

KATIANY ROCHA GALO

**FREQÜÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI - *Borrelia burgdorferi* EM
EQÜINOS NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM,
ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Adivaldo H. da Fonseca

BELÉM-PARÁ
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
NÚCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA –
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

KATIANY ROCHA GALO

**FREQÜÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI - *Borrelia burgdorferi* EM
EQÜINOS NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM,
ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Aivaldo H. da Fonseca

BELÉM - PARÁ
2006

Galo, Katiany Rocha

Frequência de anticorpos anti – *Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará / Katiany Galo; orientador, José Diomedes Barbosa Neto.- Belém: [s.n.], 2006.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2006.

1. Equino – Doenças - Belém. 2. Doença de Lyme. 3. Sorologia. I. Título.

CDD 636.089692

Semeia um pensamento e colherás um desejo; semeia um desejo e colherás a ação;
semeia a ação e colherás um hábito; semeia o hábito e colherás o caráter.

(Tihamer Toth)

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio e incentivo
que sempre me deram nos caminhos que escolhi.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e guiar meu caminho.

A toda minha família, pelo apoio e carinho, mesmo estando longe de casa.

Ao Professor Dr. José Diomedes Barbosa Neto, pela orientação, por seu exemplo profissional, pelo estímulo e principalmente pela confiança dada em nosso trabalho.

Ao Professor Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca por me dar a oportunidade de partilhar e aprender seus conhecimentos. Por ter disponibilizado o Laboratório de Doenças Parasitárias, o antígeno e os soros controles positivos e negativos.

A Universidade Federal do Pará por oferecer este curso de Pós Graduação.

Ao Órgão financiador (CAPES), pela concessão da bolsa durante todo o curso.

Ao Professor Dr. Washington Pereira que foi a pessoa que mais me incentivou a fazer o mestrado.

Ao Professor Dr. Cláudio Vieira pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Professora Dra. Hilma Lúcia pelas sugestões, críticas construtivas e apoio durante todo o trabalho e por ter concedido o Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades dos Animais para a centrifugação e armazenagem das amostras.

Ao Wilson Santos por ter disponibilizado algumas de suas amostras. A Hertel Barros e a Bianca Santos pelo apoio durante a centrifugação dos soros.

Aos estagiários, funcionários e professores do CEDIVET: Alcides Sarmiento, Alda Torres, Carlos Magno, Débora Marquiori, Natália Silva, Josinéia Sena, Tatiane Teles e Valéria Cerqueira pelo convívio e colaboração durante as coletas.

A toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial a Renata Madureira, que acompanhou cada passo das análises.

A Polícia montada de Belém e Castanhal que disponibilizaram os animais da cavalaria. Em especial ao Tenente Coronel Polaro, Capitã Gláucia e ao Major Warner.

Aos médicos veterinários e colegas da ADEPARÁ Adriano Villar, Jonh Cordeiro, Márcia Gomes, Sônia Carvalho, Sérgio Medeiros e Vanessa Souza, que entraram em contato com os proprietários para que eu pudesse realizar as coletas sanguíneas.

Aos proprietários e funcionários das propriedades que disponibilizaram os animais e me auxiliaram colaborando com o manejo dos animais.

Ao meu namorado e companheiro de todas as horas Fernando, pelo incentivo dado em todos os momentos.

A tia Ana e toda sua família por me oferecerem um ambiente alegre e familiar.

A minha vizinha Lucimar (in memoriam) que nos deixou antes que concluísse esse trabalho. Pelo incentivo, apoio, carinho e orações durante toda essa caminhada.

Ao Leonardo pelas traduções, indispensáveis para elaboração deste trabalho.

A Coordenadoria do curso pelo apoio e estímulo. Ao Rodrigo, pela amizade e incentivo.

A Luna Elmescany e a Lena Cláudia Batista, pelas impressões dos trabalhos e por fazerem parte da minha vida.

Aos meus colegas do curso pelos momentos de descontração e companheirismo especialmente Adriana Maciel, Andréa Kristina, Israel Renato, Michelle Queiroz, Nilson Bezerra, Rosilene Assunção e Vitória Seixas.

Aos animais, seres nobres que fazem parte da minha vida, todo meu apreço e sincero agradecimento.

A todos aqueles que não foram citados, mas que ajudaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2- OBJETIVO	15
2.1 - OBJETIVO GERAL	15
2.2 - OBJETIVO ESPECIFICO	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 - <i>Borrelia</i> spp	16
3.2 - BORRELIOSSE DE LYME E BORRELIOSSE DE LYME SIMILE	18
3.2.1 – Borreliose de Lyme símile em animais	23
3.2.2 – Diagnóstico	26
4- MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 - ANIMAIS	29
4.2 - COLHEITA DAS AMOSTRAS	30
4.3 - LOCAL DE EXECUÇÃO	31
4.4 - OBTENÇÃO DO ANTÍGENO	31
4.4.1 - <i>Borrelia burgdorferi</i>	31
4.4.2 – Obtenção do controle positivo e negativo	31
4.5 - ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) INDIRETO	32
4.5.1 - Anticorpos homólogos contra <i>Borrelia burgdorferi</i>	32
4.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 – RESULTADOS	35
6 – DISCUSSÃO	41
7- CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de Borrélias causadoras da Borreliose de Lyme e Borreliose de Lyme símile distribuídas no mundo e seus respectivos vetores.....19

Tabela 2: Relação dos municípios de origem dos eqüinos estudados e respectivos número de amostras de soros coletados.....29

Tabela 3: Frequência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, determinado pelo ELISA indireto.....36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Mapa do Estado do Pará, mostrando em destaque os municípios de origem dos eqüinos estudados.....29
- Figura 2: Representação esquemática da disposição dos soros testes adicionados à placa para o ELISA indireto.....33
- Gráfico 1: Porcentagem de eqüinos (n=300) positivos e negativos para anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, determinado pelo teste ELISA indireto.....35
- Gráfico 2: Freqüência sorológica de anticorpos homólogos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto à função, determinado pelo ELISA indireto.....36
- Gráfico 3: Freqüência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto a faixa etária, determinado pelo ELISA indireto.....37
- Gráfico 4: Freqüência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300), da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto à raça, determinada pelo ELISA indireto.....38
- Gráfico 5: Freqüência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto ao sexo, determinado pelo ELISA indireto.....39
- Gráfico 6: Freqüência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto aos municípios, determinado pelo ELISA indireto.....40

LISTA DE ABREVIATURAS

BSK - Barbour, Stoenner e Kelly

CEDIVET – Centro de Diagnóstico Veterinário

D.O. – Densidade Óptica.

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFA – Imunofluorescência Indireta

IgG – Imunoglobulina tipo G

IgM – Imunoglobulina tipo M

LIDEA - Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades dos Animais

PBS – Tampão Salino Fosfatado

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

PNPP – Para-fenil-fosfato de Sódio

PSI – Puro Sangue Inglês

SAS – Statistical Analysis System

TE - Transferência de embrião

UFPA - Universidade Federal do Pará

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

RESUMO

A Borreliose de Lyme é uma doença multissistêmica causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi latu sensu* e transmitida por carrapatos ixodídeos, acometendo seres humanos e animais domésticos, tendo como reservatórios naturais os animais silvestres, sendo ainda considerada uma zoonose de ampla distribuição geográfica. Foram coletadas 300 amostras sanguíneas de eqüinos aparentemente saudáveis, procedentes dos municípios de Ananideua, Belém, Benevides, Castanhal, Marituba e Santa Izabel do Pará da mesorregião metropolitana de Belém – Pará. O sangue foi coletado pela veia jugular e os soros foram analisados através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto no Laboratório de Doenças Parasitárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O objetivo do trabalho foi verificar a soroprevalência da *Borrelia burgdorferi* na mesorregião metropolitana de Belém. A frequência de soropositividade foi de 26,67% (n=80), sendo 72 (24%) com título de 1:800, seis (2%) a 1:1600 e dois (0,6%) a 1:3200. A soropositividade entre os sexos foram valores aproximados sendo 13,67% nas fêmeas e 13% nos machos. A frequência entre os animais de raças e mestiços foram 9% e 18%, respectivamente. Não houve diferença significativa de animais soropositivos quanto aos municípios, sexo, raça e faixa etária. A frequência encontrada corrobora a hipótese da ocorrência de *Borrelia* sp. na região estudada.

Palavras-chave: *Borrelia burgdorferi*, Borreliose de Lyme, Eqüinos, Sorologia, ELISA.

ABSTRACT

Lyme borreliosis is a multisystemic disease caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* and transmitted by ixodid ticks, affecting both humans and domesticated animals and having wild animals as its natural reservoirs, besides of being a zoonosis of wide geographic distribution. We picked 300 blood samples of apparently healthy horses from the cities of Ananideua, Belém, Benevides, Castanhal, Marituba and Santa Izabel of the Pará, all included in the metropolitan mesoregion of Belém – Pará. The samples were picked up by the jugular vein and the serum analysed through indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Laboratory of Parasitic Diseases of the Federal Rural University of Rio de Janeiro. The aim of this work was to verify the serum epidemiology of *Borrelia burgdorferi* in the metropolitan mesoregion of Belém. The frequency of serum positivity was 26,67% (n=80), being 72 (24%) with titre of 1:800, six (2%) with 1:1600 and two (0,6%) with 1:3200. The serum frequency by gender was approximately 13,67% of females and 13% of males. The thoroughbred and the half-breed animals had 9% and 18% of frequency, respectively. There was no significant difference in the serum positivity with regard to cities, gender, race and age. The frequency found corroborates the hypothesis of occurrence of *Borrelia* sp. in the studied region.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, Lyme borreliosis, Horses, Serology, ELISA.

1. INTRODUÇÃO

O efetivo rebanho equino no estado do Pará é de aproximadamente 282.835 animais (IBGE, 2004), sendo que a maioria é proveniente de áreas rurais com a presença de animais mestiços para trabalho, apresentando também animais de raça para competições e exposições.

A intensa atividade agropecuária no Brasil, o convívio do homem com animais domésticos e a valorização de atividades ao ar livre favorecem a disseminação de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos, propiciando o surgimento e ressurgimento de diferentes agentes etiológicos (MASSARD e FONSECA, 2004).

As doenças parasitárias constituem um dos grandes causadores de perdas econômicas à atividade pecuária, podendo ser considerado um dos mais graves problemas de ordem sanitária à pecuária nacional. Essas enfermidades causam elevados prejuízos econômicos em decorrência do baixo desempenho dos animais, impossibilidade de trânsito para outras áreas do país e principalmente para outros países, mortalidade e alto custo do tratamento de animais acometidos (CAVALCANTE, 2002).

Borreliose é uma enfermidade causada por hemoparasitas do gênero *Borrelia* e acometem diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem. Ocorre em todos os continentes e de acordo com a espécie, pode determinar patologias severas levando inclusive a óbito (SOARES et al., 2000; BENNETT, 1995).

