

**BORRELIOSE DE LYME EM EQÜINOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ROBERTO DE SOUZA SALLES

Dezembro de 2001

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**BORRELIOSE DE LYME EM EQÜINOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ROBERTO DE SOUZA SALLES

ORIENTAÇÃO

Professor Adivaldo Henrique da Fonseca

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de *Philosophiae Doctor* em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, estado do Rio de Janeiro

Dezembro de 2001

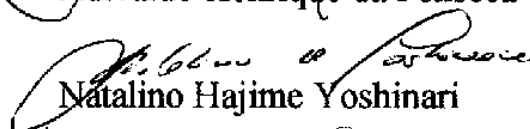
**BORRELIOSE DE LYME EM EQUINOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

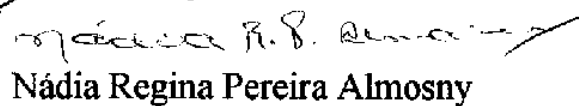
AUTOR

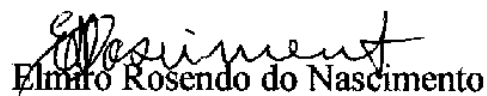
ROBERTO DE SOUZA SALLES

Aprovada em 14 de Dezembro de 2001


Adivaldo Henrique da Fonseca


Natalino Hajime Yoshinari


Nádia Regina Pereira Almosny


Elmir Rosendo do Nascimento


Laerte Grisi

*"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás;
mas só pode ser vivida olhando-se para a frente."*

Kierkegaard

*A Deus, por ter iluminado os meus caminhos até o dia de hoje,
Aos meus Pais, Cergio e Lia por terem permitido a concretização de um sonho,
À minha esposa Simone e á minha filha Renata, por toda força e compreensão,
durante toda a vida.*

AGRADECIMENTOS

A pesquisa científica exige a cooperação de grande número de pessoas; o trabalho de equipe é indispensável para sua realização. Assim sucedeu com o presente estudo, motivo pelo qual agradeço, sinceramente, a todos que participaram da sua elaboração.

Ao Professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pela oportunidade única de trabalhar nesta linha de pesquisa fascinante, pela proficiente orientação, paciência, pelo apoio e incentivo constantes durante todas as etapas da pesquisa e pelo exemplo pessoal e profissional.

Ao Professor Carlos Luiz Massard, pelo acompanhamento e sugestões oportunas que ofereceu.

Ao Professor Natalino Hajimi Yoshinari, pela orientação e colaboração eficiente, pelo treinamento em seu laboratório e fornecimento do material e infraestrutura necessária para a realização dos testes sorológicos.

A todos os funcionários do laboratório de referência em borreliose de Lyme da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Farmacêutica Virginia Bonoldi, pelo apoio na realização de parte dos ensaios laboratoriais.

Ao Doutorando Cleber Souza Soares, pela colaboração na fase inicial dos experimentos da tese e apoio durante a realização do teste de ELISA.

À Mestranda Alessandra Scofield Amaral e à bolsista de Iniciação Científica Renata Cunha Madureira, pela colaboração na realização dos testes ELISA e “Western blotting”.

Ao Professor Laerte Grisi, pela acolhida e facilidades que propiciou na UFRRJ.

À Professora Nadia Regina Pereira Almosny pelas sugestões e críticas apresentadas, assim como a toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica da UFF, pelo indispensável apoio na realização dos exames hematológicos,

Ao Professor René Garrido Neves, pela revisão e críticas apresentadas na elaboração da tese.

Ao Professor Walter Lilenbaum, pela realização dos testes sorológicos de diagnóstico da leptospirose.

Ao Professor Pedro Carvalho Rodrigues, pela orientação e sugestões de bioestatística.

À Dra. Maíra Halfen Teixeira Liberal e toda a equipe do Laboratório de Biologia Animal do município de Niterói (RJ), pela realização dos testes sorológicos de diagnósticos da brucelose e anemia infecciosa equina e pela cessão de soros de equinos procedentes de pequenos criadores do município de Seropédica (RJ).

À Direção do Instituto Vital Brazil, do Instituto de Biologia do Exército e da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro, pela permissão de utilizar os soros de equinos, indispensáveis à pesquisa.

Ao Professor Francisco Benedito Rangel Filho, pelo incentivo na qualidade de Coordenador do curso de doutorado em sanidade animal.

À Professora Jussara Schwind Pedroso Stussi, pelas sugestões e apoio na correção do texto.

Ao Professor Maurício Afonso Verícimo, pelas sugestões apresentadas e apoio na correção do texto.

À funcionária Ivana Glins, secretária do curso de doutorado em sanidade animal, pela competente participação no assessoramento técnico durante a realização do mesmo.

Aos Professores integrantes do curso de doutorado, pelo incentivo espontâneo que ofereceram.

Aos dirigentes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que aceitaram o projeto e permitiram a sua realização e pela acolhida amigável.

À Universidade Federal Fluminense, por ter sido a base fundamental para a minha formação profissional.

BIOGRAFIA

Roberto de Souza Salles é natural do município do Rio de Janeiro, nascido no dia 05 de julho do ano de 1955, filho de Cérgio Salles Paiva e Lia de Souza Salles.

O interesse pelos animais, por suas doenças e pelas ciências o orientaram para o vestibular do curso de Medicina Veterinária na UFF, o qual cursou entre 1977 e 1981. Durante sua vida acadêmica, foi bolsista de trabalho na biblioteca, monitor de bacteriologia, bolsista de iniciação científica e de aperfeiçoamento pelo CNPq. Participou do Projeto Rondon, na cidade de Meruoca, no Ceará no ano de 1980.

Em 1985, especializou-se em Patologia Experimental na UFF, dando prosseguimento com o Curso de Mestrado, na mesma área e Universidade, o qual foi concluído em 1988. Esta experiência na área de Patologia contribuiu de

maneira decisiva para sua determinação de graduar-se, também, em Medicina, que cursou entre 1985 e 1990, na Faculdade de Medicina Souza Marques. Dentro desta nova carreira, especializou-se em Medicina do Trabalho da UFF, em 1994.

O gosto pela experimentação científica conduziu-o ao magistério, exercido desde 1984, na Universidade Federal Fluminense, como Professor auxiliar de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

Foi Professor adjunto de Microbiologia na Faculdade de Medicina de Teresópolis, Professor assistente de Microbiologia na Universidade Gama Filho e Professor titular de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Nova Friburgo. Atualmente é Professor de Virologia (prática e teórica) para os Cursos de Medicina, Medicina Veterinária, Farmácia, Odontologia, Nutrição, Enfermagem e Biologia da Universidade Federal Fluminense.

Participou ativamente da vida universitária na área administrativa, tendo sido nomeado para o cargo de Coordenador do *Campus* Avançado e Centro Rural de Treinamento e Ação Comunitária - Crutac, no ano de 1990. Em dezembro do mesmo ano foi eleito Vice-Diretor do Centro de Ciências Médicas da UFF, cargo que exerceu até 1994. Neste ano, ao final do seu mandato como Vice-Diretor, candidatou-se à Direção daquele Centro, tendo sido eleito para o período seguinte, que findou em dezembro de 1998.

A vontade de aprofundar, ainda mais, seus conhecimentos, o levou a cursar o Doutorado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, tendo como linha de pesquisa o projeto de tese: Borreliose de Lyme em Equinos.

ÍNDICE

1	Introdução	1
2	Revisão da literatura	5
2.1	O gênero <i>Borrelia</i> e as doenças correlatas	5
2.2	Borreliose de Lyme no homem	7
2.3	Borreliose de Lyme em eqüinos	14
2.4	Diagnóstico da borreliose de Lyme	19
2.5	Borreliose de Lyme no Brasil	21
3	Materiais e Métodos	24
3.1	Origem e obtenção do antígeno de <i>B. burgdorferi</i>	24
3.2	Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para eqüinos	25
3.2.1	Animal controle positivo	25
3.2.2	Animais controles negativos	28
3.3	Perfil de anticorpos do eqüino controle positivo	29
3.4	Exames hematológicos do potro inoculado com <i>B. burgdorferi</i> cepa G	
	39/40 sonicada	31

3.5	Exames bioquímicos do potro inoculado com <i>B. burgdorferi</i> cepa G	
	39/40 sonicada	31
3.6	Estudo sorológico em eqüinos em condições naturais no estado do Rio de Janeiro	32
3.6.1	Animais procedentes de pequenos criadores de cavalos de Seropédica	33
3.6.2	Animais procedentes do Instituto Vital Brazil (IVB – UFF)	33
3.6.3	Animais procedentes da Policia Militar do estado do Rio de Janeiro (PM – RP Mont Campo Grande e Sulacap)	34
3.6.4	Animais procedentes do Instituto de Biologia do Exército (IBEx – Gerecinó)	34
3.7	Sorologia utilizando teste ELISA indireto para <i>Borrelia burgdorferi</i>	35
3.8	Utilização da Técnica “Western blotting”	38
3.9	Exames complementares	39
3.9.1	Exame sorológico para leptospirose	39
3.9.2	Exame sorológico para anemia infecciosa eqüina	40
3.9.3	Soroaglutinação rápida em placa para brucelose	41
3.9.4	Soroaglutinação acidificada tamponada para brucelose	43
3.10	Análise estatística	44
4	Resultados e Discussão	45
4.1	Padronização do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto para testes sorológicos em eqüinos	45

4.2	Exames laboratoriais nos eqüinos controles positivo e negativos	53
4.2.1	Hemograma	53
4.2.2	Bioquímica sérica	57
4.3	Análise sorológica (IgG) pelo método ELISA indireto, para borreliose de Lyme nos eqüinos procedentes do estado do Rio de Janeiro	62
4.4	Exame sorológico para diagnóstico diferencial para brucelose, anemia infecciosa eqüina e leptospirose	73
4.5	Análise sorológica utilizando o método “Western blotting” em amostragem de eqüinos positivos e negativos para o teste ELISA	77
5	Conclusões	80
6	Referências Bibliográficas	82
7	Apêndice	98

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Algumas etapas relacionadas ao desenvolvimento da pesquisa	37
2	Perfil da produção de anticorpos do equino inoculado com antígeno de <i>Borrelia burgdorferi</i> cepa G39/40. Curva das quatro diluições do soro e conjugado 1:1000	47
3	Titulação de oito soros hiperimunes do equino inoculado, anti <i>Borrelia burgdorferi</i> cepa G39/40, para definição do padrão positivo	50
4	Percentual de positividade comparativa ao teste ELISA para <i>Borrelia burgdorferi</i> , entre equinos de pequenos criadores de Seropédica (SERO), Instituto Vital Brazil (IVB), Polícia Militar (PM) e Instituto de Biologia do Exército (IBEx)	72
5	A. Blotting correspondente a animais oriundos de propriedades de pequenos criadores de equinos do município de Seropédica (SERO). Animais intensamente parasitados por carrapatos e com maior número de bandas, confirmando maior número de animais positivos observados no teste ELISA. B. Blotting correspondente a animais oriundos da Polícia Militar (PM), e Instituto de Biologia do Exército (IBEx), onde ocorre severo controle de carrapatos	79

ÍNDICE DE TABELAS

1	Hemograma do potro controle positivo submetido a 4 inoculações com antígeno sonicado de <i>Borrelia burgdorferi</i> (Cepa G39/40) na concentração de 1 mg por 15 kg de peso vivo _____	55
2	Média dos valores obtidos nos hemogramas dos 8 potros controle negativos, com sangue colhido no início do experimento _____	56
3	Exame bioquímico do potro controle positivo submetido a 4 inoculações com antígeno sonicado de <i>Borrelia burgdorferi</i> (Cepa G39/40) na concentração de 1 mg por 15 kg de peso vivo _____	60
4	Média do exame bioquímico sérico de 8 potros controles negativos com sangue colhido no início do experimento _____	61
5	Prevalência sorológica (IgG) pelo método ELISA indireto, para borreliose de Lyme nos eqüinos procedentes do estado do Rio de Janeiro _____	63
6	Prevalência e títulos dos soros de 42 eqüinos, procedentes de pequenos criadores de Seropédica, RJ para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>B. burgdorferi</i> _____	68
7	Prevalência e títulos dos soros de 137 eqüinos, procedentes do Instituto Vital Brazil, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>B. burgdorferi</i> _____	69
8	Prevalência e títulos dos soros de 208 eqüinos, procedentes da Polícia Militar (Rp Mont Campo Grande e Sulacap), para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>B. burgdorferi</i> _____	70

