambiente e, após esse período, lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4. O conjugado, soro de cabra anti-IgM ou anti-IgG humano conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), diluído a 1:2000 em PBST com soro equino a 1% diluído em PBST foi distribuído, sendo 100 µl por poço. A placa foi novamente incubada em câmara úmida, por 1 hora, à

temperatura ambiente e retirada após esse período e lavada por três vezes com PBST 0,05% pH 7,4. Após o preparo da solução substrato – para-nitro-fenil-fosfato (PNPP), na concentração de 1 mg/ml, diluído em tampão glicina pH 10,5 – 100 µl desta foi distribuída em cada poço. Realizada a leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 405 nm, no momento em que o primeiro controle positivo atingiu a DO de 0,5 para IgM e 1,0 para IgG.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma amostra seria considerada positiva se apresentasse uma DO igual ou maior ao valor do *cut-off* (obtido pela média dos valores de DOs dos controles negativos mais três vezes o desvio-padrão desses valores), garantindo o nível de confiança de 99,8%. Os valores em DOs expressos pelo espectrofotômetro para as microplacas foram convertidos em títulos, utilizando-se, para esse fim, um gráfico de calibração do título, em papel milimetrado. O título foi considerado positivo para IgG e para IgM se maior ou igual a 1/800.

O método estatístico utilizado para comparar os resultados sorológicos entre o grupo de pacientes com suspeita clínica e o grupo-controle foi o teste do qui-quadrado (χ^2) para valores significativos com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram selecionadas 131 pacientes, porém 25 foram retirados do protocolo por causa da positividade de um dos exames (FAN, FR, ASLO, sorologia para toxoplasmose ou sífilis) e 6 pacientes foram excluídos por preencherem critérios para outras doenças durante a seleção.

A idade dos 100 pacientes com suspeita clínica de SLS variou de 9 meses a 16 anos (média de 7 anos e 3 meses e mediana de 7 anos e 1 mês) e do grupo-controle de 10 meses a 16 anos (média de 7 anos e 5 meses e mediana de 6 anos e 8 meses). Dos pacientes com suspeita de SLS, 47% eram do sexo masculino e 53% feminino. No grupo-controle, 46% do sexo masculino e 54% do feminino. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com relação à idade e ao sexo. Dos pacientes com suspeita clínica, 68% eram procedentes da região urbana da capital e 32% da zona rural de cidades do interior do estado. Todos os pacientes do grupo-controle eram provenientes da zona urbana da capital.

Afirmaram que haviam sido picados por carrapatos 20 pacientes e 80 pacientes apresentaram contato direto com animais infestados por carrapato. O tempo decorrido entre a picada e o início dos sintomas variou de sete dias a seis

meses. O local de picada mais freqüente foi nos membros inferiores (50%).

As manifestações clínicas encontradas nos 100 pacientes com suspeita clínica de SLS foram: manifestações articulares em 78% (59 pacientes com artrite aguda e 19 com artrite crônica); manifestações cutâneas em 11% (dois pacientes com EM, três com eritema anular secundário, quatro com esclerodermia linear, uma paciente com esclerodermia em placa tipo morféia e uma paciente com esclerodermia tipo golpe de sabre); manifestações neurológicas em 10% (seis pacientes com paralisia facial, três pacientes com meningite linfocitária aguda e um com radiculoneurite) e manifestações cardiovasculares em uma paciente (pericardite).

O hemograma não demonstrou nenhuma anormalidade importante. As provas inflamatórias foram normais em 58% dos pacientes, com elevações variáveis em 42% dos pacientes. O exame do liquor realizado nos três pacientes com meningite evidenciou leucocitose com predomínio de linfomononucleares, bacterioscopia e cultura negativas. No paciente com radiculoneurite, houve aumento de proteínas no liquor sem alterações da citologia global e diferencial. A biópsia cutânea foi realizada em seis pacientes com lesões cutâneas crônicas, sendo encontradas características histopatológicas compatíveis com esclerodermia cutânea em todos.

Dos 100 pacientes com suspeita clínica de SLS, 27 apresentaram sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi*, sendo as manifestações clínicas encontradas: artrite em 21 pacientes (16 com artrite aguda e cinco com artrite crônica); manifestações cutâneas em três pacientes (um com EM e dois com esclerodermia – um linear e outro golpe de sabre); manifestações neurológicas em três pacientes (meningite linfocitária em um paciente e dois com paralisia facial).

Dos 27 pacientes, 10 apresentaram concomitantemente anticorpos contra *Babesia bovis*.