A borreliose de Lyme e a borreliose de Lyme símile são importantes infecções transmitidas aos humanos pelos carrapatos. Os sinais clínicos incluem erupções de pele no local de fixação do carrapato, seguida, na ausência de tratamento, por artrite, dor muscular e anormalidades cardíacas ou neurológicas. Uma variedade de pequenos animais silvestres, incluindo camundongos, ratos silvestres, porco-espinho, lagartos e aves podem agir como

hospedeiros reservatórios (QUINN et al., 2005). As aves migratórias além de infectar-se com a *Borrelia* sp. são capazes de disseminar larvas e ninfas infectadas a longas distâncias. Animais domésticos como cães, gatos, cavalos, bovinos, além de contraírem a infecção, são disseminadores de carrapatos infectados para o ambiente peridomiciliar, e a sorologia realizada nesses animais contribui no mapeamento das áreas de risco para a borreliose de Lyme (YOSHINARI et al, 1997).

A transmissão de *Borrelia* spp se dá pela picada de carrapatos ou piolhos, os quais inoculam saliva infectada nos hospedeiros vertebrados contaminando-os, e pode ocorrer também de forma passiva através do líquido coxal (SOARES et al., 2000). A persistência dessas bactérias patogênicas em uma região depende da presença de hospedeiros reservatórios adequados para borrelíias e de hospedeiros de manutenção para carrapatos (QUINN et al., 2005).

Seu diagnóstico é um procedimento difícil, pois as manifestações clínicas são similares a outras doenças e o imunodiagnóstico necessita de padronização para cada espécie animal na região estudada (PARKER e WHITE, 1992). No entanto, o estudo da borreliose de Lyme no Brasil, tem sido realizado através de análises sorológicas, sendo o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto, a técnica empregada (SALLES et al., 2002). Outros métodos empregados como Imunofluorescência, Immunoblotting e a Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) constituem suporte para o diagnóstico da doença de Lyme (GRODZICKI e STEERE, 1988; LIENBLING et al., 1993).

2. OBJETIVO

2.1 - OBJETIVO GERAL

Estudo soropidemiológico de *Borrelia* spp em eqüinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará.

2.2 - OBJETIVO ESPECÍFICO

Investigar a frequência de eqüinos soropositivos para anticorpos da classe IgG, homólogos contra *Borrelia burgdorferi* latu sensu através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto em seis municípios da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - *Borrelia* spp

As espécies patogênicas deste gênero podem colonizar fluidos de seus hospedeiros, inclusive o sangue de animais (BARBOUR e HAYES, 1986) e do homem (FELSENFELD, 1965). São bactérias gram negativas, microaerófilas e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993). Pertencente a ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae, a diferenciação morfológica entre as borrelíias e os demais gêneros desta família pode ser realizada pela morfometria, uma vez que estas são as maiores delas, e através de microscopia eletrônica, pela visualização dos flagelos, na qual as borrelíias possuem maior número de flagelos periplasmáticos (15-20) e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994). Outra diferença importante é o baixo conteúdo de guanina e citosina no DNA genômico das borrelíias, além das características biológicas e bioquímicas (QUINN et al., 2005).

Estas bactérias crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais, coram-se facilmente pelos corantes derivados da anilina e Romanovski e podem ser visualizadas através de microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou ainda em tecidos, quando por colorações à base de prata (BARBOUR e HAYES, 1986; QUINN et al., 1994).

As borrelíias conhecidas determinam cinco grupos de enfermidades distintas: (1) febre recorrente humana, ocasionada pelo grupo *Borrelia recurrentis* Lebert, 1874, “latu sensu”; (2) Borreliose aviária, determinada pela espécie *Borrelia anserina* Sakharoff 1891; (3) Espiroquetose bovina, causada por *Borrelia theileri* Laveran, 1903; (4) Borreliose de Lyme, ocasionada pelo grupo *Borrelia Burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner, 1984 “latu sensu”, com nove genoespécies definidas e uma genoespécie não nomeada; (5)

Aborto epizoótico bovino, causada por

citocinas, contribui para o desenvolvimento das lesões (ROBERTS et al., 1998; SPRENGER et al., 1997; STRAUBINGER et al., 1997).

O tempo de fixação do carrapato no hospedeiro é relevante quanto à eficiência na transmissão. Estudos demonstraram que para os ixodídeos é necessário um tempo superior a 48 horas (PIESMAN et al., 1987; FALCO e FISH, 1988, 1989; FALCO et al., 1995), enquanto que para os argasídeos o tempo de fixação não é relevante (DODGE, 1973; HOOGSTAL, 1985; SMITH et al., 1985).

3.2 - BORRELIOSE DE LYME E BORRELIOSE DE LYME SIMILE

A borreliose de Lyme é uma doença multissistêmica do homem e dos animais domésticos causado pela espiroqueta *B. burgdorferi* (COHEN, 1996). Também conhecida como espiroquetose ou doença de Lyme, é a mais importante das borrelioses por ser uma doença de caráter sistêmico e por se tratar de uma zoonose, tendo como vetor os carrapatos da família Ixodidae e, experimentalmente, carrapatos Argasídeos, insetos hematófagos ou ainda, por contato direto entre roedores (BURGESS et al., 1986b; BUTTER e DENMARK, 1990).

O complexo *Borrelia burgdorferi lato sensu* inclui grupo com grande número de agentes infecciosos causadores de doenças capazes de comprometer vários órgãos (ABELE e ANDER, 1990). As borrelioses do “complexo Lyme” têm distribuição geográfica universal (Tabela 1), sendo que, já foi descrita na América do Norte, América Central, América do Sul, Ásia, África, Europa e Austrália (SOARES et al, 2000).

Tabela 1: Espécies de Borrélias causadoras da Borreliose de Lyme e Borreliose de Lyme símile distribuídas no mundo e seus respectivos vetores.

Doenças	Espécies de <i>Borrelia</i>	Vetores	Distribuição
Borreliose de Lyme	<i>B. burgdorferi</i>	<i>Ixodes</i> sp.	América do Norte e Europa
	<i>B. garinii</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Europa e Ásia
	<i>B. afzelli</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Europa e Ásia
Borreliose de Lyme símile nos Estados Unidos	<i>B. andersoni</i>	<i>Ixodes</i> sp.	América do Norte
	<i>B. lonestari</i>	Amblyomma	América do Norte
Borreliose de Lyme na Europa e na Ásia	<i>B. barburii</i>	<i>A. americanum</i>	América do Norte
	<i>B. bissetii</i>	<i>Ixodes</i> sp.	América do Norte
	<i>B. valaisiana</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Europa
	<i>B. lusitaniae</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Europa
	<i>B. turdii</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Ásia
Borreliose de Lyme símile no Brasil	<i>B. tanukii</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Ásia
	<i>B. miyamotoi</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Ásia
	<i>B. japonica</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Ásia
Borreliose de Lyme símile no Brasil	<i>Borrelia</i> sp	<i>Amblyomma</i>	Brasil

Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2005).

O primeiro relato da borreliose de Lyme foi reportado em humanos na Alemanha por Buchwald (1883), onde descreveu uma atrofia difusa de pele de caráter idiopático. No entanto, em 1902 foi denominada de Acrodermite Atrófica Crônica (HERXHEIMER e HARTMANN, 1902). Em 1910, foi possível observar que essa lesão estava associada à picada do carrapato *Ixodes ricinus*, referindo-a como eritema migratório (AFZELIUS, 1910). Em 1913, Lipschuz introduziu o termo eritema migratório crônico, por observar que a lesão manifestava-se por mais de sete meses (BURGDORFER, 1993). Porém, foi em 1977 que o Dr. Allen C. Steere, nos Estados Unidos da América, identificou um grupo de crianças apresentando doença reumatóide juvenil associado ao eritema migratório na comunidade de

Lyme (Connecticut - EUA) e denominou a enfermidade de artrite de Lyme ou doença de Lyme, uma desordem multissistêmica de agente desconhecido (STEERE et al., 1977).

Em 1982, o pesquisador W. Burgdorfer isolou o agente casualmente em carrapatos da espécie *Ixodes dammini*, atualmente denominado *I. scapularis* (BURGDOFER et al., 1982) que posteriormente foi denominada de *Borrelia burgdorferi* (JOHNSON et al., 1984).

No Brasil, os primeiros relatos de borreliose de Lyme, sem confirmação clínica foram diagnosticados em humanos que apresentavam quadros dermatológicos (FILGUEIRA et al., 1989). Já em relação aos animais, o primeiro relato foi verificado por Fonseca em estudo da ocorrência de anticorpos anti *B. burgdorferi* “lato sensu” em bovinos e detecção de antígenos circulantes em cães no Rio de Janeiro (FONSECA et al., 1994).

Atualmente é difícil estimar o número de casos de borreliose de Lyme, desde a descoberta do agente causador da doença até hoje, no qual houve grande intensificação nas pesquisas em todo mundo. Na Colômbia, estudos realizados em indivíduos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença de Lyme, utilizando o ensaio ELISA e Western blotting com soro e fluido cerebral observou que a espiroqueta existente naquele país é de genoespécie distinta da *B. burgdorferi* lato sensu ou é de gênero distinto de *Borrelia* (PALÁCIOS et al., 1999).

No México, através de inquérito sorológico realizado em soros humanos, revelou que apenas 1,1 % das pessoas foram positivas para *B. burgdorferi*, havendo necessidade de isolamento da bactéria a fim de se demonstrar conclusivamente a presença de infecção naquele país (GORDILLO et al., 1999). Já na Argentina, estudo soroepidemiológico realizado em trabalhadores rurais com sintomas de artrite, demonstrou que sobre um total de 28 soros analisados, três resultaram positivos, mostrando que anticorpos anti- *B. burgdorferi* se encontram naquela população (STANCHI e BALAGE, 1993).

Trabalhos realizados em humanos no Brasil demonstraram pacientes sorologicamente positivos para IgM e IgG contra *B. burgdorferi* com a sintomatologia clínica compatível para doença de Lyme (YOSHINARI et al., 1993a; 1993b; 1997; 2003). Sendo que, em 2000, a borreliose de Lyme em humanos no Brasil foi denominada de doença de “Lyme-símile” (YOSHINARI et al., 2000). Porém, atualmente, é chamada de Síndrome Infecto Reacional Lyme símile, pois a apresentação clínica é multiforme e embora a etiologia inicial seja infecciosa, existem evidências de manifestações clínico-laboratoriais de cunho alérgico e autoimune (YOSHINARI e MANTOVANI, 2006).

No Brasil a borreliose de Lyme é considerada uma zoonose emergente e a identificação de pacientes com novas suspeitas clínicas está crescendo rapidamente, como observado por Yoshinari et al. (2003) que verificou a existência de co-infecção com agentes da borreliose de Lyme e babesiose na população do município de Cotia – SP. Estudos dessa enfermidade em humanos também já foram realizados em outros estados como Mato Grosso do Sul (COSTA et al., 1996; COSTA et al., 2001), Rio de Janeiro (AZULAY et al., 1991) e Amazonas (TALHARI et al., 1992).