9	Prevalência e títulos dos soros de 114 eqüinos, procedentes do Instituto de Biologia do Exército, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>B. burgdorferi</i> _____	71
10	Distribuição de freqüência dos soros de eqüinos analisados para borreliose de Lyme, brucelose, anemia infecciosa eqüina (AIE), leptospirose, em diferentes localidades, no estado do Rio de Janeiro _____	75
11	Análise comparativa para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>B. burgdorferi</i> segundo os locais de origem _____	76

ÍNDICE DO APÊNDICE

1	Curvas obtidas para diferentes parâmetros referentes ao hemograma do potro controle positivo, submetido a quatro inoculações com antígeno sonicado de <i>Borrelia burgdorferi</i> _____	99
2	Curvas obtidas para diferentes parâmetros referentes ao exame bioquímico do soro do potro controle positivo, submetido a quatro inoculações com antígeno sonicado de <i>Borrelia burgdorferi</i> . _____	100
3	Resultado de exames sorológicos para anemia infecciosa eqüina (AIE), brucelose e leptospirose. Eqüinos soropositivos para borreliose de Lyme _____	101
4	Resultado de exames sorológicos para anemia infecciosa eqüina (AIE), brucelose e leptospirose. Eqüinos soronegativos para borreliose de Lyme _____	103

RESUMO

A borreliose de Lyme é uma espiroquetose transmitida por carrapatos, de ampla distribuição geográfica, que acomete animais domésticos e o homem, tendo como reservatório os animais silvestres. Em todos os hospedeiros pode evoluir de forma assintomática ou produzir doença de caráter multissistêmico. Nos eqüinos, esta borreliose tem sido responsabilizada por sintomas dermatológicos, oftalmológicos, neurológicos e articulares, sendo a artrite e poliartrite os sinais clínicos mais comuns. O presente estudo teve como objetivos: estabelecer a padronização do ensaio imunoenzimático ELISA indireto e proceder levantamento sorológico da borreliose de Lyme em eqüinos no estado do Rio de Janeiro. Procedeu-se a análise de 501 soros de eqüinos provenientes de propriedades com diferentes sistemas de controle de carrapatos. Um total de 49 (9,8%) eqüinos foram positivos para borreliose de Lyme, ao teste de ELISA indireto. Destes, 36 (7,2%) apresentaram

título de 1:800, 10 (2,0%) título de 1:1600 e 3 (0,6%) título de 1:3200. Os resultados observados foram equivalentes aos descritos nos EUA, onde foram relatadas freqüências de soropositivos variando entre 7 e 34% em eqüinos assintomáticos. Os resultados obtidos pelo método “Western blotting” apresentaram bandas correspondentes entre a cepa padrão G 39/40 de *Borrelia burgdorferi* e o espiroquetídeo existente em nosso meio. Observou-se que eqüinos portadores de alta infestação por carrapatos, apresentaram maior prevalência de soropositividade nos ensaios ELISA indireto e “Western blotting”, contrastando com aqueles submetidos a rigoroso controle de carrapatos. A utilização do teste ELISA indireto para detecção de anticorpos anti *B. burgdorferi latu sensu* mostrou-se eficiente como auxílio de levantamento epidemiológico e diagnóstico. A resposta humoral dos eqüinos estudados, apresentou bom reconhecimento antigênico para *B. burgdorferi* cepa G39/40 em ambos os testes utilizados, e a freqüência de soropositivos reforça a hipótese da ocorrência de uma borreliose semelhante a borreliose de Lyme no estado do Rio de Janeiro.

SUMMARY

Lyme borreliosis is a worldwide spread spirochetosis transmitted by ticks. It affects both domestic animals and man and has wild animals as reservoirs. In all affected hosts it can develop a non-symptomatic disease or determinate a multisystemic infection. In horses, this borreliosis has been incriminated for dermatological, ophthalmic, neurologic and arthicular signs. Arthritis is the most common sign. The present study aim to standardize an immune enzymatic assay - indirect ELISA and to proceed a serological survey for Lyme disease in horses at Rio de Janeiro State, Brazil. Serum samples were collected from 501 horses originated from herds with different tick control programmes. A total of 49 samples (9.8%) were reactive at ELISA, from which 36 (7.2%) presented titters of 800, ten (2.0%) of 1600 and three (0.6%) of 3200. Those findings are in agreement

to other authors that report the frequency of reactive non-symptomatic horses ranging from 7-34%. Western-blotting results demonstrated correspondence between the standard strain G39/40 of *Borrelia burgdorferi* and the local strain. A positive correlation between tick infestation and reactivity on indirect ELISA and Western-blotting was also observed. The use of ELISA for the detection of antibodies anti-*B. burgdorferi* *latu sensu* showed to be efficient as a complementary tool in epidemiological surveys and for the clinical diagnosis. The strain G39/40 showed to be a good antigen for the detection of humoral response in the studied horses. The frequency of reactive serum samples in those horses from different herds suggests the presence of a borreliosis like Lyme disease in Rio de Janeiro State, Brazil.

1 - INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme acomete animais domésticos, silvestres e o homem, constituindo uma doença de caráter multissistêmico com ampla distribuição geográfica (BENNETT 1995, LIPSKER *et al.*, 1999). A borreliose de Lyme tem como agentes etiológicos conhecidos: *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner, 1984, em vários continentes; *B. garinii* Baranton, Postic, Saint Giron, Boerlin, Piffaretti, 1992 na Europa; *B. afzelii* Canica, Nato, Dumerle, Mazie, Baranton, Postic 1993, na Europa e no Japão; *B. japonica* Kawabata, Masuzawa, Yanagihara 1993, no Japão; *B. miyamotoi* Postic, Belfazia, Isogai, Girons, Grimont, Baranton 1993, na Ásia; *B. andersoni* Marconi, Liveris, Schwartz 1995; *B. lonestari* Barbour, Maupin, Teltow, Carter, Piesman 1996, ambas na América do Norte; *B. lusitaniae* Lefleche, Postic, Girardet, Peter, Baranton 1997, *B. valaisiana* Wang, Vandam, Lefleche, Postic, Peter, Baranton, Boer, Spanjaar, Dankert 1997, na Europa e *B. bissettii* Postic,

Ras, Lane, Hendeson & Baranton, 1998, também na América do Norte. Esses agentes e suas variantes antigênicas são responsáveis pelo polimorfismo das apresentações clínicas (BENNETT 1995).

A primeira espécie identificada foi isolada de carrapato *Ixodes scapularis* (= *I. dammini*) (BURGDORFER *et al.*, 1982), que passou a ser denominada de *B. burgdorferi* por JOHNSON *et al.* (1984). A borreliose de Lyme foi inicialmente reconhecida nos Estados Unidos e, posteriormente, descrita na Europa, Ásia, Austrália, tendo como principal vetor carrapato do gênero *Ixodes*. Na América do Sul, especialmente no Brasil, os vetores potenciais mais importantes pertencem aos gêneros *Ixodes* sp., *Ornithodoros* sp. e *Amblyoma* sp. (ABEL *et al.*, 2000).

As características clínicas nos animais domésticos são variáveis de acordo com a região geográfica (DRESSLER 1994). A resposta heterogênea decorre da existência de diferenças antigênicas entre as espécies de *Borrelia* e justifica a necessidade da realização de ensaios sorológicos, como ELISA e "Western blotting", com antígenos específicos.

Nos eqüinos, a borreliose de Lyme foi relatada como a causa de uma variedade de manifestações clínicas, incluindo febre, artrite, miosite, laminite, perda de peso (PARKER & WHITE 1992) e, possivelmente, meningoencefalite (WHITWELL *et al.*, 1993). Infecção assintomática em eqüinos é,

provavelmente, comum e este fato foi descrito por CARTER *et al.* (1994), que encontraram pouca manifestação clínica, apesar da alta incidência de anticorpos específicos para *B. burgdorferi* em eqüinos e em algumas áreas do Reino Unido.

O diagnóstico preciso da borreliose implica na qualidade do exame complementar, sendo o ensaio imunoenzimático ELISA indireto, o mais empregado e reconhecido. No entanto, devem ser estabelecidos critérios para cada laboratório, padrões de controle adequados, com o título mínimo e linha de corte ("cut-off") seguros. Deve-se evitar, portanto, os "kits" comerciais para diagnóstico, em função da possibilidade de reações cruzadas (MAGNARELLI & ANDERSON 1989).

A distribuição epidemiológica das borrelioses em animais e no homem apresenta características variadas de acordo com as regiões, dada a existência de espécies distintas, genoespécies e cepas de *Borrelia*. Do mesmo modo, existem várias espécies de carrapatos vetores, de interação vetor-patógeno e de distintos ecossistemas (BARANTON *et al.*, 1992, COYLE 1993, BENNETT 1995, EUZEBY 1995, YOSHINARI *et al.*, 1992). Os animais domésticos são competentes reservatórios de *Borrelia* sp. no ambiente domiciliar, contudo ainda serão necessários estudos fisiográficos com a finalidade de se estabelecer a situação regional da enfermidade (SOARES *et al.*, 2000).

A cultura e a identificação de espiroquetas em microscopia óptica constituem procedimentos pouco produtivos no diagnóstico da borreliose de Lyme e os testes sorológicos tornam-se fundamentais para confirmação diagnóstica (SCHRESTA *et al.*, 1985, WELLS *et al.*, 1993).

Foram objetivos deste trabalho: estabelecer a padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA indireto); e proceder a levantamento sorológico da borreliose de Lyme em eqüinos no Estado do Rio de Janeiro.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O gênero *Borrelia* e as doenças correlatas

O gênero *Borrelia* (Swellengerbel 1907) inclui espiroquetas patogênicas que acometem o homem, outros mamíferos e aves. Este microrganismo apresenta forma helicoidal, dimensão de 11 a 15 μm e 7 a 11 flagelos localizados no espaço periplasmático entre a membrana celular externa e o cilindro protoplasmático. A membrana externa envolve o complexo cilindro protoplasmático, o qual consiste de citoplasma, membrana e parede celular. Trata-se de uma bactéria microaerófila que cresce melhor a 33 °C, em meio de cultura BSK (Barbour-Stoenner-Kelly).

O microrganismo possui, pelo menos, 30 diferentes tipos de proteínas, sendo a maioria com funções ainda desconhecidas. As duas maiores proteínas de superfície externa são denominadas proteína de superfície A (OspA) de 30 a 32 kDa, e proteína de superfície B (OspB) de 34 a 36 kDa. O antígeno flagelar de 41 kDa é semelhante a outros antígenos flagelares de outros espiroquetas. Outro antígeno de 58 a 60 kDa, possui reatividade semelhante a outros antígenos equivalentes (58 a 65 kDa), presentes em uma variedade de outras bactérias (STEERE 1989).

Cinco diferentes doenças causadas por microrganismos do gênero *Borrelia* são reconhecidas por acometerem os animais e/ou o homem. São elas: 1) Febre recorrente - a primeira borreliose descrita causa doença no homem e tem como agente *B. recurrentis lato sensu* com mais de 20 espécies, cujos vetores são carrapatos do gênero *Ornithodoros* e piolhos do gênero *Pediculus*, (HOOGSTRAAL 1985). 2) Espiroquetose aviária - tem como agente etiológico a *B. anserina*, cujos vetores são os carrapatos do gênero *Argas*, em diferentes aves (QUINN *et al.*, 1994). 3) Borreliose bovina - causada por *B. theileri*, agente que também pode infectar ovinos e é transmitida por carrapatos ixodídeos, principalmente *Boophilus microplus* (NEITZ 1956); 4) Aborto epizoótico bovino - tem como agente etiológico *B. coriaceae* e como vetor *O. coriaceus*

(ZINGG & LEFEBVRE 1994); e 5) Borreliose de Lyme (BURGDORFER *et al.*,1982).

2.2 - Borreliose de Lyme no homem

A borreliose de Lyme foi inicialmente descrita nos Estados Unidos em 1975, na comunidade de Lyme - Connecticut, aonde um grupo de crianças que apresentava sintomas similares à Artrite Reumatóide Juvenil, chamou a atenção de Allen C. Steere, Pesquisador do Departamento de Medicina Interna da Universidade de Yale.

STEERE *et al.* (1977) descreveram as causas observadas de uma doença que ele inicialmente denominou Artrite de Lyme, sendo caracterizada por uma forma de manifestação cutânea, com aspecto de eritema migratório, que regredia com uso adequado de antibióticos antibacterianos. Posteriormente, STEERE (1977) publicou outro estudo descrevendo outras manifestações da doença, além de artrite e erupção cutânea, caracterizando-a como enfermidade sistêmica.

Diferentes aspectos clínicos e epidemiológicos da borreliose de Lyme já eram do conhecimento de estudiosos europeus. HERXHEIMER & HARTMAN (1902) haviam descrito a lesão crônica da doença, chamada de acrodermatite crônica atroficante; AFZELIUS (1921), na Suécia, e LIPSCHULTZ (1923), na Áustria, relataram o eritema crônico migratório associado com a picada de

carrapatos *Ixodes ricinus*; BANNWARTH (1944) associou uma meningorradiculite a algum agente infeccioso transmitido por carrapatos da espécie *Ixodes ricinus*.

