

Virgínia Lúcia Nazario Bonoldi

**Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos
por carrapatos em pacientes com Doença de Lyme-
símile brasileira (Síndrome Baggio-Yoshinari)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bonoldi, Virgínia Lúcia Nazario

Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos em pacientes com Doença de Lyme-símile brasileira (Síndrome Baggio-Yoshinari) / Virgínia Lúcia Nazario Bonoldi. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientador: Natalino Hajime Yoshinari.

Descritores: 1.Zoonoses 2.*Rickettsia* 3.Ehrlichiose/diagnóstico 4.Síndrome Baggio-Yoshinari 5.*Rickettsia parkeri* 6.*Rickettsia amblyommii* 7.*Rickettsia bellii*

USP/FM/SBD-431/09

Eu dedico a minha tese de doutorado aos meus pais, irmão e tio já falecidos. Dedico à minha família: meu querido Douglas e aos meus filhos, Matheus e Sophia.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari**, que me incentivou a desenvolver este precioso trabalho para mim, como se fosse meu pai.

À **Profa. Dra. Eloísa Dutra de Oliveira Bonfá** , Titular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Marcelo Bahia Labruna** , professor associado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por ter me disponibilizado as técnicas laboratoriais e seu precioso conhecimento.

À **Profa. Rosângela Zacarias Machado**, professora da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-Jaboticabal), por ter cedido material para experimentos laboratoriais imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos meus amigos da Disciplina de Reumatologia da FMUSP que sempre me deram uma palavra de conforto: **Ana Paula, Ângela, Cláudia, Elaine, Eliana, Fátima, Iná, Juraci, Liliam, Marcela, Maria Aparecida, Maria Aurora, Maria de Fátima, Marta , Solange, Valéria , Vilma , Vilma Trindade e Walcy** . Especialmente à **Cleonice Bueno e Margarete Borges Galhardo Vendramini**.

Aos meus queridos amigos e colegas de linha de pesquisa em Síndrome Baggio-Yoshinari: **Elenice, Mariana, Dra. Roberta e Dra. Giancarla** (amiga de longa data).

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria de F. Crestana, Marivalda de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Síndrome Baggio-Yoshinari e doença de Lyme.....	2
1.2	Ehrlichiose Monocítica Humana (EMH).....	14
1.3	Anaplasmoose Granulocítica Humana (AGH).....	17
1.4	Ehrlichiose Humana causada pela <i>Ehrlichia ewingii</i>	20
1.5	Babesiose Humana	21
1.6	Febre Maculosa (FM) causada pela <i>Rickettsia rickettsi</i>	24
1.7	Rickettsioses Brandas	28
1.7.1	Febre Maculosa causada pela <i>Rickettsia parkeri</i>	28
1.7.2	STARI (Southern Tick-Associated rash illness) causado pela <i>Rickettsia amblyommii</i>	29
2	OBJETIVOS	34
3	MÉTODOS	36
3.1	Coleta de sangue.....	39
3.2	Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Western Blotting (WB) para B. burgdorferi G39/40 (americana) modificados	39
3.3	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia equi</i>	40
3.4	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Babesia bovis</i>	41
3.5	ELISA para <i>Babesia bovis</i> (Yoshinari et al., 2003)	41
3.6	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Rickettsia</i> <i>rickettsii</i> , <i>R. parkeri</i> , <i>R. amblyommii</i> , <i>R. rhipicephali</i> e <i>R. bellii</i>	42
3.7	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i>	43

3.8	Extração do DNA das amostras de sangue com EDTA para realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	44
3.9	PCR para <i>Borrelia</i> spp.....	44
3.10	PCR para <i>Babesia</i> spp	45
3.11	PCR para <i>Ehrlichia</i> spp	46
3.12	Análise do fragmento amplificado	46
3.13	Análise Estatística.....	47
4	RESULTADOS.....	48
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÕES	78
7	ANEXOS	80
8.1	Termo da CaPPesq.....	81
8	REFERÊNCIAS.....	82
9	APÊNDICES	
9.1	Artigo para publicação	
9.2	Normas da Revista	

Lista de Abreviaturas

AGH	Anaplasrose Granulocítica Humana
BH	Babesiose Humana
DL	Doença de Lyme
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Eritema Migratório
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
PCR	Polymerase Chain Reaction
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SBY	Síndrome Baggio-Yoshinari
SFC	Síndrome da Fadiga Crônica
STARI	Southern Tick-Associated rash illness
WB	Western Blotting

Lista de Figuras

Figura 1 - Eritema migratório (EM) – lesão de pele da SBY	5
Figura 2 - Agente etiológico da SBY	7
Figura 3 - <i>Ehrlichia chaffensis</i> no interior de monócito em esfregaço sanguíneo corado pelo Método de Wrigth (1000X).....	17
Figura 4 - <i>Anaplasma phagocytophilum</i> no interior de neutrófilo em esfregaço sanguíneo corado pelo Método de Wrigth (1000X)	20
Figura 5 - <i>Babesia microti</i> intraeritrocitária na forma de anel corada pelo Método de Gimsa (1000X).....	24
Figura 6 - <i>R. rickettsii</i> intraendotélio pulmonar visualizada em histoquímica pela coloração com Ematoxilina e Eosina	27
Figura 7 - Lesão característica (“eschar”) da Febre Maculosa causada pela <i>R. parkeri</i>	29
Figura 8 - Fotomicrografia da RIFI para <i>Babesia</i> equi de paciente com SBY com história de EM	57
Figura 9 - PCR positiva com “primers” para gene 16SrRNA (850 pb).....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Agente etiológico, vetores e hospedeiros da Síndrome Baggio - Yoshinari (SBY) e doença de Lyme	9
Tabela 2.	Manifestações clínicas da Síndrome Baggio-Yoshinari e doença de Lyme	10
Tabela 3.	Tratamento da Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) e doença de Lyme	13
Tabela 4.	Manifestações clínicas das zoonoses transmitidas por carrapatos.....	30
Tabela 5.	Agentes etiológicos, vetores e hospedeiros das zoonoses transmitidas por carrapatos	31
Tabela 6.	Tratamento das zoonoses transmitidas por carrapatos.....	32
Tabela 7.	Frequência dos parâmetros diagnósticos em 70 pacientes com SBY*.....	38
Tabela 8.	Frequências das manifestações clínicas dos 70 pacientes com SBY*.....	50
Tabela 9.	Dados epidemiológicos dos pacientes com SBY.....	50
Tabela 10.	ELISA (IgG e IgM) para <i>Borrelia burgdorferi</i> G39/40 nos pacientes com SBY e no grupo controle.....	51
Tabela 11.	Western Blotting (WB) (IgG e IgM) para <i>Borrelia burgdorferi</i> G39/40 nos pacientes com SBY e no grupo controle	52
Tabela 12.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>R. rickettsii</i> na SBY e no grupo controle.....	53
Tabela 13.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>R. parkeri</i> nos pacientes com SBY e no grupo controle	54
Tabela 14.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>R. amblyommii</i> nos pacientes com SBY e no grupo controle.....	54
Tabela 15.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>R. bellii</i> nos pacientes com SBY e no grupo controle	55
Tabela 16.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>R. rhipicephali</i> nos pacientes com SBY e no grupo controle.....	55
Tabela 17.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia equi</i> nos pacientes com SBY e no grupo controle	56
Tabela 18.	ELISA para <i>Babesia bovis</i> (IgG e IgM) nos pacientes com SBY e no grupo controle	57
Tabela 19.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para <i>Ehrlichia canis</i> nos pacientes com SBY e grupo controle.....	58

Resumo

Bonoldi VLN. *Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos em pacientes com a Doença de Lyme-símile brasileira (Síndrome Baggio-Yoshinari)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 114p.

Ehrlichiose Monocítica Humana, Anaplasmoses Granulocítica Humana, Babesiose, Febre Maculosa das Montanhas Rochosas e Doença de Lyme são doenças transmitidas por carrapatos encontradas no Hemisfério Norte. No Brasil, a DL-símile chamada de Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) é descrita, mas as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais são diferentes da DL original. Nos Brasileiros, as outras doenças transmitidas por carrapatos são pouco estudadas. O objetivo desta pesquisa é estudar a possibilidade de co-infecção entre a SBY e outras doenças transmitidas por carrapatos, através de ensaios laboratoriais para *Ehrlichia* spp, *Babesia* spp and *Rickettsia* spp em um grupo de 70 pacientes com SBY. Dez pacientes estavam na fase inicial da doença e 60 no estágio latente. Eritema Migratório (EM) esteve presente em 27 (38,6%), artrite em 26 (37,1%), febre em 13 (18,5%), cefaléia em 29 (41,4%), artralgia em 36 (51,4%), mialgia em 51 (72,8%), fadiga em 38 (54,3%), meningite em 4 (5,7%), neurite craniana em 8 (11,4%), radiculopatia periférica em 9 (12,8%), encefalomielite em 4 (5,7%), cardiopatia em 7 (10%), lesão de pele atípica em 10 (14,3%) e anemia em 10 (14,3%). O ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) para *Borrelia burgdorferi* foi positivo em 21 (30%) pacientes do grupo da SBY e apenas em 3 dos 50 (6%) indivíduos do grupo controle ($p = 0.01$). Usando o método de Western blotting (WB) modificado para antígenos da *B. burgdorferi*, trinta e cinco (50%) dos pacientes com SBY foram positivos, e 2 (4%) indivíduos do grupo controle. ($p < 0,001$). A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (IgG) apresentou resultados significativos para três das cinco espécies de *Rickettsia* spp analisadas: *R. parkeri* (8,6%) ($p = 0,032$), *R. amblyommi* (22,8%) ($p = 0,031$) e para *R. bellii* (8,6%) ($p = 0,032$). O Teste do Qui-quadrado foi usado para análise estatística. Poucos pacientes apresentaram positividade para antígenos de *B. bovis* (RIFI e ELISA) e *B. equi* (RIFI). A RIFI para antígenos da *Ehrlichia canis* foi positiva apenas para um (1,4%) paciente com SBY. Isto nos leva a concluir que pacientes com SBY apresentaram co-infecção com *R. parkeri*, *R. amblyommi* e *R. bellii*, sugerindo que a SBY possa ser transmitida pelos mesmos carrapatos responsáveis pela transmissão destas *Rickettsias*.

Descritores: 1.Zoonoses 2.*Rickettsia* 3.Ehrlichiose/diagnóstico 4.Síndrome Baggio-Yoshinari 5.*Rickettsia parkeri* 6.*Rickettsia amblyommi* 7.*Rickettsia bellii*.

Summary

Bonoldi VLN. *Laboratorial study of tick-borne infectious agents in patients with Brazilian Lyme-like Disease (Baggio-Yoshinari Syndrome)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 114p.

Human Monocytic Ehrlichiosis, Human Granulocytic Anaplasmosis, Babesiosis, Rocky Mountain Spotted Fever and Lyme Disease (LD) are tick-borne diseases commonly found in the North hemisphere. In Brazil, a LD-like illness called Baggio-Yoshinari Syndrome (BYS) is described, but epidemiological, clinical and laboratorial features are different from the original LD. In Brazilian humans, the other tick-borne diseases are less frequently studied. The aim of this survey was to verify the possibility of co-infections between SYS and other tick-borne diseases, using laboratorial assays to *Ehrlichia* spp, *Babesia* spp and *Rickettsia* spp in a group of 70 patients with SYS. Ten patients were at initial stage of the disease and 60 patients were in a latent stage. Erythema migrans (EM) was present in 27 patients (38.6%), arthritis in 26 (37.1%), fever in 13 (18.5%), headache in 29 (41.4%) arthralgia in 36 (51.4%), myalgia in 51 (72.8%), fatigue in 38 (54.3%), meningitis in 4 (5.7%), cranial neuritis in 8 (11.4%), peripheral radiculopathy in 9 (12.8%), encephalomyelitis in 4 (5.7%), cardiopathy in 7 (10%), atypical skin eruptions in 10 (14.3%) and anemia in 10 patients (14.3%). ELISA (Enzyme Linked Immunossorbent Assay) for *Borrelia burgdorferi* antigens was positive in 21 patients (30%) of SYS group, while only 3 (6%) from 50 normal individuals had positive reactions ($p = 0.01$). Using the modified Western Blotting (WB) method for *B. burgdorferi* antigens, 35 (50%) of the SYS patients were positive, and 2 normal individuals (4%) from the control group ($p < 0.001$). Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) (IgG) presented positive results for three of five species of *Rickettsia* tested: *R. parkeri* (8, 6%) ($p = 0.032$), *R. amblyommi* (22.8%) ($p = 0.031$) and for *R. bellii* (8.6%) ($p = 0.032$). Chi-square test was used for the statistic analysis. A few patients developed a positive reaction to *B. bovis* (IFA and ELISA) and *B. equi* antigens (IFA). IFA for *Ehrlichia canis* antigens was positive in only one patient (1.4%) with SYS. It was possible to conclude that SYS patients presented a co-infection with *R. parkeri*, *R. amblyommi* and *R. bellii*, suggesting that SYS can be vectored by the same ticks responsible for the transmission of Rickettsial agents.

Descriptors: 1.Zoonoses 2.Rickettsia 3.Ehrlichiose/diagnóstico 4.Síndrome Baggio-Yoshinari 5.Rickettsia *parkeri* 6.Rickettsia *amblyommi* 7.Rickettsia *bellii*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Baggio-Yoshinari e doença de Lyme

Em 1989, uma equipe multidisciplinar formada pelo Prof. Domingos Baggio (Entomologista do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo – ICBUSP), Prof. Paulo Yassuda (Microbiologista do ICBUSP) e Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari (Reumatologista da Faculdade de Medicina da USP – FMUSP) iniciou a pesquisa da doença de Lyme (DL) no Brasil com o incentivo do Prof. Allen C. Steere, médico responsável pela descoberta da DL nos Estados Unidos (Steere et al., 1977; Yoshinari et al., 1992).

A DL é uma zoonose causada por bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato. As espécies patogênicas ao homem mais importantes e relatadas no Hemisfério Norte são a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. japonica*. Nos Estados Unidos o agente etiológico é a *B. burgdorferi* sensu stricto, e na Europa, a *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. burgdorferi* sensu stricto. Na Ásia as espécies patogênicas identificadas são a *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. japonica* (Baranton et al., 1992; van Dam et al., 1993) (Tabela 1).

A *Borrelia* spp é uma espiroqueta Gram negativa, microaerófila, com comprimento entre 10 e 20 µm e largura entre 0,2 e 0,5µm. Ela tem de 7 a 11 flagelos periplasmáticos, os quais estão relacionados à motilidade e morfologia da bactéria. Mutações em genes que codificam proteínas de flagelo, como o FlgE,

alteram a síntese flagelar ocasionando alteração na morfologia e motilidade da *Borrelia* spp, a qual perde sua forma espiralada e movimento em torno do próprio eixo (Charon et al., 2002). A membrana celular externa da *Borrelia* spp é composta por lipoproteínas que atuam como fatores imunogênicos ao hospedeiro, ativando o sistema imune contra a infecção bacteriana. Além disto, as lipoproteínas atuam na capacidade de virulência do microrganismo, como as proteínas de superfície OspA e OspB que atuam na transmissão da *Borrelia* spp do hospedeiro vertebrado para o carrapato (Woodman et al., 2008). Assim como, a proteína de superfície OspC que é um importante fator de virulência durante a transmissão da bactéria do carrapato para o hospedeiro (Grimm et al., 2004).

A *Borrelia* spp cresce em meio de cultura específico (BSK-II) e é corada pelos métodos de Giemsa, Hematoxilina/Eosina e com corantes à base de prata. A Reação em Cadeia de Polimerase é um teste útil e sensível na identificação de infecção pelas borrelíias, especialmente em material proveniente de biópsias de eritema migratório e sinóvia, em relação ao sangue de pacientes com DL.

A *Borrelia* spp é transmitida pelos carrapatos *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus*, todos pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*. *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* e *B. afzelii* são transmitidas pelo *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus* (Caporale et al., 1995). A *B. japonica* é transmitida exclusivamente pelo *Ixodes ovatus* (Kawabata et al., 1993) (Tabela 1).

Os Ixodídeos apresentam três estágios de evolução, larva, ninfa e adulto. Em cada fase evolutiva, o carrapato se alimenta em várias espécies de

vertebrados. As larvas e ninfas são mais frequentemente encontradas em pequenos mamíferos como roedores e a forma adulta em animais de maior porte. O homem é infectado principalmente pelas larvas e ninfas do carrapato, as quais medem cerca de 0,2 a 0,5 cm e são dificilmente observadas pelo hospedeiro. Nos Estados Unidos da América (EUA) onde as ninfas predominam no verão, nos meses de maio e junho, existe o maior risco de contágio da enfermidade. A transmissão da bactéria é efetiva apenas após 24 a 48 horas de repasto sanguíneo (Crippa et al., 2002).

As manifestações clínicas surgem por estágios, sendo inicialmente caracterizadas pela presença do Eritema migratório (EM) (Figura 1) no local da picada do carrapato e sintomas gripais (Steere et al., 1983). Na fase secundária da doença pode haver acometimento osteoarticular, dermatológico, neurológico e cardíaco. Neste estágio pode ocorrer artrite, principalmente de padrão oligoarticular; lesões de pele como as anulares secundárias, acrodermatite crônica atrófica (ACA) e linfocitoma. Complicações neurológicas são caracterizadas por meningite linfomonocitária, meningoencefalite, meningorradiculoneurite (Síndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth) manifestada com intensa dor nevrálgica, neuropatia craniana, radiculopatia motora ou sensitiva e raramente encefalomielite. Manifestações oculares podem ocorrer em todas as fases da doença como conjuntivite na fase aguda, enquanto que a queratite, uveíte e infecção da retina manifestadas por diplopia, edema, fotofobia e enbaçamento visual (Mora e Carta, 2009) ocorrem no estágio secundário da zoonose. O cometimento cardíaco é menos freqüente e caracteriza-se por bloqueio átrio-ventricular e miocardite (Steere, 1989; Stanek e Strle, 2008;

Hildenbrand et al., 2009) (Tabela 2). O tratamento da doença com antibióticos deve ser precoce para eliminar a infecção e evitar complicações secundárias e terciárias da doença (Stanek e Strle, 2008) (Tabela 3).



Figura 1 - Eritema migratório (EM) – lesão de pele da SBY

Nos EUA, atualmente existe o conceito de Síndrome Pós-Lyme para denominar um conjunto de sintomas clínicos caracterizados por fadiga, dores músculo-esqueléticas, cefaléia e distúrbios do cognitivo que persistem mesmo após a instituição do tratamento. Estudos sugerem que na fase terciária, sintomas crônicos articulares, neurológicos, cardíacos e dermatológicos são atribuídos à autoimunidade (Kuenzle et al., 2007) ou à Síndrome pós Lyme (Cairns e Godwin, 2005).

Em 1992, foram identificados os primeiros casos idênticos à DL no Brasil em irmãos que apresentaram EM, artrite e sintomas gripais após picada de carrapatos (Yoshinari et al., 1992). Após duas décadas de pesquisas, novos casos clínicos permitiram caracterizar os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença que foi denominada de Síndrome Baggio-Yoshinari devido às inúmeras particularidades

clínicas e laboratoriais em relação à DL clássica (Gauditano et al., 2005). As manifestações clínicas da SBY são semelhantes às da DL com acometimento de pele e sintomas articulares, neurológicos e cardíacos, porém, os pacientes com SBY podem apresentar recorrência destas manifestações clínicas mesmo após tratamento adequado (Yoshinari et al., 1997).

À exemplo do que ocorre no hemisfério Norte, enfermos com a SBY cursam com queixas compatíveis com a Síndrome da Fadiga Crônica (SFC), caracterizada por quatro dos seguintes sintomas: fadiga prolongada por mais de seis meses, cefaléia, mialgia, diminuição da memória, sono ou concentração, artralgia, dor de garganta ou adenomegalia cervical (Costa et al., 2001). Nos Estados Unidos da América do Norte e na Eurásia, estes sintomas são denominados de Síndrome pós-Lyme ou TAPOS (Cairns e Godwin, 2005).

O agente da SBY parece ser uma borrelia de morfologia atípica que sofreu alterações gênicas para se adaptar em ambiente diferente do habitual, considerando que no Brasil não existem carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* e nem as espécies de animais que atuam como hospedeiros do Hemisfério Norte. O exame à microscopia eletrônica do sangue periférico de doentes com SBY, revela a presença de estruturas que lembram espiroquetas sem flagelos, além de outros microorganismos com morfologias de Mycoplasmas e Chlamydias (Mantovani et al., 2007) (Figura 2). Sabe-se que espiroquetas como as borrelías e treponemas, desenvolveram grande capacidade adaptativa de sobreviver em meios inóspitos, sendo capazes de modificar o genoma e a expressão protéica (Murgia e Cinco, 2004; Ovcinnikov e Delektorskij, 2007).

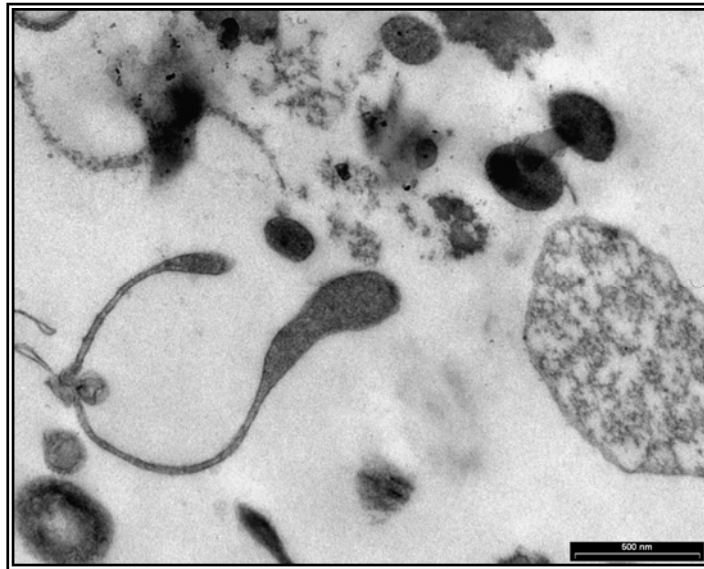


Figura 2 - Agente etiológico da SBY
(*Borrelia burgdorferi* mutante)

Espiroquetas em modificação adaptativa exibem morfologias de esporos, cistos, bacteróides, corpos densos e os que perdem a membrana externa apresentam morfologias de Mycoplasmas e são conhecidas como forma L ou bactérias sem parede (cell wall deficient bacteria).