Apesar dos relatos de Borreliose de Lyme identificados no Brasil, ainda não foi possível isolar a *Borrelia* sp devido a exigência nutricional desta espiroqueta (SOARES et al., 2000; ABEL et al., 2000), além da alta frequência de contaminação por fungos e outras bactérias no meio BSK, mesmo quando adicionado a antibióticos (OLIVEIRA, 2000). Porém, já foram visualizados microorganismos semelhantes a *Borrelia* sp em culturas de soro humano, gambás, roedores silvestres, bovinos e culturas de carrapatos. E testes realizados com cepas européias (*B. garinii* e *B. afzelli*) e norte americana (*B. burgdorferi*), comparadas com *Borrelia* sp. existentes em nosso meio, concluiu-se que os microrganismos verificados no Brasil são distintos das anteriormente citadas (YOSHINARI et al., 1997).

Recentemente, foi possível verificar através de esfregaço sangüíneo com visualização microscópica, espiroquetídeo que possuía formas típicas de *Borrelia theileri* em bubalinos no município de Castanhal, Estado do Pará, constatando o primeiro relato de infecção por *Borrelia* sp. em *Bubalis bubalis* no Brasil (SCOFIELD et al., 2005).

Os principais vetores envolvidos na transmissão da doença são representados pelas espécies *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* nos E. U. A, *Ixodes ricinus* na Europa e *Ixodes persulcatus* na Ásia (YOSHINARI et al, 1995). No Brasil, os prováveis carrapatos responsáveis pelo ciclo silvestre pertencem ao gênero *Ixodes*, enquanto o gênero *Amblyomma* estaria implicado na transmissão a animais domésticos e seres humanos (SOARES et al, 2000; ABEL et al, 2000; YOSHINARI et al, 2003). Apesar da *B. burgdorferi* ter sido demonstrada em outras espécies de carrapatos, mosquitos e pulgas, somente carrapatos ixodídeos têm sido epidemiologicamente relacionados com a transmissão da doença (COHEN, 1996).

Os sintomas da borreliose de Lyme no homem aparecem com uma condição inflamatória multissistêmica não contagiosa, sendo o sítio da picada do carrapato infectado porta de entrada para o agente etiológico. Os primeiros sintomas podem aparecer dias ou semanas após a exposição do agente e consistem num eritema migratório, linfadenite localizada, glomerulonefrite por deposição de imunocomplexo, mal estar, fadiga, cefaléia, rigidez da nuca, dores musculares e articulares, podendo evoluir para artrites e patologias nervosas e circulatórias mais graves, se a doença não for diagnosticada logo no início (COYLE, 1993).

3.2.1 – Borreliose de Lyme símile em animais

Muitas espécies de animais domésticos são suscetíveis à infecção por *B. burgdorferi*, geralmente os animais infectados parecem clinicamente normais. A susceptibilidade para a doença clínica parece variar em cada espécie, sendo que os sinais clínicos mais frequentes incluem laminite e aumento do volume articular (BUSHMICH, 1994).

Os animais domésticos atuam como carreadores e reservatórios de vetores às áreas domiciliares (ANDERSON, 1988), enquanto os silvestres caracterizam-se como reservatórios naturais, não apresentando sintomatologia clínica (SOARES et al., 2000). Os principais reservatórios de microrganismos na natureza são os roedores, marsupiais, canídeos, cervídeos e aves. O homem geralmente infecta-se acidentalmente ao invadir o ecossistema contaminado ou entrando em contato com animais portadores de carrapatos (MATHER et al., 1994; YOSHINARI et al., 1995).

No Brasil estudos demonstram que os marsupiais podem participar na epidemiologia da borreliose de Lyme (YOSHINARI et al., 1995; 1997; BATTESTI et al., 1997), sendo observado espiroquetas com características morfológicas de *Borrelia* sp. em sangue periférico de *Didelphis (marsupialis) aurita* (FONSECA et al., 1995; ABEL, 1996).

O primeiro relato de borreliose em cães foi descrito em área endêmica para a doença de Lyme nos E.U.A., onde através da cultura de sangue foi possível isolar a espiroqueta e no exame sorológico apresentou positivo para *Borrelia* sp. (LISSMAN et al., 1984). Em 1986, Burgess considerou os cães como importantes reservatórios de *B. burgdorferi* depois que isolou espiroquetas nesses animais (BURGUESS, 1986a).

Os principais transmissores são carrapatos infectados do gênero *Ixodes* (SOARES et al., 2000), no entanto, as espécies podem ocorrer por *Demacentor variabilis* ou *Amblyomma*

americanum (MATHER et al., 1994). Experimentalmente em cães da raça beagle foi demonstrado que a transmissão de *B. burgdorferi* pode ocorrer de forma intra-uterina (GUSTAFSON et al., 1993). Os sintomas clínicos primários envolvem síndrome músculo-esquelético, artrite progressiva, febre, letargia, cardiopatia com bloqueio átrio-ventricular e alteração de ritmo cardíaco (GREENE, 1990; CERRI et al., 1994).

Em felinos, há poucos estudos sobre a borreliose. A espiroqueta relacionada a *Felis catus* é a *B. burgdorferi* sendo sua incidência, mesmo em áreas enzoóticas muito baixa (APPEL, 1990; MAGNARELI et al., 1990). Acredita-se que os felinos sejam mais resistentes para o desenvolvimento dos sinais clínicos da Borreliose de Lyme que os cães (APPEL, 1990).

Em bovinos a infecção assintomática é tão comum como em outras espécies de animais domésticos. Quando presente, a doença clínica usualmente ocorre como problema no rebanho, onde os bezerros são severamente afetados. Na doença aguda, os bovinos geralmente apresentam febre, aumento do volume articular e diminuição na produção de leite. Em casos crônicos há perda de peso, laminite e aborto (PARKER e WHITE, 1992). Estudos na Europa relatam a ocorrência de dermatite digital ocasionada por *B. burgdorferi* (BLOWEY et al., 1994; GRUND et al., 1995).

Estudos feitos por Burgess (1988) mostraram que a transmissão por via oral e através de dípteros hematófagos pode ser possível, já que isolaram *B. burgdorferi* na urina e colostro de bovinos, local onde não havia presença de *I. damminis*. *B. burgdorferi* também tem sido demonstrada, embora raramente, em sangue, leite, fluido sinovial e tecido de feto abortado de vacas leiteiras infectadas (BUSHMICH e POST, 1992; BURGUESS et al., 1993).

A borreliose de Lyme em equinos só está bem definida nos EUA, demonstrando positividade de 12 a 75% entre animais assintomáticos (MARCUS et al., 1985; COHEN et al., 1988; BERNARD et al., 1990; PARKER e WHITE, 1992; COHEN et al., 1992). Carter et al.

(1994) observaram alta frequência de anticorpos em eqüinos, sendo que a maioria não apresentou sinais clínicos para borreliose de Lyme. No entanto, Marcelis et al. (1987) caracterizaram os eqüinos como reservatórios para *B. burgdorferi*, observando também que a infecção por essa espiroqueta nesses animais levava a quadro clínico.

Estudos realizados no Rio de Janeiro demonstraram que a resposta humoral de eqüinos apresentou reconhecimento antigênico para *B. burgdorferi* cepa G39/40 nos testes ELISA indireto e Western blotting), e a frequência de soropositivos reforça a hipótese da ocorrência de uma borreliose semelhante à borreliose de Lyme em eqüinos no Brasil (SALLES et al, 2002). A frequência de eqüinos positivos no estado do Rio de Janeiro foi de 28,1% para animais dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença (MADUREIRA, 2004).

Em eqüinos a infecção por *B. burgdorferi* produz sinais clínicos como perda de peso, claudicação esporádica, laminite, febre, aumento articular, enrijecimento muscular, uveíte anterior e sinais neurológicos como depressão, mudança de comportamento, disfagia, balanço de cabeça e encefalite (COHEN e COHEN, 1990; PARKER e WHITE, 1992). Em estudos feitos em áreas endêmicas para borreliose nos EUA, foi possível observar que animais sorologicamente positivos para *B. burgdorferi*, apresentaram hipersensibilidade da pele, com perda de pêlo e descamação nas áreas onde previamente havia carrapato fixado (MAGNARELLI et al., 1988a). Animais com idade avançada podem apresentar artrite e panuveíte (BURGESS et al., 1986c; MADIGAN, 1993). Sinais clínicos como dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites sugerem implicações para equideocultura (COHEN et al., 1988).

3.2.2 - Diagnóstico

Para se definir o diagnóstico da borreliose em animais deve-se associar a clínica, o histórico, a sorologia e os dados epidemiológicos, como é realizado em humanos (GOLIGHTLY, 1993; YOSHINARI et al., 1995).

Esfregaços sanguíneos periféricos corados pelo Giemsa e esfregaços confeccionados a partir de fragmento de tecido de carrapato como intestino, glândula salivar e ainda hemolinfa podem ser realizados para o diagnóstico da borreliose em animais (SOARES et al., 2000).

A recuperação e o isolamento de *Borrelia* sp. podem ser feitos através de filtração em microfiltros de 0,20 a 0,45µm (JOBE et al., 1993). No entanto, o cultivo e isolamento de *Borrelia* sp. apresentam limitações, visto que nem todas as espécies de *B. burgdorferi* latu sensu são de fácil cultivo (OLIVEIRA, 2000). No isolamento utilizam-se os meios de BSK, de Kelly, de Stoenner, ou similares aos quais semeia – se sangue, fragmentos de tecidos de hospedeiros ou de carrapatos, obtendo-se o crescimento de espiroqueta a 33° C em aproximadamente sete dias (KUIPER et al., 1994; LEBECH et al., 1995).

A imunohistoquímica é uma técnica pouco utilizada, pois se tem a dificuldade da obtenção de fragmentos de tecidos, mas que apresenta bons resultados, visto que, permite a observação de borrelia, a caracterização microscópica da lesão e ainda revela marcações antigênicas do patógeno no tecido (LEBECH et al., 1995).

O ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto tem sido o mais empregado e reconhecido para diagnosticar seguramente a borreliose levando-se em conta a qualidade do mesmo, a epidemiologia e os sinais clínicos. No entanto, o ensaio deve ser estabelecido para cada laboratório com os padrões de controle adequados, com título mínimo e linha de corte

(*cut-off*) seguros. Devendo-se evitar, portanto, os kits comerciais para o diagnóstico, devido às muitas reações cruzadas (MAGNARELLI & ANDERSON, 1988a).

Em animais, estudos de soroprevalência de borreliose são feitos por meio do ELISA indireto com antígeno sonicado total ou suas frações (SOARES et al., 2000). Em animais silvestres o ELISA é empregado na pesquisa para certificar animais sentinelas como roedores, cervídeos, marsupiais, carnívoros e aves (GILL et al., 1994; MAGNARELLI et al., 1995).

No Brasil o ensaio ELISA indireto para detecção de IgG anti *B. burgdorferi* já foi padronizado para bovinos, cães e equinos utilizando-se antígeno sonicado total de *B. burgdorferi* “stricto sensu” cepa G39/40 (ISHIKAWA, 1996; SOARES, 1998; SALLES, 2000). Estudos sorológicos foram realizados através deste ensaio, sendo estimada em 72,51% a frequência para anticorpos da classe IgG anti-*B. burgdorferi* em bovinos assintomáticos da região sudeste (ISHIKAWA, 1996), 20% em cães da baixada fluminense (SOARES et al., 1999), 48,25% em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro (ALVES et al., 2004) e em cães de áreas rurais do estado do Rio de Janeiro com 15,58% de positividade (O'DWYER et al., 2004); 9,80% de equinos no estado do Rio de Janeiro (SALLES et al., 2002) e 28,1% em equinos nos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, no estado do Rio de Janeiro (MADUREIRA, 2004).