BURGDORFER *et al.* (1982), com a utilização dos meios de cultura adequados para o cultivo de bactérias do gênero *Borrelia*, isolaram espiroquetas de carrapatos da espécie *I. scapularis* (= *I. dammini*) e, posteriormente, de sangue (BENACH *et al.*, 1983), líquido sinovial (JOHNSTON *et al.*, 1985), liquor (PREAC-MURSIC *et al.*, 1984) e pele (STEERE *et al.*, 1984) de portadores desta enfermidade. O agente do gênero *Borrelia* passou a ser chamado *B. burgdorferi*, em homenagem a Burgdorfer, que primeiro identificou o agente nos vetores.

Certas diferenças têm sido notadas entre a *B. burgdorferi stricto sensu* e *lato sensu*, tanto em seu aspecto morfológico, especificamente em proteínas de superfície externa e plasmídeos, quanto à homologia de DNA (BARBOUR *et al.*, 1985; BARBOUR *et al.*, 1986; BARBOUR, 1988).

A bactéria geralmente habita o terço médio do intestino do carrapato, principalmente do gênero *Ixodes*, podendo ser detectada nas três fases de vida do vetor (larva, ninfa e adulta) devido à modalidade de transmissão vertical (trans-ovariana) e horizontal (repasto sangüíneo em diferentes hospedeiros). Durante o parasitismo dos carrapatos em mamíferos, as espiroquetas são inoculadas

juntamente com a saliva (BENACH *et al.*, 1987). Para ocorrer a infecção, o carrapato deve manter um tempo mínimo de contato com o mamífero. Estudos experimentais mostraram que esse tempo mínimo é de 24 horas e o tempo médio de 48 a 72 horas (PIESMAN 1993). A partir da inoculação da bactéria na pele, a doença se desenvolve em fases, apresentando diferentes manifestações clínicas para cada uma. O risco de infecção depende da concentração de vetores portadores da bactéria presentes no ambiente, e do estágio evolutivo dos mesmos. As ninfas possuem maior infectividade que a forma adulta, apesar desta ter um percentual maior de contaminação. Interferem ainda, a concentração e biodisponibilidade dos reservatórios naturais (pequenos mamíferos silvestres).

Em seu estágio primário, a *B. burgdorferi* inoculada dissemina-se na pele causando, no período de três a seis dias, uma reação cutânea conhecida como eritema migratório, presente em 60 a 80% dos casos. Concomitantemente, surgem sinais sistêmicos como fadiga, febre, mialgias, artralgias e linfadenopatia regional. O eritema migratório caracteriza-se por uma mácula rósea com bordas avermelhadas que aumenta centrifugamente, podendo atingir até 60 centímetros de diâmetro. Usualmente, a lesão é plana, mas descrições em forma de placa, indurada, vesiculosa ou até lesão necrótica já foram relatadas. É geralmente assintomática, sendo raramente descrita como uma lesão quente ao toque e, em alguns casos, pruriginosa. Nesta fase, pode-se evidenciar sintomas menores

como mialgias, artralguas e mal-estar geral. Raramente verifica-se vermelhidão e queixas como conjuntivite, náuseas e vômitos. (STEERE 1983, STEERE *et al.*, 1986).

Dias ou semanas após o quadro primário, metade dos pacientes não tratados desenvolve lesões cutâneas secundárias (eritema anular secundário). As lesões secundárias tendem a ser menores que a primária, sendo que pode ocorrer confluência entre as mesmas (BARROS *et al.*, 1993). Algumas semanas após o quadro cutâneo inicial, pacientes não tratados podem desenvolver sinais e sintomas de comprometimento orgânico. As complicações mais importantes neste estágio são articulares, cardíacas e neurológicas.

O acometimento articular na fase inicial da borreliose de Lyme, usualmente, se limita à artralgia. A artrite franca geralmente ocorre nas formas latentes, meses após a infecção. Aproximadamente, 60% dos pacientes não tratados nos Estados Unidos da América desenvolvem artrite em um prazo de dois anos. Esta costuma ser de início súbito, oligoarticular ou monoarticular em grandes articulações, alternando períodos de remissão ou atividade (STEERE *et al.*, 1983). Fadiga e febre de pequena monta podem acompanhar essa fase. Quando não tratado, o quadro articular pode regredir espontaneamente, porém 10% dos pacientes evoluem para artrite crônica erosiva com proliferação sinovial (STEERE *et al.*, 1987). Nesta fase, os pacientes não respondem bem ao uso de

antibióticos; o fluido sinovial é inflamatório, geralmente, com predominância de polimorfonucleares; e o exame anatomopatológico mostra proliferação sinovial com intenso infiltrado linfoplasmocitário, semelhante ao quadro da artrite reumatóide (STEERE *et al.*, 1988). Antígenos de espiroquetas, bem como estruturas semelhantes a *B. burgdorferi*, são demonstrados em localizações perivasculares na sinóvia usando-se a impregnação pela prata ou anticorpos monoclonais. A presença do antígeno na articulação tem sido demonstrada nas formas crônicas, utilizando-se a técnica laboratorial da reação em cadeia de polimerase (Protein Chain Reaction - PCR) (NOCTON *et al.*, 1994).

Aproximadamente, 8% dos pacientes não tratados apresentam envolvimento cardíaco após semanas ou meses da infecção primária (STEERE *et al.*, 1980). Em geral, este quadro é breve, consistindo em graus variáveis de bloqueio átrio-ventricular, podendo ocorrer bloqueio cardíaco completo, quase sempre acima do feixe de Hiss. Poucos desses pacientes podem persistir com o quadro lesional no sistema de condução, e existem alguns raros casos fatais da agressão cardíaca na borreliose de Lyme. Miocardiopatia e pericardite têm sido raramente evidenciadas e, nestes casos, pode-se observar a presença de espiroquetas no miocárdio (STANEK *et al.*, 1990).

O acometimento neurológico da borreliose de Lyme varia clinicamente conforme a fase da doença. Quinze por cento dos pacientes não tratados no

estágio primário evoluem com alterações neurológicas central ou periféricas, que deixam, freqüentemente, seqüelas irreversíveis (STEERE 1989). Assim, nas fases iniciais, registram-se queixas como dor de cabeça, irritabilidade e distúrbios do sono. Geralmente, esses sintomas desaparecem com a remissão da doença (STEERE *et al.*, 1983). Em sua fase latente, podem ser encontradas várias anormalidades, sendo a mais freqüente, a meningite. Esta se apresenta com intensa cefaléia, dor e contratura da nuca, fotofobia, náuseas, vômitos e irritabilidade. O líquido céfalo-raquiano mostra-se com pressão normal, algumas centenas de células com predominância linfomonocitária, glicose em valores normais, proteínas levemente aumentadas, com aumento na relação IgG/albumina. Esse quadro é indistinguível de uma meningite asséptica. O estudo imunológico no liquor costuma evidenciar imunoglobulinas específicas contra *B. burgdorferi*, sendo descritos casos de isolamento de *Borrelia* sp em liquor desses pacientes. Em quase metade dos doentes com meningite, pode-se associar uma encefalite que se apresenta clinicamente por distúrbios na concentração, labilidade emocional, torpor e coma. A doença pode regredir espontaneamente ou evoluir com seqüelas (WEINSTEIN *et al.*, 1989).

Existem relatos da transmissão da borreliose de Lyme via transplacentária, podendo haver complicações neonatais relacionadas com a infecção materna durante o primeiro trimestre de gestação. Já se isolou *B. burgdorferi* do baço,

rim, medula óssea e cérebro de neonatos cujas mães, supostamente, foram infectadas durante o primeiro trimestre da gestação. Nenhuma correlação foi encontrada entre deformação congênita e títulos de anticorpos no cordão umbilical (SMITH *et al.*, 1991).

Para estabelecer padrão epidemiológico, o “Center for Disease Control”, (CDC Atlanta, EUA) estabeleceu os seguintes critérios diagnósticos: 1) em área endêmica, considera-se como borreliose de Lyme se, após exposição a carrapatos, o paciente apresentar eritema crônico migratório ou, na ausência deste, ocorrer registro de patologia cardiovascular, sistema nervoso ou músculo-esquelético; 2) em áreas consideradas de risco por possuírem reservatórios e vetores, considera-se o paciente com borreliose de Lyme se este desenvolver eritema crônico migratório com sorologia positiva através do "Western blotting" (presença de duas bandas de IgM ou quatro bandas para IgG ou a concomitância de uma banda de IgM com duas de IgG).

O espectro de apresentação clínica dessa enfermidade difere nas regiões onde foi descrita e está associado às características antigênicas distintas. Na América do Norte há predomínio de manifestações cutâneas e articulares; no continente europeu predominam as manifestações neurológicas; e no continente asiático a sintomatologia é, basicamente, cutânea e neurológica (EUZEBY 1995).

Subseqüentemente à identificação desta doença em humanos, a *B. burgdorferi* tem sido reconhecida como capaz de infectar animais silvestres e domésticos. No nordeste dos Estados Unidos da América, o agente está amplamente disseminado em roedores e cervídeos (MAGNARELLI *et al.*, 1986), os quais são reservatórios naturais. Os animais domésticos, como caninos, eqüinos e bovinos, comportam-se como agentes transportadores de vetores aos domicílios (ANDERSON 1988). Em contraste com a infecção inaparente nos animais silvestres, este agente pode causar doença clínica nos animais domésticos (BURGESS *et al.*, 1987, MAGNARELLI *et al.*, 1987).

2.3 - Borreliose de Lyme em eqüinos

MARCUS *et al.*, (1985) observaram que 12 dos 50 eqüinos selecionados, aleatoriamente, de áreas endêmicas para *B. burgdorferi*, apresentavam títulos de anticorpos de 1:8 até 1:2.048 contra *B. burgdorferi* pela técnica de imunofluorescência indireta. Apenas um dos 50 cavalos de áreas não endêmicas tinha um título de 1:8. Esta diferença, segundo os autores, indicou que cavalos de áreas endêmicas foram expostos à *B. burgdorferi* e que a espiroqueta induziu uma resposta de anticorpos nos cavalos. No mesmo trabalho, os autores demonstraram a não existência de reação cruzada com *Leptospira* sp. Os resultados da microaglutinação foram negativos para *Leptospira interrogans*

(sorovariantes: *canicola*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *hardjo*, *griptomtyphosa*); *Brucella abortus* (látex aglutinação) e *Toxoplasma gondii* (aglutinação).

BURGESS (1986) examinou uma fêmea de pônei Shetland de 12 anos que apresentava laminite crônica, articulações bilateralmente distendidas e o olho esquerdo opaco. A articulação do lado direito estava com processo inflamatório há seis meses, enquanto a inflamação na articulação esquerda foi detectada um mês antes do exame. Durante o exame inicial, amostra de sangue foi obtida para avaliação sorológica de infecções diversas, incluindo brucelose, leptospirose, toxoplasmose e borreliose de Lyme. Enquanto aguardavam-se os resultados dos testes sorológicos, o pônei foi tratado com penicilina procainada via intra muscular. Os resultados dos testes sorológicos foram negativos para *L. interrogans* sorovariantes: *canicola*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae*, *hardjo*, *griptomtyphosa*, *B. abortus* e *T. gondii*. O título de anticorpo imunofluorescente indireto para *B. burgdorferi* foi 1:1.024.

BURGESS *et al.* (1987) avaliaram o soro de um equino de seis anos com sintomatologia neurológica. O teste para pesquisa de anticorpo por imunofluorescência indireta mostrou-se positivo com título de 1:2048 para borreliose de Lyme.

COHEN *et al.* (1990) demonstraram, através de uma pesquisa sorológica em eqüinos na área de New Jersey e Pensilvânia, que cerca de 10% mostraram níveis significantes de anticorpos para *B. Burgdorferi*. Contudo, numa área altamente endêmica na região central de New Jersey, até 60% das éguas e potros de uma fazenda eram soropositivos. Em 1983, soro de animais desta mesma fazenda exibiu somente 12% de positividade em éguas e 35% em potros.