Recentemente, identificou-se borrelíias de morfologia atípica, semelhantes ao descrito no Brasil, em tecido cerebral de pacientes com neuroborreliose (Miklossy et al., 2008). Em geral, as bactérias na sua forma L não são patogênicas, com raras exceções. Contudo, as estruturas visualizadas nos pacientes com SBY são capazes de invadir células endoteliais e crescem temporariamente em meio de cultivo conhecido como SP4, adequado para cultivo de *Spiroplasma spp* (Mollicutes). Do ponto de vista laboratorial, aproximadamente 65% dos pacientes com SBY desenvolvem resposta imunológica humoral e celular contra antígenos da *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana. Contudo, a reatividade imunológica é fraca e

transitória. Adicionalmente, doentes com SBY desenvolvem altas frequências de distúrbios autoimunes, como os anticorpos contra componentes neuronais (Gauditano et al., 2000).

Os carrapatos transmissores do agente etiológico da SBY sugerem ser o *Amblyomma cajennense* (carrapato estrela) e o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ambos pertencentes à Família Ixodidae (Barros-Battesti et al., 2000; Costa et al., 2002; Yoshinari et al., 2003)

Na atualidade, define-se a SBY como enfermidade transmitida por carrapatos não pertencente ao complexo *Ixodes ricinus*, causada por espiroquetas de comportamento latente de morfologias atípicas, que reproduz manifestações clínicas semelhantes ao visto na DL, exceto pela ocorrência de recorrências e alta incidência de anomalias autoimunes. Trata-se de enfermidade típica do território brasileiro e que deve ser separada da clássica DL encontrada no Hemisfério Norte. Postula-se que, as condições geográficas e climáticas próprias do país, aliadas à ocorrência de carrapatos exóticos, diferente dos descritos nos EUA e Eurásia, tenham propiciado o desenvolvimento de espiroquetas de características ímpares, capazes de justificar as particularidades observadas na SBY em relação à DL.

Tabela 1. Agente etiológico, vetores e hospedeiros da Síndrome Baggio - Yoshinari (SBY) e doença de Lyme

	SBY	DL - EUA	DL – Europa/Ásia
Agente etiológico	<i>Borrelia</i> spp mutante	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	<i>Borrelia garinii</i> , <i>Borrelia afzelii</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , sensu stricto, <i>Borrelia japonica</i>
Vetores	<i>Amblyomma cajennense</i> , <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>Ixodes loricatus</i>	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>Ixodes pacificus</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>
Reservatórios	gambás: <i>Didelphis marsupialis</i> , <i>Didelphis albiventris</i> roedores silvestres: <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Akodon cursor</i> , <i>Oxymycterus sp.</i>	roedor silvestre: <i>Peromyscus leucopus</i> , cervo: <i>Odocoileus virginianus</i> , lagartos	aves : <i>Phasianus colchicus</i> , <i>Turdus chrysolaus</i> , roedores

FONTE: Costa et al., 2002; Barros-Battesti et al., 2000; LoGiudice et al., 2003; Kurtenbach et al, 1998; Miyamoto et al., 1997.

Tabela 2. Manifestações clínicas da Síndrome Baggio-Yoshinari e doença de Lyme

SBY	DL – EUA	DL – Europa/Ásia
Fase aguda:	Fase aguda:	Fase aguda:
Eritema Migratório(EM) febre, cefaléia, artralgia, mialgia, fadiga, mal estar, linfadenomegalia.	EM, febre, mal estar, fadiga, cefaléia, calafrios, conjuntivite, linfadenopatia.	Cefaléia, artralgia, mialgia, fadiga linfocitoma, mal estar, EM (menos frequente).
Fase secundária:	Fase secundária:	Fase secundária:
Dermatológicas:	Dermatológicas:	Dermatológicas:
lesões anulares secundárias, linfocitoma, paniculite, escleroderma- like.	Eritema anular secundário, Acrodermatite Crônica Atrófica (ACA)– raro	Eritema anular secundário, Acrodermatite Crônica Atrófica (ACA), linfocitoma.
Neurológicas:	Neurológicas (<10%):	Neurológicas (>35%):
Meningite, neurite craniana, neuropatia periférica ,neurite óptica, encefalomielites agudas e crônicas, meningoradiculite (Síndrome de Bannwarth), polirradiculoneurite (Guillain-Barré),	caracterizada pela tríade meningite linfomonocitária, paralisia facial e miningoencefalite.	meningoradiculoneurite (Síndrome de Garin- Bujadoux-Bannwarth), meningoencefalite, encefalomielite, uveíte, queratite ocular.

Continua...

Continuação Tabela 2

SBY	DL – EUA	DL – Europa/Ásia
Osteo-articulares:	Osteo-articulares:	Osteo-articulares
Artrite com padrão oligoarticular, inicialmente de grandes articulações e progressivamente de pequenas, com rigidez matinal.	Artrite de grandes articulações com padrão oligoarticular.	Artrite com padrão oligoarticular.
Fotossensibilidade, Fenômeno de Raynaud, síndrome seca, vasculite	Cardíacas: Bloqueio átrio-ventricular, miocardite	Cardíacas: Bloqueio átrio-ventricular, miocardite
Cardíacas (10%): Arritmia cardíaca e cardiopatia.	Fase terciária: Dermatológicas: raras	Fase terciária: Dermatológicas:
Fase terciária: Dermatológicas: ACA.	Ósteo-articulares: Artrite crônica (10% dos doentes, provavelmente devido à auto-imunidade)	Acrodermatite crônica atrófica (causada por <i>Borrelia afzelii</i>)
Osteo-articulares: Artrite crônica	Neurológicas: Encefalomielite, ataxia cerebral, encefalopatia, distúrbio do cognitivo.	Ósteo-articulares: raras
		Neurológicas: Encefalomielite crônica, distúrbio do cognitivo.

Continua...

Conclusão Tabela 2

SBY	DL – EUA	DL – Europa/Ásia
Neurológicas:	Síndrome Pós-Lyme	
Cefaléia, encefalomielite crônica, distúrbio do cognitivo (alteração do sono, comportamento, raciocínio, memória, nervosismo, parestesia de extremidades.	Fadiga, mialgia, artralgia, cefaléia, rigidez de nuca, parestesia, irritabilidade, diminuição do sono, concentração e memória.	
Síndrome da Fadiga Crônica: fadiga persiste por mais de 6 meses, mialgia, artralgia, cefaléia, dor de garganta, adenomegalia cervical, irritabilidade, diminuição do sono, concentração e memória		

Tabela 3. Tratamento da Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) e doença de Lyme

SBY	DL – EUA	DL – Europa
Fase aguda:	Fase aguda:	Fase aguda:
Doxiciclina 100mg/2Xdia, ou Amoxicilina 500mg/4Xdia - 30 dias	Doxiciclina 100 mg duas vezes ao dia ou amoxicilina 500 mg quatro vezes ao dia ou azitromicina 500 mg/dia por 2 a 3 semanas.	Doxiciclina 200 mg/dia, amoxiciclina 2g/dia, axetil- cefuroxime, azitromicina 500 mg/dia ou penicilina V – 14 dias
Fase latente:		
Repetir prescrição da fase aguda por três meses ou	Fase secundária:	Fase secundária:
Ceftriaxone 2g endovenoso – 30 dias,, seguido de doxiciclina 200 mg/dia ou azitromicina 500mg/dia por dois meses.	Mesmo esquema da fase aguda. Doentes com queixas neurológicas podem ser tratados com ceftriaxone 2g/EV/dia ou penicilina cristalina 20 milhões por 2 a 3 semanas.	Acometimento neurológico ou cardíaco: ceftriaxone 2g/EV/dia ou penicilina G – 20 milhões ao dia durante 2 ou 3 semanas.
Associação de difosfato de cloroquina 250mg/dia ou hidroxicloroquina 400mg/dia. Imunossupressores ou drogas modificadoras da artrite reumatóide são indicados nos casos de complicação articular. Não há padronização terapêutica nos casos de recidivas neurológicas.	Fase terciária:	ACA ou artrite:
	Semelhante ao estágio secundário, prolongando-se os antibióticos até 30 dias.	Ceftriaxone 2/EV/dia ou, penicilina G 20 milhões ao dia, doxiciclina 200 mg/dia ou amoxicilina 2g/dia por 4 semanas.
		Fase terciária:
		Semelhante ao estágio secundário, prolongando-se os antibióticos até 30 dias.
Observação: casos de SBY latentes englobam os diagnosticados após três meses do contágio e os recorrentes. Não há critérios que permitam predizer quando desistir dos antibióticos aos pacientes com SBY latentes.	Observação: como não se admite DL recorrente, as queixas posteriores ao tratamento são interpretados como Síndrome pós-Lyme e não medicados com antibióticos.	Observação: à exemplo da conduta Norte americana não se admite recorrências na Europa e Eurásia e portanto não há recomendação de antibióticos na Síndrome pós-Lyme.

1.2 Ehrlichiose Monocítica Humana (EMH)

Ehrlichiose humana é o termo empregado para as infecções causadas pelos microorganismos de células monocíticas (Ehrlichiose monocítica humana) e granulocíticas (Ehrlichiose granulocítica humana). Os primeiros relatos de Ehrlichiose Humana foram em pacientes com sintomas de febre, cefaléia, mialgia, leucopenia, trombocitopenia e anemia. O esfregaço sanguíneo destes doentes revelou a presença de bactérias em vacúolos no interior de monócitos. Nos Estados Unidos da América, em 1987, Maeda e cols. descreveram pela primeira vez a Ehrlichiose Humana causada pela *E. canis*, baseado na Imunofluorescência Indireta positiva para esta espécie de microorganismo.

Em 1991, Dawson e cols. conseguiram isolar o agente etiológico da Ehrlichiose Monocítica Humana (EMH) de sangue periférico de paciente com febre de 39,4°C, cefaléia, faringite, náusea, vômito, linfadenopatia e esplenomegalia Na época, o agente foi classificado como geneticamente diferente da *E. canis*, mas com semelhança antigênica, uma vez que os pacientes tinham sorologia positiva para esta espécie. Anderson e cols. (2001), aplicando a Reação em Cadeia de Polimerase em amostras de sangue de pacientes e posterior sequenciamento do produto amplificado, classificaram a nova espécie de *Ehrlichia* com homologia de 98,2 % com a *E. canis*. A nova espécie causadora da EMH foi nomeada de *Ehrlichia chaffeensis*.

Agente etiológico: *Ehrlichia chaffeensis* é uma bactéria Gram negativa pleomórfica intracelular obrigatória, pertencente à família Anaplasmataceae. A *E. chaffeensis* invade células mononucleares e se agrupa em vacúolos ou mórulas

que medem de 2 a 3 μm . Dentro das máculas, as bactérias permanecem protegidas da ação de enzimas lisossômicas (Tabela 5).

Clínica: os sintomas clínicos devido à infecção pela *E. chaffeensis*, que se seguem após picada de carrapatos são pouco específicas e caracterizam-se por febre de 38°C a 39,5°C, cefaléia, mialgia e mal estar. Podem ocorrer artralgia, náusea, vômito, diarreia, tosse e confusão mental. Na EMH existem relatos de acometimento de pele caracterizado por “rash” cutâneo em cerca de 30% dos pacientes. Os exames laboratoriais nesta fase da doença revelam leucopenia, trombocitopenia e elevação de enzimas hepáticas como alanina e aspartato aminotransferases. Manifestações clínicas mais graves são menos frequentes, podendo ser agudas ou se estabelecerem numa fase mais tardia da doença na ausência de tratamento adequado (Tabela 6). Stone et al. (2004) descreveram quadro de falência renal e cardíaca. Paddock e cols. (2001) relataram a ocorrência da síndrome semelhante ao choque séptico, principalmente em pacientes imunodeprimidos devido a infecção pelo HIV ou pelo uso de imunossupressores. Acometimento do sistema nervoso central ocorre em 20% dos pacientes, como sintomas de meningite ou meningoencefalite (Dumler et al., 2007) (Tabela 4).

Vetor: o carrapato responsável pela transmissão da *E. chaffeensis* é o *Amblyomma americanum* (Anderson et al., 1993) (Tabela 5).

Reservatório natural: o veado *Odocoileus virginianus* é reconhecido como reservatório da *E. chaffeensis*. Sua presença é suficiente para completar o ciclo epidemiológico da EMH, porque este animal além de albergar a *E. chaffeensis* (Litle et al., 1999), ele serve de hospedeiro para as fases imaturas e adulta do *Amblyomma americanum*, carrapato transmissor da doença ao homem (Tabela 5).

Diagnóstico laboratorial

Identificação do agente etiológico: a coloração pelo método de Wright identifica as mórulas de *E. chaffeensis* no interior de monócitos no esfregaço de sangue periférico (Foto 3), medula óssea e líquido cefalorraquidiano dos pacientes com EMH (Dunn et al., 1992). A *E. chaffeensis* cresce em histiócitos de cão da linhagem DH82, e a cultura sanguínea do paciente deve permanecer sob incubação de duas a seis semanas para se observar infecção intracelular. Além do isolamento da bactéria, a cultura permite amplificar a quantidade de microrganismos, aumentando a sensibilidade da PCR (Polymerase Chain Reaction). Os “primers” empregados na PCR são os que amplificam fragmentos conservados do gene 16S rRNA presente em eubactérias. O uso de “primers” conservados é útil na identificação de microrganismos ainda não conhecidos, pois o sequenciamento do fragmento amplificado pela PCR e o uso de “primers” mais específicos permitem a classificação da espécie (Anderson et al., 1992).

Sorologia: a metodologia empregada no diagnóstico sorológico da EMH é a Imunofluorescência Indireta. As lâminas são sensibilizadas com macrófagos caninos da linhagem DH82 infectados com *E. canis* ou *E. chaffeensis* (Dawson et al., 1991a; da Costa et al., 2006). Preferencialmente a sorologia é realizada com duas amostras do soro do paciente coletadas em datas consecutivas para constatar mudança nos títulos de anticorpos (soroconversão).

A EMH é freqüente nos Estados Unidos, na Costa do Atlântico, Centro-Sul e Centro-Oeste do País, onde é considerada uma zoonose emergente nas regiões onde se encontram o vetor *Amblyomma americanum* e o reservatório

natural *Odocoileus virginianus*. Existem relatos da doença em humanos na Venezuela, (Martinez et al., 2008), México (Gongóra-Biachi et al., 1999) e Brasil (Calic et al., 2004).

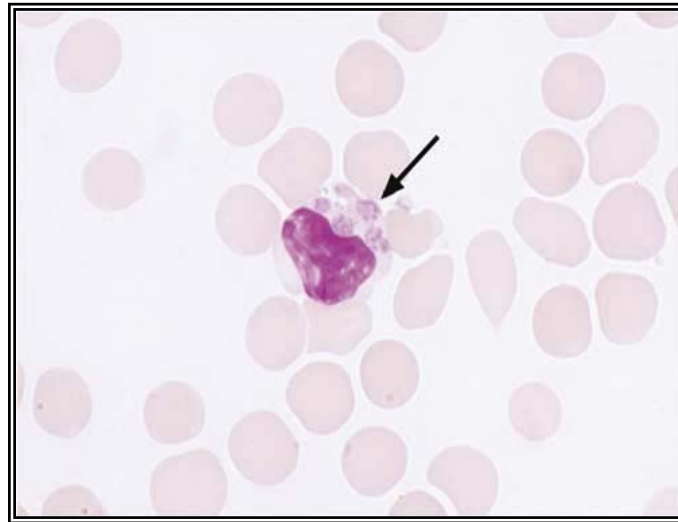


Figura 3 - *Ehrlichia chaffensis* no interior de monócito em esfregaço sanguíneo corado pelo Método de Wrigth (1000X) (Hamilton et al., 2004)

1.3 Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH)

Nos Estados Unidos, em 1994, Bakken et al. descrevem pela primeira vez, uma zoonose causada em humanos, por bactéria intracelular obrigatória com tropismo por neutrófilos, relacionando geneticamente com a *Ehrlichia phagocytophila* e *Ehrlichia equi*, agentes causadores da Ehrlichiose em ruminantes e em eqüinos, respectivamente. A doença chamou-se Ehrlichiose Granulocítica Humana (EGH). Com a reorganização da Família *Anaplasmataceae*, estas espécies foram unificadas no Gênero *Anaplasma* (Dumler et al., 2001), sendo o agente etiológico da renomenada Anaplasmoze Granulocítica Humana classificado como

Anaplasma phagocytophilum ou *A. phagocytophila*. Em 1997, Petrovec e et al., descreveram a EGH na Europa.

Agente etiológico: O *Anaplasma phagocytophilum* é uma bactéria pleomórfica, Gram-negativa, que se agrupa dentro de vacúolos formando mórulas no interior de leucócitos polimorfonucleares. São coradas pelo método de Wright no interior de neutrófilos em esfregaço sanguíneo ou de medula espinal. Não se distinguem morfologicamente da *E. chaffeensis* na microscopia de campo claro, exceto pela distinção quanto ao tipo celular onde ocorre o parasitismo.

Clínica: após 5 a 30 dias da picada do carrapato, surgem sintomas clínicos caracterizados por febre entre 38,5°C à 41°C, cefaléia, calafrios, mialgia, mal estar, artralgia, letargia, náusea, e em menor frequência, tosse, vômito, diarreia, conjuntivite, linfadenopatia. Constituem manifestações clínicas graves da AGH a coagulação intravascular generalizada, insuficiência respiratória e renal, acometimento neurológico periférico (Dumler et al., 2005; Blanco et al., 2002) e meningoencefalite (Dumler et al., 2007) (Tabela 4).

Os exames laboratoriais de rotina indicam leucopenia, trombocitopenia e aumento de transaminases hepáticas. (Bakken e Dumler, 2006). Estas alterações laboratoriais e o dano hepático são atribuídos à destruição dos granulócitos parasitados e provavelmente à fagocitose destas células infectadas quando passam pelo órgão.

O tratamento com doxiciclina deve ser empírico no início dos sintomas clínicos a fim de evitar a evolução da doença (Hamburg et al., 2008) (Tabela 6).

Vetores: os carrapatos responsáveis pela transmissão do *Anaplasma phagocytophilum* são o *Ixodes scapularis* (Pancholi et al., 1995; Magnarelli et al.,

1995a; Daniels et al., 1997), *I. pacíficus* (Barlough et al., 1997) e *I. ricinus* (Pusterla et al., 1999; Petrovec et al., 1999).

Reservatórios naturais: o roedor da espécie *Peromyscus leucopus* é considerado o principal reservatório natural do agente etiológico da AGH. Esta espécie encontra-se infectada pelo *A. phagocytophilum* na natureza, sendo também hospedeiro do *I. scapularis* (Walls et al., 1997). *Neotoma fuscipes* e *Clethrionomys glareolus* são outras espécies de roedores frequentemente infectados pelo *A. phagocytophilum*, assim como o cervo *Odocoileus virginianus* (Belongia et al., 1997 Walls et al., 1998) (Tabela 5).

Diagnóstico laboratorial

Identificação do agente etiológico: a coloração pelo método de Wright identifica as mórulas do *Anaplasma phagocytophilum* no interior de neutrófilos no esfregaço de sangue periférico. (Figura IV) A parasitemia causada pelo *Anaplasma phagocytophilum* é menor que 1%, sendo possível seu isolamento em cultura de linhagem celular de leucemia humana HL60 (Goodman et al., 1996). Na identificação do microrganismo geralmente usa-se primers do gene 16S rRNA.

Sorologia: a metodologia empregada no diagnóstico sorológico da AGH é a Imunofluorescência Indireta com células da linhagem HL60 infectadas experimentalmente com *E. equi* ou *A. phagocytophilum*. Normalmente, os anticorpos são detectados a partir da segunda semana após o início dos sintomas clínicos, sendo prudente a realização do teste em duas amostras de soros consecutivas para constatar a soroconversão.

A AGH é uma doença emergente relatada nos Estados Unidos (Bakken et al., 1995), Europa (Petrovec et al., 1997) e Ásia (Zhang et al., 2009).

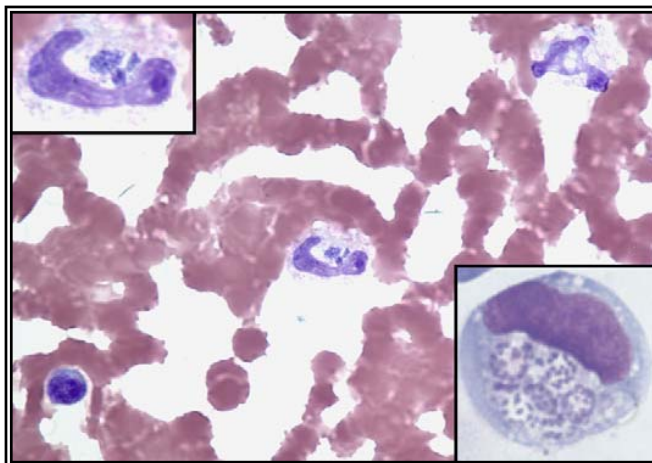


Figura 4 - *Anaplasma phagocytophilum* no interior de neutrófilo em esfregaço sanguíneo corado pelo Método de Wrigth (1000X) (Bakken et al., 2008)

1.4 Ehrlichiose Humana causada pela *Ehrlichia ewingii*

Em 1999, Buller et al. relataram outra espécie de *Ehrlichia* como agente etiológico da Ehrlichiose Humana nos Estados Unidos. A *Ehrlichia ewingii*, agente causador da Ehrlichiose em cães, infecta igualmente neutrófilos de humanos causando a doença com quadro clínico semelhante à EMH e AGH. O vetor da Ehrlichiose Humana causada pela *E. ewingii* é o *Amblyomma americanum* e os reservatórios são ainda desconhecidos.