Outros métodos de diagnóstico também são empregados como a imunofluorescência indireta, western blotting e a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). A imunofluorescência indireta é um ensaio subjetivo para ser empregado no diagnóstico de borrelioses e a maioria dos estudos revelou a superioridade do ELISA indireto, em termos de sensibilidade, especificidade e operacionalidade (STIERNSTEDT et al., 1985; GOLIGHTLY, 1993). Geralmente este ensaio pode ser utilizado para triagem ou, ocasionalmente, quando os dados clínicos e epidemiológicos ajudam no diagnóstico (BENNET, 1995).

O Western blotting tem sido empregado secundariamente como definição do resultado, em casos de dúvida no método ELISA. A problemática do imunoblotting é a obtenção do padrão positivo ideal (“gold standard”) pelos laboratórios, o que se torna difícil, exceto em caso de imunizações experimentais (ENGSTROM et al., 1995; SOOD et al., 1995). Em ensaios com soros humanos para a borreliose de Lyme, Grodzicki e Steere (1988) demonstraram a superioridade do blotting sobre o ELISA, pois essa técnica é mais sensível e específica, podendo ser usada para confirmar o ELISA (DRESSLER et al., 1993).

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é o mais preciso dos ensaios, pois garante o resultado específico através da amplificação do DNA do agente. Esta técnica tem sido empregada em fluidos e tecidos de humanos e de animais, e em fragmentos de carrapatos (LIENBLING et al., 1993, MOTER et al., 1994, ZBINDEN et al., 1994), estando ainda relacionada às manifestações clínicas e respostas sorológicas (LEBECH e HANSE, 1992; KARCH et al., 1994, MOURITSEN et al., 1996); a desvantagem é o custo muito oneroso.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – ANIMAIS

No período de agosto a novembro de 2005 foram colhidas e analisadas 300 amostras de sangue de eqüinos de diversas raças. Esses animais com idades que variavam entre sete meses e 23 anos provenientes de seis municípios (Tabela 2) da mesorregião metropolitana de Belém (Figura 1) distribuídos em 23 propriedades e de animais pertencentes a carroceiros.

Tabela 2: Relação dos municípios de origem dos eqüinos estudados e respectivos número de amostras de soros coletados.

Municípios de origem dos eqüinos	Número de amostras
Ananideua	25
Belém	61
Benevides	22
Castanhal	131
Marituba	11
Santa Izabel do Pará	50
Total	300

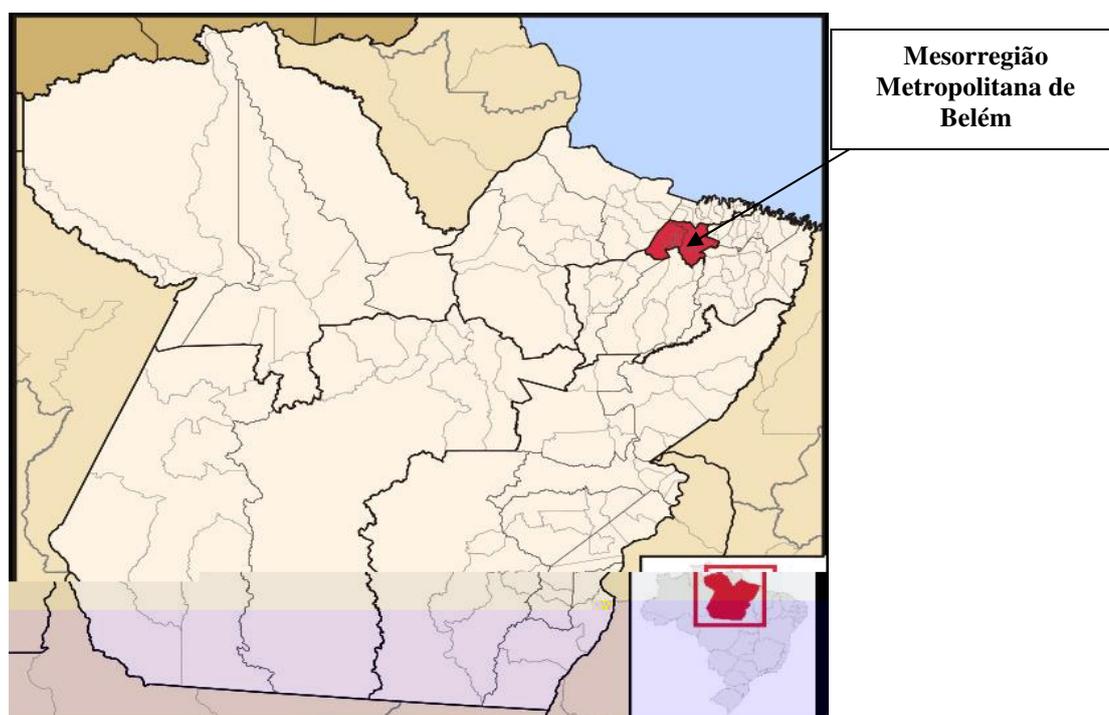


Figura 1: Mapa do Estado do Pará, mostrando em destaque os municípios de origem dos eqüinos estudados.

Foram registrados dados como identificação do animal, sexo, raça, idade, procedência, presença ou ausência de carrapatos, função e frequência do uso de medicamentos no controle de ectoparasitas através de um questionário (Anexo 1).

Os animais foram classificados de acordo com a faixa etária em dois grupos: de sete meses a sete anos e acima de sete anos. Quanto à função, os equinos foram divididos em duas categorias: os animais destinados ao esporte e ao trabalho. Os animais destinados ao esporte eram aqueles pertencentes a cavalaria da Polícia Militar do Pará utilizados para equoterapia, animais provenientes de haras destinados à vaquejada e exposição, além de animais para fins reprodutivos, como os utilizados para Transferência de Embriões (T.E.) ou para a produção de híbrido. E os de trabalho foram aqueles provenientes de carroceiros utilizados para tração ou de fazendas para manejo do gado.

4.2 – COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras de soro sanguíneo foram coletadas através da venopunção jugular, com agulha descartável 25 x 8 mm, após anti-sepsia com álcool iodado. Foram utilizados para tubos tipo “vacuttainer” colhendo-se um volume de aproximadamente sete mL. Após a colheita, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a retração do coágulo e transportadas até o Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades dos Animais (LIDEA) ou ao Centro de Diagnóstico Veterinário (CEDIVET - Castanhal) – Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foram submetidas a centrifugação (Centrífuga CELM®) a 3000 rpm durante 5 minutos para obtenção da fração sérica e posteriormente foram devidamente identificadas, aliquotadas em tubos tipo *ependorf* e armazenados à -20°C para posterior análise.

4.3 - LOCAL DE EXECUÇÃO

As análises sorológicas foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Projeto Sanidade Animal, convênio Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro /Embrapa.

4.4 - OBTENÇÃO DO ANTÍGENO

4.4.1 - *Borrelia burgdorferi*

O meio de Kelly modificado ou meio BSK (Barbour, Stoenner e Kelly), para cultivo de *B. burgdorferi* foi preparado segundo descrição original (BARBOUR, 1984).

O antígeno utilizado foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Aivaldo Fonseca do Laboratório de Doenças Parasitárias do Projeto Sanidade Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

4.4.2 – Obtenção do controle positivo e negativo

Os soros controle positivos e negativos utilizados foram doados gentilmente pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Projeto Sanidade Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para as análises.

4.5 - ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) INDIRETO

4.5.1 - Anticorpos homólogos contra *Borrelia burgdorferi*

As amostras coletadas foram analisadas através do ELISA indireto padronizado por Salles (2001).

Na realização do ensaio para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi latu sensu*, o antígeno de *B. burgdorferi stricto sensu* cepa G39/40 foi diluído a 20 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6, para a sensibilização de microplacas de poliestireno com 96 orifícios (M-4043, Sigma Chemical), que foram incubadas em câmara úmida a 4 °C "overnight".

Após sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 0,05% pH 7,4 (PBS T 20) e bloqueadas com soro de coelho diluído a 1% em PBS T 20, por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Posteriormente as placas foram lavadas como descrito anteriormente.

Os soros testes, bem como os oito soros controles negativos foram diluídos a 1:800, e o soro controle positivo foi diluído em série, a partir de 1:800 até 1:102400, todos em PBS T 20; esta etapa do ensaio foi incubada por 90 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente e lavada como a anterior. Foi adicionado às placas conjugado IgG de coelho anti IgG eqüina ligado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical) na diluição de 1:1000 em PBS T 20 e incubado por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. As placas foram forradas com a solução reveladora substrato para-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) (Sigma Chemical) diluído em tampão glicina pH 10,5 na concentração de 1mg/mL. Estas permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e momento de leitura em

espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Microplate Reader model 550, Bio-Rad Laboratories), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm (Figura 2). Em todas as fases do ensaio foram utilizados 200µL de solução por orifício. A linha de corte do ensaio foi estabelecida pela média aritmética dos valores de densidade óptica dos soros controles negativos mais três vezes o desvio padrão destes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Br	C-	C+	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1	1:800	AT									
B	Br	C-	C+	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	2	1:1600	AT									
C	Br	C-	C+	19	20	21	22	23	24	25	26	27
	3	1:3200	AT									
D	Br	C-	C+	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	4	1:6400	AT									
E	Br	C-	C+	37	38	39	40	41	42	43	44	45
	5	1:12800	AT									
F	Br	C-	C+	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	6	1:25600	AT									
G	Br	C-	C+	55	56	57	58	59	60	61	62	63
	7	1:51200	AT									
H	Br	C-	C+	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	8	1:102400	AT									

Figura 2: Representação esquemática da disposição dos soros testes adicionados à placa para o ELISA indireto.

Br : Branco

C- : Controle Negativo

C+ : Controle Positivo

AT : Antígeno teste

4.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foram utilizados os testes não paramétricos qui-quadrado e Fisher, por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1996). Os gráficos foram realizados no programa computacional Microsoft Excel.

5 - RESULTADOS

O exame sorológico de anticorpos da classe IgG anti - *Borrelia burgdorferi* analisados através do ensaio ELISA indireto mostrou que dos 300 equinos estudados, 26,67% (n= 80) foram positivos (Gráfico 1), sendo que 72 (24%) apresentaram título de 1: 800, seis (2,0%) título de 1:1600 e dois (0,6%) título de 1:3200, enquanto 220 (73,33%) soros foram negativos. A frequência e os títulos da análise sorológica estão representados na Tabela 3.