Apresentaram anticorpos contra *Babesia bovis* apenas 14 pacientes, sendo as seguintes manifestações clínicas encontradas: 10 pacientes com acometimento articular; dois pacientes com acometimento cutâneo (um com EM e outro com esclerodermia em placa tipo morféia); um paciente com acometimento neurológico (paralisia facial) e um paciente com pericardite. Os resultados das sorologias e as características dos pacientes estão resumidas nas Tabelas 1 a 6, a seguir.

A positividade da sorologia para *B. burgdorferi* nos soros de pacientes com suspeita de SLS para os anticorpos da classe IgG e IgM mostraram-se aumentadas quando comparadas com o grupo-controle. Nesses pacientes, o teste ELISA contra *B. burgdorferi* mostrou positividade de 12% para anticorpos da classe IgG e 17% para IgM. O grupo-controle apresentou positividade para *B. burgdorferi* em 8% tanto para anticorpos da classe IgG quanto para IgM. Houve diferença significativa estatisticamente entre os dois grupos ($p < 0,05$).

A positividade da sorologia para *B. bovis* nos soros de pacientes com SLS para o anticorpo IgG (24%) mostrou-se aumentada quando comparada com o grupo-controle (3%). Houve diferença significativa estatisticamente entre os dois grupos ($p < 0,05$). Apenas 1 paciente do grupo com suspeita de SLS apresentou positividade do anticorpo IgM (1:3200) e nenhum paciente do grupo-controle. No grupo de pacientes com quadro clínico e epidemiologia compatíveis com a SLS houve concomitância na positividade da sorologia para *B. burgdorferi* e *B. bovis* em 11 pacientes. No grupo-controle, não houve concomitância em nenhum caso.

TABELA 1
PACIENTES COM ACOMETIMENTO CUTÂNEO COM SOROLOGIA POSITIVA PARA
***BORRELIA BURGDORFERI* (BO) E/OU *BABESIA BOVIS* (BA) PELO ELISA**

Nº	Idade	Sexo	Procedência	Tipo de lesão	Duração da doença	Picada ou contato	Sorologia (ELISA)
1	2 a 3 m	F	Interior	Eritema migratório	3 dias	Picada há 7 dias	IgM Bo 1/100 IgG Ba 1/800
2	14 a	F	Capital	Esclerodermia morféia	5 anos	Contato	IgG Ba 1/800
3	7 a	F	Capital	Esclerodermia em golpe de sabre	4 anos	Contato	IgG Bo 1/800 IgM Bo 1/200 IgG Ba 1/1600 IgM Ba 1/3200
4	14 a	F	Capital	Esclerodermia linear	5 anos	Contato	IgG Bo 1/400
5	3 a	M	Interior	Eritema migratório	5 dias	Picada há 7 dias	IgG Ba 1/1600

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*; a = anos; m = meses; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IgM = imunoglobulina M; IgG = imunoglobulina G.

TABELA 2
PACIENTES COM MONOARTRITE AGUDA E SOROLOGIA POSITIVA PARA
***BORRELIA BURGdorFERI* (Bo) E/OU *BABESIA BOVIS* (Ba) PELO ELISA**

Nº	Idade	Sexo	Procedência	Articulação acometida	Duração da doença	Picada ou contato	Sorologia (ELISA)
6	6 a 6 m	M	Interior	Quadril E de repetição (3×)	1 mês	Picada há 6 meses	IgM Bo1/100
7	6 a 1 m	M	Interior	Tornozelo E	10 dias	Contato	IgM Bo1/100
8	10 a 3	F	Capital	Joelho E	1 mês	Contato	IgM Bo1/100
9	8 a	F	Capital	Tornozelo E	15 dias	Picada há 2 meses	IgG Ba 1/800
10	2 a 7 m	F	Interior	Quadril E	12 dias	Contato	IgG Ba 1/800
11	8 a 11 m	M	Capital	Joelho D	5 meses antes	Contato	IgM Bo1/100 IgG Ba 1/800
12	12 a	M	Capital	Tornozelo E	7 dias	Contato	IgG Ba 1/800
13	8 a	M	Capital	Tornozelo E	7 dias	Contato	IgM Bo1/100 IgG Ba 1/800
14	2 a 2 m	F	Interior	Quadril D	6 dias	Picada há 7 dias	IgG Bo 1/400 IgM Bo 1/200
15	8 a 4 m	M	Capital	Quadril D	5 dias	Contato	IgG Ba 1/12800
16	4 a 8 m	M	Capital	Quadril D	15 dias	Picada há 1 mês	IgG Ba 1/800
17	7 a	M	Capital	Quadril D	18 dias	Contato	IgG Bo 1/400
18	4 a 10 m	F	Capital	Quadril D	1 mês	Contato	IgG Ba 1/3200
19	2 a 6 m	F	Capital	Quadril D de repetição (2×)	15 dias	Contato	IgM Bo1/100
20	1 a 11 m	M	Capital	Quadril D	5 dias	Contato	IgG Ba 1/800

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*; a = anos; m = meses; F = sexo feminino; M = sexo masculino; D = direito; E = esquerdo; IgM = imunoglobulina M; IgG = imunoglobulina G.