1.5 Babesiose Humana

Em 1957, Skrabalo e Deanovic reportaram o primeiro caso de babesiose humana (BH), ao descrever parasitismo intraeritrocitário por protozoário semelhante ao agente causador da piroplasmose bovina em paciente com febre, anemia e hemoglobinúria. Em 1968 Fitzpatrick et al. citaram novo caso da doença em humanos, classificando o agente causador como *Babesia divergens* e em 1970, Western et al. mencionaram a *B. microti* como uma nova espécie envolvida na doença em humanos.

Clínica. Enfermos com BH podem evoluir com febre, anorexia, mal estar, cefaléia, fadiga, calafrios, anemia hemolítica, urina escura. A infecção pela *Babesia* spp pode ser sub-clínica ou auto-limitada (Ruebush et al., 1977). A BH em pacientes com deficiência imunológica em decorrência da infecção do vírus HIV ou esplenectomizados pode apresentar evolução crônica com febre persistente e resistência ao tratamento (Falagas et al., 1996). A evolução da doença pode ser fatal em pacientes idosos ou imunodeprimidos na ausência de tratamento (Herwaldt et al., 2004) (Tabela 6).

Os sintomas clínicos da babesiose humana inicialmente são brandos e não específicos, como o surgimento de febre, anemia hemolítica, cefaléia, calafrios, diaforese. O paciente esplenectomizado, imunodeprimido ou não tratado adequadamente, pode evoluir com febre alta, anemia grave, icterícia, urina escura, anorexia, perda de peso, fadiga, insuficiência respiratória e cardíaca, acometimento do sistema nervoso central, falência renal e risco de morte (White et al., 1998). A patogênese da Babesiose Humana decorre da lise celular dos eritrócitos

parasitados causando anemia, hiperbilirrubinemia que provavelmente leva a falência renal, síndrome da angústia respiratória e acometimento neurológico. Além disto, a presença da *Babesia* spp altera a composição da membrana das hemácias e as células esplênicas passam a removê-las da corrente sanguínea, sobrecarregando o órgão linfóide (Commins et al., 1988) (Tabela 4).

Agente etiológico: a *Babesia* spp é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, junto aos agentes causadores da Malária (*Plasmodium* spp) e Toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) e Subordem Piroplasmidae. A *Babesia* spp é transmitida pela saliva do carrapato na forma de esporozoítos e infecta diretamente a hemácia do hospedeiro vertebrado. No interior dos eritrócitos, o protozoário na forma de merozoíto evolui para forma de trofozoíto e gametócitos e sofre divisão binária se multiplicando e invadindo novas hemácias ou causando hemólise. A *Babesia* spp continua seu ciclo evolutivo no carrapato, onde se desenvolvem as formas sexuais e esporozoítos.

As espécies patogênicas identificadas nos Estados Unidos e Europa são *B. microti* (Dammimn et al., 1981; Hildebrandt et al., 2007)), *B. divergens* (Fitzpatrick et al., 1968), *B. divergens* like (Herwaldt et al., 2004), *B. duncani* (Conrad et al., 2006), *Babesia venatorum* (EU1) (Herwaldt et al., 2003). Na Ásia, os agentes etiológicos são *Babesia microti*-like (Wei et al., 2001) e *Babesia* KOI (Kim et al., 2007) (Tabela 5).

Vetores: o agente transmissor da *B. microti* é o *I. scapularis*. O vetor envolvido na transmissão dos protozoários *B. divergens*, *B. divergens* like e *B. venatorum* na Europa é o *Ixodes ricinus* (Becker et al., 2009). O carrapato transmite o protozoário com repasto de 48 a 52 horas. A BH pode ser adquirida através da

transusão de sangue contaminado com o protozoário proveniente de doador assintomático (Smith et al., 1986) (Tabela 5).

Reservatório Natural: o reservatório da *B. microti* é o roedor *Peromyscus leucopus* (Mather et al., 1990) (Tabela 5).

Diagnóstico laboratorial

Identificação do agente etiológico: a *Babesia* spp é visualizada no interior do eritrócito em esfregaço sanguíneo corado pelos métodos de Giemsa ou Wright. Os protozoários intraeritrocitários encontram-se em forma de anel, piriforme, estruturas duplas (*B. divergens*) ou tetrâmera chamada de Cruz de Malta (*B. microti*, *B. duncani*) (Figura 5). A frequência de parasitemia é de cerca de 1% em humanos (Vannier et al., 2008).

A identificação de novas espécies de piroplasmas é feita através da PCR utilizando “primers” para amplificar fragmentos dos genes 18S rDNA, 18S rRNA e β tubulina (Hunfeld et al., 2008).

Sorologia: a Imunofluorescência Indireta para *B. microti* é considerada uma metodologia sensível, específica e reprodutível para ser usada como diagnóstico laboratorial para BH (Krause, 1994). Para que o diagnóstico seja preciso é necessário a análise de duas amostras de soro consecutivas do paciente, na fase aguda e convalescente, para constatar variação nos títulos de anticorpos (soroconversão). O teste sorológico padronizado para diagnóstico da babesiose é a Imunofluorescência Indireta com antígeno de *Babesia microti* que apresenta boa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. A detecção de IgG pode ser

observada desde o início da doença e apresenta menos resultados falsos positivos que a detecção de IgM. Assim, em áreas não endêmicas, apenas as amostras positivas para IgG são testadas para IgM, evitando-se resultados falso-positivos. A Imunofluorescência Indireta com antígenos da *B. divergens* ainda apresenta resultados controversos (Duh e cols., 2007).

A Babesiose Humana é uma zoonose emergente relata nos Estados Unidos, Europa, Ásia e América do Sul (Vannier, 2009).

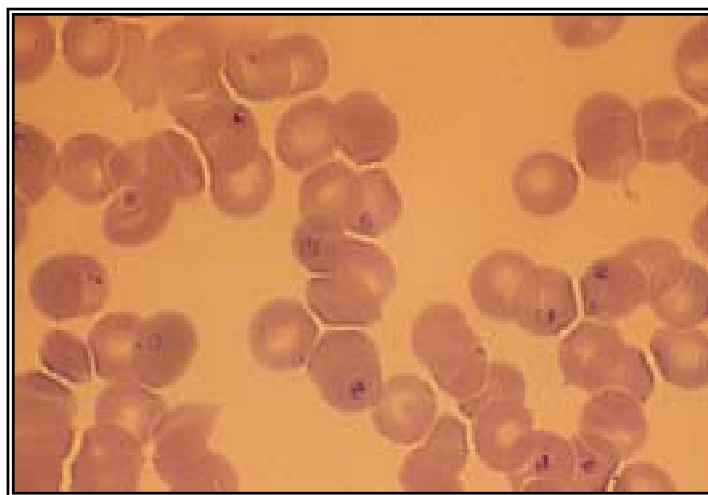


Figura 5 - *Babesia microti* intraeritrocitária na forma de anel corada pelo Método de Gimsa (1000X) (Vannier et al., 2008).

1.6 Febre Maculosa (FM) causada pela *Rickettsia rickettsi*

A Febre Maculosa Brasileira é (FMB) uma doença infecciosa de evolução rápida causada pela *Rickettsia rickettsii*. Ela foi identificada na década de vinte e na década de oitenta tornou-se uma enfermidade re-emergente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. O quadro clínico característico

é febre acima de 40°C e exantema após uma semana da picada do carrapato. A doença foi descrita primeiramente em 1899 nos Estados Unidos da América (Maxey et al., 1899), onde é denominada de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR). A zoonose tem caráter endêmico em regiões do Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil.

Clínica: a enfermidade cursa com febre alta, erupções na pele maculopapulares principalmente em tronco, palma das mãos e sola dos pés, cefaléia intensa, mialgias, edema no dorso das mãos e pés, conjuntivite, edema periorbital, esplenomegalia, hepatomegalia, distensão abdominal. Os exames laboratoriais de rotina podem mostrar aumento moderado de transaminases hepáticas, hipoalbuminemia, aumento de creatinina fosfoquinase e trombocitopenia (Cunha et al., 2008). A evolução clínica na ausência de tratamento é mórbida com relato de edema pulmonar e cerebral em decorrência da infecção endotelial que acarreta aumento da permeabilidade vascular, inflamação, edema e coagulação (Walker et al., 2008). Os sintomas neurológicos descritos na FMMR são perda da audição, confusão mental, hemiparesia e encefalite (Archibald e Sexton, 1995). Existe relato de choque séptico causado pela *R. rickettsii* (Gonçalves da Costa et al., 2002). O tratamento empírico é preconizado mediante suspeita clínica associada à história de picada de carrapatos ou visita em área endêmica devido à alta mortalidade da doença (Tabela 4).

Agente etiológico: a *Rickettsia rickettsii* é um coccobacilo intracelular obrigatório principalmente de endotélio vascular, por onde a bactéria se dissemina pelo organismo humano. Caracteriza-se como bactéria Gram negativa com 0,7µm a 2,0µm de comprimento e 0,3µm a 0,5µm de largura.

Vetores: os principais carrapatos transmissores são *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* (Brasil), *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* (Estados Unidos da América) (Tabela 5).

Reservatórios naturais: os carrapatos são considerados reservatórios da *R. rickettsii*. Todos os estágios evolutivos do artroópode (larva, ninfa e adulto) albergam a bactéria pela via de transmissão transtadial. A *R. rickettsii* também infecta os ovos dos carrapatos via transmissão transovariana. Alguns mamíferos são considerados reservatórios da *R. rickettsii* como roedores (*Spermophilus lateralis* e *Microtus pennsylvanicus*) e lebre (*Lepus americanus*), o cão serve como sentinela para os humanos (Dumler et al.; 2005; Kidd et al., 2008). No Brasil, os principais reservatórios primários são capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), equino (*Equus caballus*) e anta (*Tapirus terrestris*) (Viana et al., 2008) (Tabela 5).

Diagnóstico laboratorial:

Identificação do agente etiológico: a *R. rickettsii* pode ser isolada de sangue, plasma ou biópsia de paciente em cultura de células Vero. O sobrenadante da cultura contém bactérias que são coradas pela técnica de Laranja de Acridina. A bactéria pode ser visualizada através da coloração com Ematoxilina e Eosina (Figura 6) ou Imunofluorescência em biópsia de pele ou tecido proveniente de autópsia (Walker et al., 1989; Rozental et al., 2006). A análise molecular é realizada empregando “primers” dos genes *htrA*, *ompA*, *ompB* e *gltA* para detecção e caracterização da bactéria através da PCR (Nascimento et al., 2005).

Sorologia: a Imunofluorescência Indireta com *R. rickettsii* cultivada em células Vero apresenta boa sensibilidade (94% - 100%) e é o ensaio preconizado pelo CDC (Centre of Disease Control). Para o diagnóstico sorológico são imprescindíveis duas amostras de soro, uma na fase inicial e outra após cerca de quinze dias do início dos sintomas clínicos para detectar aumento dos níveis de anticorpos.

A FM é uma zoonose emergente em todo o mundo, existem áreas endêmicas para doença nos Estados Unidos, Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil, Argentina (Dumler et al., 2005).

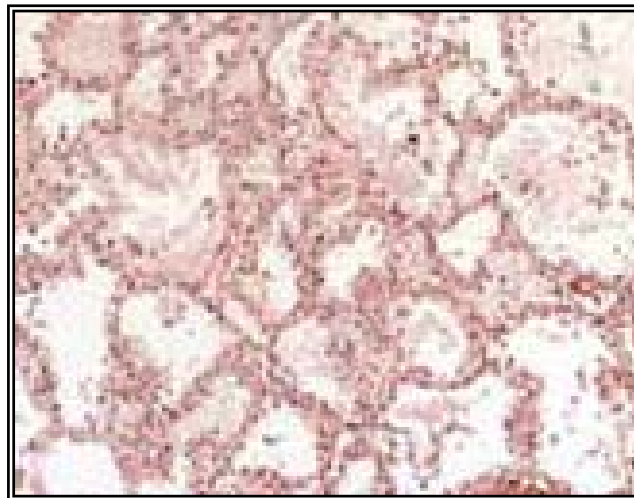


Figura 6 - *R. rickettsii* intraendotélio pulmonar visualizada em histoquímica pela coloração com Ematoxilina e Eosina (1000X) (Rozental et al., 2006)

1.7 Rickettsioses Brandas

1.7.1 Febre Maculosa causada pela *Rickettsia parkeri*

Nos Estados Unidos, Paddock et al. (2004) descreveram uma zoonose transmitida por carrapatos com manifestações clínicas semelhantes a da FMMR, contudo de caráter mais brando, com presença de lesão cutânea característica denominada de “eschar” no local da picada do artrópode. A análise molecular do agente etiológico, obtido a partir da biópsia de pele, identificou microorganismo novo chamado de *R. parkeri*.

Clínica: após cerca de uma semana da picada do carrapato, o paciente apresenta febre até 39°C e lesão característica no local da picada (“eschar”) (Figura 7) associada a lesões maculares e papulares espalhadas pelo corpo. Concomitantemente pode ocorrer mialgia, artralgia, náusea e vômito. Podem surgir vesículas ou pústulas após cerca de três dias dos sintomas iniciais e linfadenopatia (Paddock et al., 2008) (Tabela 4).

Vetores: o vetor transmissor é o *Amblyomma maculatum*. Os estágios de larva, ninfa e adulto podem picar o homem e transmitir a doença (Tabela 5).

Diagnóstico laboratorial

Identificação do agente etiológico: a *R. parkeri* é morfologicamente semelhante à *R. rickettsii* quando corada pela Hematoxilina/Eosina em procedimento histopatológico de biópsia de pele ou imunohistoquímica. A *R. parkeri* cresce em cultura de células Vero, sendo identificada após uma semana de incubação, quando é

visualizada no espaço intra e extra celular. O sobrenadante corado pelo Acridine-Orange revela cocco-bacilos e bacilos. A identificação filogenética através da análise molecular é realizada com “primers” que amplificam genes do antígeno de 17 KDa, *gltA* e *rompA* (Paddock et al., 2008).

Sorologia: a detecção de anticorpos aumenta após cerca de duas semanas do contágio, sendo necessárias duas amostras de soro consecutivas para detectar a soroconversão através da Imunofluorescência Indireta com *R. parkeri* ou *R. rickettsii* cultivadas em célula Vero.

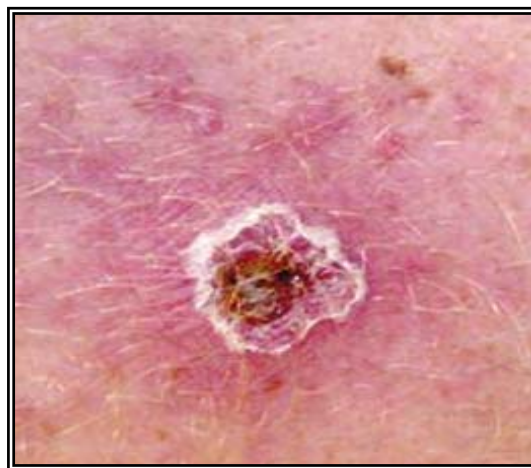


Figura 7 - Lesão característica (“eschar”) da Febre Maculosa causada pela *R. parkeri* (Paddock et al., 2008)

1.7.2 STARI (Southern Tick-Associated rash illness) causado pela *Rickettsia amblyommii*

Em 2007, Billeter e cols. descreveram como possível agente causador de lesão cutânea (STARI), que se desenvolve no sítio da picada do carrapato *Amblyomma americanum* nos Estados Unidos, uma nova espécie de *Rickettsia*, a *R.*

amblyommii. A bactéria foi identificada em artrópode que parasitava o paciente. A lesão eritematosa (STARI) foi o único sintoma clínico manifestado, o qual regrediu após tratamento com doxiciclina (Billeter et al., 2007). O *A. americanum* é vetor da Ehrlichiose Humana e tem sido relatado como hospedeiro e potencial vetor da *R. amblyommii* nos Estados Unidos (Mixson, et al., 2006).

Tabela 4. Manifestações clínicas das zoonoses transmitidas por carrapatos

Ehlichiose Monocítica Humana	Anaplasmosse Granulocítica Humana	Babesiose Humana	Febre Maculosa causada pela <i>R. rickettsii</i>	Rickettsioses brandas
Febre, cefaléia, mialgia, mal estar, artralgia, náusea, vômito, diarreia, tosse, confusão mental, acometimento renal e cardíaco, choque séptico, meningite, meningoencefalite	Febre, calafrios, mal estar, mialgia, náusea, cefaléia, confusão mental, ataxia, tosse, artralgia, diarreia, conjuntivite, linfadenopatia, insuficiência respiratória, insuficiência renal, meningoencefalite	Febre, calafrios, mal estar, cefaléia, fadiga, anorexia, anemia, urina escura, falência renal, insuficiência cardíaca e respiratória, acometimento neurológico	Febre > 40°C, erupções maculopapulares no dorso das mãos, planta dos pés e tronco. mialgia, tosse seca, náusea, dores abdominais, esplenomegalia, hepatomegalia, edema periorbital, conjuntivite, confusão mental, perda de audição, hemiparesia, encefalite, Aumento de transaminases hepáticas, creatinina e fosfoquinase, hipoalbuminemia, trombocitopenia	Febre até 39°C, “eschar”, erupções maculopapulares, vesículas ou pústulas no corpo. mialgia, artralgia, linfadenopatia, náusea, vômito, Aumento de transaminases hepáticas, leve leucopenia

Tabela 5. Agentes etiológicos, vetores e hospedeiros das zoonoses transmitidas por carrapatos

	Ehlichiose Monocítica Humana	Anaplasmoze Granulocítica Humana	Babesiose Humana	Febre Maculosa brasileira	Rickettsioses brandas
<i>Agente Etiológico</i>	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Babesia microti</i> , <i>B.divergens</i> , <i>B.divergens</i> like, <i>B. duncani</i> , <i>B.venatorum</i> Babesia KOI	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettia parkeri</i> , <i>Rickettsia amblyommii</i> <i>R. bellii</i> (?)
<i>Vetores</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I.ricinus</i> , <i>I.persulcatus</i>	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>Ixodes ricinus</i>	<i>Amblyomma cayennense</i> , <i>Amblyomma aureolatum</i> (Brasil);; <i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (E.U.A.)	<i>Amblyomma maculatum</i>
<i>Hospedeiros</i>	Cervo: <i>Odocoileus virginianus</i>	Roedores: <i>Peromyscus leucopus</i> , <i>Neotoma fuscipes</i> <i>Clethrionomys glareolus</i> Cervo: <i>Odocoileus virginianus</i>	Roedores: <i>Peromyscus leucopus</i> , <i>Microtus agrestis</i> <i>Cervo e bovinos</i>	Capivara: <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> Roedores: <i>Microtus pennsylvanicus</i> Anta, lebre, cão e equino	Cervo: <i>Odocoileus virginianus</i>

Tabela 6. Tratamento das zoonoses transmitidas por carrapatos

Ehlichiose Monocítica Humana	Anaplasrose Granulocítica Humana	Babesiose Humana	Febre Maculosa brasileira	Rickettsioses brandas
Doxiciclina 100mg 2Xdia – 2 semanas	Doxiciclina 100mg 2Xdia – 2 semanas	Clindamicina 600mg 4Xdia e Quinina 650mg 4X dia – 7dias Atovaquone 750mg 2Xdia e azitromicina 500mg 1 dia e 250mg/dia – 7dias	Doxiciclina 100mg 2Xdia – 2 semanas	Doxiciclina 100mg 2Xdia – 9 dias

FONTE: Krause et al., 2000; Buckingham et al., 2005 e Billeter et al., 2007

No Hemisfério Norte as doenças transmitidas por carrapatos têm caráter emergente, incluindo a ocorrência de co-infecções entre estas zoonoses. Krause et al. (1996) relataram infecção simultânea entre *Borrelia* spp e *Babesia* spp em doentes de área de risco. Nestas regiões, os carrapatos podem albergar simultaneamente *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum* (Holden et al., 2003).

Os testes laboratoriais para o diagnóstico das zoonoses transmitidas por carrapatos estão bem estabelecidos no Hemisfério Norte. No Brasil, com exceção da Febre Maculosa e da Doença de Lyme símile (Síndrome Baggio-Yoshinari-SBY), as demais zoonoses não apresentam padronização diagnóstica laboratorial. O Laboratório de Interação Microorganismo e Artrite, localizado no Laboratório de Investigação em Reumatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (LIM-17 do

HCFMUSP) é considerado como de Referência pelo Ministério da Saúde do Brasil para pesquisa da SBY.

Neste sentido, amostras de sangue e líquido, oriundos de todo o território brasileiro, são enviados para realização de sorologias para *Borrelia burgdorferi*. Contudo, com frequência, sintomas e sinais clínicos compatíveis com outras zoonoses são relatados pelos enfermos ou médicos, após episódio de picada por carrapatos, como surgimento de “rash” cutâneo atípico, febre muito alta, anemia, leucopenia, plaquetopenia, elevação de transaminases hepáticas, etc. Contudo, a ausência de procedimentos laboratoriais no diagnóstico das demais zoonoses transmitidas por carrapatos em humanos, tem impedido o reconhecimento destas enfermidades.

2 OBJETIVOS

1. Implantar metodologias laboratoriais para diagnosticar em humanos, as zoonoses transmitidas por carrapatos (Ehrlichiose, Babesiose e Rickettsiose brandas), com intuito de possibilitar o diagnóstico laboratorial destas enfermidades no Brasil.
2. Pesquisar possibilidade da existência de co-infecções, em nível laboratorial, entre o agente etiológico da SBY e outras zoonoses transmitidas por carrapatos como Ehrlichiose, Babesiose e Rickettsioses.