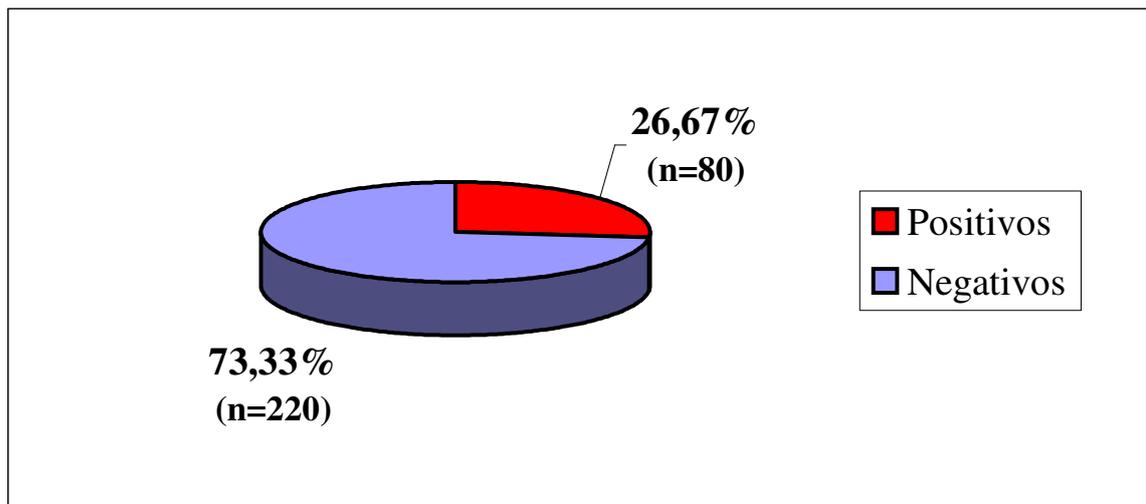


Gráfico 1: Porcentagem de equinos (n=300) positivos e negativos para anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, determinado pelo teste ELISA indireto.

Tabela 3: Frequência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, determinado pelo ELISA indireto.

Frequência				
Título	Positivos (n)	Relativa	Absoluta	Negativos (n)
1:800	72	90%	24%	-
1:1600	06	7,5%	2%	-
1:3200	02	2,5%	0,6%	-
Total positivos	80	100%	26,67%	-
		(80/80)	(80/300)	
Total	-	-	-	73,33%
Negativos				(220/300)

Na análise dos dados, verificou-se que, em relação à função dos animais (Gráfico 2), os animais destinados ao esporte apresentaram positivities de 8,67% (n=26) e os de trabalhos foi de 18% (n=54), não foi observada diferença significativa quanto aos testes de Qui-quadrado e Fischer.

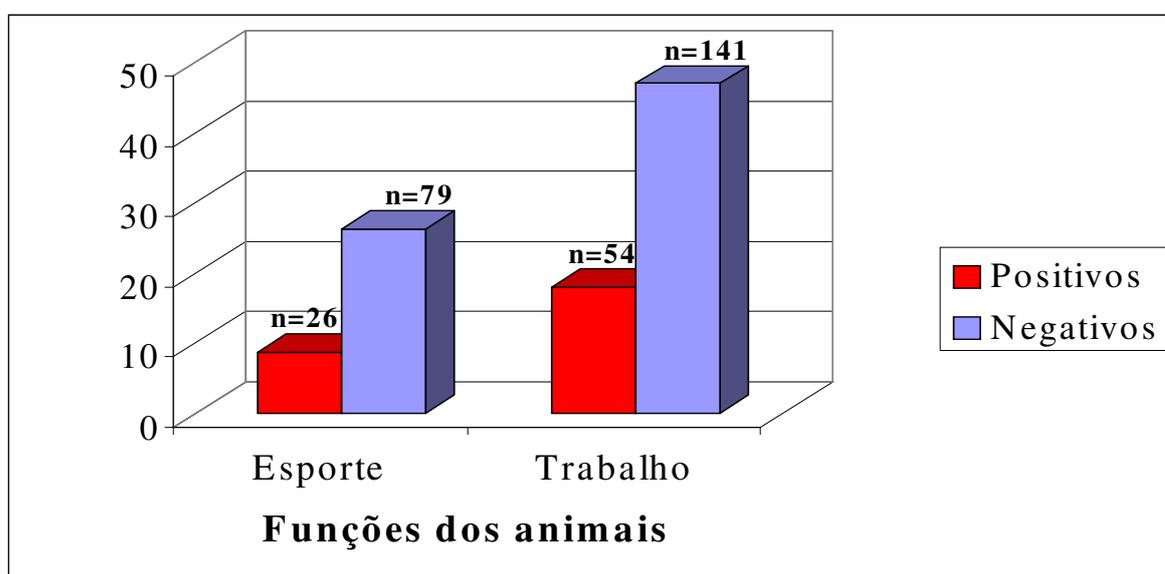


Gráfico 2: Frequência sorológica de anticorpos homólogos anti - *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto à função, determinado pelo ELISA indireto.

Quanto à faixa etária, dividida em dois grupos, foi observada a frequência de 16,33% (n= 49) dos animais de sete meses a sete anos de idade e de 10,33% (n=31) dos animais acima de sete anos, conforme observado no Gráfico 3. Não houve diferença significativa entre as diferentes idades nos testes de Qui-quadrado e Fischer.

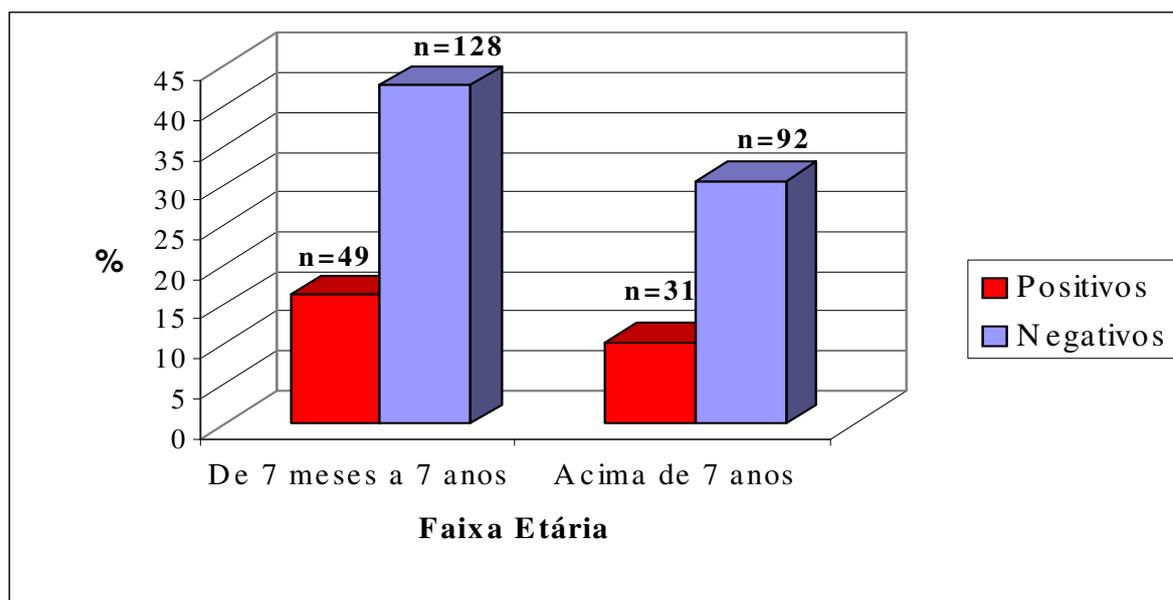


Gráfico 3: Frequência sorológica de anticorpos anti – *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto à faixa etária, determinado pelo ELISA indireto.

De acordo com as raças, não houve diferença significativa entre essas utilizando os métodos Qui-quadrado e Fischer, nas quais foram divididos em animais de raça e animais mestiços. As raças analisadas foram: Andaluz (n=1), Árabe puro (n= 9), Brasileiro de Hipismo (n=14), Manga Larga (n=55) Marajoara (n=10), Paint Horse (n=1), Pampa (n=1), Poney (n=1), Puro Sangue Inglês (n=3), Puruca (n=11), Quarto de Milha (n=13), totalizando 119 animais de raça e 181 equinos de raça não definida. Verificou-se que foram reagentes 9% (n= 27) dos animais de raça e 17,67% (n=53) dos animais mestiços, conforme observado no Gráfico 4.

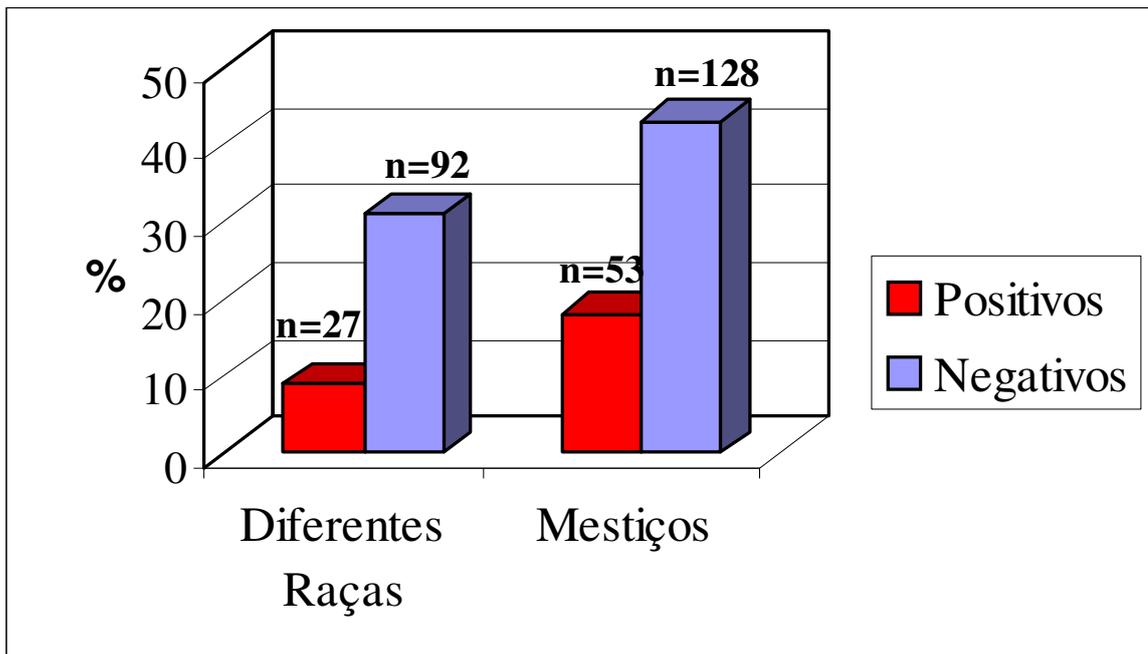


Gráfico 4: Frequência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=300), da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto à raça, determinada pelo ELISA indireto.

Quanto ao sexo, foram reagentes 13,67% (n=41) das fêmeas e 13% (n =39) dos machos, como observado no Gráfico 5, não havendo diferença significativa segundo os métodos de Fischer e Qui-quadrado.