TABELA 3
PACIENTES COM OLIGOARTRITE AGUDA E SOROLOGIA POSITIVA PARA
***BORRELIA BURGdorFERI* (Bo) E/OU *BABESIA BOVIS* (Ba) PELO ELISA**

Nº	Idade	Sexo	Procedência	Articulação acometida	Duração da doença	Picada ou contato	Sorologia (ELISA)
21	14 a	F	Capital	Joelhos	1 mês	Contato	IgM Bo1/100
22	10 a	M	Capital	Joelhos	2 dias	Contato	IgG Ba1/25600
23	4 a 10 m	M	Capital	Punhos	7 dias	Contato	IgG Bo 1/400 IgG Ba 1/800
24	2 a 6 m	F	Capital	Quadril	15 dias	Contato	IgM Bo 1/100
25	6 a 2 m	M	Interior	Joelhos	6 meses antes	Contato	IgG Bo 1/800
26	7 a	F	Interior	Joelhos	3 meses antes	Picada há 6 meses	IgG Bo1/400
27	8 a 5 m	M	Interior	Joelhos	1 mês	Contato	IgG Bo 1/400

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*; a = anos; m = meses; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IgM = imunoglobulina M; IgG = imunoglobulina G.

TABELA 4
PACIENTES COM POLIARTRITE AGUDA E SOROLOGIA POSITIVA PARA
***BORRELIA BURGdorFERI* (Bo) E/OU *BABESIA BOVIS* (Ba) PELO ELISA**

Nº	Idade	Sexo	Procedência	Articulações acometidas	Duração da doença	Picada ou contato	Sorologia (ELISA)
28	9 a 6 m	F	Capital	Joelhos, tornozelos, punhos	7 dias	Picada há 1 mês	IgM Bo 1/100 IgG Ba 1/800
29	9 a 9 m	F	Capital	Joelhos, tornozelos, quadril direito	2 dias	Contato	IgM Bo 1/100

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*; a = anos; m = meses; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IgM = imunoglobulina M; IgG = imunoglobulina G.

TABELA 5
PACIENTES COM ARTRITE CRÔNICA E SOROLOGIA POSITIVA PARA
BORRELIA BURGDOFFERI (Bo) E/OU BABESIA BOVIS (Ba) PELO ELISA

N°	Idade	Sexo	Procedência	Articulações acometidas	Duração da doença	Picada ou contato	Sorologia (ELISA)
30	5 a 4 m	F	Capital	Monoartrite tornozelo D	5 meses	Contato	IgM Bo1/100 IgG Ba 1/800
31	8 a 8 m	F	Capital	Monoartrite tornozelo D	7 meses	Picada há 9 meses	IgM Bo1/100
32	10 a 9 m	M	Capital	Oligoartrite (4), joelhos, tornozelos	6 meses	Contato	IgG Ba 1/800
33	5 a	M	Capital	Monoartrite, joelho E	1 ano	Contato	IgG Bo 1/400
34	4 a 7 m	F	Interior	Monoartrite joelho D	40 dias	Contato	IgG Ba 1/800
35	16 a	M	Interior	Oligoartrite (4), joelhos e tornozelos	2 a 7 meses	Contato	IgG Bo 1/400 IgG Ba 1/1600
36	5 a	F	Interior	Poliartrite (8) mãos, punhos, joelhos e tornozelos	45 dias	Contato	IgG Bo 1/400 IgG Ba 1/3200

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*; a = anos; m = meses; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IgM = imunoglobulina M; IgG = imunoglobulina G.

TABELA 6
PACIENTES COM ACOMETIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SOROLOGIA POSITIVA PARA BORRELIA
BURGDOFFERI (Bo) E/OU BABESIA BOVIS (Ba) PELO ELISA

N°	Idade	Sexo	Procedência	Tipo de acometimento	Duração da doença	Picada ou contato	Sorologia (ELISA)
37	5 a 9 m	M	Interior	Meningite linfocitária	7 dias	Picada 1 mês	IgM Bo1/100
38	11 a	F	Interior	Paralisia facial	14 dias	Contato	IgM Bo 1/100 IgG Ba 1/3200
39	10 a 7 m	M	Capital	Paralisia facial	12 dias	Picada há 2 meses	IgG Ba 1/3200
40	3 a 4 m	F	Capital	Paralisia facial	7 dias	Contato	IgG Bo 1/400

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*; a = anos; m = meses; M = sexo masculino; F = sexo feminino; IgM = imunoglobulina M; IgG = imunoglobulina G.