3 MÉTODOS

Entre Janeiro de 2006 a Outubro de 2007, foram selecionados em sequência, setenta pacientes com SBY, segundo critério diagnóstico adotado no LIM-17 HCFMUSP. Consideram-se parâmetros diagnósticos maiores: 1. presença do eritema migratório ou complicações sistêmicas como artrite, neuropatias (meningite, neurite craniana, neuropatia periférica, encefalomielite) ou cardiopatia (arritmia cardíaca ou cardiomegalia); 2. história de picada por carrapato, visita à área rural ou contato com animais infestados por carrapatos, estando o evento epidemiológico, associado com o início dos sintomas clínicos; 3. sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana segundo metodologias modificadas no LIM-17 HCFMUSP (Barros et al., 1996). Compõem os parâmetros menores: 1. recorrências clínicas; 2. sintomas da Síndrome da Fadiga Crônica; 3. identificação de estruturas semelhantes aos espiroquetídeos em sangue periférico, no exame de microscopia de campo escuro e crescimento temporário dos mesmos em meio de cultura SP4. O paciente que apresentar três parâmetros maiores, ou, dois parâmetros maiores associados a dois menores é considerado como doente com SBY, desde que outras hipóteses diagnósticas infecciosas ou autoimunes estejam descartadas. Na Tabela 7 está representada a frequência dos parâmetros maiores e menores no grupo de 70 pacientes com SBY.

Cinquenta doentes (71,4%) eram do sexo feminino e 20 (28,6%) do sexo masculino. A idade variou entre 12 e 79 anos, com média de 41,36 anos. Sessenta pacientes estavam na fase latente da doença, com mais de três meses de evolução clínica e 10 na fase aguda.

O grupo controle foi composto por cinquenta pessoas sadias, quarenta (80%) do sexo feminino e dez (20%) do sexo masculino, com idade média de 35 anos.

O protocolo de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética da Instituição sob n° 776/06 (Anexo 1).

Tabela 7. Frequência dos parâmetros diagnósticos em 70 pacientes com SBY*

Parâmetros maiores	Frequência	
EM	27	38,6%
Artrite	26	37%
Neuropatia	32	45,7%
Cardiopatia	7	10%
Sorologia positiva para <i>B. burgdorferi</i>	54	77%
Parâmetros menores	Frequência	
Recorrência	52	74,2%
Síndrome da Fadiga Crônica	25	35,7%
Identificação de espiroquetídeos	48	68,6%

* Considera-se caso positivo de SBY a presença de três critérios maiores ou dois maiores e dois menores, afastado outras doenças infecciosas ou autoimunes.

3.1 Coleta de sangue

Coletou-se 4 ml de sangue com anti-coagulante (K₂EDTA) para extração de DNA e 10 ml de sangue sem anti-coagulante para separação do soro.

3.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Western Blotting (WB) para *B. burgdorferi* G39/40 (americana) modificados (Dressler et al., 1993; Engstrom et al., 1995; Barros et al., 1996)

O ensaio ELISA foi desenvolvido de forma semelhante ao descrito no Hemisfério Norte, com emprego de antígeno sonificado total da *Borrelia burgdorferi* G39/40. O WB foi realizado de forma habitual, mas a interpretação do ensaio foi diferente da preconizada pelo CDC (EUA) que, considera o teste positivo na presença de bandas específicas (Dressler et al., 1993). No Brasil, devido ao agente etiológico ser diferente e os pacientes desenvolverem baixa reatividade humoral para espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* sensu lato, o LIM-17 do HCFMUSP considera o WB positivo, quando da presença de 4 bandas IgG, duas bandas IgM, ou duas IgG e uma IgM, sem levar em consideração o peso molecular das bandas.

Considera-se sorologia positiva para SBY, quando um dos exames, ELISA ou WB, é positivo. Ao contrário dos EUA, onde o ELISA é considerado o teste de "screening" e o WB exame confirmatório, realizado apenas quando existem dúvidas diagnósticas.

3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia equi* (Aquino et al., 1999)

As lâminas de RIFI infectadas com *Babesia equi* foram gentilmente cedidas pela Profa. Rosângela Zacarias Machado da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-Jaboticabal). As lâminas foram sensibilizadas com esfregaço sanguíneo de cavalo infectado experimentalmente com *Babesia equi* e os poços para inoculação dos soros foram delimitados com esmalte de unha. Foram adicionados 10µl de soro diluídos a 1/64 em Tampão fosfato (PBS pH 7,4), incluindo dois soros de eqüinos usados como controles, um positivo e outro negativo. Os soros foram incubados à 37°C, por 40 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS pH 7,4 por 5 minutos, três vezes, imersas rapidamente em água destilada e secas à temperatura ambiente.

Adicionou-se 10µl do conjugado: para os soros controles, o anti-IgG eqüino conjugado à fluoresceína (Sigma – “whole molecule” – F7750) foi diluído à 1/70 em PBS pH 7,4 com 1% de Azul de Evans. Para os pacientes, foi empregado o “anti-human IgG y-chain specific” conjugado à fluoresceína (Sigma – F0132) na diluição de 1/32 em PBS pH7,4 com 1% de Azul de Evans.

Os conjugados foram incubados à 37°C, por 35 minutos. As lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e secas ao abrigo da luz. As lâminas foram recobertas com duas gotas de glicerina tamponada e lamínula, e visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon). As amostras foram consideradas positivas a partir de 1/64.

3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Babesia bovis*

As lâminas de RIFI infectadas com *Babesia bovis* foram gentilmente cedidas pela Profa. Rosângela Zacarias Machado da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-Jaboticabal). Foi empregado o mesmo procedimento descrito acima utilizando lâminas sensibilizadas com sangue de bovino infectado experimentalmente, controles positivo e negativo de boi, assim como, o “anti-bovine IgG – whole molecule” – marca Sigma - F7887 conjugado à fluoresceína.

3.5 ELISA para *Babesia bovis* (Yoshinari et al., 2003)

O antígeno da *Babesia bovis* foi gentilmente oferecido pelo Prof .Cléber Oliveira Soares do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (Embrapa, MS). As placas com 96 poços foram sensibilizadas com 100µl de antígeno bruto de *Babesia bovis* na concentração de 2,5mg/ml diluído 1/500 em Tampão de Dubelco's pH 7,2 e incubadas à 4°C por 18 horas, em câmara úmida. Lavou-se as placas com PBS pH 7,4.- 0,05% Tween 20 (PBS-T), três vezes. Adicionou-se 100µl de PBS-T – 1% soro de coelho e incubou-se durante 1 hora, à 37°C ,em câmara úmida, para o bloqueio dos sítios da placa. Procedeu-se à nova lavagem e adicionou-se 100µl dos soros diluídos 1/100 para detecção de IgM (placa 1) e 1/400 para detecção de IgG (placa 2) em PBS-T-1% soro de coelho e incubação à 37°C, por 1 hora, em câmara úmida. Soros humanos foram utilizados como controles, sendo um soro positivo e 8 negativos, estes últimos foram empregados para o cálculo do cutt-of da reação.

Após a lavagem, na placa 1 adicionou-se 100µl por poço de “anti-human IgM -Fab specific -alkaline phosphatase” (Sigma - A3437) e na placa 2, 100µl de “ anti-human IgG -Fab specific - alkaline phosphatase” (Sigma – A8542). Os conjugados foram diluídos 1/2000 em PBS-T-1% soro de coelho e as placas foram incubadas à 37°C, por 1 hora, em câmara úmida. Após lavagem, o ensaio foi revelado com adição de 100µl de substrato na concentração de 1 mg/ml (Sigma) e a leitura realizada em Espectrofotômetro de placa (Labsystems Multiskan MS – filtro de 405nm).

3.6 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. bellii* (Horta et al., 2004)

O mesmo procedimento foi realizado para cada uma das espécies de *Rickettsia spp.* Os ensaios foram realizados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Marcelo Labruna. As lâminas, previamente sensibilizadas com cultura de células Vero contaminadas com diferentes espécies de *Rickettsia*, foram descongeladas e imersas em Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2 por 10 minutos. Posteriormente, elas foram secas à temperatura ambiente. Foram adicionados 10µl por poço dos soros a serem analisados, incluindo dois controles: um positivo e um negativo, todos diluídos 1/64 em PBS pH 7,2. Os soros foram incubados à 37°C, por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,2 0,1% Triton X-100 por 10 minutos e secas em temperatura ambiente. Foram adicionados 10µl por poço de anti-

IgG humana conjugado à fluoresceína (Sigma –“ whole molecule” – F3512) diluído 1/400 em PBS pH 7,2. Incubou-se à 37°C por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem suplementado com Azul de Evans 2mg/ml durante 10 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, elas foram secas ao abrigo da luz. Adicionou-se gotas de glicerina tamponada e cobriu-se com lamínula para leitura em microscópio de fluorescência (Nikon). As amostras foram consideradas positivas a partir de 1/64.

3.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis* (Oliveira et al., 2008)

Os ensaios foram realizados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Marcelo Labruna. As lâminas sensibilizadas com cultura de células macrofágicas de linhagem de origem canina (DH 82) infectadas com *E. canis* foram descongeladas, imersas em água destilada e secas à temperatura ambiente.

Os soros humanos testes e os controles positivo e negativo foram diluídos à 1/64 em Tampão fosfato pH 7,2 (PBS) com 2% de soro de coelho e adicionados em cada poço da lâmina no volume de 15µl. A incubação do soro foi à 37°C, por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS pH 7,2 durante 5 minutos, 2 vezes e secas à temperatura ambiente.

Foi empregado o “anti-human IgG γ -chain specific” conjugado à fluoresceína (Sigma – F0132) na proporção de 1/400 em PBS pH 7,2 com 2% de soro de coelho. A incubação do conjugado ocorreu à 37°C, por 30 minutos em câmara úmida.

As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 suplementado com Azul de Evans (2mg/ml) durante 5 minutos ao abrigo da luz e secas à temperatura ambiente também ao abrigo da luz. Adicionou-se 2 gotas de glicerina tamponada na lâmina e lamínula para leitura em microscópio de fluorescência (Nikon) na magnitude de 400X. As amostras foram consideradas positivas a partir de 1/64.

3.8 Extração do DNA das amostras de sangue com EDTA para realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O DNA genômico foi extraído de 100µl de sangue com anticoagulante (EDTA) utilizando o KIT DNeasy Blood & Tissue Handbook, marca QIAGEN, segundo procedimento descrito no manual do fabricante.

3.9 PCR para *Borrelia* spp (Rich et al., 2001)

Foram utilizados “primers” para amplificar o fragmento 16S rRNA (850pb) com a seguinte sequência de nucleotídeos: 16Sborr TF: 5'- GAG TCT GCG TCT TAT TAG CTA – 3' e 5'- AAC AAG GGT TGC GCT CGT TG – 3'. A PCR foi realizada com a adição do DNA extraído em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4),

50 mM de KCl, contendo 1,5 de MgCl₂ e mistura de 0,025uM do dDNTP, 2,5 pmols de cada primer e 1,25 unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em um volume de 20µl.

A ciclagem estabelecida no Termociclador (Perkin – Elmer 2400) foi de desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação de 1m a 94°C, pareamento a 68 °C durante 1m e uma extensão por 1m e 30s a 72 °C. A extensão final foi a 72 °C por 7 min.

3.10 PCR para *Babesia* spp (Spolidorio et al., 2009)

Foram utilizados “primers” para amplificar o fragmento 18S rDNA (360pb) com a seguinte sequência de nucleotídeos: BAB (33-57) (5'-GCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAA-3') e BAB (432-409) (5'-TTCCTTAGATGTGGTAGCCGTTTC-3') O DNA extraído foi adicionado em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), 50 mM de KCl, contendo 1,5mM de MgCl₂, mistura de 0,2 mM de dDNTP, 12,5 pmols de cada primer, e 1,5 unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em um volume de 50ul.

A ciclagem estabelecida no Termociclador (Perkin – Elmer 2400) foi de desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 15 s. a 95°C, pareamento a 63 °C durante 30s e uma extensão por 30s a 72 °C. A extensão final ocorreu a 72 °C por 7 min.

3.11 PCR para *Ehrlichia* spp (Anderson et al., 1992; Breitschwerdt et al., 1998, Aguiar et al., 2007)

Foram utilizados “primers” para amplificar o fragmento de 360pb do gene 16S rRNA. Com a seguinte sequência de nucleotídeos: GE2: (5'- GTT AGT GGC AGA CGG GTG AGT – 3') e HE3 (5'- TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT -3'). O DNA extraído foi adicionado em tampão Tris-HCl 32 mM (pH 8,4), 80 mM de KCl., contendo 2 mM de MgCl₂ e mistura de 0,125uM do dDNTTP, 10pmols de cada primer e 1,5 unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em um volume de 50ul.

A ciclagem estabelecida no Termociclador (Perkin – Elmer 2400) foi de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 15 s. a 95°C, pareamento a 62 °C durante 30s e uma extensão por 30s a 72 °C. A extensão final ocorreu a 72 °C por 7 min

3.12 Análise do fragmento amplificado

Os produtos de PCR foram analisados para verificação da presença do fragmento amplificado pela reação através da eletroforese em gel de agarose 1,5% (*Babesia* sp e *Ehrlichia* sp) e 0,8% (*Borrelia* sp), Tampão de TBE 0,5X, corante Blue Juice, corado com Sybr Gold (Invitrogen) e visualizado com luz U.V. Foi utilizado padrão de tamanho de fragmento de DNA de 50pb (50-3147 pb -Sigma)).

3.13 Análise Estatística

Os resultados foram tabelados e analisados pelo Programa Estatístico SPSS 14 utilizando o método não paramétrico Teste de Qui-quadrado, de Pearson com nível de significância estabelecido para $p \leq 0,05$ e o Kappa Index para analisar a concordância entre o ELISA e WB.

4 RESULTADOS

No grupo de 70 pacientes com SBY, o EM foi descrito em 27 enfermos (38,6%), artrite em 26 (37,1%), febre em 13 (18,5%), cefaléia em 29 (41,4%), artralgia em 36 (51,4%), mialgia em 51 (72,8%), fadiga em 38 (54,3%), meningite em 4 (5,7%), neurite craniana em 8 (11,4%), radiculite periférica em 9 (12,8%), encefalomielite em 4 (5,7%), cardiopatia em 7 (10%), acometimento ocular em 7 (10%), rash cutâneo em 10 (14,3%) e anemia em 10 (14,3%) (Tabela 8). A Síndrome da Fadiga Crônica (SFC), entidade clínica inclusa nos critérios diagnósticos da SBY esteve presente em 23 (32,8%) enfermos (Tabela 7).

Em relação aos eventos epidemiológicos relacionados com o início da SBY, 52 (74,3%) doentes referiram histórico de picada por carrapatos, 45 (64,3%) tiveram contato com animais infestados por carrapatos, 5 (7,1%) haviam visualizado carrapatos e 2 (2,8%) tiveram contato com animal infectado por *Babesia* spp. (Tabela 9).

Tabela 8. Frequências das manifestações clínicas dos 70 pacientes com SBY*

Manifestações clínicas	Frequências	
Eritema migratório:	27	38,6%
Artrite:	26	37,1%
Febre:	13	18,5%
Cefaléia:	29	41,4%
Artralgia:	36	51,4%
Mialgia:	51	72,8%
Fadiga:	38	54,3%
Meningite:	4	5,7%
Neurite craniana:	8	11,4%
Radiculopatia periférica:	9	12,8%
Encefalomielite:	4	5,7%
Cardiopatía:	7	10,0%
Acometimento ocular	7	10,0%
Rash cutâneo	10	14,3%
Anemia	10	14,3%

* Dados retrospectivos e cumulativos relatados pelos doentes ou reportados pelos médicos

Tabela 9. Dados epidemiológicos dos pacientes com SBY

Ocorrências	Frequências	
Picados por carrapatos:	52	74,3%
Contato com animais:	45	64,3%
Contacto com carrapato:	5	7,1%
Cavalos infectados com <i>Babesia</i> sp:	2	2,8%

Nos resultados da sorologia para *Borrelia burgdorferi* G39/40 (ELISA), observa-se que 21 (30%) pacientes com SBY apresentaram positividade, enquanto apenas 3 indivíduos (6%) do grupo normal foram positivos ($p=0,001$ – Teste do Qui-quadrado) (Tabela 10). Anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* identificados através do WB foram positivos em 35 (50%) doentes com SBY e em apenas 2 (4%) normais ($p<0,001$) (Tabela 11).

Quarenta pacientes (66,7%) do grupo da SBY apresentaram anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* (ELISA ou WB) versus 5 (10%) indivíduos do grupo controle ($p<0,001$ – Teste do Qui-quadrado) (Tabela 11).

Tabela 10. ELISA (IgG e IgM) para *Borrelia burgdorferi* G39/40 nos pacientes com SBY e no grupo controle

	IgG	IgM	IgG e IgM	IgG ou IgM
Controle (n=50)	1 (2%)	3 (6%)	1 (2%)	3 (6%)
SBY (n=70) *	14(20%)	12(17,1%)	5 (7,1%)	21(30%)
SBY(<3 meses) (n=10)	0 (0%)	2(20%)	0 (0%)	2 (20%)
SBY (>3 meses) (n=60)	14(23,3%)	10(16,6%)	5(8,3%)	19(31,6%)

* Estatisticamente significativo ($p= 0,001$ - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 11. Western Blotting (WB) (IgG e IgM) para *Borrelia burgdorferi* G39/40 nos pacientes com SBY e no grupo controle

	IgG	IgM	IgG e IgM	IgG ou IgM	ELISA ou WB
Controle (n=50)	2(4%)	0(0%)	0(0%)	2 (4%)	5(10%)
SBY (n=70)*	20(28,6%)	18(25,7%)	5(7,1%)	35(50%)	47(67,1%)
SBY (<3meses) (n=10)	3(30%)	2(20%)	1(10%)	5(50%)	7 (70%)
SBY (>3meses) (n=60)	17(28,3%)	16(26,6%)	4(6,7%)	30(50%)	40(66,7%)

* Estatisticamente significativo ($p < 0,001$ - Teste do Qui-quadrado).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Rickettsia* spp foi considerada positiva, quando títulos foram superiores a 1/64, sugerindo que o indivíduo teve contato prévio com a bactéria. Para diagnóstico, seriam necessários resultados de duas amostras consecutivas.

Conforme dados da Tabela 12, a RIFI para *R. rickettsii* mostrou que 9 (12,8%) pacientes com SBY apresentaram positividade, sendo 1 (10%) na fase inicial da doença (< 3 meses) e 8 (13,5%) na fase secundária (> 3 meses). Seis (12%) pessoas sadias também tiveram positividade, demonstrando não haver diferença estatística entre os dois grupos ($p = 0,889$ - Teste do Qui-quadrado).

Na Tabela 13 estão descritas as positivities da RIFI para *R. parkeri*, onde podemos constatar que 6 (8,6%) dos pacientes com SBY foram positivos, sendo 1 (10%)

na fase aguda e 5 (8,30%) na fase secundária da doença, em contraste aos indivíduos saudáveis que não apresentaram reatividade sorológica ($p=0,032$ - Teste do Qui-quadrado).

Outra espécie de *Rickettsia* contra a qual as amostras dos pacientes com SBY reagiram com maior intensidade que a dos normais ($p=0,031$ - Teste do Qui-quadrado) foi com a *R. amblyommii*, pois 16 (22,8%) pacientes do grupo da SBY foram positivos *versus* 4 (8%) do grupo controle. Dos 16 doentes soro-positivos, 3 (30%) estavam na fase aguda e 13 (21,6%) na fase secundária da doença (Tabela 14).

Na Tabela 15, encontramos os resultados da RIFI para *R. bellii*. Dos 70 pacientes com SBY, seis (8,6%) foram positivos *versus* nenhum positivo do grupo controle ($p=0,032$ -Teste do Qui-quadrado). Dos positivos, um paciente estava na fase aguda (10%) e 5 (8,3%) na fase secundária da SBY.

Na Tabela 16 verificamos que não houve diferença estatística quanto às frequências de positivos contra *R. rhipicephali* no grupo da SBY e no grupo controle ($p=0,150$ - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 12. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *R. rickettsii* na SBY e no grupo controle

	<i>R. rickettsii</i> - IgG
Controle(n=50)	6 (12%)
SBY (n=70)*	9 (12,8%)
SBY (< 3 meses) (n=10)	1 (10%)
SBY (> 3 meses) (n=60)	8 (13,5%)

* Estatisticamente não significativo ($p= 0,889$ - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 13. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *R. parkeri* nos pacientes com SBY e no grupo controle

	<i>R. parkeri</i> - IgG
Controle(n=50)	0(0%)
SBY (n=70)*	6 (8,6%)
SBY (< 3 meses) (n=10)	1 (10%)
SBY (> 3 meses) (n=60)	5 (8,3%)

* Estatisticamente significativo (p= 0,032. - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 14. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *R. amblyommii* nos pacientes com SBY e no grupo controle

	<i>R. amblyommii</i> – IgG
Controle (n=50)	4 (8%)
SBY (n=70)*	16(22,8%)
SBY (< 3 meses)(n=10)	3(30%)
SBY (> 3 meses)(n=60)	13(21,6%)

*Estatisticamente significativo (p=0,031 - Teste do Qui-quadrado)

Tabela 15. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *R. bellii* nos pacientes com SBY e no grupo controle

	<i>R. bellii</i> - IgG
Controle (n=50)	0 (0%)
SBY (n=70)*	6 (8,6%)
SBY (< 3 meses)(n=10)	1 (10%)
SBY (> 3 meses)(n=60)	5 (8,3%)

* Estatisticamente significativo (p=0,032 - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 16. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *R. rhipicephali* nos pacientes com SBY e no grupo controle

	<i>R. rhipicephali</i> - IgG
Controle (n=50)	10 (14,3%)
SBY (n=70)*	11 (15,7%)
SBY (< 3 meses)(n=10)	2 (20%)
SBY (> 3 meses)(n=60)	9 (15%)

Estatisticamente não significativo (p=0,150 - Teste do Qui-quadrado).

A investigação laboratorial da *Babesia* spp foi feita através de duas metodologias: a RIFI e o ELISA. Os resultados da RIFI para detecção de anticorpos da classe IgG estão descritos na Tabela 17. Dos 70 pacientes com SBY, apenas 1 (1,4%) apresentou positividade contra a *B. bovis* ($p=0,396$ - Teste do Qui-quadrado) e 2 (2,8%) contra a *B. equi*, ($p=0,228$ - Teste do Qui-quadrado) enquanto todas as pessoas sadias tiveram resultados negativos. (Figura 8).