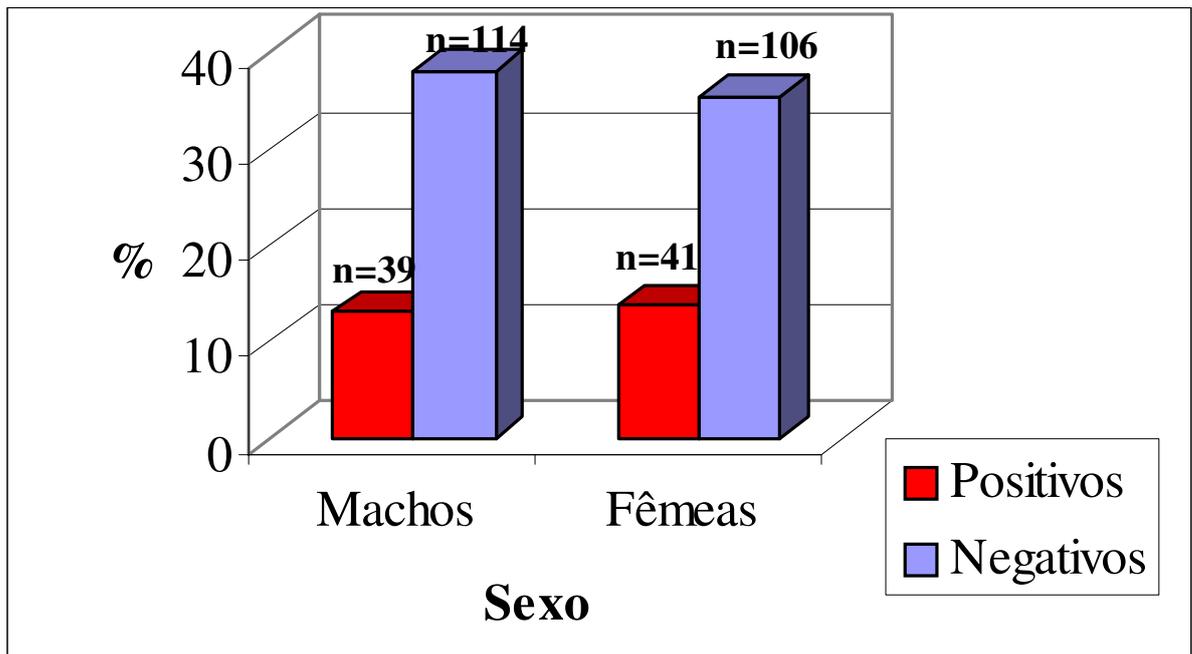


Gráfico 5: Frequência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto ao sexo, determinado pelo ELISA indireto.

De acordo com os municípios estudados, não houve diferença significativa nos testes Qui-quadrado e Fischer, sendo que em Ananideua a frequência foi de 4,00% (n= 12); 6,33% (n=19) em Belém, 0,67% (n= 02) em Benevides, 10,33% (n=31) em Castanhal, 0,67% (n=02) em Marituba e 4,67% (n=14) em Santa Izabel do Pará conforme observado no Gráfico 6.

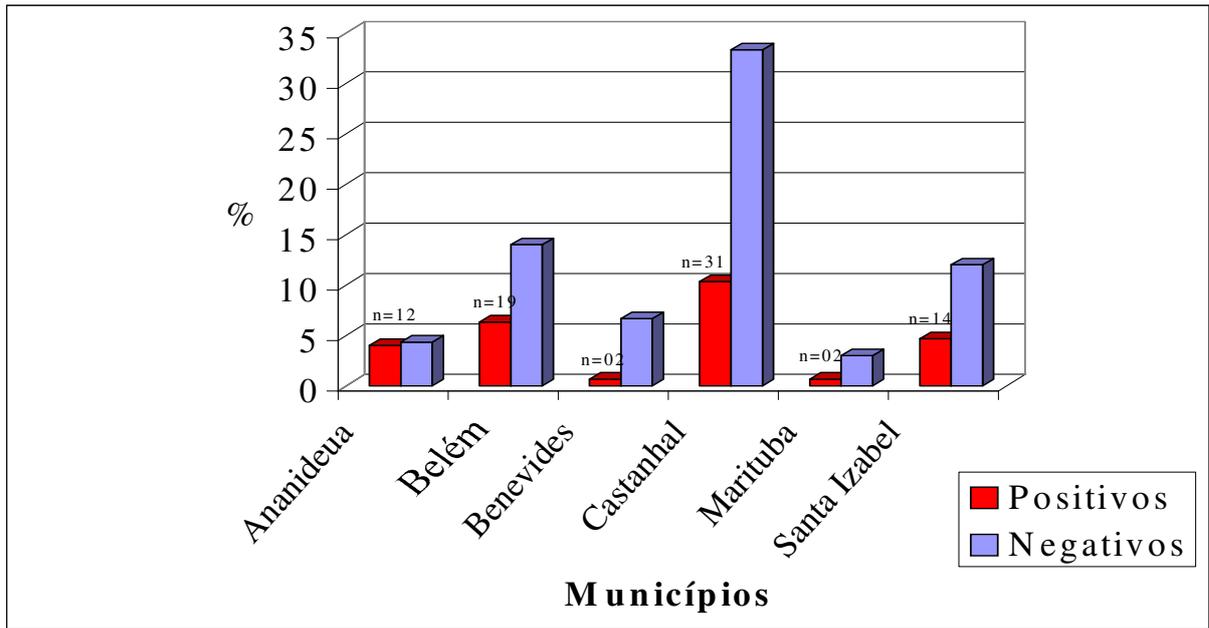


Gráfico 6: Frequência sorológica de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=300) da mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará, quanto aos municípios, determinado pelo ELISA indireto.

6 - DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos anti – *B. burgdorferi* 26,67% (80/300) encontrada no presente estudo foi superior ao observado por Salles et al. (2002), que ao analisarem 501 soros de eqüinos no Estado do Rio de Janeiro através do ensaio ELISA indireto, encontraram 9,8% (n=49) de animais positivos. No entanto, os resultados aproximam-se daqueles encontrados por Madureira (2004), que verificou 28,1% (216/769) de soropositividade em eqüinos provenientes dos municípios Três Rios, Vassouras e Valença, também no Estado do Rio de Janeiro. Além de apresentar resultados semelhantes com o que vem sendo reportado nos Estados Unidos da América, onde foram observadas soropositividade que variavam entre 12% e 75% em eqüinos ausentes de sintomatologia clínica para borreliose de Lyme (MARCUS et al., 1985; COHEN et al., 1988; BERNARD et al., 1990; COHEN et al., 1992; PARKER e WHITE, 1992).

No presente estudo, a maioria dos animais estava infestado por carrapatos, no entanto, não foi possível determinar quais as espécies existentes, e na maioria das propriedades não havia controle preventivo eficiente. Alguns faziam banhos carrapaticidas que variavam de semanal a mensal, outros só realizavam quando havia uma alta infestação de carrapatos.

Ishikawa (2000) em estudo realizado nas mesorregiões Norte Fluminense e Médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro, sugere que o alto índice de soropositividade em bovinos esteja diretamente relacionado com o alto índice de infestação de carrapatos nesses animais. O mesmo foi observado em estudos feitos com hospedeiros vertebrados, incluindo eqüinos selvagens em que havia correlação entre o parasitismo por carrapatos e a presença de anticorpos para *B. burgdorferi* (REES e AXFORD, 1994; OLIVER et al., 1999). No entanto, Magnarelli et al. (1989) observaram que os maiores índices de anticorpos em eqüinos foram

encontrados justamente na época do ano em que as ninfas de *I. scapularis* encontravam-se nos pastos, que constituem os vetores dessa espiroqueta naquela região. Porém Bernard et al. (1990), concluem que a localização geográfica e a época do ano em que a sorologia é realizada está diretamente relacionada com as taxas de exposição a *B. Burgdorferi*.

Em relação à função desses animais, foi possível verificar que os animais de trabalho, que recebiam menor controle efetivo de ectoparasitas, foram os que apresentaram maior soropositividade em relação a *B. burgdorferi*. Fato equivalente ocorreu em estudos efetuados em equinos no Estado do Rio de Janeiro onde os animais eram mantidos em diferentes tipos de manejo. Os locais onde havia um melhor controle de ectoparasitas apresentaram 0,9% de soropositividade para *B. burgdorferi*, contrastando com os animais que viviam em locais sem nenhum tipo controle, onde apresentaram 42,9% (SALLES et al., 2002).

No presente trabalho não houve diferença significativa entre a distribuição da frequência de anticorpos anti-*B. burgdorferi* e as faixas etárias e raças. Estes resultados estão de acordo com os observados em outros estudos. Madureira (2004) encontrou equinos positivos, através do ELISA indireto, em todas as faixas etárias, com maior prevalência em animais entre 72 a 120 meses. Marcus et al. (1985) observaram que nos EUA a frequência de *B. burgdorferi* em equinos foi maior em áreas endêmicas que em áreas não - endêmicas com soropositividade de 24% e 2%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre raças e sexo.

Em relação ao total de amostras obtidas em cada município, observou-se que em Castanhal ocorreu o maior número de animais positivos (10,33%), porém não houve diferença significativa comparando com os demais. Esse fato pode ser justificado pelo maior número de soros coletados naquele município.

O estudo epidemiológico das borrelioses tem atualmente como principal ferramenta imunológica o ensaio imuno-enzimático ELISA indireto, devido às suas características

confiáveis de sensibilidade e especificidade (MAGNARELLI e ANDERSON, 1988a). Neste método, *Borrelia* sp. íntegra, antígeno sonificado ou frações protéicas podem ser usados como antígeno, contudo os dois últimos preparados têm mostrado melhores resultados (BENNETT, 1995; OKSI et al., 1995), sendo o antígeno sonificado o mais empregado (CRAFT et al., 1984; MAGNARELLI et al., 1994). No entanto, os Kits comerciais para diagnóstico não conferem resultados confiáveis, devido à variação antigênica fisiográfica, além de fatores físico-químicos (CALLISTER et al., 1990).

Estudos da borreliose através do ELISA indireto já foram realizados em eqüinos no Reino Unido, apresentando baixa soropositividade (CARTER et al., 1994), em Nova Jersey - Pensilvânia, demonstrando 10% de soropositividade (COHEN et al., 1988), em mid-Atlantic veterinary teaching hospital no qual, dos 181 soros analisados, apenas nove foram soropositivos (BERNARD et al., 1990) e no Texas Central que verificou que a infecção é incomum no local, mesmo com confirmação através do Western blotting (COHEN et al., 1992). No entanto, Magnarelli et al., (1989), caracterizaram o ELISA um teste específico para identificar infecções por *B. burgdorferi* em eqüinos analisando 517 soros eqüinos para detecção de anticorpos IgM contra *B. burgdorferi*.

Estudos realizados com soros de bovinos através da técnica de imunofluorescência verificaram reação cruzada entre *B. burgdorferi*, *B. coriaceae* e *B. theileri*, no entanto estes resultados não foram observados ao utilizarem o ensaio ELISA indireto com antígenos de extrato de célula total, sugerindo esse ensaio como o de eleição para estudos epidemiológicos de borreliose (ROGERS et al., 1999).