Os pacientes com sintomatologia e sorologia positivas para *B. burgdorferi* foram tratados conforme o padronizado. Os pacientes com sorologia positiva, mas assintomáticos na época do acompanhamento não foram tratados. Durante esse seguimento, cinco pacientes com sorologia positiva apresentaram reagudização da artrite, sendo então introduzido a antibioticoterapia por 14 a 21 dias com remissão dos quadros. Os pacientes com outros acometimentos não apresentaram reagudização nem progressão da doença. Nenhum paciente evoluiu com acometimento de mais de um sistema. Os pacientes com sorologia positiva para *Babesia bovis* não foram tratados até o momento.

DISCUSSÃO

Revisando-se a literatura, a faixa etária pediátrica é freqüentemente afetada pelas diferentes manifestações da DL^(2,6,38-41). Neste estudo, a faixa etária escolar foi a mais acometida e não houve predomínio do sexo masculino,

como ocorreu em alguns estudos⁽³⁸⁻⁴¹⁾. A rotina diária das crianças, com atividades de lazer ao ar livre, pode torná-las mais suscetíveis às picadas de carrapato, que, geralmente, são contaminadas no próprio ambiente domiciliar, pois a distribuição dos carrapatos na natureza é bastante ampla e variada⁽⁴²⁾. Esses podem estar presentes nos gramados de praças e residências, infectando conseqüentemente os animais domésticos de estimação, que são competentes reservatórios de *Borrelia* sp.⁽³⁹⁾.

Em vários estudos epidemiológicos realizados tanto em adultos quanto em crianças, menos da metade dos pacientes recordavam a picada do carrapato antes do início dos sintomas, provavelmente pelo pequeno tamanho das ninfas, cujo potencial de infectividade para o homem é maior do que dos carrapatos adultos^(20,42,43). Neste estudo, somente 20% afirmaram que haviam sido picados por carrapatos.

Em estudos anteriores à lesão patognomônica cutânea, o EM esteve presente em 50% a 70% dos pacientes com DL, sendo a manifestação mais freqüente em crianças⁽⁴⁴⁾.

No estudo presente, apenas um paciente apresentou esta lesão. Apresentaram lesão cutânea crônica apenas dois pacientes, caracterizadas como lesões em placa do tipo morfêia e esclerodermia localizada linearmente em membro inferior direito. Lesões semelhantes à esclerodermia na DL têm sido descritas principalmente na Europa, com isolamento do agente etiológico (*B. afzelii*)⁽⁴⁵⁾. No Brasil, em 1998, Costa *et al.* registraram a ocorrência de lesões esclerodérmica – *like* em adultos em Mato Grosso do Sul. Foi sugerido ainda neste estudo a existência de uma borreliose semelhante à europeia no Estado⁽¹⁴⁾. Existem ainda relatos recentes na literatura de associação da *Borrelia burgdorferi* com a esclerodermia linear em golpe de sabre e com hemiatrofia facial progressiva ou síndrome de Parry-Romberg^(25,46,47).

A artrite de Lyme descrita na literatura geralmente é de evolução aguda e oligoarticular^(24,38,48). Neste estudo, todos os pacientes com artrite aguda apresentaram remissão do quadro apenas com antiinflamatórios não-hormonais em 1 a 3 semanas, pois a sorologia foi realizada meses após a coleta. Em dois pacientes com recidiva da artrite, a antibioticoterapia com amoxicilina por 14 a 21 dias, na dose de 50 mg/kg/dia em três doses diárias, foi realizada.

Há relatos de recorrência da artrite e evolução para artrite crônica em 10% dos pacientes, semelhantemente à artrite reumatóide juvenil (ARJ), sendo difícil o diagnóstico diferencial^(49,50). No presente estudo, cinco pacientes com artrite crônica apresentaram anticorpos contra *Borrelia burgdorferi*. Estes pacientes estavam sendo tratados como portadores de ARJ. Apresentaram IgM positivo (1/100) para *B. burgdorferi* dois pacientes e mantinham monoartrite em tornozelo mesmo após dois meses de tratamento com antiinflamatório não-hormonal. Com o resultado da sorologia, receberam amoxicilina por 21 dias, com remissão da artrite. Nos outros três pacientes, não foi introduzida a antibioticoterapia, pois já estavam em remissão por mais de seis meses no momento em que foi realizada a técnica sorológica.