Tabela 17. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *Babesia bovis* e *Babesia equi* nos pacientes com SBY e no grupo controle

	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia equi</i>
	IgG	IgG
Controle (n=50)	0 (0%)	0 (0%)
SBY (n=70)	1 (1,4%)	2 (2,8%)
SBY (< 3meses) (n=10)	0 (0%)	1 (10%)
SBY (> 3meses) (n=60)	1 (1,66%)	1 (1,66%)

Estatisticamente não significativos ($p = 0,396$ para *B. bovis* e $p = 0,228$ para *B. equi* - Teste do Qui-quadrado).

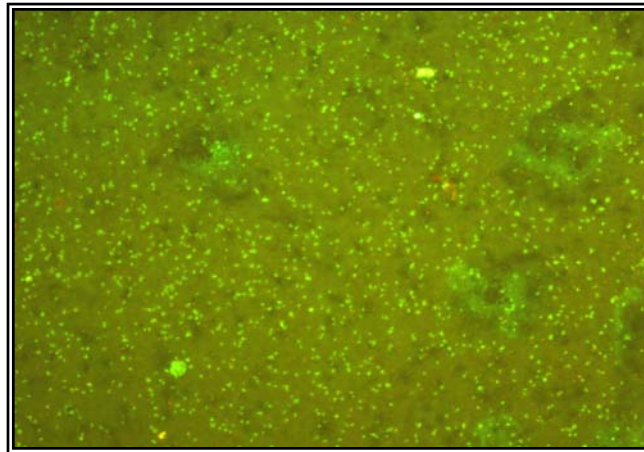


Figura 8 - Fotomicrografia da RIFI para *Babesia equi* de paciente com SBY com história de EM

Na Tabela 18 estão representados os resultados do ELISA para *B. bovis*. No grupo de 70 doentes com SBY, 5 (7,1%) apresentaram IgM e 2 (2,8%) IgG, enquanto no grupo controle apenas um indivíduo apresentou positividade para IgM (2%), resultados estatisticamente não significantes ($p=0,228$ para IgG e $p=0,203$ para IgM - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 18. ELISA para *Babesia bovis* (IgG e IgM) nos pacientes com SBY e no grupo controle

	IgG	IgM	IgG e IgM	IgG ou IgM
Controle (n=50)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)
SBY (n=70)	2 (2,8%)	5 (7,1%)	2 (2,8%)	5 (7,1%)
SBY (< 3meses) (n=10)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)
SBY (> 3meses) (n=60)	1 (1,66%)	4 (6,66%)	1 (1,66%)	4 (6,66%)

Estatisticamente não significativo ($p= 0,228$ para IgG e $p= 0,203$ para IgM -Teste do Qui-quadrado).

Na Tabela 19 verifica-se que apenas 1 (1,40%) paciente com SBY demonstrou RIFI positiva para *E.canis* ($p=0,396$ - Teste do Qui-quadrado).

Tabela 19. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (IgG) para *Ehrlichia canis* nos pacientes com SBY e grupo controle

	<i>E. canis</i> - IgG
Controle (n=50)	0 (0%)
SBY(n=70)	1 (1,40%)
SBY (< 3meses) (n=10)	0 (0%)
SBY (> 3meses) (n=60)	1 (1,66%)

Estatisticamente não significativo ($p= 0,396$ - Teste do Qui-quadrado).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada com iniciadores para amplificar genes capazes de identificar os Gêneros *Borrelia*, *Babesia* e *Ehrlichia* para todos os pacientes com SBY e indivíduos normais. Em relação ao PCR para *Borrelia* com emprego do primer 16S RNA, obtivemos positividade para 12 pacientes com SBY. Três pessoas sadias também apresentaram positividade, indicando que estes primers amplificam seqüências presentes no genoma humano e de outros microrganismos (Figura 9).

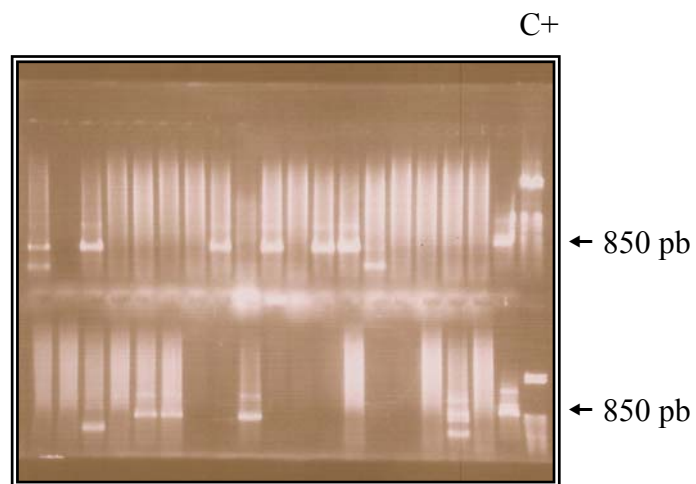


Figura 9 - PCR positiva com “primers” para gene 16SrRNA (850 pb)
(Gênero *Borrelia*) dos pacientes com SBY. C+ *B. anserina*

5 DISCUSSÃO

A casuística do estudo foi constituída por pacientes que compareceram ao Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-17 do HCFMUSP), para realizar sorologia para *Borrelia burgdorferi*. No ato da coleta do sangue, contaram a história clínica surgida após a picada de carrapatos ou, na dúvida deste episódio, contato com carrapatos ou com animais infestados pelo artrópode. Outras vezes traziam histórico clínico fornecido pelos médicos que encaminharam os doentes suspeitos de SBY ao Laboratório.

Dos 70 enfermos com SBY, apenas 10 (14,2%) estavam com a enfermidade aguda, ou seja, arbitrariamente definida, como doença nos três primeiros meses após contágio com a bactéria. A maioria relatava sintomas que ocorreram há mais de três meses, corroborando o conceito de que a SBY é uma enfermidade de longa evolução com recorrências freqüentes, quando a enfermidade não é identificada e tratada precocemente. Entre os setenta pacientes estudados com SBY, o EM que é característico da zoonose, esteve presente em 27 (38,6%) pacientes. Costa e cols. (2001) observaram que 50% dos pacientes com doença de Lyme – símile brasileira (SBY) apresentavam este aspecto distintivo. Nos EUA o EM é descrito em 70% dos pacientes com DL (Bacon et al., 2008).

À semelhança dos doentes norte-americanos e europeus que evoluem com sintomas sistêmicos (Steere et al., 2004; Dandache e Nadelman, 2008), os enfermos

com SBY também relataram sintomas gerais compatíveis com quadro gripal como febre (n=13), cefaléia (n=29), artralgia (n=36), mialgia (n=51) e fadiga (n=38).

Nos Estados Unidos da América, sessenta por cento dos pacientes com DL apresentam comprometimento articular (Steere et al., 1987). No Brasil, Yoshinari et al. (1999) relataram envolvimento articular em 38% dos casos de SBY, frequência bem próxima da obtida no presente estudo (37,1%). Dos 26 casos de artrite, 25 pacientes estavam com mais de três meses de evolução clínica, ou seja no estágio latente da enfermidade.

Acometimento cardíaco da SBY, representado na maioria dos casos por arritmia sinusal, e em menor frequência, por cardiomegalia, foi descrito em 9% dos pacientes brasileiros por Yoshinari et al. (1999). Na nossa casuística, dez por cento apresentaram cardiopatia. No Hemisfério Norte, a frequência de acometimento cardíaco varia entre 5% a 10% (Lelovas et al., 2008).

As manifestações neurológicas mais relatadas pelos pacientes foram cefaléia (n=29), radiculopatia periférica (n=9), neurite craniana (n=8), meningite (n=4) e encefalomielite (n=4). Na Europa predominam complicações neurológicas, sendo descrita uma forma de meningorradiculite muito dolorosa conhecida como Síndrome de Bannwarth (Cepok et al., 2003). Nos Estados Unidos, o quadro neurológico ocorre em aproximadamente 15% e distingue-se pela tríade: meningite, neurite periférica e radiculite periférica, predominando a meningite linfomonocitária e a paralisia facial (Pachner e Steiner, 2007). No Brasil, manifestações neurológicas foram descritas em 37,5% dos doentes por Costa et al. (2001). No presente estudo, neuropatia foi observada em 32 enfermos (45,7%), possivelmente porque

neurologistas são os especialistas que mais encaminham pacientes ao Laboratório para realização de sorologia para *Borrelia burgdorferi*.

Os setenta doentes preencheram os critérios diagnósticos da SBY ao apresentaram três dos cinco parâmetros maiores: EM, artrite, neuropatia, cardiopatia ou sorologia positiva para *Borrelia burgdorferi* G39/40, ou dois parâmetros maiores associados a dois parâmetros menores, os quais são caracterizados por recorrência de manifestações clínicas, Síndrome da Fadiga Crônica (SFC) e presença de espiroquetídeos em sangue periférico identificados através da microscopia de campo escuro.

O diagnóstico da DL nos EUA baseia-se na história de exposição ao carrapato, epidemiologia, manifestações clínicas nos diferentes estágios da doença e resultados dos testes sorológicos. Nos Estados Unidos, noventa e três por cento dos casos de DL são diagnosticados em áreas endêmicas (CDC, 2007), e nestas localidades, a simples presença do EM é suficiente para o diagnóstico da doença (Dandache e Nadelman, 2008).

Para o diagnóstico laboratorial da SBY os ensaios sorológicos ELISA e WB demonstraram boa concordância pelo Kappa Index, permitindo valorizar o resultado positivo de um dos testes. No Brasil, devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos, realizamos ambos os testes simultaneamente, e consideramos resultado positivo se um deles for reagente. Nos EUA, o diagnóstico sorológico é realizado primeiramente através do ELISA ou Imunofluorescência Indireta (IFI), pois estes testes são considerados mais sensíveis para DL. O WB é efetuado apenas para as amostras positivas ou com resultados não conclusivos no ELISA ou IFI (Engstrom et al., 1995)..

Outro procedimento laboratorial para auxiliar o diagnóstico da SBY é a visualização de microrganismos semelhantes aos espiroquetídeos na microscopia de campo escuro. Este exame tem valor apenas para casos clínicos muito agudos e característicos da SBY porque vinte por cento dos indivíduos assintomáticos, assim como pacientes com enfermidades autoimunes, apresentam estas estruturas circulantes no sangue periférico. Acreditamos que, estas estruturas possam ser provenientes de microrganismos saprófitos, que habitualmente fazem parte da bioflora do trato intestinal ou respiratório, mas que não determinam complicações clínicas aos hospedeiros (Yoshinari, 2009). Quarenta e oito pacientes (68,6%) com SBY foram positivos ao visualizarmos estruturas semelhantes aos espiroquetídeos na microscopia de campo escuro. Pensamos que estas estruturas representem agente etiológico (espiroqueta) da SBY em apresentação morfológica atípica, mas não está excluída a hipótese de tratar-se de microrganismos saprófitos circulantes no sangue periférico, conseqüente às alterações imunológicas causadas pela enfermidade. Sabemos que espiroquetas são capazes de sintetizar componentes que neutralizam a resposta humoral do hospedeiro, além de originar autoanticorpos no organismo infectado (Kuenzle et al., 2007).

A microscopia eletrônica do sangue periférico de pacientes com SBY exhibe bactérias que lembram morfológicamente *Mycoplasmas*, que são bactérias desprovidas de parede celular. Outras estruturas morfológicas visualizadas lembram *Chlamydias* e bacteróides. No conjunto, estas formações sugerem existência de espiroquetas na apresentação de forma L ou “cell wall deficient bactéria” na SBY (Mantovani et al., 2007), ou seja, espiroquetas que perderam flagelos periplasmáticos e componentes da membrana externa.

Desde que, em nenhum momento, conseguimos o isolamento de espiroqueta na apresentação helicoidal e flagelada na SBY, postulamos que a etiologia desta zoonose emergente brasileira, seja causada por bactérias, possivelmente borrélias com morfologias atípicas. Admitimos que, pelo fato de inexistir no país, carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* hematófagos ao homem nas áreas de risco e haver grande diversidade climática e de animais reservatórios, tenha ocorrido o surgimento de espiroquetas geneticamente modificadas, incluindo modificações quanto à expressão de flagelos e lipoproteínas da membrana externa (Osp).

A forma L da *Borrelia burgdorferi* já foi descrita em meio de cultura rico em antibióticos (Kersten et al., 1995) ou alojadas no tecido cerebral de pacientes com Doença de Lyme (Miklossy et al., 2008). No ambiente intracelular, a bactéria na forma L fica resguardada da ação dos anticorpos e das células de defesa do sistema imune, conseguindo permanecer por longos períodos no hospedeiro. Explica-se assim, porque a maioria dos pacientes da atual casuística de SBY, 52 casos, foi constituída de doentes com sintomas recorrentes, justificando tanto a morbidade como a dificuldade de diagnosticar esta síndrome.

Microorganismo desprovido de parede celular não é uma particularidade da *Borrelia burgdorferi*, pois é observado no cultivo de *Escherichia coli* (Onoda et al., 1987), *Staphylococcus epidermidis* (Wróblewska et al., 2006), *Listeria monocytogenes* (Dell'Era et al., 2009), *Streptococcus pyogenes* (Michailova et al., 2000), quando ocorre presença de antibióticos ou carência de algum nutriente. As bactérias na formas L são consideradas como microorganismos adaptados às condições inóspitas do meio ambiente. Estudos à microscopia eletrônica mostram que bactérias na forma L conseguem sobreviver no interior de células, como

demonstrado em biópsia de pacientes com hematúria idiopática (Domingue et al., 1993), cistite intersticial (Domingue et al., 1995), endocardite (Piepkorn e Reichenbach, 1978), gastrite crônica por *Helicobacter pylori* (Astrauskiene e Bernotiene, 2007) e artrite reacional (Wang e Chen, 2004).

Os pacientes com SBY não tratados ou medicados erroneamente no estágio agudo evoluem com surtos de recidiva clínica e tendem a desenvolver complicações tardias, especialmente neurológicas ou reumatológicas, classificadas no grupo das crônicas idiopáticas. Esta forma de evolução clínica com recidivas clínicas não é reconhecida no Hemisfério Norte, pois nestes países, admite-se que a DL seja perfeitamente tratável com antibióticos. Utilizam antibióticos por menor período de tempo que o preconizado no Brasil, e não preconizam antibioticoterapia na presença de manifestações clínicas subseqüentes. Sabemos que nos EUA e Eurásia, a DL é causada por *Borrelia* spp na sua morfologia completa, portanto mais susceptíveis aos antibióticos. Ao contrário, no Brasil, as pesquisas indicam que os espiroquetas causadores da SBY encontram-se na apresentação latente, com capacidade de sobreviver no interior das células, portanto de difícil eliminação pelo hospedeiro.

As particularidades quanto ao agente etiológico da SBY justificam as particularidades clínicas, como as recidivas e desordens autoimunes, assim como explicam as dificuldades de isolamento dos espiroquetas em meio BSK e dificuldades diagnósticas laboratoriais, como os títulos baixos de anticorpos detectados no ELISA e WB. Assim como, corroboram resultados negativos na amplificação de fragmentos de genes de proteínas de flagelo e de membrana (OspA) da *Borrelia* spp com “primers” empregados comumente na PCR para investigação da DL no Hemisfério Norte (Costa et al., 2002)

Contudo, mesmo nos EUA e Eurásia, existe uma complicação relatada nos doentes com DL que receberam antibióticos, caracterizada pela persistência de sintomas vagos como artralgia, mialgia, fadiga, distúrbios do cognitivo, que compõe o quadro clínico conhecido como Síndrome pós Doença de Lyme (Pfister e Rupprecht, 2006; Marques, 2008). Entretanto, pesquisadores destes continentes não conseguem justificar, porque estes sintomas, altamente mórbidos, persistem nos enfermos com DL. No Brasil, optamos por chamar estas queixas de Síndrome da Fadiga Crônica, a qual esteve presente em 25 pacientes com SBY (35,7%).

Nos EUA, desde a descoberta da DL em 1977, cresceu o interesse pelo estudo de outras zoonoses transmitidas por carrapatos, identificando-se assim, inúmeras formas de co-infecções com a DL. Igualmente no Brasil, temos observado ocorrência de casos atípicos associados às picadas por carrapatos, como lesões exantemáticas diversas, anemia, leucopenia, plaquetopenia, elevação de enzimas e bilirrubinas, que sugerem infecções por rickettsias, babesias e ehrlichias.

Dez pacientes com SBY relataram história de anemia associada a sintomas “flu like” após o episódio epidemiológico associado à transmissão da doença, quatro destes enfermos também apresentaram EM. Sintomas da DL associados à anemia já foram anteriormente reportados em pacientes portadores de co-infecção entre *Borrelia* spp e *Babesia microti*, principal agente etiológico da Babesiose Humana nos Estados Unidos (Sweeney et al., 1998).

A Babesiose humana é transmitida por carrapatos e causada por protozoário intracelular com tropismo por hemácias. Várias espécies de *Babesia* spp patogênicas ao homem foram identificadas em todo o mundo: *B. microti* (Estados Unidos (Dammimn et al., 1981), Europa (Hildebrandt et al., 2007)), *Babesia microti*-like

(Ásia) (Wei et al., 2001), *B. divergens* (Europa) (Fitzpatrick et al., 1968), *Babesia divergens* - like (Estados Unidos) (Herwaldt et al., 2004), *B. duncani* (Estados Unidos) (Conrad et al., 2006), *Babesia* EU1 (Europa) (Herwaldt et al., 2003) , *Babesia* KOI (Ásia) (Kim et al., 2007). Os sintomas clínicos da Babesiose Humana inicialmente são brandos e não específicos como febre, anemia hemolítica, cefaléia, calafrios, diaforese. O paciente esplenectomizado, imunodeprimido ou não tratado adequadamente, pode evoluir com febre alta, anemia severa, icterícia, urina escura, anorexia, perda de peso, fadiga, insuficiência respiratória e cardíaca, acometimento do sistema nervoso central, falência renal, com risco de morte (White et al., 1998). Contrariamente, a infecção pode evoluir sem manifestações clínicas (Rech et al., 2004). Os pacientes apresentam alterações laboratoriais como aumento de transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, desidrogenase láctica, bilirrubinas, trombocitopenia e ocasionalmente leucopenia (Rech et al., 2004). No esfregaço sanguíneo corado pelo Método de Giemsa podemos visualizar a *Babesia* spp intraeritrocitária na forma de anel, inclusões piriformes ou tetraédricas (Cruz de Malta), normalmente na frequência inferior a 1%. Independente da visualização do protozoário no esfregaço sanguíneo, a detecção de anticorpos através da Imunofluorescência Indireta é um elemento importante para o diagnóstico da doença. Quando o paciente tem contato com *Babesia* spp, ele pode apresentar positividade com títulos baixos na Imunofluorescência durante meses, mesmo após a remissão dos sintomas clínicos (Ruebush et al., 1981).

Três pacientes com SBY foram positivos na Imunofluorescência Indireta (IFI), um para *B. bovis* e 2 para *B. equi*, sendo que um doente estava na fase aguda da SBY e dois na fase latente ou secundária da doença. Nenhum soro do grupo controle

foi positivo. Estes resultados evidenciam contato prévio com o protozoário, considerando que a Reação de Imunofluorescência para *Babesia* spp apresenta boa especificidade, como relataram Magnarelli et al. (1995b) ao testar soros de pacientes com Doença de Lyme e Ehrliquiose granulocítica e não constatarem sorologia positiva para *B. microti*.

O ELISA com antígenos da *B. bovis* demonstrou positividade em cinco amostras de pacientes com SBY sendo um com história de anemia. Estes achados sustentam a teoria de contato prévio dos doentes com *Babesia* spp. Sorologia positiva para *Babesia bovis* já havia sido reportada em pacientes com doença de Lyme símile brasileira por Yoshinari et al. (2003). Um indivíduo do grupo controle apresentou positividade no ELISA, sugerindo que o ELISA seja mais sensível que a IFI para identificar infecção por *B. bovis*, embora, Yoshinari et al. (2003) não tenham constatado resultados positivos no ELISA para *B. bovis* no grupo controle, anteriormente.

Araújo et al. (1998) demonstraram boa concordância de 96,6% entre os resultados da IFI e do ELISA com antígenos de *B. bovis* utilizando soros de bovinos.

A Babesiose Humana não é restrita ao Hemisfério Norte, onde o primeiro relato foi em 1957 (Skrabalo e Deanovic, 1957), baseado nas manifestações clínicas e visualização do parasito. Na América do Sul, Rios et al. (2003) descreveram a doença na Colômbia, enquanto Yoshinari et al. (2003), relataram que os primeiros casos de SBY descritos em irmãos no município de Itapevi, apresentaram igualmente elevados títulos de anticorpos contra *B. bovis*, indicando haver co-infecção entre os agentes etiológicos da SBY e babesiose. Ambos os estudos adotaram os mesmos critérios diagnósticos de 1957. Atualmente, as espécies patogênicas no Hemisfério Norte já foram filogeneticamente classificadas.

No Brasil, apesar da existência de áreas endêmicas para babesiose em animais, não existe investigação importante da babesiose em humanos, possivelmente porque, não há exames sorológicos diagnósticos disponíveis e os médicos não pensam em investigar a enfermidade no Hemisfério Sul, diante de tão poucos relatos ou grupos de pesquisa.

No Brasil, estudos demonstram que espécies de carrapatos capazes de parasitar humanos, estão infectadas por *Babesia* spp. O *Rhipycephalus sanguineus* alberga *Babesia equi* (Battsetseg et al., 2002), agente etiológico da Babesiose eqüina e humana, e *Babesia canis* (Babesiose canina.). O *Rhipycephalus* (*Boophilus*) *microplus* é suspeito de atuar como vetor da SBY e alberga *Babesia bigemina* (Oliveira et al., 2008) e *Babesia bovis* (Quintão et al., 2007), agentes causadores da Babesiose bovina. Estes dados alertam para o risco do homem contrair a doença, lembrando que as espécies de carrapatos que transmitem a Babesiose Humana no Hemisfério Norte não existem no Brasil, onde tanto o agente etiológico, como os vetores têm características intrínsecas do país.