BURGESS (1989) estudou eqüinos e bovinos com suspeita de doença clínica por *B. Burgdorferi*. Todas as amostras de soro, leite, colostro e líquido sinovial foram testados para anticorpos contra o microrganismo por imunofluorescência. Sangue total, leite, colostro e amostras de fluido sinovial foram cultivados para *B. Burgdorferi* e foram mantidos registros dos sinais clínicos de animais com anticorpos positivos, data de amostragem e locação de animal por região. A autora observou amostras testadas para anticorpos, 282/430 soros bovinos, 118/190 soros eqüinos, 5/10 fluidos sinoviais bovinos, 3/6 fluidos sinoviais eqüinos, 2/3 dos colostros bovinos, 0/44 leites de vaca e soro de um feto abortado foram positivos com um título de 1:128 ou maior. Das amostras cultivadas, a proporção de positividade foi de: 7/156 sangue de bovinos, 2/35 sangue de eqüinos, 1/14 fluidos sinoviais de bovinos, 0/4 fluidos sinoviais, 1/3

colostro de bovinos, 0/44 leite de vaca e 2/10 de amostras de urina de vaca foram positivas para *B. burgdorferi*.

BERNARD *et al.* (1990) relataram que amostras de sangue obtidas de 13 cavalos, de um grupo de 100 (13%) e de seis cavalos, de um grupo de 91 (7%), nos meses de junho e outubro, respectivamente, mostraram anticorpos para *B. burgdorferi*, conforme determinado pelo ELISA.

COHEN *et al.* (1992) examinaram 469 amostras de eqüinos, tendo encontrado um caso positivo para *B. burgdorferi* pelo teste de ELISA, com sintomatologia. A população estudada foi considerada de alto risco para infecção por *B. burgdorferi* onde casos humanos foram relatados. Os sinais clínicos associados com a evidência da infecção por *B. burgdorferi* em eqüinos, incluíam: artrite, uveíte, encefalite, laminite, edema pulmonar, dermatite e mortalidade de potros. Foram incluídos naquele estudo, os cavalos avaliados por problemas musculoesqueléticos, oftalmológicos, neurológicos e dermatológicos, sendo que os sinais clínicos mais comuns, reportados, de borreliose em animais domésticos, foram artrite e poliartrite. Apesar de uma alta prevalência de cavalos examinados devido a problemas de laminite (21,5%), doença oftalmológica (6,8%) e dermatológica (4,3%) nenhum animal soropositivo no “Western blotting” foi identificado.

CARTER *et al.* (1994) mediram os níveis de anticorpos (IgG e IgM) para *B. burgdorferi* nos soros e fluidos sinoviais de cavalos do Reino Unido. Foi usado, também, “Western blotting” para amostras obtidas de cavalos soropositivos, tendo sido verificada baixa prevalência de soropositividade, com aumento em áreas que tinham uma alta incidência de borreliose humana e canina. Infecções de cavalos por *Leptospira* não causaram reações cruzadas no ELISA para *B. burgdorferi*. A maioria dos cavalos não apresentou sinais clínicos da borreliose de Lyme.

CAROLINE *et al.* (1996) realizaram pesquisa de anticorpos, pelo teste de ELISA, em soro de uma égua puro sangue de oito anos de idade. O animal apresentava manifestações neurológicas e o teste mostrou-se positivo tanto no soro quanto no líquido céfalo raquidiano.

GERHARDS *et al.* (1996) estudaram o soro de 156 eqüinos, sem manifestações clínicas para borreliose de Lyme, e 79 com uveíte recorrente, tendo encontrado 48% de positividade (título de 1:64 ou maior). Não observaram correlação significativa entre sinais de uveíte recorrente eqüina e título de anticorpos aumentados para a espiroqueta ($p > 0,05$).

MAGNARELLI *et al.* (1998), entre 1982 e 1985, analisaram 705 amostras de soros de eqüinos para pesquisa de anticorpos de *B. burgdorferi*, utilizando imunofluorescência indireta para estudo de anticorpos de IgM e imunoglobulina

total (IgM e IgG). Foram detectados 37 (5,3%) e 90 (12,8%) casos positivos, respectivamente. O principal título para anticorpo IgM, foi mais alto durante o mês de julho. Oitenta e seis eqüinos com imunoglobulina total para *B. burgdorferi* viviam em áreas de Connecticut onde o carrapato vetor, *I. dammini*, é prevalente. Desses 86 eqüinos, nove tinham anticorpos para *B. burgdorferi* e desenvolveram distúrbios nos membros ou nas articulações que resultaram em episódios isolados ou recorrentes de laminite.

CHANG *et al.* (2000), em trabalho experimental com sete pôneis expostos a carrapatos infectados com *B. burgdorferi*, realizaram reação sorológica nove meses após a exposição, obtendo soroconversão em todos os animais. Os pôneis controles foram negativos por cultura, PCR e teste sorológico. Este foi o primeiro relatório de infecção experimental induzida pela exposição de eqüino a carrapatos infectados por *B. burgdorferi*.

2.4 - Diagnóstico da borreliose de Lyme

O diagnóstico da borreliose de Lyme em seres humanos é realizado a partir da presença de dados clínicos e epidemiológicos confirmados pelos exames laboratoriais. O diagnóstico comprobatório da borreliose em humanos somente pode ser feito quando houver isolamento do agente etiológico a partir do material obtido do tecido do suposto doente. O procedimento adequado para o

isolamento de *Borrelia* sp é obtido com a utilização do meio BSK, o qual é rico em nutrientes.

A primeira técnica empregada no diagnóstico da borreliose de Lyme foi a imunofluorescência indireta (IFA). Posteriormente, iniciou-se a utilização do ELISA indireto, e do “Western-blotting” (MAGNARELLI *et al.*, 1984). Reações cruzadas podem ocorrer, visto que alguns epítomos antigênicos de *Borrelia* sp tais como os componentes de 41 e 60 kDa, são comuns ao *Treponema* sp e à *Leptospira* sp.

A IFA tem sido empregada secundariamente para definição do resultado junto ao teste ELISA. O ELISA supera a IFA quanto à especificidade, sensibilidade e operacionalidade (MAGNARELLI *et al.*, 1984). Provas padronizadas no Brasil para humanos BARROS (2000), cães JOPERT (1995) e bovinos ISHIKAWA *et al.* (1997), comprovam a eficiência do ensaio.

A análise da reatividade imunológica pelo “Western blotting” é utilizada para esclarecer ou confirmar os resultados obtidos do ELISA, e pode ser útil nos casos de resultados falsos positivos. Em geral, o método “Western blotting” é mais sensível e específico para diagnóstico (MAGNARELLI *et al.*, 1984). Apresenta, entretanto, desvantagens que incluem a migração de múltiplas proteínas para a mesma área, resultados inconsistentes entre os laboratórios

devido a diferenças na qualidade, variedade de concentração dos reagentes e alto custo. Até hoje não existe uma padronização satisfatória dos resultados.

Ainda não foi possível a padronização do PCR para borreliose de Lyme, por não se ter obtido genes iniciadores universais, necessários a amplificação do material genético de *Borrelia* sp, sem amplificar o material de outros microrganismos (BARROS, 2000).

2.5 - Borreliose de Lyme no Brasil

No Brasil, hipóteses clínicas de ocorrência da borreliose de Lyme foram realizadas inicialmente por TALHARI (1987) e FILGUEIRA (1989). YOSHINARI *et al.* (1989) em trabalho da revisão literatura, reafirmaram a possibilidade da ocorrência da doença em nosso território, dado o caráter de distribuição universal da enfermidade e a presença de vetores do agente.

JOPPERT (1995), realizou inquérito sorológico para borreliose de Lyme em cães, empregando a metodologia ELISA indireto para a detecção de anticorpos da classe IgG, tendo o cuidado de imunizar experimentalmente um cão pela inoculação de *B. burgdorferi* cepa G39/40, na concentração de 0,1 mg por kg de peso, inativado pelo calor e com dose de reforço subsequente após sete dias da primeira inoculação. A autora realizou acompanhamento da resposta imunológica pelo ELISA indireto e “Western blotting”, do soro canino

considerado padrão positivo. Soros de cães normais provenientes do canil da Polícia Militar do Estado de São Paulo, livres de ectoparasitas, foram selecionados como controles negativos. Das 237 amostras analisadas de soros caninos da região de Cotia-Itapevi, detectou-se positividade em 23 amostras (9,7%), frequência observada em áreas endêmicas a borreliose de Lyme. Nos cães soropositivos que tiveram contato com carrapatos, a prevalência de positividade foi de 70%, sugerindo presença de *Borrelia* sp na região e participação destes ectoparasitos no mecanismo de transmissão. Esses estudos levaram a autora a considerar a região estudada como uma provável área de risco para borreliose de Lyme.

FONSECA *et al.* (1995) observaram borrelias no sangue periférico e urina de gambás. ELISA indireto e “Western blotting” em marsupiais, revelaram alta frequência de soros positivos tanto em gambás capturados em São Paulo como no Rio de Janeiro. Os testes sorológicos efetuados em bovinos provenientes da região de Itaguaí apresentaram alta reatividade de anticorpos da classe IgG contra antígenos da *B. burgdorferi* cepa G39140, segundo ISHIKAWA (2000) . Em outro estudo, foi possível detectar a presença de antígenos circulantes de *Borrelia* sp. em 6,2% dos cães desta região, empregando-se a técnica de ELISA (SOARES *et al.*,1999). Estes dados preliminares permitiram inferir que a região estudada é uma área de risco para a existência de uma borreliose semelhante à

Borreliose de Lyme, e inclui a possibilidade da participação de marsupiais no ciclo de transmissão desta espiroquetose. FONSECA & YOSHINARI¹ (comunicação pessoal - dados não publicados) observaram bovinos com artrite no município de Alegre (ES). Nesta mesma região, foram observadas crianças com queixas articulares recorrentes, algumas soropositivas para borreliose de Lyme e medicadas com penicilina benzatina. Nestes casos, não houve registro de eritema migratório, apesar da existência de relato de picada por carrapatos. Camundongos capturados na região revelaram a presença de *Borrelia* sp no sangue periférico (FONSECA, *et al.*, 1995).

BENESI *et al.* (1995) encontraram *Borrelia* sp. em esfregaço de sangue periférico de bovino proveniente da região de Bragança Paulista. O teste de ELISA para a borreliose de Lyme demonstrou prevalência de 23,8% de soros positivos na população bovina local utilizando ELISA indireto. Nesta área, identificou-se um bovino com artrite e três funcionários da mesma fazenda apresentavam lesão cutânea compatível com eritema migratório, sendo um deles soropositivo para borreliose de Lyme.

¹ Laboratório de Referência em Borreliose de Lyme, Faculdade de Medicina da USP

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Origem e obtenção do antígeno de *B. burgdorferi*

A cepa *B. burgdorferi* (G39/40), utilizada no presente trabalho, tem sido mantida por repicagem no meio BSK há mais de 10 anos, no laboratório de borreliose de Lyme do Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do professor Natalino Hajime Yoshinari. Para obtenção do antígeno, 1,0 ml de cultura de *B. burgdorferi* foi adicionada em um frasco com 500 ml de meio de cultura e mantido em estufa a 33°C por uma semana. A cultura obtida foi centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos, a 4°C (Sorvall Rc2.b). O sedimento resultante foi ressuspensão em PBS 0,001M MgCl₂ 6H₂O, pH 7,4 e submetido ao processo anterior por mais duas vezes. Dessa forma, o ‘pellet’ obtido foi lavado e, em seguida, suspenso na mesma solução completando o volume final em 6,0 ml.

No preparo do antígeno para teste sorológico, a suspensão foi submetida à sonicação¹ por 3 minutos, com intervalos de 15 segundos, filtrada em microfiltro de 0,45µm, aliqüotada e estocada a -70°C até o momento do uso (GRODZICKI *et al.*,1988). A concentração protéica desse antígeno foi dosada pelo método de Folin², obtendo-se 4,0 mg/ml.

3.2 - Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) para eqüinos

3.2.1 - Animal controle positivo

Para a obtenção do soro controle positivo utilizou-se um potro sadio, macho, com três meses e meio e 113 Kg de peso vivo, originário da fazenda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada no município de Cachoeiras de Macacu - RJ. Realizaram-se quatro inoculações, com intervalos de 15 dias, de antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa G39/40; com hidróxido de alumínio (adjuvante), por via subcutânea, com agulhas e seringas descartáveis de 10 ml, na dose de 1,0mg/15kg. Procedeu-se à obtenção de soros uma hora antes do primeiro inóculo (colheita 0) e a cada cinco dias, até completar 125 dias (colheita 25). Procedeu-se, ainda, à colheita de sangue do animal para hemograma completo, exame bioquímico e reação sorológica para

¹ Fisher Sonic Dismembrator, model 300 - Dynatech

² Lowry *et al.* (1951)

borreliose de Lyme, leptospirose, brucelose e anemia infecciosa eqüina, com a finalidade de averiguar possíveis reações cruzadas com *B. burgdorferi*. A colheita foi feita por punção da jugular (Figura 1c), utilizando-se seringas de 20ml esterilizadas, sendo o sangue colocado em tubos esterilizados, alguns contendo anticoagulante (citrato de sódio) para testes bioquímicos e sorológicos. Todo o material foi acondicionado em caixas de isopor contendo gelo e enviado ao laboratório.