Na Europa, a paralisia facial é a neuropatia periférica mais comum na DL, ocorrendo em 3% das crianças com a doença e regredindo em duas a oito semanas, mesmo sem tratamento^(2,51,52). Neste estudo, a paralisia facial ocorreu em seis pacientes e a sorologia para *B. burgdorferi* foi positiva em dois. Um paciente com paralisia facial havia sido picado por carrapato dois meses antes e apresentou títulos altos de anticorpos da classe IgG para *Babesia bovis* (1:3200). Não existem relatos até o momento da babesiose humana cursando com paralisia facial. A positividade do anticorpo pode significar reação cruzada ou infecção

prévia pela *Babesia*, que pode ser explicada pela presença apenas de IgG.

Na literatura, a alteração cardíaca mais freqüentemente relatada é o bloqueio cardíaco⁽⁵³⁾. Neste estudo, uma paciente apresentou pericardite aguda sem etiologia definida, resolvida com antibioticoterapia por 14 dias (ceftriaxona) e a sorologia foi positiva para *B. bovis* (IgG 1:800). Por não existirem dados sobre a babesiose na infância com comprometimento cardíaco, não é possível afirmar que a pericardite tenha sido causada pela infecção por *Babesia*. É mais provável que a positividade signifique exposição prévia com infecção assintomática.

O ELISA contra *B. burgdorferi* mostrou positividade em 29% dos pacientes, sendo 17% para IgM e 12% para IgG. Estudos anteriores mostraram resultados com porcentagem maior que a encontrada neste estudo. Em um dos primeiros estudos realizados na faixa etária pediátrica, Williams *et al.*⁽⁴¹⁾ encontraram 73% de positividade para *B. burgdorferi* em 90 crianças com idade média de 9 anos que apresentaram EM associado às manifestações articulares ou do SNC em uma região endêmica de Nova York.

Gerber *et al.*⁽⁴⁴⁾ relataram 37% de positividade de anticorpos contra *B. burgdorferi* em crianças com critérios clínicos e epidemiológicos de DL em Connecticut, em 1996. Os resultados encontrados no Brasil por Gauditano *et al.*⁽⁵⁴⁾ mostraram soropositividade pelo ELISA em pacientes com SLS de 38,89% para IgG e 36,11% para IgM.

A análise dos resultados sorológicos deve ser criteriosa e sempre correlacionada com a história clínica e epidemiológica dos pacientes. Os títulos de IgG elevados são mais característicos da fase tardia da doença. Sendo assim, a presença de IgG em pacientes com algumas semanas da doença sugere exposição prévia da mesma forma que sintomas crônicos não podem ser atribuídos à DL se somente a IgM estiver presente⁽¹⁹⁾. Os anticorpos da classe IgM tornam-se positivos após três a quatro semanas do estágio primário com pico em seis a oito semanas e regressão em quatro a seis meses. Já os níveis de IgG se elevam em seis a oito semanas após o início da infecção, atingem o pico em quatro a seis meses, e podem declinar após o tratamento, mas, geralmente, permanecem detectáveis por muitos anos, mesmo em pacientes assintomáticos⁽⁵²⁾.

Os resultados encontrados no grupo-controle deste estudo (8% de positividade tanto para anticorpos da classe IgG quanto para IgM) diferiram em porcentagem em relação a alguns relatos da literatura. Um estudo realizado em 1993 na Alemanha, em que amostras de 574 crianças saudáveis foram coletadas pelo período de dois anos, mostrou que a

taxa de soroprevalência encontrada de anticorpo IgG foi de 2,6% e de IgM 0,7%⁽²⁾. No Brasil, Gauditano *et al.*⁽⁵⁴⁾ compararam pacientes com SLS com um grupo-controle constituído de 80 amostras de soros de doadores de sangue normais e encontraram positividade para IgG em 1,25% e para IgM em 2,5%. Essa diferença nos resultados do presente estudo pode ter ocorrido em virtude de a região do estudo ser propícia à disseminação dos vetores da SLS, e estes pacientes do grupo-controle, embora não preenchessem os critérios clínicos e epidemiológicos, poderiam ter tido exposição prévia com infecção assintomática.

A positividade da sorologia para *B. bovis* nos soros de pacientes com SLS para o anticorpo IgG (24%) mostrou-se aumentada quando comparada com o grupo-controle (3%). Os resultados encontrados estão próximos aos descritos na literatura. No Brasil, Yoshinari *et al.*⁽³⁴⁾ realizaram o teste ELISA para babesiose em 59 pacientes com SLS, e foram encontrados 16,9% de positividade de anticorpos IgG e 15,25% de IgM contra *B. bovis*. Ou seja, 25,42% dos pacientes com SLS apresentaram anticorpos para os antígenos da babesiose. Nesse mesmo estudo, o teste foi realizado também em um grupo de 49 indivíduos normais, a fim de se conhecer a frequência da soropositividade para babesiose na população normal, e foi encontrada 8,2% de positividade para anticorpos IgG para *Babesia bovis* e 2,04% para IgM, aproximando-se dos resultados encontrados no presente estudo para IgG. A positividade dos anticorpos contra *Babesia bovis* pode ser por causa da memória imunológica dos indivíduos testados, pois demonstrou-se que os anticorpos anti-babesia podem se manter detectáveis pelo período de um a dois anos após a infecção primária, mesmo assintomática⁽²¹⁾. Nenhum paciente deste estudo apresentou IgM positivo contra *B. bovis*.