A infecção pela *Babesia* spp pode estar associada a *Borrelia* spp, uma vez que ambas podem ser transmitidas pelo mesmo vetor, como o *Ixodes scapularis* (*B. microti*) e *I. ricinus* (*B. divergens*). Co-infecções entre *Babesia* spp e *Borrelia* spp já foram relatadas por Wang et al. (2000), Krause et al. (1996) e Steere et al. (2003). Normalmente, estes enfermos com DL apresentam persistência de sintomas clínicos até que o diagnóstico de co-infecção com babesiose seja estabelecida e tratada. A infecção simultânea ocorre porque os vetores da Babesiose e da Doença de Lyme são os mesmos, o *Ixodes ricinus* e *I. scapularis*. Lembramos que no Brasil, os carrapatos transmissores da SBY são diferentes e não pertencem ao complexo *Ixodes*

ricinus., fato que pode mudar o padrão de co-infecções entre os agentes transmitidos por carrapatos aos homens no país.

O *I. ricinus* do mesmo modo é um dos vetores da Ehrlichiose Humana, zoonose causada por rickettsias intracelulares obrigatórias de leucócitos sanguíneos classificadas como *Ehrlichia chaffeensis* quando parasitam monócitos (Ehrlichiose Monocítica Humana) (Anderson et al., 1991) ou *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmosse Granulocítica Humana) (Bakken et al., 1995; Petrovec et al., 1997) e *E. ewingii* (Buller et al., 1999) quando parasitam neutrófilos. Os sintomas clínicos causados por estes microrganismos são febre, mialgia, cefaléia, mal estar, artralgia, náusea, vomito, tosse, diarreia, rigidez de nuca e confusão mental. Acometimento neurológico caracterizado por meningite ou meningoencefalite e rash cutâneo são manifestações raras, mas podem ocorrer na Ehrlichiose Monocítica Humana (Dumler et al., 2007). Alterações laboratoriais importantes são a presença de leucopenia, trombocitopenia e aumento do nível sérico de aspartato desidrogenase (Olano et al., 2003).

Um paciente com SBY apresentou positividade na sorologia para *E. canis*, espécie já descrita como agente etiológico da Ehrlichiose Humana. (Dawson et al., 1991b; Barton e Foy, 1989), sugerindo ter havido contacto prévio com alguma espécie de *Ehrlichia*, levando em consideração que existe reação cruzada entre as espécies desta bactéria na Imunofluorescência Indireta. Na Ásia, à semelhança do Brasil, dados clínicos e sorológicos fazem o diagnóstico da doença, uma vez que a bactéria ainda não foi identificada (Zhang et al., 2009)..

Em 2004, os primeiros casos da doença no Brasil, foram identificados através do quadro clínico e sorologia positiva para *Ehrlichia chaffeensis* no Estado de Minas Gerais (Calic et al., 2004).

A sorologia positiva para *Ehrlichia canis* em paciente com SBY sugere que possa ter havido infecção simultânea entre o agente causador da SBY e *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp. Em 1997, Nadelman et al. descreveram co-infecção entre *Borrelia burgdorferi* e o agente da Ehrlichiose Monocítica Humana. Co-infecção entre o agente causador da doença de Lyme e *Anaplasma phagocytophilum* (AGH) também já foi descrita anteriormente (Hermanowska-Szpakowicz et al., 2004).

O homem adquire DL e Ehrlichiose Humana através da transmissão simultânea dos agentes etiológicos pelo mesmo carrapato. Co-infecção em *I. ricinus* entre *Borrelia burgdorferi* sensu lato e *Anaplasma phagocytophilum* foi descrita por Koci et al. (2007) na Europa.

Achados importantes de pesquisa de campo alertam da presença dos agentes etiológicos da Ehrlichioses Humana no meio ambiente e da descoberta iminente de novos vetores e reservatórios.

A *Ehrlichia chaffeensis* já foi identificada em *Dermacentor variabilis* e *I. pacificus* (Kramer et al., 1999), estas espécies de carrapatos ainda não são consideradas vetores da EMH, mas são parasitas humanos.

Na Ásia, o *Anaplasma phagocytophilum* já foi identificado parasitando várias espécies de roedores (*Niviventer confucianus*, *Apodemus sylvaticus*, *Rattus losea*, *Niviventer coxingi*) que mantêm o microrganismo no ambiente (Zhan et al., 2008).

No Brasil *E. chaffeensis* foi identificada em cervo (*Blastocerus dichotomus*) (Machado et al., 2006) na região do Rio Paraná, Sudeste do Brasil, onde ainda não foi isolada de humanos, mas está presente parasitando animais silvestres.

Relatos de carrapatos e mamíferos abrigando *Ehrlichia* spp e *Anaplasma* spp alertam para o risco de contágio destas zoonoses pelos humanos.

No Brasil, o carrapato que mais pica o homem e transmite doenças é o *Amblyomma cajennense*, potencial vetor da SBY e transmissor da *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira. A doença foi primeiramente descrita na América do Norte, onde se denomina Febre das Montanhas Rochosas (Walker, 1989). As manifestações clínicas características da doença após cerca de duas semanas da picada do carrapato são febre acima de 40°C, cefaléia, exantema, mialgia, mal estar, artralgia, fadiga, dores abdominais e náusea. A doença tem evolução rápida caso não tratada precocemente (doxiciclina) porque a *Rickettsia spp* é intracelular obrigatória que invade o endotélio vascular se disseminando pelos tecidos (Estripeaut et al., 2007). Pode ocorrer insuficiência respiratória, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia, hemorragia, gangrena, falência renal, convulsão, coma e morte (Lamas et al., 2008; Angerami et al., 2008). Existem relatos de acometimento cardíaco (Doyle et al., 2006) e encefalomielite (Wei e Baumann, 1999). As alterações laboratoriais são hiponatremia, trombocitopenia, aumento de transaminases hepáticas (Amsden et al., 2005).

Dez pacientes com SBY narraram ocorrência de exantema associado à febre, mialgia, cefaléia e artralgia. A Imunofluorescência para anticorpos da classe IgG contra *R. rickettsii* foi positiva em nove pacientes porém, 6 amostras do grupo controle também apresentaram positividade. Resultados falso positivos na Imunofluorescência para *R. rickettsii* já foram descritos entre pessoas sadias (Kantso et al., 2009). A análise estatística pelo teste de Qui-quadrado demonstrou que a positividade dos pacientes contra antígenos da *R. rickettsii* não foi significativa, sugerindo que se houver presença de co-infecção nos pacientes com SBY com história de exantema, não foi pela *R. rickettsii*.

Em 2004, Paddock et al. descreveram uma doença semelhante à Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, mas com sintomas mais brandos como febre até 40° C, exantema, cefaléia, mialgia, linfadenopatia, lesão de pele denominada eschar no local da picada do carrapato, sem relato de acometimento neurológico ou morte (Paddock et al., 2008). Recentemente, atendemos no laboratório doente com febre, exantema e lesão de pele lembrando eschar no ponto da picada. A sorologia para o grupo das Rickettsioses brandas foi positiva e a PCR da biópsia da lesão confirmou infecção por *Rickettsia spp.* O seqüenciamento mostrou tratar-se de uma nova espécie de *Rickettsia* inexistente no país, semelhante filogeneticamente à *R. parkeri* e *R. africae* (Roux e Raoult, 2000). A *R. africae* causa rickettsiose em humanos semelhante à *R. parkeri* (Ndip et al., 2004). Curiosamente, seis pacientes com SBY foram positivos na Imunofluorescência para *R. parkeri* e nenhum indivíduo do grupo controle. A presença de anticorpos contra *R. parkeri* nos pacientes com SBY indica existência de co-infecção entre estas bactérias no Brasil e alerta quanto a necessidade do diagnóstico sorológico para rickettsioses mais brandas além da imunofluorescência para *R. rickettsii*, único ensaio preconizado como teste diagnóstico para Febre Maculosa no Brasil.

Estudos de soro-prevalência indicam que cavalos, capivaras e cães tiveram contato ou albergam *R. parkeri* no Brasil (Pacheco et al., 2007; Silveira et al., 2007). Com relação ao agente transmissor no país, *R. parkeri* foi identificada parasitando *Amblyomma triste* no Brasil. Esta espécie de carrapato está relacionada à transmissão da *R. parkeri* no Uruguai (Venzal et al., 2004).

Os pacientes com SBY apresentaram positividade significativa contra antígenos da *R. amblyommii* sugerindo infecção simultânea entre estas bactérias. Nos

Estados Unidos da America, em 2007, Billeter et al. relataram caso clínico de paciente com lesão de pele no sítio da picada do carrapato *Amblyomma americanum*. A análise molecular do artrópode revelou infecção pela *Rickettsia amblyommii*, espécie ainda não considerada patogênica (Apperson et al., 2008). Este único relato nos alerta quanto à potencialidade desta nova espécie causar doença.

No Hemisfério Sul, a *R. amblyommii* foi identificada parasitando *A. cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na Colômbia (Bermúdez et al., 2009).

No Brasil a *R. amblyommii* foi identificada em *A. cajennense* (Labruna et al., 2004), carrapato mais frequentemente relacionado ao parasitismo humano no país, potencial transmissor da SBY e vetor da Febre Maculosa Brasileira. Existe relato de cães com sorologia positiva para *R. amblyommii* em Rondônia (Labruna et al., 2007), sugerindo a circulação do microrganismo na região.

Outra espécie de *Rickettsia* identificada infectando *Amblyomma cajennense* em região endêmica para Febre Maculosa Brasileira é a *R. bellii* (Labruna et al., 2004). Os pacientes com SBY estudados apresentaram sorologia positiva contra antígenos de *R. bellii* estatisticamente significativa, sugerindo o contato com a bactéria, porém, ainda sem possibilidade de correlacionar esta possível infecção pregressa com as manifestações clínicas exibidas pelos doentes. A *R. bellii* ainda não é considerada patogênica ao homem, mas está circulante no meio ambiente infectando o *Amblyomma aureolatum*, carrapato relacionada a transmissão da Febre Maculosa Brasileira (Pinter e Labruna, 2006) e o *Amblyomma dubitatum* (Pacheco et al., 2009), carrapato hospedeiro de capivaras em área endêmica para Febre Maculosa Brasileira (Perez et al., 2008).

Dentre as infecções transmitidas por carrapatos no Brasil, os resultados com as *Rickettsias* ditas brandas foram bastante significativos, pela alta frequência de soro-positivos em pacientes com SBY, indicando que houve co-infecção entre bactérias do grupo das *Rickettsioses* brandas com agente etiológico da SBY. Outra sugestão é a de que carrapatos transmissores da SBY, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus Boophilus microplus*, participem também como vetores destas *rickettsioses*. Esta descoberta indica a importância da aplicação de metodologias diagnósticas para zoonoses transmitidas por carrapatos no Brasil considerando um cenário endêmico para estas doenças em bovinos, eqüinos e caninos; exposição aos vetores infectados por *Borrelia* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp e *Rickettsia* spp. e indisponibilidade de instrumentos laboratoriais para identificar doenças infecciosas que requerem tratamento com antibióticos específicos.

O estudo alerta a classe médica, quanto à necessidade de investigar as doenças transmitidas por carrapatos, em doentes com história epidemiológica e sintomas compatíveis, especialmente as sugestivas de *rickettsioses* ditas brandas. Embora pouco conhecidas no Brasil, as zoonoses transmitidas por carrapatos são bem estudadas e diagnosticadas em todo mundo. Neste sentido, este é o primeiro trabalho a alertar a classe médica brasileira sobre a possível ocorrência de co-infecções e zoonoses diversa causadas por carrapatos e a disponibilizar procedimentos diagnósticos laboratoriais para a maioria das enfermidades.

Assim como a SBY tem epidemiologia, clínica e dados laboratoriais distintos da DL, as outras zoonoses transmitidas por carrapatos no país, podem ter particularidades próprias no Brasil, especialmente porque os carrapatos existentes no país são diferentes. O Laboratório de Interação Microorganismo-Artrite localizado

no LIM-17 do HCFMUSP é referência para pesquisa da SBY, e após o presente estudo está igualmente apto para diagnosticar as demais zoonoses transmitidas por carrapatos. Este fato é de grande relevância, pois é a única Instituição Pública a realizar todos os procedimentos diagnósticos à população em geral, possibilitando o diagnóstico de novas enfermidades e contribuindo na difusão de conhecimentos à classe médica brasileira.

6 CONCLUSÕES

O diagnóstico laboratorial para SBY realizado através dos testes sorológicos ELISA e Western Blotting com antígenos totais da *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 americana apresentam boa concordância, sugerindo a aplicação do ELISA como teste de triagem e o Western Blotting como exame confirmatório dos resultados inconclusivos no ELISA. Contudo, é importante a realização de ambos os testes para aumentar a sensibilidade da prova diagnóstica laboratorial da SBY.

A presença de anticorpos específicos contra *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii* e *Rickettsia bellii* estatisticamente significativa sugere ter havido co-infecção com estes microorganismos nos pacientes com SBY.

Anticorpos contra a *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* também foram detectados nos pacientes com SBY, embora as frequências de positividade tenham sido baixas, sugerindo que estes microorganismos podem eventualmente causar enfermidades em humanos.

O fato de ter ocorrido co-infecção entre os agentes etiológicos da SBY e Rickettsioses brandas sugerem que *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* seja vetores destas zoonoses no Brasil.

7 ANEXOS

8.1 Termo da CaPPesq



APROVAÇÃO

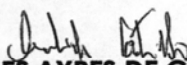
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em sessão de 20.12.06, **APROVOU**, o Protocolo de Pesquisa nº **776/06**, intitulado **"Padronização e aplicação prática de metodologias diagnósticas de enfermidades transmitidas por carrapatos em humanos"**, apresentado pelo **Departamento de CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Natalino Hajime Yoshinari**

Pesquisador(a) Executante: **Sra. Virginia Lucia Nazario Bonoldi**

CAPPesq, 20 de dezembro de 2006


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

matc

8 REFERÊNCIAS

Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LM, Labruna MB. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J Med Entomol.* 2007; 44:126-32.

Amsden JR, Warmack S, Gubbins PO. Tick-borne bacterial, rickettsial, spirochetal, and protozoal infectious diseases in the United States: a comprehensive review *Pharmacotherapy.* 2005;25:191-210.

Anderson BE, Summer JW, Dawson JE, Tzianabos T, Greene CR, Olson JG, Fishbein DG, Olsen-Rasmussen M, Holloway BP, George EH. Detection of the etiologic agente of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 775-780.

Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:2838-42.

Anderson BE, Sims KG, Olson JG, Childs JE, Piesman JF, Happ CM, Maupin GO, Johnson BJ. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:239-44.

Anderson JM, Norris DE. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in *Peromyscus leucopus*, the primary reservoir of Lyme disease in a region of endemicity in southern Maryland. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:5331-41.

Angerami RN, da Silva AM, Nascimento EM, Colombo S, Wada MY, Dos Santos FC, Mancini DM, de Oliveira RC, Katz G, Martins EC, da Silva LJ. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 15: 1198

Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ, Dail K, Johnson J, Watson DW. Tick-borne diseases in North Carolina: is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:597-606.

Aquino LCT, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, Castro MB, Malheiros EB. Clinical, Parasitological and Immunological Aspects of Experimental Infection with *Trypanosoma evansi* in Dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999; 94: 255-60.

Araújo FR, Madruga CR, Leal CR, Schenk MA, Kessler RH, Marques AP, Lemaire DC. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet Parasitol.* 1998;74:101-8.

Archibald LK, Sexton DJ. Long-term sequelae of Rocky Mountain spotted fever. *Clin Infect Dis* 1995;20:1122–5.

Astrauskiene D, Bernotiene E. New insights into bacterial persistence in reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2007; 25:470-9.

Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Lyme-disease-United State, 1002-206. *MMWR Surveill Summ*. 2008; 57:1-9.

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*. 1994;272:212-8.

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*. 1995;273:23.

Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:236-47.

Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22:433-48.

Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont Welsh J, Pretzman C, Postic D, Saint Girons I, Baranton G, McClelland M. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42:370-7.

Barlough JE, Madigan JE, Kramer VL, Clover JR, Hui LT, Webb JP, Vredevoe LK. *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2018-21.

Barros JLB, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. The clinical spectrum of Lyme Disease in Brazil. *Rev Bras Reumatol.* 1996.; 36: 67-74.

Barros-Battesti DM, Yoshinari NH, Bonoldi VLN, Gomes AC. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. *J Med Entomol.* 2000; 37: 820-7.

Battsetseg B, Lucero S, Xuan X, Claveria FG, Inoue N, Alhassan A, Kanno T, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol.* 2002;107:351-7.

Becker CA, Bouju-Albert A, Jouglin M, Chauvin A, Malandrin L. Natural transmission of Zoonotic *Babesia* spp. by *Ixodes ricinus* ticks. *Emerg Infect Dis.* 2009 ;15:320-2.

Belongia EA, Reed KD, Mitchell PD, Kolbert CP, Persing DH, Gill JS, Kazmierczak JJ. Prevalence of granulocytic *Ehrlichia* infection among white-tailed deer in Wisconsin. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1465-8.

Bermúdez SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, Motta JA, Dasch GA. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. *J Med Entomol.* 2009;46(4):856-61.

Billeter SA, Blanton HL, Little SE, Levy MG, Breitschwerdt EB. Detection of *Rickettsia amblyommii* in association with a tick bite rash. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007 ;7: 607-10.

Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8:763-72.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsoni*. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2645-51.

Buckingham SC. Tick-borne infections in children: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management strategies. *Pediatric Drugs.* 2005; 7:163

Buckingham SC. Tick-borne infections in children: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management strategies. *Paediatr Drugs.* 2005;7:163-76.

Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisa Y, Unver A, Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N, Storch GA. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med.* 1999;341:148-55.

Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisa Y, Unver A, Cairns V, Godwin J. Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta-analysis of reported symptoms. *Int J Epidemiol.* 2005;34(6):1340-5.

Cairns V, Godwin J. Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta-analysis of reported symptoms. *Int J Epidemiol.* 2005;34:1340-5.

Calic SB, Galvão MA, Bacellar F, Rocha CM, Mafra CL, Leite RC, Walker DH. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(3):259-62.

Commins MA, Goodger BV, Waltisbuhl DJ, Wright IG. *Babesia bovis*: studies of parameters influencing microvascular stasis of infected erythrocytes. *Res Vet Sci.* 1988; 44:226-8.

Caporale DA, Rich SM, Spielman A, Telford SR 3rd, Kocher TD. Discriminating between Ixodes ticks by means of mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 1995;4:361-5.

- Cepok S, Zhou D, Vogel F, Rosche B, Grummel V, Sommer N, Hemmer B. The immune response at onset and during recovery from *Borrelia burgdorferi* meningoradiculitis. *Arch Neurol*. 2003; 60: 849-55.
- Chang YF, Novosel V, Chang CF, Kim JB, Shin SJ, Lein DH. Detection of human granulocytic ehrlichiosis agent and *Borrelia burgdorferi* in ticks by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*. 1998;10:56-9.
- Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet*. 2002; 36: 47-73.
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*. 1994;32:589-95.
- Conrad PA, Kiemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford SR3rd, Herwaldt BL. Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. *Int J Parasitol*. 2006; 36: 779-89.
- Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Clinical and laboratorial outline of Lyme-like disease, in Mato Grosso do Sul State: analysis of 16 patients. *Rev Bras Reumatol*. 2001;41: 142-50.

- Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Search for *Borrelia* sp. In Ticks Collected from Potential Reservoirs in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: a Short Report. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 631-5.
- Crippa M, Rais O, Gern L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2002 ;2:3-9.
- Cunha BA. Clinical features of Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:143-4.
- da Costa PS, Valle LM, Brigatte ME, Greco DB. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. *Braz J Infect Dis*. 2006;10:7-10.
- Dammimn GJ, Spielnan A, Benach JL, Piesman J. The rising incidence of clinical *Babesia microti* infection. *Hum Pathol*. 1981;12: 398-400.
- Dandache P, Nadelman RB. Erythema Migrans. *Infect. Dis. Clin. N. Am*. 2008; 22: 235-260
- Daniels TJ, Falco RC, Schwartz I, Varde S, Robbins RG. Deer ticks (*Ixodes scapularis*) and the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a New York City park. *Emerg Infect Dis*. 1997;3:353-5.

Dawson JE, Rikihisa Y, Ewing SA, Fishbein DB. Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *J Infect Dis.* 1991a;163:564-7.

Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH, Duntley CW. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *Clin Microbiol.* 1991b;29:2741-5.

Dell'Era S, Buchrieser C, Couvé E, Schnell B, Briers Y, Schuppler M, Loessner MJ. *Listeria monocytogenes* L-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. *Mol Microbiol.* 2009;73:306-22.

Domingue GJ, Thomas R, Walters F, Serrano A, Heidger PM Jr. Cell wall deficient bacteria as a cause of idiopathic hematuria. *J Urol.* 1993; 150:483-5.

Domingue GJ, Ghoniem GM, Bost KL, Fermin C, Human LG. Dormant microbes in interstitial cystitis. *J Urol.* 1995; 153:1321-6.

Doyle A, Bhalla KS, Jones JM 3rd, Ennis DM. Myocardial involvement in rocky mountain spotted fever: a case report and review. *Am J Med Sci.* 2006; 332:208-10.

Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis.* 1993; 167:392-400.

Duh D, Jelovsek M, Avsic-Zupanc T. Evaluation of an indirect fluorescence immunoassay for the detection of serum antibodies against *Babesia divergens* in humans. *Parasitology*. 2007 ;134:179-85.

Dumler JS, Chen SM, Asanovich K, Triggiani E, Popov VL, Walker DH. Isolation and characterization of a new strain of *Ehrlichia chaffeensis* from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1704-11.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:2145-65.

Dumler JS, Walker DH. Rocky Mountain spotted fever--changing ecology and persisting virulence. *N Engl J Med*. 2005;353: 551-3.

Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*. 2007;45 :45-51.

Dunn BE, Monson TP, Dumler JS, Morris CC, Westbrook AB, Duncan JL, Dawson JE, Sims KG, Anderson BE. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2207-10.

Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol.* 1995; 3:419-27.

Estripeaut D, Aramburú MG, Sáez-Llorens X, Thompson HA, Dasch GA, Paddock CD, Zaki S, Ereemeeva ME. Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1763-5.