Na padronização do ELISA indireto, procedeu-se quatro tratamentos para o antígeno cujas concentrações foram de 5; 10; 15 e 20 µg/ml; utilizando-se microplacas de poliestireno com 96 orifícios³, sendo duas por concentração, as quais foram sensibilizadas com extrato total sonicado de *B. burgdorferi* em tampão carbonato pH 9.6 e incubadas em câmara úmida a 4 °C “overnigt”.

Após sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes em solução tampão (PBS- Tween 20 à 0,05%, pH-7,4) e a seguir bloqueadas com soro de coelho a 1% diluído em PBS – Tween 20, por uma hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se as placas conforme descrito anteriormente.

Selecionou-se soro da colheita 20 (45 dias pós quarto inóculo) do animal imunizado, o qual foi utilizado em quatro diluições seriadas ao dobro de 1:200 a 1:1600 (1:200; 1:400; 1:800 e 1:1600); utilizou-se o soro da colheita zero, como

³ Sigma

controle negativo, diluído em duplicata e em série ao dobro de 1:200 a 1:1600. Esta etapa do ensaio foi incubada e lavada como descrito anteriormente.

Adicionou-se à placa de poliestireno⁴ o conjugado, IgG de coelho anti IgG de equino ligado a fosfatase alcalina⁵, diluído em três concentrações em duplicatas de 1:500; 1:1000 e 1:2000. A incubação e a lavagem foram equivalentes á descrita anteriormente. A seguir, adicionou-se em toda a placa o substrato Para Nitro Fenil Fosfato de Sódio (PNPP) diluido em tampão glicina pH 10.5 (1 mg/ml). A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro com filtro para comprimento de onda de 405 nanômetros. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200 µl de solução por orifício da placa.

Após a análise da etapa anterior, procedeu-se à obtenção da curva de anticorpos IgG do animal imunizado. Novas placas foram sensibilizadas com antígeno sonicado total, na concentração de 20µg/ml em tampão carbonato pH 9,6. O tempo e o bloqueio foram equivalentes como anteriormente descritos. Os soros, de todas as colheitas em quatro diluições duplicatas, em série, e ao dobro de 1:200 a 1:1600, foram adicionados à placa, realizando-se duas repetições para esta etapa, tendo sido utilizadas duas placas. Adicionou-se o conjugado diluído a 1:1000 para toda a placa. A incubação, a lavagem, a revelação e volume foram idênticas a fase anterior. Realizada a análise da etapa anterior, procedeu-se à titulação de oito soros hiperimunes anti *B. burgdorferi*, para a

⁴ Sigma

definição de um padrão positivo ideal. Nesta etapa, a placa foi sensibilizada e bloqueada como descrita anteriormente. Após análise, selecionou-se os soros das colheitas 8, 9, 10, 11, 17, 19, 20 e 21, os quais foram sob dez diluições seriadas crescentes em dobro de 1:200 a 1:102400 do padrão positivo ideal.

Periodicamente, a cada cinco dias, realizou-se a confecção de esfregaços com sangue periférico, os quais foram fixados em metanol e corados pelo método de Giemsa diluído em tampão Sorensen pH 6,8 (4 gotas/ ml), para a pesquisa de hematozoários. O sangue foi obtido, acrescido do anticoagulante citrato fosfato dextrosado, sendo submetido à técnica de Knott modificada para pesquisa de microfilárias, realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias-Projeto Sanidade Animal. Procedeu-se, também, no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, ao exame bioquímico e ao hemograma completo do animal para avaliar possíveis variações hematológicas.

3.2.2 - Animais controles negativos

Para a obtenção de soros controles negativos foram utilizados oito soros de potros puro-sangue inglês, oriundos do Jockey Clube do Rio de Janeiro, com idades variando de um a dois anos. Os animais encontravam-se clinicamente

⁵ Sigma

sadios, mantidos em baias individuais, recebendo ração apropriada, não tendo sido relatado contato com carrapatos.

A colheita de sangue foi realizada como descrito anteriormente, (ítem 3.2.1) assim como a obtenção dos soros, alíquotagem e armazenamento. Realizou-se, ainda: hemograma completo; bioquímica; esfregaços sangüíneos periféricos, para pesquisa de hematozoários; e exame para pesquisa de microfilárias, como descrito anteriormente (ítem 3.2.1). Uma alíquota de cada amostra dos soros controles negativos foi submetida à pesquisa de anticorpos contra sete variantes sorológicas de *Leptospira* sp.

3.3 - Perfil de anticorpos do equino controle positivo

Após a análise estatística e gráfica⁶, procedeu-se à obtenção da curva de anticorpos da classe IgG do animal (C1) imunizado. As microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com antígeno sonicado total na concentração de 15 µg/ml em tampão carbonato pH 9,6; incubadas, lavadas e bloqueadas como descrito no item anterior. Os soros de todas as colheitas (colheita 0 a 20) em quatro diluições duplicatas, em série e ao dobro de 1:100 a 1:800 foram adicionados à placa da coluna 2 a 12 (colheita 0 a 10) em uma placa, ficando a coluna 1 como branco. Em outra placa, a coluna 1 como branco, a 2 repetiu-se a colheita 0 (controle) e da coluna 3 a 12 os demais soros (colheita 11 a 20),

⁶ Theory and Problems of Statistics – Spiegel

utilizando-se duas placas para esta etapa, com duas repetições, total de quatro placas.

Adicionou-se o conjugado diluído a 1:1000 em toda a placa a qual foi incubada em câmara úmida por uma hora na temperatura de 37 °C. A seguir adicionou-se em toda a placa a substância para-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) em tampão glicina pH 10,5 (1mg/ml); sendo a leitura da reação procedida em espectofotômetro com filtro para comprimento de onda de 405 nm. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200 µl de solução por orifício da placa.

3.4 – Exames hematológicos do potro inoculado com *B. burgdorferi* cepa G 39/40 sonicada

Os hemogramas compunham-se de avaliação do volume globular, hematimetria, hemoglobinometria, leucometria global, hematimetria específica, hematoscopia e leucocitoscopia. O volume globular foi efetuado em centrífuga para micro hematócrito⁷, utilizando-se tubos capilares (COLES, 1986). A hematimetria e leucometria global foram realizadas em câmara de Neubauer-Thomas, utilizando-se, respectivamente, soro fisiológico para hematimetria e líquido de Turk para a leucometria (COLES, 1986). A hemoglobinometria foi avaliada através de testes espectrofotométricos utilizando-se “kits” comerciais⁸. A coloração dos esfregaços sangüíneos para a leucometria específica, hematoscopia, leucocitoscopia e pesquisa de parasitos foi realizada pelo método Giemsa (JAIN,1993). A contagem de plaquetas foi realizada em câmara de Neubauer-Thomas utilizando-se, como diluente, oxalato de amônio a 5% (COLES, 1986).

3.5 - Exames bioquímicos séricos do potro inoculado com *B. burgdorferi* cepa G 39/40 sonicada

A determinação dos valores séricos de uréia, creatinina, glicose, aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (Fal), cálcio, fósforo, colesterol, bilirrubinas, proteínas totais e albumina foram

⁷ Fanen

efetuadas em analisador bioquímico⁹ nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFF (RJ). A bilirrubina indireta, globulinas e relação albumina globulina foram determinadas através de cálculos aritméticos (KANEKO,1997) e, finalmente, os níveis plasmáticos de fibrinogênio foram determinados por refratometria conforme técnica descrita por COLES (1986).

3.6 - Estudo sorológico em eqüinos em condições naturais no Estado do Rio de Janeiro

Amostras de um total de 501 soros de eqüinos, assim como as amostras controle positivo e negativo, foram obtidas por venopunção da jugular utilizando-se seringas descartáveis de 20 ml e agulhas nº 27 x 8, retirando-se de 10 - 15 ml de sangue venoso. O sangue colhido foi depositado em tubos de ensaio com capacidade de 15 ml e, posteriormente, centrifugado a 15000 rpm para obtenção de fração sérica. Os soros obtidos foram aliquotados em tubos de polipropileno tipo *Eppendorf* e estocados a 20 °C negativos, até as realizações das análises imunológicas. As amostras foram obtidas dentro das condições naturais em que os animais se encontravam, ora no regime de pasto aberto, ora estabulados, quando recebiam suplementação alimentar. A colheita foi realizada entre março e outubro do ano 2000. Os animais tinham idade superior a seis

⁸ Labtest S.A.

⁹ Baush & Lomb S.A.

meses e não foram levantados dados referentes ao sexo, raça e idade devido à dificuldade da colheita das amostras e diversidade da origem dos animais.

3.6.1 - Animais procedentes de pequenos criadores de eqüinos de Seropédica

Um total de 42 animais oriundos do município de Seropédica, procedentes de pequenas propriedades de atividade agrícola e cujos soros foram encaminhados inicialmente para diagnóstico de anemia infecciosa eqüina, no laboratório da Pesagro-Rio em Niterói, RJ. Tratavam-se de animais com sistema de criação extensiva, pastejo natural e com elevada população de carrapatos. O controle de carrapatos, conforme informado pelos proprietários, era incipiente e feito apenas quando a frequência era elevada.

3.6.2 - Animais procedentes do Instituto Vital Brazil. (IVB-UFF)

Um total de 137 eqüinos oriundos do município de Cachoeiras de Macacu, pertencentes à Fazenda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense e ao Instituto Vital Brazil (Figuras 1 a e1b) e utilizados para a produção de soro antitetânico, anti-rábico e antiofídico. Os animais eram mantidos em regime de semi-extensivo e o manejo incluía complementação alimentar durante o período noturno, recebendo ração balanceada e volumosa sob a forma de capim picado. Sempre foi observada a presença de carrapatos, os quais eram controlados através da aplicação de produtos carrapaticidas por

aspersão. O sistema de manejo inclui o rodízio de produtos à base de piretróides e avermectinas.

3.6.3 - Animais procedentes da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro (PM- RP MONT Campo Grande e Sulacap)

Um total de 208 animais oriundos do município do Rio de Janeiro, os quais são utilizados em rotina de trabalho da Policia Montada, em toda a cidade do Rio de Janeiro. O sistema de manejo era semi-intensivo, recebendo ração balanceada e volumosa sob a forma de capim picado, sendo que a maior parte do tempo os animais eram mantidos em baias individuais, com bom controle de carrapatos.

3.6.4. Animais procedentes do Instituto de Biologia do Exército (IBEx - Gericinó)

Um total de 114 eqüinos oriundos do Instituto de Biologia do Exército (IBEx - Gericinó), localizado no bairro de Marechal Hermes, no Município do Rio de Janeiro, os quais são utilizados para produção de soro antiofídico. O sistema de manejo era do tipo semi-intensivo, recebendo ração balanceada e volumosa sob a forma de capim picado, sendo que a maior parte do tempo os animais eram mantidos em baias individuais, com rigoroso controle de carrapatos.

3. 7 - Sorologia utilizando teste ELISA indireto para *Borrelia burgdorferi*

Realizou-se o ensaio (Figura 1f) para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi lato sensu*, utilizando o antígeno de *B. burgdorferi stricto sensu* cepa G39/40 diluído a 20 µg/ml em tampão carbonato pH 9,6, sensibilizando-se em placas de poliestireno¹⁰ com 96 orifícios, incubadas em câmara úmida a 4°C durante toda noite.

Após sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 a 0,05% e bloqueadas com soro de coelho a 1% diluído em PBS T 20 e mantidas por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente.

Os soros controles (um positivo e oito negativos), bem como os soros testes, foram diluídos em duplicata a 1:800 em PBS T 20, sendo esta etapa do ensaio incubada e lavada como a anterior. Adicionou-se às placas conjugado IgG de coelho anti IgG de eqüino ligado à fosfatase alcalina¹¹ na diluição de 1:1000 em PBS T 20. A incubação e lavagem prosseguiram como na fase anterior. Foram adicionadas às placas a solução reveladora composta pelo substrato PNPP¹² diluído em tampão glicina pH 10,5, na concentração de 1mg/ml. Estas permaneceram à temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) até a revelação e momento de leitura em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios¹³, utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm. Em todas as fases do

¹⁰ Sigma Chemical

¹¹ Sigma Chemical

¹²⁻⁹ Sigma Chemical

¹³ Microplate Reader model 450, Bio-Rad Laboratories

ensaio utilizou-se 200 µl 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.