Ainda em relação ao grupo-controle, em um outro estudo realizado em Cuba, foram detectados anticorpos contra *Babesia bovis* pelo ELISA em 3,9% dos doadores de sangue⁽⁵⁵⁾.

Em relação aos resultados positivos obtidos neste trabalho, devemos considerar que em publicações de autores brasileiros^(8,10,13-15,18), ficou demonstrado que tendo a *B. burgdorferi* como substrato, o teste ELISA mostrou maior sensibilidade diagnóstica que o método de WB. Esta observação levou o Centro de Referência para a DL no Brasil da FMUSP, a considerar o teste de ELISA como exame de triagem para aqueles pacientes que tenham epidemiologia e clínica positivas. Porquanto, os casos positivos ao ELISA devem ser submetidos ao exame de WB para confirmação.

Neste trabalho, o objetivo foi realizar a triagem laboratorial inicial nos soros das crianças que apresentassem critérios clínicos e epidemiológicos, preconizados pelo Centro de Referência para a DL, no Brasil, da FMUSP.

Por outro lado, Costa *et al.*^(14,15) demonstraram que os pacientes que tiveram reatividade contra *B. burgdorferi* pelo método ELISA foram positivos no WB e as bandas detectadas não apresentavam os pesos moleculares das proteínas descritas e preconizadas para confirmação diagnóstica pelo Centro de Controle de Doenças (CDC, EUA)^(8,9,13).

Ainda assim, considera-se imprescindível a realização do WB com achado de, no mínimo, duas bandas de IgM ou quatro de IgG, isoladamente, ou de uma banda de IgM e duas de IgG, concomitantemente, para confirmação diagnóstica^(8,9).

Apesar de espiroquetídeos terem sido observados no Brasil, em amostras de soro e cultura de sangue de pacientes com quadro clínico compatível com a SLS, não se conseguiu ainda o isolamento e a caracterização do agente etiológico. Além disso, as tentativas de amplificação do DNA do gênero *Borrelia* sp., por meio da técnica de PCR a partir do soro, líqüores e de meios de culturas mostraram-se infrutíferas até este momento^(13,16,18).

Esses fatos, aliados à difícil resposta terapêutica que os pacientes com sorologia e clínica compatíveis com SLS têm apresentado nos estudos nacionais, sugerem que o(s) agente(s) etiológico(s) desta síndrome devem ser de espécie diferente daquelas observadas nos Estados Unidos, Europa e Ásia.

Concluindo, foi encontrada uma frequência superior de anticorpos contra *Borrelia* e *Babesia* nos pacientes em relação aos controles. Embora pequena, essa diferença foi estatisticamente significativa. Esse achado não atesta que o quadro clínico dos pacientes seja causado por espécies de *Borrelia* ou *Babesia*, mas levanta a possibilidade de participação de algum agente infeccioso que possa estar relacionado a esses microrganismos. É importante frisar também que os controles foram todos provenientes de área urbana, enquanto parte dos pacientes com sorologia positiva foram provenientes de zona rural, e conseqüentemente podem ter sido repetidamente expostos ao contato com estes agentes infecciosos.

Portanto, os soros que tiveram resultados positivos pelo ELISA, neste trabalho, deverão ser submetidos à confirmação pelo WB, e os resultados correlacionados com a clínica e à epidemiologia de cada paciente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos médicos que encaminharam pacientes para a pesquisa e à médica veterinária Dra. Maria Aparecida C. Cunha, aos bioquímicos Dr. César A. Arão e Dra. Iza Keiko Hirai Akamine e à bióloga Márcia Cristina Correa Chagas pelo inestimável auxílio na realização dos ensaios imunoenzimáticos.