Falagas ME, Klempner MS. Babesiosis in patients with AIDS: a chronic infection presenting as fever of unknown origin. *Clin Infect Dis.* 1996;22:809-12.

Fitzpatrick JE, Kennedy CC, McGeown MG, Oreopoulos DG, Robertson JH, Soyannwo MA. Human case of piroplasmiasis (babesiosis). *Nature.* 1968; 217:861-2.

Gauditano G, Bonoldi VLN, Hiratsuka RC, Kiss MH, Yoshinari NH. Common immunological aspects between Lyme disease and rheumatic fever. *Rev Bras Reumatol.* 2000; 40: 1-8.

Gauditano G, Bonoldi VLN, Costa IP, Battesti DMB, Barros PJL, Fonseca AH, Higuchi ML, Yoshinari NH. Síndrome de Lyme-símile ou Complexo Infecção-Reacional do Carrapato – Síndrome de Baggio Yoshinari. XVIII Jornada Paulista de Reumatologia e XI Encontro de Reumatologia Avançada. 21-27 Maio, 2005.

Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N, Storch GA. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis *N Engl J Med*. 1999;34:148-55.

Gelfand JA & Callahan MV. Babesiosis. *Current Clin Top Infect Dis*. 1998;18:201-16.

Gonçalves da Costa PS, Brigatte ME, Pereira de Almeida E, de Carvalho Valle LM. Atypical fulminant *Rickettsia rickettsii* infection (Brazilian spotted fever) presenting as septic shock and adult respiratory distress syndrome. *Braz J Infect Dis*. 2002 ;6:91-6.

Gongóra-Biachi RA, Zavala-Velázquez J, Castro-Sansores CJ, González-Martínez P. First case of human ehrlichiosis in Mexico. *Emerg Infect Dis*. 1999 5:481.

Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurtti TJ, Munderloh UG. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*. 1996;334:209-15.

Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, Schwan TG, Policastro PF, Elias AF, Rosa PA. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3142-7.

Hamburg, BJ. MD; Storch, Gregory A. MD; Micek, Scott T. PharmD, BCPS; Kollef, Marin H. MD The Importance of Early Treatment With Doxycycline in Human Ehrlichiosis. *Medicine*. 2008; 87:53-60.

Hamilton KS, Standaert SM, Kinney MC. Characteristic peripheral blood findings in human ehrlichiosis. *Mod Pathol*. 2004;17:512-7.

Hermanowska-Szpakowicz T, Skotarczak B, Kondrusik M, Rymaszewska A, Sawczuk M, Maciejewska A, Adamska M, Pancewicz S, Zajkowska J. Detecting DNAs of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*. 2004;11:351-4.

Herwaldt BL, Cacciò S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Löschenberger K, Tura S, Pieniazek NJ. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:942-8.

Herwaldt BL, de Bruyn G, Pieniazek NJ, Homer M, Lofy KH, Slemenda SB, Fritsche TR, Persing DH, Limaye AP. *Babesia divergens*-like infection, Washington State. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:622-9.

Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:595-601.

Hildenbrand P, Craven DE, Jones R, Nemeskal P. Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30:1079-87.

- Holden K, Boothly JT, Amand S, Massunq RF. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from coastal region of California. *J Med Entomol*. 2003; 40: 534-9.
- Horta MC, Labruna MB, Sangioni CA, Vianna MCB, Germari SM, Galvão MAM, Mafra CL, Vidotto MO, Schumaker TTS, Walker DH. Prevalence of Antibodies to Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Human and Domestic Animals in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil. Serologic Evidence for Infection by *Rickettsia rickettsii* and another Spotted Fever Group *Rickettsia*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 71: 93-7
- Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol*. 2008; 38:1219-37.
- Kantsø B, Svendsen CB, Jørgensen CS, Krogfelt KA. Evaluation of serological tests for the diagnosis of rickettsiosis in Denmark. *J Microbiol Methods*. 2009; 76:285-8.
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol*. 1993;37:843-8.
- Kersten A, Poitschek C, Rauch S, Aberer E. Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:1127-33.

Kidd L, Maggi R, Diniz PP, Hegarty B, Tucker M, Breitschwerdt E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. *Vet Microbiol.* 2008 ;129:294-303.

Kim JY, Cho SH, Joo HN, Tsuji M, Cho SR, Park IJ, Chung GT, Ju JW, Cheun HI, Lee HW, Lee YH, Kim TS. First case of human babesiosis in Korea: detection and characterization of a novel type of *Babesia* sp. (KO1) similar to ovine babesia. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:2084-7.

Koci J, Movila A, Taragel'ová V, Toderas I, Uspenskaia I, Derdákóvá M, Labuda M. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. *Exp Appl Acarol.* 2007;41:147-52.

Kramer VL, Randolph MP, Hui LT, Irwin WE, Gutierrez AG, Vugia DJ. Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 ;60:62-5.

Krause PJ, Telford SR 3rd, Ryan R, Conrad PA, Wilson M, Thomford JW, Spielman A. Diagnosis of babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. *J Infect Dis.* 1994;169:923-6.

Krause, P. J., S. R. Telford III, A. Spielman, V. Sikand, R. Ryan, D. Christianson, G. Burke, P. Brassard, R. Pollack, J. Peck, and D. H. Persing. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA.* 1996; 275:1657-1660.

Krause PJ, Lepore T, Sikand VK, Gadbow J Jr, Burke G, Telford SR 3rd, Brassard P, Pearl D, Azlanzadeh J, Christianson D, McGrath D, Spielman A. Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. *N Engl J Med*. 2000;343(20):1454-8.

Kuenzle S, von Büdingen HC, Meier M, Harrer MD, Urich E, Becher B, Goebels Pathogen specificity and autoimmunity are distinct features of antigen-driven immune responses in neuroborreliosis. *Infect Immun*. 2007;75:3842-7.

Kurtenbach K, Carey D, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol*. 1998;35:77-81.

Labruna MB, Whiworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LM, Camargo EP, Popov V, Walker DH. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol*. 2004.;41: 1073-81.

Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LM. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007;7:249-55.

Lacz NL, Schwartz RA, Kapila R. Rocky Mountain spotted fever. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006; 20(4):411-7.

- Lamas C, Favacho A, Rozental T, Bóia MN, Kirsten AH, Guterres A, Barreira J, de Lemos ER. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil *Braz J Infect Dis*. 2008;12:149-51.
- Lelovas P, Dontas I, Bassiakou E, Xanthos T. Cardiac implications of Lyme disease, diagnosis and therapeutic approach. *Int J Cardiol*. 2008; 129:15-21.
- Levin ML, Fish D. Immunity reduces reservoir host competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. *Infect Immun*. 2000 ;68:1514-8.
- Little SE, Howerth EW. *Ehrlichia chaffeensis* in archived tissues of a white-tailed deer. *J Wildl Dis*. 1999;35:596-9.
- LoGiudice K, Ostfeld RS, Schmidt KA, Keesing F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:567-71.
- Machado RZ, Duarte JM, Dagnone AS, Szabó MP. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Vet Parasitol*. 2006;139:262-6.
- Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, Schankman NS, DeRock E. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J Clin Microbiol*. 1996 ;34:434-5.

- Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med*. 1987;316:853-6.
- Magnarelli LA, Stafford KC 3rd, Mather TN, Yeh MT, Horn KD, Dumler JS. Hemocytic rickettsia-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to *Ehrlichiae* and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995a; 33:2710-4.
- Magnarelli LA, Dumler JS, Anderson JF, Johnson RC, Fikrig E. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *J Clin Microbiol*. 1995b;33:3054-7.
- Mantovani E, Costa IP, Gauditano G, Bonoldi VLN, Higuchi ML, Yoshinari NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40:443-456.
- Marques A. Chronic Lyme Disease: An appraisal. *Infect Dis Clin North Am*. 2008; 22: 341-360.
- Martínez MC, Gutiérrez CN, Monger F, Ruiz J, Watts A, Mijares VM, Rojas MG, Triana-Alonso FJ. *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:519-20.

Masuzawa T, Kharitononkov IG, Okamoto Y, Fukui T, Ohashi N. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia) - a sympatric region for both tick species. *J Med Microbiol.* 2008;57:986-91.

Masuzawa T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57:229-35.

Masuzawa T, Kharitononkov IG, Okamoto Y, Fukui T, Ohashi N. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia) - a sympatric region for both tick species. *Med Microbiol.* 2008;57:986-91.

Mather TN, Telford SR 3rd, Moore SI, Spielman A. *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*: efficiency of transmission from reservoirs to vector ticks (*Ixodes dammini*). *Exp Parasitol.* 1990 ;70:55-61.

Maxey, E.E. Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. *Med. Sentinel* 1899; 7:433-438.

Michailova L, Markova N, Radoucheva T, Stoitsova S, Kussovski V, Jordanova. Atypical behaviour and survival of *Streptococcus pyogenes* L forms during intraperitoneal infection in rats. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 28:55-65.

- Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation*. 2008; 5:40.
- Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol*. 1996;34:724-7.
- Mixson TR, Campbell SR, Gill JS, Ginsberg HS, Reichard MV, Schulze TL, Dasch GA. Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and Rickettsial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from nine states. *J Med Entomol*. 2006 Nov;43(6):1261-8.
- Miyamoto K, Sato Y, Okada K, Fukunaga M, Sato F. Competence of a migratory bird, red-bellied thrush (*Turdus chrysolaus*), as an avian reservoir for the Lyme disease spirochetes in Japan. *Acta Trop*. 1997;65:43-51.
- Mora P, Carta A. Ocular manifestations of Lyme borreliosis in Europe. *Int J Med Sci*. 2009;6:124-5.
- Mott J, Barnewall RE, Rikihisa Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. *Infect Immun*. 1999;67:1368-78.

Murgia R, Cinco M. Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. *APMIS*. 2004; 112: 57-62.

Nadelman RB, Horowitz HW, Hsieh TC, Wu JM, Agüero-Rosenfeld ME, Schwartz I, Nowakowski J, Varde S, Wormser GP. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med*. 1997;337:27-30.

Nascimento EM, Gehrke Fde S, Maldonado RA, Colombo S, Silva LJ, Schumaker TT. Detection of Brazilian spotted fever infection by polymerase chain reaction in a patient from the state of São Paulo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:277-9.

Nau R, Christen HJ, Eiffert H. Lyme disease--current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106:72-81.

Ndip LM, Fokam EB, Bouyer DH, Ndip RN, Titanji VP, Walker DH, McBride JW. Detection of *Rickettsia africae* in patients and ticks along the coastal region of Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:363-6.

Olano JP, Masters E, Hogrefe W, Walker DH. Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1579-86.

Oliveira MC, Oliveira-Sequeira TC, Regitano LC, Alencar MM, Néo TA, Silva AM, Oliveira HN. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Vet Parasitol*. 2008;155:281-6.

Onoda T, Oshima A, Nakano S, Matsuno A. Morphology, growth and reversion in a stable L-form of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol.* 1987;133:527-34.

Ovcinnikov NM, Delektorskij VV. Current concepts on the morphology and biology of *Treponema pallidum* based on electron microscopy. *Br J Vener Dis.* 1971; 47:315-28.

Pacheco RC, Horta MC, Moraes-Filho J, Ataliba AC, Pinter A, Labruna MB. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomedica.* 2007;27:364-71.

Pacheco RC, Horta MC, Pinter A, Moraes-Filho J, Martins TF, Nardi MS, Souza SS, Souza CE, Szabó MP, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42:351-3.

Pachner AR, Steiner I. Lyme neuroborreliosis: infection, immunity, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2007; 6:544-52.

Paddock CD, Folk SM, Shore GM, Machado LJ, Huycke MM, Slater LN, Liddell AM, Buller RS, Storch GA, Monson TP, Rimland D, Sumner JW, Singleton J, Bloch KC, Tang YW, Standaert SM, Childs JE. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1586-94.

Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, McLellan SL, Tamminga CL, Ohl CA. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis*. 2004;38:805-11.

Paddock CD, Finley RW, Wright CS, Robinson HN, Schrodtt BJ, Lane CC, Ekenna O, Blass MA, Tamminga CL, Ohl CA, McLellan SL, Goddard J, Holman RC, Openshaw JJ, Sumner JW, Zaki SR, Ereemeeva ME. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1188-96.

Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, Reed KD Jr, Dumler JS, Bakken JS, Telford SR 3rd, Persing DH. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis*. 1995;172:1007-12.

Perez CA, Almeida AF, Almeida A, Carvalho VH, Balestrin Ddo C, Guimarães MS, Costa JC, Ramos LA, Arruda-Santos AD, Máximo-Espíndola CP, Barros-Battesti DM. Ticks of genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) and their relationship with hosts in endemic area for spotted fever in the State of São Paulo. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2008;17:210-7.

Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, Telford SR, Spielman A, Thomford JW, Conrad PA. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 ;30:2097-103.

Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1556-9.

Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, Lotric-Furlan S, Avsic Zupanc T. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol.* 1999;37:209-10.

Pfister HW, Rupprecht TA. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. *Int J Med Microbiol.* 2006; 296:11-6.

Piepkorn MW, Reichenbach DD. Infective endocarditis associated with cell wall-deficient bacteria. Electron microscopic findings in four cases. *Hum Pathol.* 1978; 9:163-73.

Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:523-9.

Popov VL, Korenberg EI, Nefedova VV, Han VC, Wen JW, Kovalevskii YV, Gorelova NB, Walker DH. Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with *Rickettsia*, *Borrelia*, and a flavivirus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:699-716.

Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB, Weber R, Braun U, Lutz H. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1999 ;37(5):1332-4.

Quintão-Silva MG, Melo MN, Ribeiro MF. Comparison of duplex PCR and microscopic techniques for the identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Zoonoses Public Health.* 2007;54:147-51.

Rech A, Bittar CM, de Castro CG, Azevedo KR, dos Santos RP, Machado AR, Schwartzmann G, Goldani L, Brunetto AL. Asymptomatic babesiosis in a child with hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26:213.

Rich SM, Armstrong PM, Smith RD, Telford 3th SR. Lone Star Tick-Infecting *Borreliae* are most closely related to the agent of bovine borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 2001 39: 494-7.

Ríos L, Alvarez G, Blair S. Serological and parasitological study and report of the first case of human babesiosis in Colombia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36:493-8.

Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50:1449-55.

Rozental T, Ereemeeva ME, Paddock CD, Zaki SR, Dasch GA, Lemos ER. Fatal case of Brazilian spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:257-9.

Ruebush TK 2nd, Juranek DD, Chisholm ES, Snow PC, Healy GR, Sulzer AJ. Human babesiosis on Nantucket Island. Evidence for self-limited and subclinical infections. *N Engl J Med.* 1977;297:825-7.

Ruebush TK 2nd, Chisholm ES, Sulzer AJ, Healy GR. Development and persistence of antibody in persons infected with *Babesia microti*. *Am J Trop Med.* 1981;30:291-2.

Silveira I, Pacheco RC, Szabó MP, Ramos HG, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13: 1111-3.

Siński E, Pawełczyk A, Bajer A, Behnke J. Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2006;13:295-300.

Skrabalo z, Deanovic z. Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop.* 1957;9:11-6.

Smith RP, Evans AT, Popovsky M, Mills L, Spielman A. Transfusion-acquired babesiosis and failure of antibiotic treatment. *JAMA* 1986;256:2726-2727.

Spielman A. Human babesiosis on Nantucket Island: transmission by nymphal Ixodes ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1976 ;25:784-7.

Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliari KM, Yoshinari NH. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;163:357-61.

Stanek G, Strle F. Lyme Disease : European Perspective. *Infect Dis Clin North Am.* 2008;22: 327-39.

Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 1977; 20:7-17.

Steere AC, Bartenhagen NH, Craft JE, Hutchinson GJ, Newman JH, Rahn DW, Sigal LH, Spieler PN, Stenn KS, Malawista SE. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med.* 1983 ;99:76-82.

Steere AC, Schoen RT, Taylor E. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann. Intern. Med.* 1987; 107: 725-31.

Steere A C. Lyme disease. *N Engl J Med.* 1989;321:586-96.

- Steere AC, Dhar A, Hernandez J, Fisher PA, Sikand VK, Schoen RT, Nowakowski J, McHugh G, Persing DH. Systemic symptoms without erythema migrans as the presenting picture of early Lyme disease. *Am. J. Med.* 2003. 114:58-62.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 1093-10.
- Stone JH, Dierberg K, Aram G, Dumler JS. Human monocytic ehrlichiosis. *JAMA.* 2004;292:2263-70.
- Sweeney CJ, Ghassemi M, Agger WA, Persing DH. Co infection with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in a western Wisconsin resident. *Mayo Clin Proc.* 1998; 73:338-41.
- Taragel'ová V, Koci J, Hanincová K, Kurtenbach K, Derdáková M, Ogden NH, Literák I, Kocianová E, Labuda M. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:1289-93.
- Thomford JW, Conrad PA, Telford SR 3rd, Mathiesen D, Bowman BH, Spielman A, Eberhard ML, Herwaldt BL, Quick RE, Persing DH. Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. *J Infect Dis.* 1994;169:1050-6.

Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am*. 2008 ;22(2):217-34.

van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, RamselaarAC, Kramer MD, Dankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*. 1993;17:708-17.

Vannier E, Gewurz BE, Krause PJ. Human Babesiosis. *Infect Dis Clin N Am*. 2008; 22: 469-88.

Vannier E, Krause PJ. Update on babesiosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009;2009:1-9.

Venzal JM, Portillo A, Estrada-Peña A, Castro O, Cabrera PA, Oteo JA. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1493-5.

Vianna MC, Horta MC, Sangioni LA, Cortez A, Soares RM, Mafra CL, Galvão MA, Labruna MB, Gennari SM. Rickettsial spotted fever in capoeirão village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;297-301.

Walker DH. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. *Clin Microbiol Rev* .1989; 2:227-40.

Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6:375-86.

Walls JJ, Greig B, Neitzel DF, Dumler JS. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1997 ;35:853-5.

Walls JJ, Asanovich KM, Bakken JS, Dumler JS. Serologic evidence of a natural infection of white-tailed deer with the agent of human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Maryland. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:762-5.

Wang, T. J., M. H. Liang, O. Sangha, C. B. Phillips, R. A. Lew, E. A. Wright, V. Berardi, A. H. Fossel, and N. A. Shadick. Coexposure to *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* does not worsen the long-term outcome of Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 31:1149-54.

Wang KX, Chen L. *Helicobacter pylori* L-form and patients with chronic gastritis. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1306-9.

Wei Q, Tsuji M, Zamoto A, Kohsaki M, Matsui T, Shiota T, Telford SR 3rd, Ishihara C. Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2178-83.

Wei TY, Baumann RJ. Acute disseminated encephalomyelitis after Rocky Mountain spotted fever. *Pediatr Neurol*. 1999;21:503-5.

Western KA, Benson GD, Gleason NN, Healy GR, Schultz MG. Babesiosis in a Massachusetts resident. *N Engl J Med*. 1970; 283:854-6.

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*. 1998;158:2149-54.

Woodman ME, Cooley AE, Stevenson B. Production of outer surface protein A by *Borrelia burgdorferi* during transmission from infected mammals to feeding ticks is insufficient to trigger OspA seroconversion. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;54:277-82.

Wróblewska J, Janicka G, Gospodarek E, Szymankiewicz M. L-forms of *Staphylococcus epidermidis* induced by penicillin. *Pol J Microbiol*. 2006; .55:243-4.

Yoshinari NH, Barros PJL, Yassuda P, Baggio D, Steere AC, Pagliarini RC, Cossermelli W. Estudo Epidemiológico da Doença de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 1992;47:71-5.

Yoshinari NH, Barros PJJ, Bonoldi VLN, Ishikawa M, Barros-Battesti DM, Pirana S, Fonseca AH, Schumaker TT. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 1997;52: 111-117.

Yoshinari NH, Bonoldi VLN, Barros-Battesti DM, Schumaker TTS. Doença de Lyme-símile no Brasil. *Rev.Bras. Reumatol*. 1999; 38: 57-8.

Yoshinari NH, Abrão MG, Bonoldi VLN, Soares CO, Madruga CR, Scofield A, Massard CL, Fonseca AH. 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*. 2003; 98: 311-18.

Yoshinari NH. A long journey to understand *Borrelia burgdorferi* in Brazil. *Rev Bras Reumatol*. 2009; 49: 483-6.

Zhan L, CAO WC, de Vlas S, Xie SY, Zhang PH, WU XM, Dumler JS, Yang H, Richardus JH, Habbema JD. A newly discovered *Anaplasma phagocytophilum* variant in rodents from southeastern China. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:369-80.

Zhang S, Hai R, Li W, Li G, Lin G, He J, Fu X, Zhang J, Cai H, Ma F, Zhang J, Yu D, Yu XJ. Seroprevalence of human granulocytotropic anaplasmosis in central and southeastern China. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:293-5.

9 APÊNDICES

9.1 Artigo para publicação

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene



**The American Journal of
Tropical Medicine and Hygiene**

Laboratorial study of tick-borne infectious agents in patients with Brazilian Lyme-like Disease (Baggio-Yoshinari Syndrome)

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Bonoldi, Virginia; University of São Paulo, Rheumatology Division
Key Words:	Rickettsial Diseases, Zoonotic Diseases, Lyme Disease, Diagnostics, Ehrlichiosis, Babesiosis

 **scholarONE™**
Manuscript Central

9.2 Normas da Revista

SPECIFIC MANUSCRIPT GUIDELINES

FIRST MANUSCRIPT PAGE

The running heads are flush left. The title, authors, and authors' affiliations are centered. The abstract is flush left, and immediately follows the authors' affiliations with one space between.