Os soros foram diluídos na seguinte disposição: a) coluna 1 - contendo PBS T 20 (branco do ensaio); b) colunas 2 e 3 - soros controles positivos em duplicata, diluídos em série crescente ao dobro de 1:400 a 1:51200; c) coluna 4 - a cada orifício foi adicionado um soro controle negativo, com o total de oito controles (2890, 2891, 2892, 2893, 2894, 2895, 2896 e 2897) diluídos a 1:400; d) coluna 5 e as seguintes - foram utilizados para adicionar os soros a serem testados, diluídos a 1:800 (32 amostras por placa) em duplicata.

O conjugado com fosfatase alcalina⁹ foi adicionado em toda placa, após ser diluído a 1:1000 em PBS T 20. A adição do substrato, procedimentos de lavagem, incubação, volume das soluções e leitura da placa foram realizados como descritos nos itens anteriores.

Figura 1 - Algumas etapas relacionadas ao desenvolvimento da pesquisa



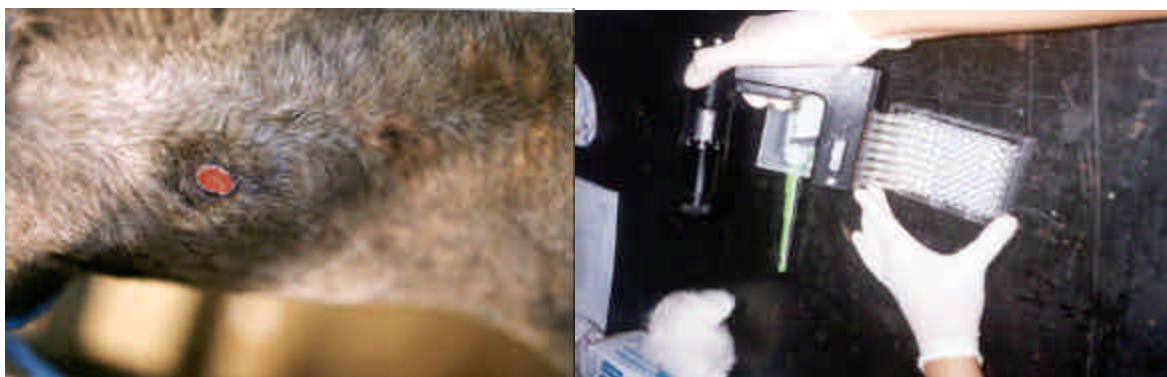
1a - Vista panorâmica da Fazenda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, local de realização de parte dos experimentos

1b - Equinos pertencentes ao Instituto Vital Brazil e à Fazenda da Faculdade de Veterinária da UFF



1c - Colheita de sangue do potro controle positivo para o teste de ELISA

1d - Frasco contendo *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 sonicada e frasco contendo adjuvante



1e - Resolução do abscesso no pescoço do potro controle positivo

1f - Equipamentos utilizados no processamento do teste ELISA

3.8 – Utilização da técnica “Western blotting”

Padronizou-se um “Western blotting” para detecção de anticorpos da classe IgG contra *B. burgdorferi* em equino. Utilizou-se como controle positivo o soro de um animal inoculado experimentalmente com antígeno de *B. burgdorferi* cepa G39-40 e como controle negativo, soro de dois animais sem história de contato com carrapato.

O antígeno foi utilizado na quantidade de 600µg, o soro diluído em 1:100 e 1:200 e o conjugado diluído em 1:2000 e 1:4000. Como bloqueio, testou-se soro bovino a 2% e leite desnatado a 5%. Os soros, o conjugado e os bloqueios foram diluídos em TBS-T 20. O bloqueio escolhido foi o leite desnatado a 5%, o soro na diluição de 1:200, o conjugado na diluição de 1:4000.

Realizou-se o “Western blotting” dos soros eqüinos com a finalidade de confirmar os soros positivos pela técnica ELISA. Foi analisado um total de 98 amostras de soros, dos quais 49 eram ELISA positivos, e 49 eram ELISA negativos. Foram utilizados um controle positivo e dois controles negativos em cada teste.

Realizou-se a eletroforese de 600µg de extrato de *B. burgdorferi* por duas horas utilizando corrente contínua de 25mA, em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% e gel de empilhamento a 4%. Fez-se a transferência das proteínas do gel para o papel de nitrocelulose, utilizando uma corrente de 25V, por 18 horas na geladeira (4 °C). Após a transferência, a fita foi corada com Ponceau,

agitando por 10 minutos, com a finalidade de certificar a presença de proteínas, sendo, a seguir, cortada e bloqueada com leite desnatado a 5%, por uma hora. Colocaram-se os soros a serem testados, o controle positivo e os controles negativos na diluição de 1:200 incubando por hora e meia. A seguir, adicionou-se o conjugado anti IgG equino marcado com fosfatase alcalina na diluição de 1:4000, incubou-se por uma hora. Acrescentou-se o substrato revelador BCIP-NBT¹⁴ e aguardou-se o aparecimento de bandas no controle positivo, utilizando-se pesos moleculares conhecidos (PM=24 kDa, PM=45 kDa e, pm=66 kDa). Entre todas as etapas acima, foram feitas três lavagens com TBS-T 20.

3.9 - Exames complementares

3.9.1 –Exame sorológico para leptospirose

Um total de 49 soros positivos para borreliose de Lyme, pelo teste ELISA e 49 negativos, foram aliquotados e enviados ao Laboratório de Leptospirose do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, sob a responsabilidade do professor Walter Lilenbaum.

Para o diagnóstico sorológico, utilizou-se o método de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos (SAM) e leitura em microscopia de campo

¹⁴ Bio-Rad

escuro, conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (MYERS, 1985). Dessa forma, os soros, após centrifugação, foram diluídos a 1/50 em solução de NaCl a 0,85% estéril e, com a adição do antígeno, obteve-se a diluição final de 1/100. A reação de aglutinação foi avaliada sob microscopia de campo escuro de acordo com o percentual de leptospiras aglutinadas, variável de negativa (-), em que não se observou aglutinação entre as leptospiras, até positiva (++++), em que se verificou mais de 75% das leptospiras aglutinadas. Considerou-se reativa uma amostra em que mais de 50% das leptospiras se apresentem aglutinadas.

Com a finalidade de identificar a provável sorovariante infectante, considerou-se a positividade de um soro para a sorovariante em que se observou a aglutinação mais evidente. Como antígenos, foram utilizadas culturas de leptospiras sorovariantes: *autumnalis* (Akiyami A), *bratislava* (Jez bratislava), *canicola* (Hond Utrecht IV), *hardjo* (Hardjopratiño), *icterohaemorrhagiae* (RGA), *copenhageni* (M 20), *pomona* (Pomona) e *wolffi* (3705), mantidas em meio de Ellinghausen (conforme Myers, 1985) enriquecido com albumina bovina.

3.9.2 – Exame sorológico para anemia infecciosa eqüina¹⁵

Um total de 49 soros positivos e 49 negativos para borreliose de Lyme, pelo teste ELISA, foram aliquotadas e enviadas ao Laboratório de Biologia

¹⁵ TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná.

Animal. Pesagro-Rio na Alameda São Boaventura, Horto de Niterói, RJ. Inicialmente, depositaram-se 2 ml de agar fundido a 2%, formando uma camada de 1,3 mm de espessura após a solidificação em placa de Petri (60 mm de diâmetro e 16 mm de altura). As placas foram conservadas à temperatura de geladeira (4 °C), até duas semanas, em recipientes fechados hermeticamente. A seguir colocou-se uma camada de agar a 1% (a 60 °C) sobre a base solidificada de agar a 2%, no momento em que a placa foi utilizada. Deixou-se esfriar as placas à temperatura ambiente (28 °C), por 15 minutos, para permitir a evaporação. Colocaram-se na geladeira, em recipiente fechado, para completar o estado de gel, durante alguns minutos, antes de serem utilizados. A técnica utilizada consistiu em colocar seis cavidades de 4 milímetros (mm) cada uma, com 3 mm de separação entre elas e uma cavidade central para o antígeno de 4 mm de diâmetro também. Esta disposição possibilitou a determinação de reação de identidade na precipitação. O teste foi realizado segundo descrição original*

3.9.3 - Soroaglutinação rápida em placa para brucelose¹⁶

Um total de 49 soros positivos e 49 negativos, para borreliose de Lyme, pelo teste ELISA foram aliquotados e enviados ao Laboratório de Biologia Animal. Pesagro-Rio na Alameda São Boaventura, Horto de Niterói, RJ.

* COGGINS (1972)

¹⁶ TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná.

O antígeno para diagnóstico da brucelose consistiu em suspensão celular inativada de *Brucella abortus* amostra 1119-3, a 10 - 12% por volume, corada com solução de verde brilhante e cristal violeta, padronizado por comparação com antígeno de referência. Sua preparação obedeceu técnica internacional recomendada pelo Ministério da Agricultura. Observou-se a seguinte rotina para processamento dos soros testes: Antígeno e soro permaneceram por 30 minutos à temperatura ambiente antes de ser iniciada a prova; utilizou-se conta-gotas aferido para 0,03ml por gota de antígeno, placa de vidro com quadriculado padrão¹⁷ e caixa apropriada para manter constante a temperatura do teste; usou-se pipetas sorológicas de 0.2 ml, previamente limpas e secas.

Processamento: 1) O frasco de antígeno foi agitado suavemente para sua homogeneização; 2) com a pipeta inclinada num ângulo de 45 graus, em contato com a placa, foram depositadas nos quadriculos de cima para baixo, quantidades de 0.08 – 0.04 – 0.02 e 0.01ml de soro; 3) com o conta-gotas em posição vertical (sem encostar no soro), pingou-se 1 gota de antígeno em cada porção de soro; 4) misturou-se o soro e o antígeno com bastão de vidro, começando pela gota que continha 0.01 ml de soro no sentido de baixo para cima homogeneizando a mistura em círculos com diâmetros adequados; 5) promoveu-se movimentos circulares com a placa e deixou-se em repouso, marcando o início da prova; 6) após os três minutos, promoveu-se 3 ou 4 suaves movimentos rotativos com a

¹⁷ TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná

placa, a qual foi deixada em repouso; 7) no oitavo minuto, registrou-se as reações e procedeu-se à leitura.

3.9.4 - Soroaglutinação acidificada tamponada para brucelose¹⁸

Um total de 49 soros positivos e 49 negativos, para borreliose de Lyme, pelo teste ELISA foram aliquotados e enviados ao Laboratório de Biologia Animal. Pesagro-Rio na Alameda São Boaventura, Horto de Niterói, RJ.

O antígeno¹⁹ consistiu em suspensão celular inativada de *Brucella abortus* amostra 1119-3, corada com rosa bengala, diluída a 8% em solução tampão pH 3,63 padronizado por comparação com antígeno de referência. Este antígeno, devido a seu pH, inibe algumas aglutininas inespecíficas que proporcionam resultados satisfatórios em soros de animais não vacinados, pertencentes a rebanhos classificados como sorologicamente suspeitos.

Processamento: 1) O frasco de antígeno foi agitado suavemente para sua perfeita homogeneização; 2) com a pipeta inclinada num ângulo de 45 graus, em contato com a placa, foram depositados nos quadrículos de cima para baixo, quantidades de 0.08 – 0.04 – 0.02 e 0.01ml de soro; 3) com o conta-gotas em posição vertical (sem encostar no soro), pingou-se 1 gota de antígeno em cada porção de soro; 4) misturou-se o soro e o antígeno com bastão de vidro, começando pela gota que continha 0.01 ml de soro no sentido de baixo para cima

¹⁸ TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná.

homogeneizando a mistura em círculos com diâmetros adequados; 5) promoveu-se movimentos circulares com a placa e deixou-se em repouso, marcando o início da prova; 6) após 4 minutos, promoveu-se 10 a 12 suaves movimentos rotativos com a placa, a qual foi deixada em repouso; 7) no quinto minuto, procedeu-se à leitura.

3.10 - Análise estatística

Os dados obtidos no presente estudo foram analisados, utilizando-se: tabelas com distribuição de frequência e percentuais; teste não paramétrico do χ^2 (Qui-quadrado), para comparação de proporções, através de tabelas de contingência, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Padronização do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto para testes sorológicos em eqüinos

Durante todo o experimento, tanto os animais controle positivo e negativos para *B. burgdorferi* permaneceram negativos nos exames hemoscópicos para hematozoários e na soroaglutinação microscópica para as oito sorovariantes do gênero *Leptospira*. ISHIKAWA (2000) encontrou resultado semelhante no estudo de borreliose de Lyme em bovinos do Estado do Rio de Janeiro.