Na Alemanha, o diagnóstico definitivo ainda não demonstrou correlação objetiva entre quadro clínico, sorologia positiva e DNA específicos para *Borrelia*, necessitando de confirmação com testes diretos como o PCR e cultivo (SCHONERT et al., 2002).

Estudos realizados com o Kit ELISA em eqüinos na Polônia demonstraram que não houve interação entre quadro clínico e sorologia positiva em 86,2% das amostras (DZIERZECKA, 2002). No entanto, Portier et al. (2002), obtiveram o diagnóstico definitivo da borreliose de Lyme através da sorologia em um pônei que apresentava sintomas de hipetermia, edema de membros e manqueira. Magnarelli et al. (1988b) observaram que de 705 animais, nove (1,3%) apresentaram sintomas de febre branda, letargia, manqueira e relutância ao andar e posteriormente foi feito Imunofluorescência para *B. burgdorferi* nesses animais, tendo como resultado 100% de positividade para esse espiroquetídeo.

No Brasil, o ELISA indireto utilizado para detecção de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* já foi realizado em humanos (YOSHINARI et al., 1997), e em animais domésticos das seguintes espécies: bovinos (FONSECA et al., 1996; ISHIKAWA, 1996), caninos (SOARES et al., 1999; JOPPERT et al., 2001; ALVES et al., 2004; O'DWER et al., 2004) e eqüinos (SALLES et al., 2002; MADUREIRA, 2004).

A epidemiologia e os espectros clínicos das Borrelioses em animais e no homem apresentam características variadas de acordo com as regiões, devido à existência distinta de espécies, genoespécies, e cepas de *Borrelia*, carrapatos vetores, interação vetor - patógeno e ecossistemas distintos (BARATON et al., 1992; COYLE, 1993; YOSHINARI et al., 1997), sendo os animais domésticos competentes reservatórios de *Borrelia* sp. no ambiente domiciliar (MATHER et al., 1994).

7 - CONCLUSÃO

- Eqüinos estudados em seis municípios da mesorregião metropolitana de Belém apresentaram anticorpos homólogos contra *Borrelia burgdorferi*.
- A frequência de soropositivos confirma a ocorrência de *Borrelia* sp no Estado do Pará.
- A presença de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em eqüinos na mesorregião metropolitana de Belém é indicativo da ampla distribuição do agente e da possibilidade de ocorrerem casos humanos de borreliose na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I. S. **Estudo de *Borrelia* sp. em *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) naturalmente infectados.** 1996. 40 f. Trabalho de Monografia, Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.

ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. *Borrelia* – like Spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 621-624, sep/oct, 2000.

ABELE D.C.; ANDER, K.H. The many faces and phases of borreliosis I. Lyme disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, p. 167-86, 1990.

AFZELIUS, A. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 101, p. 404 – 406, 1910.

ALVES, A. L.; MADUREIRA, R. C.; SILVA, R. A.; CÔRREA, F. N.; BOTTEON, R. C. M. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 203-206, out-dez. 2004.

ANDERSON J.F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 190, 1988.

APPEL, J. L. Lyme in disease dogs and cats. **Compendium**, v. 12, n. 5, p. 617, 1990.

AUSTIN, F.E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen – 5% carbon dioxide in vitro. **Canadian Journal Microbiology**, v. 39, p. 1103-1110, 1993.

AZULAY R.D.; ABULAFIA L.A.; SODRÉ C.T.; AZULAY D.R.; AZULAY M. M. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 30, p. 569 – 571, 1991.

BARANTON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIROS, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with Lyme borreliosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 378-83, 1992.

BARBOUR, A. G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 57, p. 521-525, 1984.

BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.

BATTESTI, D. M.; SOARES, C. O.; ZEITUNE, A. D.; YOSHINARI, N. H.; ARZUA, M. Estudo de *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) como reservatório da borreliose de Lyme, através de método sorológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15, 1997, Salvador: **Anais...** p. 252, 1997.

BENNETT, C. E. Ticks and Lyme disease. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 343-405, 1995.

BERNARD, W. V.; COHEN, D.; BOSLER, E.; ZAMOS, D. Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses referred to a mid-Atlantic Veterinary Teaching Hospital. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 196, n. 8, p. 1255-1258, 1990.

BLOWEY, R.W.; CARTER, S.A.; WHITE, A.D.; BARNES, A. *Borrelia burgdorferi* infections in UK cattle: a possible association with digital dermatitis. **The Veterinary Record**, v. 135, p. 577-578, 1994.

BUCHWALD, A. Ein fall Von diffuser idiopathischer hautatropic. **Derm. Vierteljahresschr**, v. 10, p. 553-554, 1883.

BURGDORFER, W.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme disease: a tick borne spirochetosis? **Science**, v. 216, p. 1317- 1319, 1982.

BURGDORFER W, Discovery of *Borrelia burgdorferi*. In: COYLE P.K. (ed.) **Lyme Disease**. Boston : Mosby Year Book, p. 3-7, 1993.

BURGESS, E. C. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Laboratory Animal Science**, v.36, n.3, p. 288-290, 1986a.

BURGESS, E. C.; AMUNDSON, T. E.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. A. EDELMAN, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp. with *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, n.2, p. 355-359, 1986b.

BURGESS, E. C.; GILLETE, D.; PICKETT, J. P. Arthritis and panuveitis as manifestation of *B. Burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.189, n.10, p. 1340-1342, 1986c.

BURGESS, E. C. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horse and cows. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 235-243, 1988.

BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; CLEVEN, T.D. *Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents and birds from four Wisconsin dairy farms. **Veterinary Microbiology**, v.35, p. 61-77, 1993.

BUSHMICH, S. L.; POST J. E. Lyme borreliosis in dairy cattle. In: VETERINARY INTERNATIONAL CONFERENCE ON LYME BORRELIOSIS, 1992, Arlington. **Proceedings...** Arlington: p. 172, 1992.

BUSHMICH, S. L. Lyme borreliosis in domestic animals. **Journal of spirochetel and tick-borne disease**, v.1, n. 1, 1994.

BUTTLER, J. F.; DENMARK, H. A. Tick (Acari: Ixodidae) vectors of Lyme disease organisms (*Borrelia burgdorferi*) in Florida. Fla Department of. Agriculture and Consumer Service Division of Plant Industry. **The Entomology**, Circular n° 326, 1990.

CALLISTER, S. M.; CASE, K. L.; SCHELL, R. F. Diagnostic testing for Lyme disease. **Labmedica**, p. 11-14, fev/ mar, 1990.

CARTER, S. D.; MAY, C.; BARNES, A.; BENNETT, D. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 187-190, 1994.

CAVALCANTE, G. C. **Prevalência e diagnóstico do *Trypanossoma vivax* em bovino do Estado do Pará**. 2002, 66f. Tese de mestrado (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.

CERRI, D.; FARINA, R.; ANDREANI, E.; NUVOLON, R.; PEDRINI, A. Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi*. **Research in Veterinary Science**, v. 57, p. 256-258, 1994.

COHEN, D.; BOSLER, E. M.; BERNARD, W.; MEIRS II, D.; EISNER, R.; SCHULZE, T. C. Epidemiologic studies of Lyme Disease in horses and their public health significance. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 244-257, 1988.

COHEN, N. D.; COHEN, D. Borreliosis in horses: a comparative review. **The Compendium**, v. 12, n. 10, p. 1449-1458, 1990.

COHEN, N. D.; HECK, F. C.; HEIM, B.; FLAD, D. M.; BOSLER, E. M.; COHEN, D. Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in a population of horses in central Texas. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 201, n. 7, p. 1030-1034, 1992.

COHEN, N. D. Borreliosis (Lyme disease) in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 8, n. 4, p. 213-215, 1996.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. São Paulo: Medsi, 1992.

COSTA, I. P.; YOSHINARI, N. H; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V. L. N.; LEON, E. P.; ZEITUNE, A. D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme em Mato Grosso do sul: relato de três casos clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 51, n.6, p. 253-257, 1996.

COSTA, I. P.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. Perfil clínico e laboratorial da doença Lyme-símile no Estado de Mato Grosso do Sul: análise de 16 pacientes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 41, n.3, mai-jun, 2001.

COYLE, P. K. **Lyme disease**. St. Louis: Mosby Year Book, 1993, 235 p.

CRAFT, J. E.; GRODZICKI, R. L.; STEERE, A.C. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. **The Journal Infectious Disease**, v. 149, n. 5, p.789-795, 1984.

DODGE, R.W. Culture of ethiopian *Borrelia recurrentis*. **Applied Microbiology**, v, 25, n. 6, p. 935-939, 1973.

DORWARD, D. W.; SCHWAN, T.G.; GARON, C. F. Immune capture and detection o *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n.6, p. 1162-1170, 1991.

DRESSLER, F.; WHALEN, J.A.; REINHARDT, B.N.; STEERE, A.C. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. **The Journal Infectious Disease**, v.167, p.392-400, 1993.

DZIERZECKA, M. Correlation between the presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and the clinical signs of Lyme disease. **Medycyna-Weterynaryjna**, v. 58, n. 7, p. 523 -526, 2002.

ENGSTROM S.M.; SHOOP E.; JOHNSON R. C. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.02, p. 419-427, 1995.

FALCO C. R.; FISH, D. Ticks parasitizing humans in a Lyme disease endemic area of southern New York State. **American Journal of Epidemiology**, v. 128, p.146 - 1152, 1988.

FALCO C. R.; FISH, D. Potential for exposure to tick bites in recreational parks in a Lyme disease endemic area. **American Journal of Public Health**, v.79, p. 12-15, 1989.

FALCO C. R.; DANIELS T. J. ; FISH D. Increase in abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in an emergent Lyme disease endemic area.

GORDILLO, G.; TORRES, J.; SOLÓRZANO, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; TAPIA-CONYER, R.; MUÑOZ, O. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. **Archives of Medical Research**, v. 30, p. 64-68, 1999.

GREENE, R. T. An update on the serodiagnosis of canine lyme borreliosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 167-71, 1990.

GRODZICKI, R.L.; STEERE, A.C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. **The Journal of Infectious Disease**, v. 157, n. 4, p. 790-797, 1988.

GRUND, S.; NATTERMANN, H.; HORSCH, F. Electron-microscopic examination of spirochaetes in dermatitis digitales lesions in cows. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, p. 533-542, 1995.

GUSTAFSON, J. M.; BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; STEINBERG, H. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 6, p. 882-890, 1993.

HERXHEIMER, K.; HARTMANN K. U. Acrodermatitis chronica atrophicans. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 61, n. 57, p. 255-300, 1902.

HOOGSTAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vector. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135-238, 1985.

HYDE, F.W.; JOHNSON, R.C.; WHITE, T.J.; SHELBURNE, C.E. Detectin of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.1, p. 58-61, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 15 jan. 2006.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico**, 1996, 51 f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

ISHIKAWA, M. M. **Perfil da produção de anticorpos anti - *Borrelia burgdorferi* em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural**. 2000, 80 f. Tese de Doutorado, UFRRJ, Rio de Janeiro, 2000.

JOBE, D.A.; CALLISTER, S.M.; SCHELL, R.F. Recovery of *Borrelia burgdorferi* by filtration. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1896-1898, 1993.