REFERÊNCIAS

- Nadelman RB, Wormser GP: Lyme borreliosis. *Lancet* 352: 557-65, 1998.
- Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, et al.: Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood: a prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediatr Suppl* 386: 1-76, 1993.
- Ornstein K, Berglund J, Bergström S, Norrby R, Barbour AG: Three major Lyme *Borrelia* genospecies (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified by PCR in cerebrospinal fluid from patients with neuroborreliosis in Sweden. *Scand J Infect Dis* 34: 341-6, 2002.
- Masuzawa T: Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia. *Jpn J Infect Dis* 57: 229-35, 2004.
- Fonseca AH, Salles RS, Salles SAN, Madureira RC, Yoshinari NH: Borreliose de Lyme símile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *An Bras Dermatol* 80(2): 171-8, 2005.
- Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T: Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis* 3 (8): 489-500, 2003.
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, et al.: Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20: 7-17, 1977.
- Yoshinari NH, Steere AC, Cossermelli W: Revisão da Borreliose de Lyme. *Rev Ass Med Bras* 35: 34-7, 1989.
- Yoshinari NH, Barros PJJ, Yassuda P, Baggio D, Steere AC, Cossermelli W: Estudo epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 47: 71-5, 1992.
- Yoshinari NH, Oyafuso LK, Monteiro FGV, et al.: Doença de Lyme: relato de um caso observado no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 48: 170-4, 1993.
- Barros PJJ, Levy LH, Monteiro FGV, Yoshinari NH. Doença de Lyme. Acometimento cutâneo e tratamento das fases iniciais. *Rev Assoc Med Bras* 39: 170-2, 1993.
- Barros PJJ, Bonoldi V, Yoshinari NH: Características clínicas da doença de Lyme no Brasil. *Rev Bras Reumatol* 36(2): 67-74, 1996.
- Yoshinari NH, Barros PJJ, Bonoldi VLN, et al.: Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 52: 111-7, 1997.
- 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* 41 (3): 142-150, 2001.
- Costa IP, Yoshinari NH, Barros PJJ, et al.: Doença de Lyme em Mato Grosso do Sul: relato de três casos clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 51: 253-7, 1996.
- 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, Brazil: a short report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(5): 631-5, 2002.
- Eskow E, Adelson ME, Raja-Venkitesh S, Mordechai E: Evidence for disseminated *Mycoplasma fermentans* in New Jersey residents with antecedent tick attachment and subsequent musculoskeletal symptoms. *J Clin Rheumatol* 9(2): 77-87, 2003.
- Gauditano G, Bonoldi VLN, Costa IP, et al.: Síndrome de Lyme-Símile ou complexo infecto-reacional do carrapato – síndrome de Baggio-Yoshinari. *Rev Paulista Reumatol* 4 (3): 17, 2005.
- Soares CO, Costa IP, Naka EN, et al.: Caracterização clínica, epidemiológica e laboratorial da Borreliose de Lyme e a coexistência com a Babesiose em humanos e bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. In press. 2006.
- Lo Re III V, Occi JL, Macgregor RR: Identifying the vector of Lyme disease. *Am Fam Physician* 69: 1935-7, 2004.
- Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Raphaeli I, Tilton RC: Serological diagnosis of human babesiosis by IgG Enzyme-linked immunosorbent assay. *Curr Microbiol* 49: 385-9, 2004.
- Lipsker D, Antoni-Bach N, Hansmann Y, Jaulhac B: Long-term prognosis of patients treated for erythema migrans in France. *Br J Dermatol* 146: 872-6, 2002.
- Melo IS, Gadelha AR, Ferreira LCL: Estudo histopatológico de casos de eritema crônico migratório diagnosticados em Manaus. *An Bras Dermatol* 78:169-77, 2003.
- Huppertz HI, Bents W, Haubitz I, et al.: Diagnosis of paediatric Lyme arthritis using a clinical score. *Eur J Pediatr* 157: 304-8, 1998.
- Wackernagel A, Bergmann AR, Aberer E: Acute exacerbation of systemic scleroderma in *Borrelia burgdorferi* infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19(1): 93-6, 2005.
- Brzonova I, Wollenberg A, Prinz JC: Acrodermatitis chronica atrophicans affecting all four limbs in an 11-year-old-girl. *Br J Dermatol* 147: 375-8, 2002.
- Christen HJ: Lyme neuroborreliosis in children. *Ann Med* 28: 235-40, 1996.
- Escudero-Nieto R, Guerrero-Espejo A: Enfermedades producidas por *Borrelia*. *Enferm Infect Microbiol Clin* 23(4): 232-40, 2005.
- Soares CO: Princípios, padronização e validação das provas sorológicas – técnicas imunoenzimáticas. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO, editors. *Imunodiagnóstico em medicina veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; 2001. p.145-75.
- Cermakova Z, Ryskova O, Honegr K, Cermakova E, Hanovcova I: Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. *Med Sci Monit* 11 (4): 121-5, 2005.
- Stone EG, Lavombe EH, Rand PW: Antibody testing and Lyme disease risk. *Emerg Infect Dis* 11 (5): 722-4, 2005.
- Blaauw AAM, Van Loon AM, Schellekens JFP, Bijlsma JWJ: Clinical evaluation of guidelines and two-test approach for Lyme disease. *Rheumatology* 38: 1121-6, 1999.