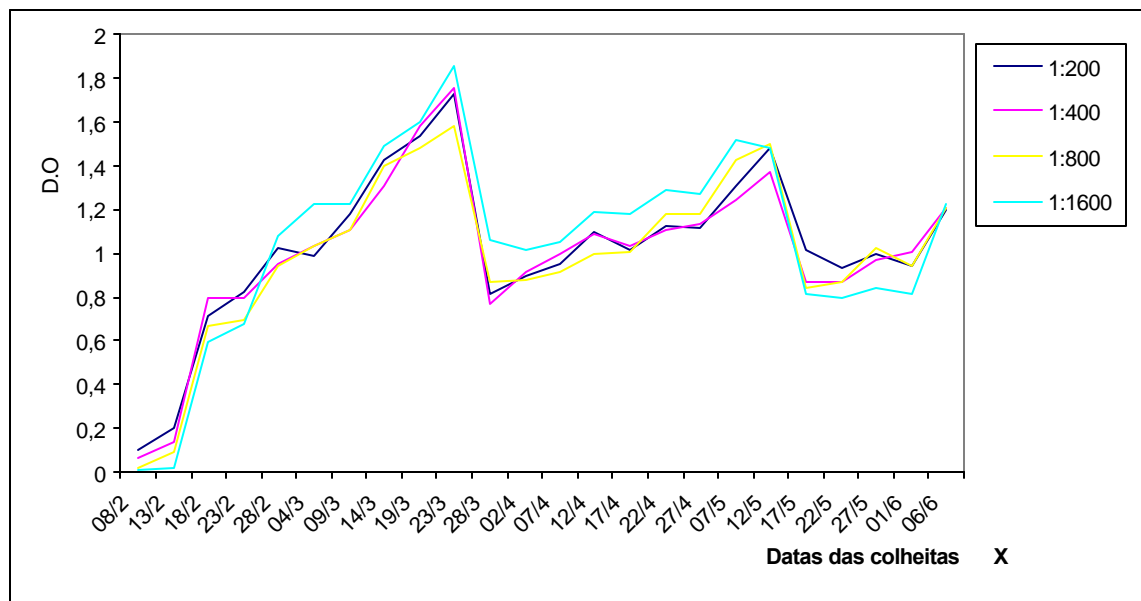
Na análise das médias da densidade óptica (DO) obtidas na interação de quatro concentrações de antígeno e de quatro diluições do soro hiperimune com três diluições do conjugado, pôde-se observar que nas concentrações de antígeno de 5,0; 10,0; 15,0 µg/ml, os valores da DO foram menores do que na concentração 20,0µg/ml cujos valores de DO mostraram-se elevados. As diluições do soro

apresentaram uma inclinação compatível à diluição do conjugado, tendo a diluição 1:800 dos soros apresentado valores próximos às diluições de 1:200 e 1:400 e distante dos valores da diluição 1:1600.

Quando analisada cada diluição do conjugado, verificou-se que as diluições 1:500 e 1:1000 mostraram valores da DO elevados, enquanto que na diluição 1:2000 estes valores foram baixos demonstrando, possivelmente, a diminuição da concentração ou falta de conjugado na reação. Então, durante a obtenção da curva de anticorpos IgG do animal imunizado, utilizou-se uma placa com a diluição do conjugado a 1:500 e outra a 1:1000, a fim de verificar qual a diluição ideal. Os resultados das reações na placa onde o conjugado foi diluído a 1:500 não foram satisfatórios, pois na análise gráfica obteve-se picos irregulares na resposta imune do animal, demonstrando, possivelmente, excesso de conjugado nesta diluição. Na placa onde foi utilizada a diluição 1:1000, os resultados foram satisfatórios, correspondendo à resposta imunológica do animal frente aos inóculos realizados. A análise do controle negativo, mostrou-se com valores de DO desprezíveis.

Ao avaliar as 24 colheitas do animal controle positivo, observou-se resposta satisfatória do animal a cada inóculo, mantendo-se crescente com ligeiro declínio,

Figura 2 – Perfil da produção de anticorpos do equino inoculado com antígeno de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40. Curva das quatro diluições do soro e conjugado 1:1000



com ligeiro declínio, após o quarto inóculo do antígeno, provavelmente em decorrência de abscesso séptico no local da inoculação (Figura 1e).

Realizou-se a análise estatística e/ou gráfica, quando necessária, de cada etapa do experimento, através do “software Microsoft Excel versão 5.0 (1985 - 1994, Microsoft Corp. USA) e/ou análise estatística manual, utilizando-se média

aritmética, desvio padrão e linha de corte “*cut-off*”. Os valores processados foram obtidos da absorvância, expressos em densidade óptica pelo espectrofotômetro leitor de microplacas de 96 orifícios¹.

A linha de corte “*cut-off*” foi obtida e estimada pelo valor da média das densidades ópticas dos oito soros negativos mais três vezes o valor do desvio padrão, obtendo, assim, um nível de confiança de 99,9% (FONSECA *et al.*, 1985), sendo a linha de corte o valor mínimo acima do qual a média da duplicata do soro teste deve encontrar-se para estar positivo.

A partir dos valores em densidade óptica do controle positivo com suas respectivas diluições (títulos), foi desenvolvida a curva de regressão, que auxiliou na obtenção do título da amostra a ser testada.

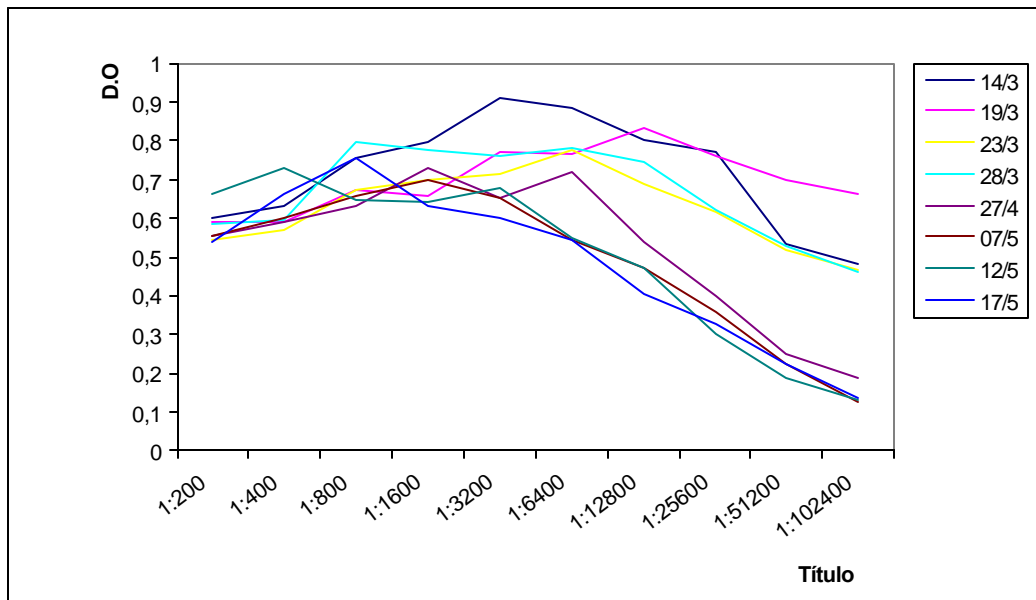
Sobre o valor do título mínimo estimado (1:400), projetou-se uma linha cruzando a linha de corte e paralela ao eixo Y (DO), a qual orientou na obtenção do título da amostra analisada. Assim, na análise gráfica, a amostra positiva deve ter uma média de DO acima do valor da linha de corte. E esta deve, no gráfico, partir perpendicularmente do eixo de Y (DO), tocar a linha do título mínimo (1:400) indo, paralelamente à linha de regressão (controle positivo), tocar a linha de corte, partindo perpendicularmente da linha de corte para o eixo de X (título), obtendo-se o título estimado.

¹ Microplate Reader model 450, Bio-Rad Laboratories

A definição do soro hiperimune baseou-se no nível de anticorpos altos ($DO > 1.000$) e a titulação manteve-se alta mesmo após o último inóculo. Os soros das colheitas 17, 19, 20 e 21, foram os que melhor se enquadraram nos parâmetros propostos, apresentando uma atividade de anticorpos com título de 1:102400 satisfatória (Figura 3).

O ensaio foi determinado utilizando-se, para a sensibilização, antígeno a $20\mu\text{g/ml}$, soros testes bem como controles negativos diluídos a 1:800, controle positivo diluído de 1:800 a 1:102400 e conjugado a 1:1000. A análise dos controles negativos demonstrou que a média das densidades ópticas destes encontra-se abaixo do valor observado na maior diluição do controle positivo (1:102400).

Figura 3 – Titulação de oito soros hiperimunes do equino inoculado, anti *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, para definição do padrão positivo



Para a obtenção de soro hiperimune contra *Borrelia* sp, faz-se necessária a negatividade comprovada de infecção ou anticorpos anti *Leptospira* sp., a fim de se evitar reações cruzadas (McKENNA *et al.*, 1995); assim justifica-se o teste das oito

variantes sorológicas com maior prevalência, segundo recomendação da OMS para a espécie eqüina, as quais foram negativas.

A negatividade para hematozoários e para *L. interrongans* e *L. biflexa*, bem como os parâmetros hematológicos normais validaram o uso dos animais controles. Diferentes concentrações antigênicas têm sido utilizadas para sensibilizar microplacas, desde 5µg/ml a 30µg/ml (McKENNA *et al.*, 1994). BERNARD *et al.*, (1990) utilizaram 5µg/ml de antígeno sonicado de *B. burgdorferi* ao desenvolver ELISA indireto para eqüinos. BENXIU *et al.* (1994) utilizaram a diluição de 1:200 para bovinos, enquanto BERNARD *et al.* (1990) relataram para eqüinos a diluição de 1:500; e, ao desenvolver ELISA indireto para bovinos utilizando a proteína flagelar P41 (41 kDa), BENXIU *et al.* (1994) otimizaram o ensaio com soros diluídos a 1:200. Ao inocular antígeno de *B. burgdorferi* com adjuvante completo de Freund em cão, JOPPERT (1995) relatou o surgimento de anticorpos sete dias após o primeiro inóculo. Em bovinos, com antígeno livre de adjuvantes, ISHIKAWA (1997) relatou o surgimento de anticorpos seis dias após o primeiro inóculo e crescimento após cada inóculo, observando o pico de anticorpos nove dias depois do terceiro inóculo. A produção de anticorpos no presente trabalho foi observada a partir do quinto dia depois da inoculação. O perfil da curva de anticorpos foi alterado em decorrência de abscesso séptico, a qual foi restabelecida, após o tratamento e recuperação do animal. Este fato, foi compatível com os

resultados observados por JOPPERT (1995) e ISHIKAWA (1997), tendo o equino imunizado demonstrado uma resposta imunológica satisfatória.

O soro hiperimmune foi relatado por JOPPERT (1995), aos 28 dias depois do último inóculo (segundo inóculo) e por ISHIKAWA *et al.* (1997) aos 18 dias após o último inóculo (terceiro inóculo) apresentando, este, atividade de anticorpos circulantes com título de até 1:6400. No presente estudo obteve-se o padrão hiperimmune aos 30 dias após o último inóculo (quarto), este com atividade de anticorpos de 1:102400. A linha de corte estabelecida no presente ensaio garantiu confiança de 99,9% e o título mínimo de 1:800 reduz as possibilidades de reações cruzadas.

A padronização do ensaio ELISA indireto realizado por ISHIKAWA *et al.* (1997) mostrou-se satisfatória para detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* em bovinos de duas meso-regiões fisiográficas do estado do Rio de Janeiro: Norte Fluminense e Médio Paraíba, sendo, provavelmente, muito útil para auxiliar no diagnóstico de borreliose de Lyme em outras regiões do Brasil, pois demonstrou elevada sensibilidade e especificidade.

4. 2. Exames laboratoriais nos equinos controles negativos e positivo

4.2.1. Hemograma

O volume globular, assim como a hematimetria e a hemoglobinometria (Tabela 1), mostraram tendência a decrescer após a segunda inoculação do antígeno sonicado. Os valores de volume globular e hemoglobina (Tabela 1) estavam diminuídos, em comparação com o resultado da média dos soros dos equinos controle negativos (Tabela 2), o que caracterizou um processo de anemia normocítica e normocrômica. A leucometria global (Tabela 1) revelou elevação relacionada, provavelmente, ao abscesso desenvolvido após o segundo inóculo. A linfocitose absoluta observada está coerente com o leucograma de um potro de 3,5 meses.

A linfopenia (Tabela 1) foi relacionada à reação aos antígenos inoculados e ao abscesso, uma vez que também foi percebida uma tendência à neutrofilia (Tabela 1) nesta ocasião. O número dos monócitos (Tabela 1) mostrou-se elevado ao redor do 40º dia após a primeira inoculação, caracterizando a fase de resolução inflamatória. Nesta fase, a quantidade de neutrófilos (Tabela 1) estava reduzida e o número de linfócitos (Tabela 1) tendia a uma elevação, fenômeno coerente com a evolução da fase aguda para a cronificação.