JOHNSON, R. C.; SCHIMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp nov.: etiologic agente of Lyme disease. **Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 496, 1984.

JOPPERT, A. M., HAGIWARA, M. K.; YOSHINARI, N. H. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n.5, p. 251-255 , 2001.

KARCH, H.; HUPPERTZ, H.I.; BÖHME, M.; SCHMIDT, H.; WIEBECKE, D.; SCHWARZKOFF, A. Demonstration of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples from healthy humans whose sera contain *B. burgdorferi*-specific antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2312-2314, 1994.

KUIPER, H.; VAN DAM, A.P.; SPANJAARD, L.; JONGH, B.M.; WIDJOJOKUSUMO, A.; RAMSELAAR, T.C.P.; CAIRO, I.; VOS, K.; DANKERT, J. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from biopsy specimens taken from healthy-looking skin of patients with Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 715-720, 1994.

LEBECH, A.M.; HANSEN, K. Detectin of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by poLymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n.7, p. 646-1653, 1992.

LEBECH, A.M.; CLEMMENSEN, O.; HANSEN, K. Comparison of in vitro culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2328-2333, 1995.

LIENBLING, M.R.; NISHIO, M.J.; RODRIGUEZ, A.; SIGAL, L.H.; JIN T.; LOUIE, J.S. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. **The Arthritis Rheumatology**, v. 36, n. 5, p. 665-675, 1993.

LISSMAN, B. A.; JACOBSON R.H.; LAUDERDALE T.L.; CHANG Y.F.; SHIN S.J.; THOMFORD J. W.; TODHUNTER R. J.; SUMMERS B. A. Spirochete-associated arthritis (Lyme Disease) in a dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 185, n. 2, p. 219-220, 1984.

MADIGAN. Lyme disease in horses. **The Backstretch**, p. 12-16, feb.1993.

MADUREIRA, R. C. **Frequência de anticorpos homólogos anti- *Borrelia burgdorferi* em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro.** Dissertação de mestrado. 46 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária), Curso de Pós - graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, Rio de Janeiro, 2004.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; APPERSON, C.S.; FISH, D.; JOHNSON, R.C.; CHAPPELL, W.A. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white tailed deer from Connecticut, New York state, and North Caroline. **Journal of Wildlife Diseases**, n. 22, p. 178-188, 1986.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Epidemiology**, v. 127, n. 4, p. 818-825, 1988a.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; SHAW, E. ; PAST, J. E.; PALKA, F. C. Borreliosis in equids in northeastern United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 3, p. 359-362, 1988b.

MAGNARELLI, L. A.; JOHN, F.; ANDERSON, J. F. Class specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 195, n. 10, p. 1365-1368, 1989.

MAGNARELLI L.A.; ANDERSON J.F.; LEVINE H.R. ; LEVY S.A. Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 197, n.1, p. 63-66, 1990.

MAGNARELLI L.A.; ANDERSON J.F.; JOHNSON R.C.; NADELMAN R.B.; WORMSER G.P. Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p.1154-1158, 1994.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; JOHNSON, R.C. Analyses of mammalian sera in enzima-linked immunosorbent assay with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 159 - 165, 1995.

MARCELIS, L.; MANEFFE DE, P.; CHAIDRON, E.; BIGAIGNON, G.; KAGERUKA, P.; GOUBAU, P. **Horse reservoir for *Borrelia burgdorferi*?** *The Lancet*, n. 25, p. 977, 1987.

MARCUS, L. C.; PATTERSON, M. M.; GILFILLAN, R. E.; URBAND, P. H. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses: serologic survey. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2570-2571, 1985.

MASSARD, C. L.; FONSECA, H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 23, p. 15-23, 2004.

MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 205, n. 2, p. 186-188, 1994.

MOTER, S.E.; HOFMANN, H.; WALLISH, R.; SIMON, M.M; KRAMER, M.D. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.12, p. 2980-2988, 1994.

MOURITSEN, C.L.; WITWER, C.T.; LITWIN, C.M.; YANG, L.; WEIS, J.J.; MARTINS, T.B.; JASKOWSKI, T.D.; HILL, H.R. Polymerase chain reaction of Lyme disease. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 105, n. 5, p. 647-654, 1996.

OKSI J.; UKSILA J.; MARJAMAKI, M.; NIKOSKELAINEN, J.; VILJANEN M. K. Antibodies against whole sonicated *Borrelia burgdorferi* spirochetes, 41- kilodalton flagellin, and P39 protein in patients with PCR or culture-proven late Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2260 – 2264, 1995.

OLIVER, J. H.; MAGNARELLI, L. A. ; HUTCHESON, H. J. ; ANDERSON, J. F. Ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* from mammals at Cape Hatteras, NC and Assateague Island, MD and VA. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 578-585, 1999.

OLIVEIRA, A. **Cultivo de *B. burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em diferentes meios**. 2000, 114f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.

O'DWYER, L. H.; SOARES, C.O. L; MASSARD, C. L. ; SOUZA, J. C. P. ; FLAUSINO, W. ; FONSECA. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi* latu sensu associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 201-205, Jan/fev. 2004.

PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. **Cornell Veterinary**, v. 82, p. 253-274, 1992.

PALÁCIOS, R.; OSORIO, L. E.; GIRALDO, L. E.; TORRES, A. J.; PHILIPP, M. T.; OCHOA, M. T. Positive IgG Western Blot for *Borrelia burgdorferi* in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 499-503, 1999.

PFISTER, H.W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **The Lancet**, v. 343, p. 1013-1016, 1994.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; SINSKY, R. J.; SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 25, p. 557-558, 1987.

PORTIER, K.; FORTIER, G.; RIFFAULT, C.; PERRIN, R. Suspected Lyme disease in a pony. **Pratique Veterinaire Equine**, v. 34, n. 134, p. 59-65, 2002.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**, 5 ed. London: Wolfe Publishing, 1994.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Arned, 2005, 512p.

RESS, D. H. E.; AXFORD, J. S. Lyme disease: a rare but clinically important disease in the UK. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 175-177, 1994.

RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N.; PIESMAN, J.; SPIELMAN, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme Disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 2, p. 201-205, 1987.

ROBERTS, E. D.; BOHN, R. P.; LOWRIE, R. C.; HABICHT, G.; KARONA, L.; PIESMAN, J.; PHILIPP, M. T. Pathogenesis of Lyme neuroborreliosis in the Rhesus monkey: The early disseminated and chronic phases of disease in the peripheral nervous system. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 722-732, 1998.

ROGERS, A. B.; SMITH, R. D.; KAKOMA, I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia coriaceae* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 6, p. 694-697, 1999.

SALLES, R. S.; FONSECA, A. H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* em equinos no Estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v.22, n. 127, p. 46-49, maio/ junho, 2002.

SCHONERT, S.; GRABNER, A.; HEIDRICH, J.; SCHONBERG, A.; NOCKLER, K.; BAHN, P.; LUGE, E.; BREM, S.; MULLER, W. Lyme disease in the horse? Comparative studies of direct and indirect testing for *Borrelia burgdorferi*. **Praktische-Tierarzt**, v. 83, n. 12, p. 1064-1068, 2002.

SCOFIELD, A.; COSTA, C. M.; BARBOSA, J. D. ; FONSECA, A. H. . Ocorrência de *Borrelia* sp em Búfalo (*Bubalus bubalis*) no município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 1, 2005, Búzios, **Anais...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Buiatria, p. 1, 2005.

SMITH R.D., MIRANPURI G.S., ADAMS J.H.; AHRENS E.H. *Borrelia theileri*: isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1396-1398, 1985.

SOARES, C. O. **Estudo da borreliose canina: imunodiagnóstico, soropidemiologia e análise interativa com a babesiose canina**. 1998. 80 pp. Dissertação - UFRRJ, Rio de Janeiro, 1998.

SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 111-114, 1999.

SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.

SOOD, S.K.; ZEMEL, L.S.; ILOWITE, N.T. Interpretation of immunoblot in pediatric Lyme arthritis. **Journal of Rheumatology**, n. 22, p. 758-761, 1995.

SPRENGER, H.; KRAUSE, A.; PRIEM, S.; FABIAN, D.; BURMESTER, G. R.; GEMSA, D.; RIDING, M. G. *Borrelia burgdorferi* induces chemokines in human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4384-4388, 1997.

STANCHI, N.O.; BALAGE, L. J. Lyme disease: antibodies against *Borrelia burgdorferi* in farm workers in Argentina. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 4, p. 305- 307, ago.1993.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS user's guide, version 6.11, 4.ed. Cary, NC: 1996. 842 p.

STEERE, A. C.; MALAWISTA S.E.; SNYDMAN, D. R.; SHOPE, R. E.; ANDIMAN, W. A.; ROSS, M. R. STEERE, R. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **The Arthritis Rheumatology**, p. 20-27, 1977.

STIERNSTEDT, G.T.; GRANSTRÖM, M.; HEDERSTEDT, B.; SKÖLDENBERG, B. Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in serum and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 819-825, 1985.

STRAUNBINGER, R. K.; STRAUBINGER, A. F.; HARTER, L. JACOBSON, R. H.; CHANG, Y. F.; SUMMERS, B.; ERB, H. N.; APPEL, M. J.G. ***Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks.** Infection and Immunity, v. 65, p. 1273-1285, 1997.

TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; FERREIRA, L. C. L. **Eritema chronicum migrans, eritema migratório, doenças de Lyme ou borreliose de Lyme.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 67, p. 205-209, 1992.

YOSHINARI, N. H.; OYAFOSO, L. K.; MONTEIRO, F. G. V.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; FERREIRA, L. G. E.; BONASSE, F.; BAGGIO, D.; D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. **Revista do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 170-174, 1993a.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. M. C.; MENDONÇA, M.; OYAFUSO, L. K.; LEVY, L.; COSSERMELLI, W. Lyme disease in Brasil: report of five cases. **Revista Espanhola de Reumatologia**, v. 20, p. 6, 1993b.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; BONOLDI, V. L. N.; BTTTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. S.; COSSERMELLI, W. **Borreliose de Lyme – zoonose emergente de interesse multidisciplinário.** News Lab, v. 3, n. 12, p. 90-104, 1995.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BATTISTI, D. M. B.; PIRANA, S.; FONSECA, A. H.; SCHUMAKER, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; SOARES, C. O. FONSECA, A H.; SCOFIELD, A.; BATTESTI, D. B.; MADRUGA, C. R. Serology for *Babesia bovis* in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 1, 2000. **Annals...** p. 820, 2000.

YOSHINARI, N. H.; ABRAO, M. G.; BONOLDI, V. L. N. *et al.* Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p.311-318, abr. 2003.

YOSHINARI, N. H. & MANTOVANI, E. Síndrome Infecto-Reacional Lyme-Simile. Disponível em: http://www.parasitologia.org.br/atualidades/conferencia_natalino_hajime.pdf
Acesso em: 08. Out. 2006.

ZBINDEN, R.; GOLDENBERGER, D.; LUCCHINI, G.M.; ALTWEGG, M. Comparison of two methods for detecting intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies and PCR for diagnosis of Lyme antibodies and PCR for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1795-1798, 1994.