33. Craven RB, Quan TJ, Bailey RE, et al.: Improved serodiagnostic testing for Lyme disease: results of a multi center serologic evaluation. *Emerg Infect Dis* 2: 136-40, 1996.
34. Yoshinari NH, Abrão MG, Bonoldi VLN, et al.: Coexistence of antibodies to tick-borne agents of Babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia County, state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (3): 311-8, 2003.
35. White DJ, Talarico J, Chang HG, Birkhead GS, Heimberger T, Morse DL: Human babesiosis in New York State: review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. *Arch Intern Med* 158: 2149-54, 1998.
36. Krause PJ, Telford SR, Pollack RJ, et al.: Babesiosis: an underdiagnosed disease of children. *Pediatrics* 89: 1045-8, 1992.
37. Stanczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B: *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med* 11: 109-14, 2004.
38. Saulsbury, Frank T: Lyme Arthritis in 20 children residing in a non-endemic area. *Clin Pediatr* 44 (5): 419-21, 2005.
39. Eichenfield AH, Goldsmith DP, Benach JL, et al.: Childhood Lyme arthritis: experience in an endemic area. *J Pediatr* 109 (5): 753-8, 1986.
40. Huppertz HI: Lyme disease in children. *Curr Opin Rheumatol* 13:434-9, 2001.
41. Williams CL, Strobino B, Lee A, et al.: Lyme disease in childhood: clinical and epidemiologic features of ninety cases. *Pediatr Infect Dis J* 9: 10-4, 1990.
42. Klein JD, Eppes SC, Hunt P: Environmental and life-style risk factors for Lyme disease in children. *Clin Pediatr (Phila)* 35(7): 359-63, 1996.
43. Goossens HAT, Bogaard AE, Nohlmans MKE: Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 39(3): 844-8, 2001.
44. Gerber MA, Shapiro ED, Burke GS, Parcels VJ, Bell GL: Lyme disease in children in southeastern Connecticut. *N Engl J Med* 335: 1270-4, 1996.
45. Goodlad JR, Davidson MM, Gordon P, Billington R, Ho-Yen DO: Morphoea and *Borrelia burgdorferi*: results from the Scottish Highlands in the context of the world literature. *J Clin Pathol* 55: 374-8, 2002.
46. Salpietro DC, Merlino MV, Bruglia S, Guarneri F, Vaccaro M: Linear scleroderma 'en coup de sabre' associated with facial atrophy in a patient seropositive for *Borrelia burgdorferi*: a true case of molecular mimicry? *Pediatr Allergy Immunol* 15: 570-2, 2004.
47. Sahin MT, Baris S, Karaman A: Parry-Romberg syndrome: a possible association with borreliosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18: 204-7, 2004.
48. Renaud I, Cachin C, Gerster JC: Good outcomes of Lyme arthritis in 24 patients in an endemic area for Switzerland. *Joint Bone Spine* 71: 39-43, 2004.
49. Ecklund K, Vargas S, Zurakowski D, Sundel RP: MRI features of Lyme arthritis in children. *AJR Am J Roentgenol* 184: 1904-9, 2005.
50. Hendrickx G, De Boeck H, Gossens A, Demanet C, Vandenplas Y: Persistent synovitis in children with Lyme arthritis: two unusual cases. An immunogenetic approach. *Eur J Pediatr* 163: 646-50, 2004.
51. Niemann G, Köksal MA, Oberle A, Michaelis R: Facial palsy and Lyme borreliosis: long-term follow-up of children with antibioticly untreated "idiopathic" facial palsy. *Klin Pädiatr* 209: 95-9, 1997.
52. Vázquez M, Sparrow SS, Shapiro ED: Long-term neuropsychologic and health outcomes of children with facial nerve palsy attributable to Lyme disease. *Pediatrics* 112 (2): 93-7, 2003.
53. Karadag B, Spieker LE, Schwitler J, et al.: Lyme carditis. *Cardiology in Review* 12: 185-7, 2004.
54. Gauditano G, Bonoldi VLN, Hiratsuka RC, Kiss MH, Yoshinari NH: Aspectos imunológicos comuns entre a doença de Lyme e a febre reumática. *Rev Bras Reumatol* 40 (1): 1-8, 2000.
55. Hernandez MS, Castellano MA, Martínez RP, Pérez BS, González JRB, Sibello AS: Pesquisa de *Babesia* em trabalhadores agropecuários y donantes em la provincia de Ciego de Avila. *Rev Cubana Med Trop* 49(2): 130-5, 1997.