Left running head: All capital letters (All Caps); last name of first author plus "and Others"

e.g.,

LRH: BOCKARIE AND OTHERS

Right running head: All Caps; this is the running head for your ~50-character short title

e.g.,

RRH: PCR-ELISA FOR THE DETECTION OF *W. BANCROFTI*

The Title is centered, Roman type (no bold, no italics except for Genus and species, which are italicized.) No punctuation at the end.

e.g.,

Application of a Polymerase Chain Reaction-ELISA to Detect *Wuchereria Bancrofti* in Pools of Wild-Caught *Anopheles Punctulatus* in a Filariasis Control Area in Papua New Guinea

Authors' names are centered. Commas are used throughout except at the end of a line. Do not split a name to the next line. Please be sure to use include the first and last name of each author. Middle names or initials are optional.

e.g.,

Moses J. Bockarie, Peter Fischer, Steven A. Williams, Peter A. Zimmerman, Lysaght Griffin, Michael P. Alpers, and James W. Kazura

Authors' locations/affiliations: departments, institutions, city, state, and/or country are spelled out in full, in italics using Title Case without any numbers. A semi-colon separates each address. Do not split a phrase to the next line. There is no punctuation after the last author's location. Do not use any symbols such as asterisks after authors' names to refer to the specific affiliations of authors. Just list the institutions in the order that the author is listed. If two authors are at the same place, it is listed only once, in the order of the first author mentioned. If the country is the United States of America, it is not included in the address because AJTMH is published in the USA. Other countries are spelled out in full with no abbreviations.

e.g.,

Papua New Guinea Institute of Medical Research, Madang, Papua New Guinea;
Clark Science Center, Department of Biological Sciences, Smith College,
Northampton, Massachusetts; Molecular and Cellular Biology Program, University
of Massachusetts, Amherst, Massachusetts; Division of Geographic Medicine, Case
Western Reserve University School of Medicine, University Hospitals of Cleveland,
Cleveland, Ohio

(Note that the authors' addresses, complete with street and room numbers, postal codes, phone, FAX, and e-mail are found only at the end of the text in the Authors' addresses section of the paper, just above the References.)

TEXT

Format

Please provide the following (in order):

1. A concise abstract (150 words maximum)
2. An introductory paragraph
3. Separate sections for Materials and Methods
4. Results
5. Discussion
6. Separate paragraphs for acknowledgments, listing of financial support, all authors' detailed addresses including telephone and FAX numbers, a shipping address for reprints, if reprints are being ordered
7. A list of the references cited.

REFERENCES

References should be cited by consecutive numbers in the text. The numbers should appear in superscripts, not in parentheses, and should appear after any closing punctuation. Abbreviate journal names in the style used by the National Library of Medicine. References should be from peer-reviewed publications that are generally available to the readers of the Journal.

Abstracts, proceedings, works in progress, theses, dissertations, and manuscripts submitted but not yet accepted for publication are not acceptable to cite as references. If it is necessary to cite information from these sources, they should be cited in the text only, in parentheses as follows: (Jamestown JW and others, unpublished data).

Format. All authors must be listed; never use "et al." or the phrase "or others." Authors are indicated by their last names followed by a space and their initial(s) (with no period/full stop). Periods are not used after abbreviated words in journal titles. Authors' names are separated by commas only, and is not used. The year of publication follows the final name, preceded by a comma. Double check all information including the correct abbreviation of the journal cited. Note that the abbreviated journal, the volume number, and the colon that follows are in italics. There is a space after the colon, before the page numbers. The page numbers are written out completely: 472--476 (not 473--76).

See pages 28--51 in the American Medical Association (AMA) Manual of Style (9th Edition) for various types of reference sources so that you can incorporate them and then modify the formatting for AJTMH as follows:

Authors' names: Never use et al. in the references or text. See the following examples:

Examples of articles:

Michaels E, Bunyan DJP, Charlesworth JM Jr, Black JM III, 1997. Global mapping: lymphatic filariasis in perspective. *Parasitol Today* 11: 472--476.

Examples of books:

Olive EA, 1995. Lymphatic Filariasis Infection and Disease. London: Academic Press, 129-131.

Chapter in a book:

Gilles HM, 1993. Epidemiology of malaria. Gilles HM, Warrell DA, eds. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. Third edition. Boston, MA: Edward Arnold, 124-163.

Web reference:

Centers for Disease Control and Prevention, 2008. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) recommendations. Available at: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/ACIP-list.htm>. Accessed May 1, 2008.

At AJTMH, contrary to AMA Style, the year of publication always follows the comma after the last author's initial(s).

Consult Index Medicus for the correct abbreviation of the journal cited. The journal abbreviation, the volume number, and the colon are all italicized. The colon is followed by a space, then the page numbers. The page numbers are both written in their entirety, separated by an en dash which you represent in your manuscript by two hyphens.

FORMATTING AND STYLE GLOSSARY

Abbreviations and acronyms. The first time it appears, a word or phrase is spelled out in its entirety preceding the abbreviation or acronym which appears in parentheses. The first instance of the acronym is designated in both the abstract and in the text, the first time it appears and for each figure and table, using the acronym subsequently. Try not to use an abbreviation at the beginning of a sentence or as part of a heading.

Plurals of acronyms have no apostrophes. STDs. M & Ms.

Commonly used abbreviations:

Injections. IP = intraperitoneal, IV = intravenous, IM = intramuscular

Commas. Always insert a comma before the "and" at the end of a series of three or more items.

Ethical guidelines. Ethical considerations must be addressed in the materials and methods section. 1) Please state that informed consent was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project. 2) Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your country's equivalent authority or agency.

Formatting. Use Times New Roman with the font size of 12 throughout. The entire manuscript, including figure legends and tables, should be double spaced (not 1.5 spaces, not a variation such as "equivalent") with one inch margins all around, flush left with a ragged right margin even though when printed in the journal it will be single-spaced and justified?the printer sets all of that up for printing from the manuscript format. Insert only one space between words and sentences, including after a colon (except for the colon after the Acknowledgments, Financial support, Disclaimers, Authors' addresses, and Reprint request sections at the end of the text, just before the REFERENCES).

Headings.

A primary heading is used for the main sections and is centered alone in all capital letters, no bold or italics.

A secondary heading is indented, bold, sentence case, and ends with a period. The text follows on the same line after one space.

A tertiary heading is indented, in sentence case, italicized, and ends with a period.

Sentences and paragraphs. Indent the first sentence of each paragraph. Try not to use an abbreviation at the beginning of a sentence.

Hyphens and dashes.

Dashes. Insert 2 hyphens (--) between numbers or other cases whenever it means "to" as in 4 to 6 years (4--6 years, 1994--1999), The printer will translate -- into an "en dash" [?] which is longer than a hyphen. All you need to do is insert 2 hyphens. The proofreader's mark for an en dash is - . On the rare occasion that you want to put a long dash between the phrases in a sentence for emphasis, use three hyphens (---)

to indicate an "em dash" [?]. There are no spaces before or after the hyphen, the en dash, and the em dash. Do not use a -- for the "to" in ratios or mathematical formulas; they require a virgule or forward slash mark.

Hyphens. Insert a hyphen between words that together modify a noun (T-cell group, but group of T cells) or when an adverb and other word modify a noun.

half-life

antimalarial

Italics. Italicize the words and phrases in your text directly, do not underline. There is no need to both italicize and underline.

Italicize *in vitro*, *in vivo*.

Nomenclature. Genus and species. Genus is spelled out completely the first time an organism is mentioned in the abstract, the text, and in every figure and table. If you are discussing several different species within a genus, so that the genus is the same for each species mentioned, spell the genus + species out in full the first time each new species is mentioned, even if it seems redundant. After the first time, use the genus abbreviation with a period. Genus and species are always italicized. Do not italicize "spp." or "sensu stricto" or "sensu lato" that may follow genus and species. Genus is italicized when it appears alone (i.e., *Plasmodium* infections. Adjectives such as plasmodial are not italicized.). Species, when used as in the text is not italicized (i.e., falciparum malaria).

Numbers and symbols. Insert one space between the number and the units of measure, no space between the numeral and the % sign. Add a space before and after the \geq , \leq , and = symbols.

Parentheses and brackets. Parentheses enclose brackets. In a sentence, the punctuation comes after the close-parentheses symbol.

Quotation Marks. Use quotation marks sparingly, only when absolutely necessary for clarity and to designate a particular, unusual use of a word. When redefining a word, use the quotes only in the first instance in both the text and abstract.

Subsequent use does not require quotes, as you have already alerted the reader to make the mental adjustment.

References and citations

Note: Published abstracts; published or unpublished proceedings, works in progress, theses, and dissertations; and manuscripts submitted but not yet accepted for publication are not acceptable references to cite. If it is necessary to cite information from these sources, cite them in the text only, in parentheses as follows: (Jamestown JW and others, unpublished data).

See pp. 28--51 in the AMA Manual of Style [9th Edition] for expressing various sources of reference. Modify the formatting for AJTMH as follows:

Authors' names. Never use et al. in the references or text. All authors must be listed in the following format:

First author's last name (no comma) single space, his or her initial(s) without periods (no full stops until after the year), comma, single space, next author(s) in the same format until all have been listed. After the final author's initial(s), comma, single space, insert the year of publication, period (full stop).

Year of publication. At AJTMH, contrary to AMA Style, the year of publication always follows the comma after the last author's initial(s).

Journal abbreviation. Consult Index Medicus for the correct abbreviation of the journal cited. The journal abbreviation, the volume number, and the colon are all italicized. The colon is followed by a space before the page numbers. The page numbers are both written in their entirety, separated by 2 hyphens (en dash).

Spacing between sentences. Use one space only.

Spelling. Use American spelling except in the references where spelling and punctuation follow the original citation.

Chagas disease. No apostrophe as per the current CDC standard usage. Bed net.

Possum is the correct word for opossum in Australia.

Superscripts and subscripts. Use your software to create a true superscript or subscript. Insert superscripts correctly, after the punctuation with no space in between.^{2,3,6--8} Here, there are no spaces between the reference number 2, the comma, the 3, or the 6--8 of the superscript. For serial references of 3 or more, insert 2 hyphens between numbers. For example: Other studies reported that opossums usually inspect triatomines both manually and visually before ingesting them.^{1, 6--8,11} For subscripts follow same procedure, check the Subscript box.

Symbols. A minus sign itself should be used, not a hyphen.

Time. Time of day. Use AM and PM.

Time. sec = second(s), msec = millisecond(s); hr = hour(s); yr = year(s); d = day(s). Plurals of years have no apostrophes. 1940s. 1800s.

Units of measure. Abbreviate in the Methods section, but not in the abstract, introduction and results (unless describing a procedure), and discussion.

Abbreviations.

Weights and measures.

g = gram and is always lower case, mg, µg. kilogram = kg.

L = liter. Use the word "liter" for liter when it is mentioned alone in the text. Use a capital L for liter in the instance of g/L and in conjunction with m (milliliter = mL), µ (microliter = µL), and d (deciliter = dL).

Note that if designations are followed by numerals or letters, capitalize them: i.e., when particular day(s), week(s), site(s), lane(s), subject(s), group(s) and similar designations are followed by numbers or letters (Day 6; Weeks 1--7. Site 15, Lanes A--D; Subjects A2 and A5, Genotype A). When designating without a following number, use the third day, the fifth week, second subject, etc.

SPECIFIC MANUSCRIPT GUIDELINES

FIRST MANUSCRIPT PAGE

The running heads are flush left. The title, authors, and authors' affiliations are centered. The abstract is flush left, and immediately follows the authors' affiliations with one space between.

Left running head: All capital letters (All Caps); last name of first author plus "and Others"
e.g.,

LRH: BOCKARIE AND OTHERS

Right running head: All Caps; this is the running head for your ~50-character short title
e.g.,

RRH: PCR-ELISA FOR THE DETECTION OF *W. BANCROFTI*

The Title is centered, Roman type (no bold, no italics except for Genus and species, which are italicized.) No punctuation at the end.

e.g.,

Application of a Polymerase Chain Reaction-ELISA to Detect *Wuchereria Bancrofti* in Pools of Wild-Caught *Anopheles Punctulatus* in a Filariasis Control Area in Papua New Guinea

Authors' names are centered. Commas are used throughout except at the end of a line. Do not split a name to the next line. Please be sure to use include the first and last name of each author. Middle names or initials are optional.

e.g.,

Moses J. Bockarie, Peter Fischer, Steven A. Williams, Peter A. Zimmerman, Lysaght Griffin, Michael P. Alpers, and James W. Kazura

Authors' locations/affiliations: departments, institutions, city, state, and/or country are spelled out in full, in italics using Title Case without any numbers. A semi-colon separates each address. Do not split a phrase to the next line. There is no punctuation after the last author's location. Do not use any symbols such as asterisks after authors' names to refer to the specific affiliations of authors. Just list the institutions

in the order that the author is listed. If two authors are at the same place, it is listed only once, in the order of the first author mentioned. If the country is the United States of America, it is not included in the address because AJTMH is published in the USA. Other countries are spelled out in full with no abbreviations.

e.g.,

Papua New Guinea Institute of Medical Research, Madang, Papua New Guinea;
Clark Science Center, Department of Biological Sciences, Smith College,
Northampton, Massachusetts; Molecular and Cellular Biology Program, University
of Massachusetts, Amherst, Massachusetts; Division of Geographic Medicine, Case
Western Reserve University School of Medicine, University Hospitals of Cleveland,
Cleveland, Ohio

(Note that the authors' addresses, complete with street and room numbers, postal codes, phone, FAX, and e-mail are found only at the end of the text in the Authors? addresses section of the paper, just above the References.)

TEXT

Format

Please provide the following (in order):

1. A concise abstract (150 words maximum)
2. An introductory paragraph
3. Separate sections for Materials and Methods
4. Results
5. Discussion
6. Separate paragraphs for acknowledgments, listing of financial support, all authors' detailed addresses including telephone and FAX numbers, a shipping address for reprints, if reprints are being ordered
7. A list of the references cited.

REFERENCES

References should be cited by consecutive numbers in the text. The numbers should appear in superscripts, not in parentheses, and should appear after any closing punctuation. Abbreviate journal names in the style used by the National Library of Medicine. References should be from peer-reviewed publications that are generally available to the readers of the Journal.

Abstracts, proceedings, works in progress, theses, dissertations, and manuscripts submitted but not yet accepted for publication are not acceptable to cite as references. If it is necessary to cite information from these sources, they should be cited in the text only, in parentheses as follows: (Jamestown JW and others, unpublished data).

Format. All authors must be listed; never use "et al." or the phrase "or others." Authors are indicated by their last names followed by a space and their initial(s) (with no period/full stop). Periods are not used after abbreviated words in journal titles. Authors' names are separated by commas only, and *is* is not used. The year of publication follows the final name, preceded by a comma. Double check all information including the correct abbreviation of the journal cited. Note that the abbreviated journal, the volume number, and the colon that follows are in italics. There is a space after the colon, before the page numbers. The page numbers are written out completely: 472--476 (not 473--76).

See pages 28--51 in the American Medical Association (AMA) Manual of Style (9th Edition) for various types of reference sources so that you can incorporate them and then modify the formatting for AJTMH as follows:

Authors' names: Never use et al. in the references or text. See the following examples:

Examples of articles:

Michaels E, Bunyan DJP, Charlesworth JM Jr, Black JM III, 1997. Global mapping: lymphatic filariasis in perspective. *Parasitol Today* 11: 472--476.

Examples of books:

Olive EA, 1995. *Lymphatic Filariasis Infection and Disease*. London: Academic Press, 129-131.

Chapter in a book:

Gilles HM, 1993. Epidemiology of malaria. Gilles HM, Warrell DA, eds. *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. Third edition. Boston, MA: Edward Arnold, 124-163.

Web reference:

Centers for Disease Control and Prevention, 2008. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) recommendations. Available at: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/ACIP-list.htm>. Accessed May 1, 2008.

At AJTMH, contrary to AMA Style, the year of publication always follows the comma after the last author's initial(s).

Consult Index Medicus for the correct abbreviation of the journal cited. The journal abbreviation, the volume number, and the colon are all italicized. The colon is followed by a space, then the page numbers. The page numbers are both written in their entirety, separated by an en dash which you represent in your manuscript by two hyphens.

FORMATTING AND STYLE GLOSSARY

Abbreviations and acronyms. The first time it appears, a word or phrase is spelled out in its entirety preceding the abbreviation or acronym which appears in parentheses. The first instance of the acronym is designated in both the abstract and in the text, the first time it appears and for each figure and table, using the acronym subsequently. Try not to use an abbreviation at the beginning of a sentence or as part of a heading.

Plurals of acronyms have no apostrophes. STDs. M & Ms.

Commonly used abbreviations:

Injections. IP = intraperitoneal, IV = intravenous, IM = intramuscular

Commas. Always insert a comma before the "and" at the end of a series of three or more items.

Ethical guidelines. Ethical considerations must be addressed in the materials and methods section. 1) Please state that informed consent was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project. 2)

Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your country's equivalent authority or agency.

Formatting. Use Times New Roman with the font size of 12 throughout. The entire manuscript, including figure legends and tables, should be double spaced (not 1.5 spaces, not a variation such as "equivalent") with one inch margins all around, flush left with a ragged right margin even though when printed in the journal it will be single-spaced and justified?the printer sets all of that up for printing from the manuscript format. Insert only one space between words and sentences, including after a colon (except for the colon after the Acknowledgments, Financial support, Disclaimers, Authors' addresses, and Reprint request sections at the end of the text, just before the REFERENCES).

Headings.

A primary heading is used for the main sections and is centered alone in all capital letters, no bold or italics.

A secondary heading is indented, bold, sentence case, and ends with a period. The text follows on the same line after one space.

A tertiary heading is indented, in sentence case, italicized, and ends with a period.

Sentences and paragraphs. Indent the first sentence of each paragraph. Try not to use an abbreviation at the beginning of a sentence.

Hyphens and dashes.

Dashes. Insert 2 hyphens (--) between numbers or other cases whenever it means "to" as in 4 to 6 years (4--6 years, 1994--1999), The printer will translate -- into an "en dash" [?] which is longer than a hyphen. All you need to do is insert 2 hyphens. The proofreader's mark for an en dash is - . On the rare occasion that you want to put a long dash between the phrases in a sentence for emphasis, use three hyphens (---) to indicate an "em dash" [?]. There are no spaces before or after the hyphen, the en dash, and the em dash. Do not use a -- for the "to" in ratios or mathematical formulas; they require a virgule or forward slash mark.

Hyphens. Insert a hyphen between words that together modify a noun (T-cell group, but group of T cells) or when an adverb and other word modify a noun.

half-life

antimalarial

Italics. Italicize the words and phrases in your text directly, do not underline. There is no need to both italicize and underline.

Italicize *in vitro*, *in vivo*.

Nomenclature. Genus and species. Genus is spelled out completely the first time an organism is mentioned in the abstract, the text, and in every figure and table. If you are discussing several different species within a genus, so that the genus is the same for each species mentioned, spell the genus + species out in full the first time each new species is mentioned, even if it seems redundant. After the first time, use the genus abbreviation with a period. Genus and species are always italicized. Do not italicize "spp." or "sensu stricto" or "sensu lato" that may follow genus and species. Genus is italicized when it appears alone (i.e., *Plasmodium* infections. Adjectives such as plasmodial are not italicized.). Species, when used as in the text is not italicized (i.e., falciparum malaria).

Numbers and symbols. Insert one space between the number and the units of measure, no space between the numeral and the % sign. Add a space before and after the \geq , \leq , and = symbols.

Parentheses and brackets. Parentheses enclose brackets. In a sentence, the punctuation comes after the close-parentheses symbol.

Quotation Marks. Use quotation marks sparingly, only when absolutely necessary for clarity and to designate a particular, unusual use of a word. When redefining a word, use the quotes only in the first instance in both the text and abstract. Subsequent use does not require quotes, as you have already alerted the reader to make the mental adjustment.

References and citations

Note: Published abstracts; published or unpublished proceedings, works in progress, theses, and dissertations; and manuscripts submitted but not yet accepted for publication are not acceptable references to cite. If it is necessary to cite information from these sources, cite them in the text only, in parentheses as follows: (Jamestown JW and others, unpublished data).

See pp. 28--51 in the AMA Manual of Style [9th Edition] for expressing various sources of reference. Modify the formatting for AJTMH as follows:

Authors' names. Never use et al. in the references or text. All authors must be listed in the following format:

First author's last name (no comma) single space, his or her initial(s) without periods (no full stops until after the year), comma, single space, next author(s) in the same format until all have been listed. After the final author's initial(s), comma, single space, insert the year of publication, period (full stop).

Year of publication. At AJTMH, contrary to AMA Style, the year of publication always follows the comma after the last author's initial(s).

Journal abbreviation. Consult Index Medicus for the correct abbreviation of the journal cited. The journal abbreviation, the volume number, and the colon are all italicized. The colon is followed by a space before the page numbers. The page numbers are both written in their entirety, separated by 2 hyphens (en dash).

Spacing between sentences. Use one space only.

Spelling. Use American spelling except in the references where spelling and punctuation follow the original citation.

Chagas disease. No apostrophe as per the current CDC standard usage. Bed net.

Possum is the correct word for opossum in Australia.

Superscripts and subscripts. Use your software to create a true superscript or subscript. Insert superscripts correctly, after the punctuation with no space in between.^{2,3,6--8} Here, there are no spaces between the reference number 2, the comma, the 3, or the 6--8 of the superscript. For serial references of 3 or more, insert 2 hyphens between numbers. For example: Other studies reported that opossums usually inspect triatomines both manually and visually before ingesting them.^{1, 6--8,11} For subscripts follow same procedure, check the Subscript box.

Symbols. A minus sign itself should be used, not a hyphen.

Time. Time of day. Use AM and PM.

Time. sec = second(s), msec = millisecond(s); hr = hour(s); yr = year(s); d = day(s).

Plurals of years have no apostrophes. 1940s. 1800s.

Units of measure. Abbreviate in the Methods section, but not in the abstract, introduction and results (unless describing a procedure), and discussion.

Abbreviations.

Weights and measures.

g = gram and is always lower case, mg, µg. kilogram = kg.

L = liter. Use the word "liter" for liter when it is mentioned alone in the text. Use a capital L for liter in the instance of g/L and in conjunction with m (milliliter = mL), µ (microliter = µL), and d (deciliter = dL).

Note that if designations are followed by numerals or letters, capitalize them: i.e., when particular day(s), week(s), site(s), lane(s), subject(s), group(s) and similar designations are followed by numbers or letters (Day 6; Weeks 1--7. Site 15, Lanes A--D; Subjects A2 and A5, Genotype A). When designating without a following number, use the third day, the fifth week, second subject, etc.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)