Não foram observados relatos referentes a alterações leucocitárias em equinos infectados por micorganismos do gênero *Borrelia*. FRIDRIKSDÓTTIR & VERNES (1992) revelaram terem observado leucometria normal. Este dado

confirmou a suspeita de que a leucocitose observada, no presente experimento, era determinada pelo abscesso.

Tabela 1. Hemograma do potro controle positivo submetido a 4 inoculações com antígeno sonicado de *Borrelia burgdorferi* (Cepa G39/40) na concentração de 1 mg por 15 kg de peso vivo

Exame	Seqüência de colheitas (em dias)								
	1 ¹	+ 5	+ 10	+ 15	+ 20	+ 25	+ 30	+ 35	+ 40
Hematimetria (mm ³)	6	6	7,9	8	9,7	6,2	8,4	7	6,2
Hemoglobina (g%)	10	10	11,4	13,1	8,9	10,3	12	11,6	10,3
Volume Globular (µ ³)	30	30	31	40	24	31	36	35	31
Leuco. Global(mm ³)	23.350	23.400	21.800	36.500	25.200	24.800	16.850	16.100	19.000
Basófilo	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Eosinófilo	0	0	0	0	1	0	0	1	1
Bastonetes	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Neutrófilos	23	23	30	59	49	31	27	33	28
Linfócitos	75	75	62	38	45	62	63	60	65
Monócitos	2	2	4	1	4	4	8	5	6

¹ Colheita de sangue realizada no dia da 1ª inoculação do antígeno.

Tabela 2. Média dos valores obtidos nos hemogramas dos 8 potros controle negativos, com sangue colhido no início do experimento

Exames realizados	Média
Hematimetria	8,3
Hemoglobina	13,4
Volume Globular	41,8
Leucometria Global	8988
Eosinófilos	0
Bastonetes	0
Basófilos	0
Neutrófilos	56,7
Linfócitos	42,5
Monócitos	2,5

4.2.2. Bioquímica Sérica

Os níveis séricos de uréia (Tabela 3) estiveram dentro dos valores considerados normais, em relação ao grupo controle negativo, (Tabela 4) até o 20º dia após a primeira inoculação. A partir desta época, observou-se uma ligeira elevação nestes níveis, que tendem para a normalidade a partir do 40º dia. Esta elevação foi associada ao abscesso formado durante o processo de inoculação do antígeno devido à lesão muscular decorrente deste.

Os níveis de creatinina (Tabela 3) tenderam a uma elevação, acompanhando os de uréia (Tabela 3), o que também foi relacionado à necrose muscular com perda de fosfato de creatina e conseqüente formação de creatinina (Tabela 3). Entretanto, estes valores permaneceram dentro da normalidade

Não foram observados fatos que justificassem as elevações dos níveis séricos de uréia e creatinina nos animais inoculados. Entretanto, BURGESS *et al.* (1986) descreveram glomerulonefrites e nefrites intersticiais à necrópsia de eqüinos infectados por *B. burgdorferi*.

Os níveis de glicose (Tabela 3) estiveram ligeiramente elevados na fase de inoculação em relação ao grupo controle negativo (Tabela 4), o que foi relacionado ao estresse sistêmico. BURGESS *et al.* (1986) relataram, em eqüino adulto portador de borreliose, a ocorrência de hiperglicemia importante.

A atividade sérica de AST (Aspartato Amino Transferase) (Tabela 3) esteve elevada no início da fase aguda e tendeu à normalidade. Níveis séricos de cortisol são determinantes de alterações na função hepática, segundo KANEKO *et al.* (1997). No entanto, existe a possibilidade da *Borrelia* sp determinar, nesta fase inicial, suave miopatia. Patologias musculares e abscessos podem determinar esta elevação.

FRIDRIKSDÓTTIR & VERNES (1992) observaram elevação na atividade sérica de AST associada a elevações na atividade de CPK (Creatino Fosfo Quinase) em ovinos infectados na Noruega. BURGESS *et al.* (1996) observaram elevações nas atividades de TGO e CPK em equinos e relacionaram o fato com a ocorrência de traumas ósseos e musculares sofridos pelo animal.

KANEKO *et al.* (1997) descreveram, em eqüinos infectados, a elevação das atividades de AST e CPK. Os referidos autores verificaram que os níveis de selênio e a atividade da Glutation Peroxidase de eqüinos infectados estavam normais concluindo que eles não eram portadores de miopatia. Este relato revelou a possibilidade de alterações enzimáticas causadas por outros fatores.

A atividade sérica de fosfatase alcalina (FAL) esteve elevada a partir do momento da inoculação. Os níveis séricos elevados de FAL (Tabela 3) podem expressar doença hepática; entretanto, a isoenzima induzida por corticosteróides

torna esta determinação pouco específica por elevar-se em várias patologias ou em estresse, segundo KANEKO *et al.* (1997)

Os níveis séricos de colesterol (Tabela 3) estiveram dentro da normalidade. Entretanto, podem elevar-se em doenças hepáticas crônicas, segundo MEYER & HARVEY (2000)

Os níveis séricos de proteínas totais (Tabela 3) tenderam à elevação a partir do 35º dia, quando observou-se uma leve redução dos níveis de albumina (Tabela 3) e elevação das globulinas (Tabela 3). Esta observação está de acordo com a caracterização do momento em que ocorreu a elevação dos níveis de anticorpos, expressos nos níveis de globulina, segundo KANEKO *et al.* (1997), MEYER & HARVE (1998) e FELDMANN *et al.* (2000).

As variações nos níveis de cálcio e fósforo (Tabela 3) estão relacionadas à fase de crescimento do animal e às alterações eletrolíticas decorrentes de lesão renal e do estresse, segundo KANEKO *et al.* (1997).

Tabela 3. Exame bioquímico do potro controle positivo submetido a 4 inoculações com antígeno sonicado de *Borrelia burgdorferi* (Cepa G39/40) na concentração de 1 mg por 15 kg de peso vivo

Exame	Seqüência de colheitas (em dias)								
	1 ¹	+ 5	+ 10	+ 15	+ 20	+ 25	+ 30	+ 35	+ 40
Uréia (mg/dl)	34	33	34	33	57,5	53,4	43,3	44,4	39
Creatinina(mg/dl)	0,55	0,79	0,88	0,79	1,6	1,55	1,1	1,98	1,3
Glicose (mg/dl)	93,6	123,8	133,4	123,8	99,5	-	87,3	94	60
AST (UI/L)	38,5	72,3	40,9	72,3	44,8	45,7	67,9	45,7	16,8
FAL (UI/L)	283,7	156,4	346	156,4	120,6	152,1	184,6	124,2	139,7
Colesterol (mg/dl)	94,1	130,3	126,8	130,3	97,8	-	-	-	-
P. Totais(mg/dl)	7,59	9,28	9	9,28	9,2	5,9	6,1	11,8	5,1
Albumina (g/dl)	2,15	3,1	3,1	3,1	1,8	2,5	2,4	2,5	2,6
Globulin (g/dl)	5,44	6,8	5,9	6,18	7,4	3,4	3,7	9,3	2,5
Cálcio (mg/dl)	13,9	-	-	-	9	-	8,9	9,1	12,9
Fósforo (mg/dl)	4,65	4,47	3,7	7,41	8,4	-	7,1	9,3	7,2

¹ Colheita de sangue realizada no dia da primeira inoculação do antígeno.

AST Asparato Amino Transferase

FAL Fosfatase Alcalina

Tabela 4. Média do exame bioquímico sérico de 8 potros controles negativos com sangue colhido no início do experimento

Exame	Média
Uréia	35,2
Creatinina	2
Glicose	76,6
AST	46,3
FAL	69,6
Proteínas Totais	6,3
Albumina	2,9
Globulina	3,3
Colesterol	91,3
Amilase	122,8
Cálcio	10,3
Fósforo	2,3

AST Asparato Amino Transferase

FAL Fosfatase Alcalina

4.3 - Análise sorológica pelo método ELISA indireto, para borreliose de Lyme nos eqüinos procedentes do estado do Rio de Janeiro

O exame sorológico de 501 eqüinos mostrou que: 49 (9,8%) foram reagentes ao ELISA indireto, sendo que 36 (7,2%) apresentaram título de 1:800, 10 (2,0%) título de 1:1600 e 3 (0,6%) título de 1:3200; enquanto 452 (90,2%) foram negativos (Tabela 5).

A borreliose de Lyme em eqüinos está bem definida nos Estados Unidos da América e Europa. Para que se conheça a situação epidemiológica deste agente etiológico em outros países como o Brasil, as pesquisas são de fundamental importância, assim como se justifica a padronização do ensaio ELISA indireto como auxiliar no diagnóstico e no inquérito epidemiológico. Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 5 e Apêndice 3) indicam que a prevalência de eqüinos soropositivos foi 9,8%, próximos aos valores encontrados nos Estados Unidos da América, onde os relatos indicam uma freqüência média entre 7 e 34% para eqüinos assintomáticos (BERNARD *et al.*, 1990; COHEN *et al.*, 1992), demonstrando a ocorrência de anticorpos anti *Borrelia* em nosso país. MAGNARELLI *et al.* (1989) encontraram 34% de amostras de sangue positivas para *B. burgdorferi* no teste ELISA, em áreas com alta infestação por carrapatos.

Tabela 5. Prevalência sorológica (IgG) pelo método ELISA indireto, para borreliose de Lyme nos equinos procedentes do estado do Rio de Janeiro

Título	Positivos	Prevalência (%)	
		Relativa* (n=49)	Absoluta** (n=452)
1:800	36	73,5%	7,2%
1:1600	10	20,4%	2,0%
1:3200	3	6,1%	0,6%
Total de positivos	49	(49/49) 100%	(49/501) 9,8%

* = Amostras de positivos

** = Total de casos

O perfil da borreliose de Lyme, no Brasil, foi caracterizado através de estudos clínicos, sorológicos, epidemiológicos e de tratamento realizados em seres humanos (YOSHINARI *et al.*, 1993; YOSHINARI *et al.*, 1995; YOSHINARI *et al.*, 2000) em cães (JOPPERT, 1995; SOARES, 1999) e em bovinos (ISHIKAWA, 1997; FONSECA *et al.*, 1996; ISHIKAWA *et al.*, 2000)

Os 513 bovinos estudados na região Sudeste do Brasil, por ISHIKAWA (1997), apresentaram alta percentagem (70,04%) de soropositivos anti *B. burgdorferi* cepa G39/40 indicando imunidade adquirida ou infecção subclínica, conforme observado em áreas endêmicas, como nos Estados Unidos da América do Norte (BENXIU & COLLINS, 1994). Algumas áreas do estado do Espírito Santo foram consideradas área de risco para a existência da borreliose de Lyme, por apresentarem uma maior porcentagem de animais soropositivos (ISHIKAWA *et al.*, 1997).

Em estudo sobre borreliose em cães da baixada fluminense do estado do Rio de Janeiro, SOARES *et al.* (1999) relataram que, de 150 cães, 20% foram soropositivos. Este resultado encontra-se próximo aos relatados em áreas de risco na América do Norte (MAGNARELLI *et al.*, 1988) e corrobora com a hipótese da ocorrência de microrganismo antigenicamente equivalente da *B. burgdorferi* na região estudada.

Na presente pesquisa, verificou-se que de 42 amostras de sangue de equinos provenientes de pequenas criações de Seropédica, 42,8% (18 animais) foram positivos ao teste ELISA indireto. Destes, 28,6% (12 animais) reagiram ao título de 1800; 11,9% (5 animais) reagiram positivamente ao título de 1:1600; 2,3% (1 animal) reagiu positivamente ao título de 1:3.200; e 57,1% (24 animais) foram negativos (Tabela 6; Apêndice 3).

Os carrapatos são transmissores naturais de espiroquetas do gênero *Borrelia*, e a infestação natural por populações elevadas de carrapatos pode ser considerada um indicador de altos títulos sorológicos.

Os animais provenientes de Seropédica são de criação extensiva com alta infestação por carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense*, *Anocentor nitens* e *Boophilus microplus*. Este resultado mostra relação direta entre a presença de carrapatos e o exame sorológico para *Borrelia* sp. REES & AXFORD (1994) e OLIVER *et al.* (1999), estudando diferentes hospedeiros vertebrados, inclusive equinos selvagens, demonstraram que existe correlação entre o parasitismo por carrapatos e a presença de anticorpos para *B. burgdorferi*. Este mesmos autores evidenciaram que hospedeiros resistentes podem servir de fonte de infecção para carrapatos e constituírem-se de sentinela para indicar a presença do agente etiológico. Resultados semelhantes foram relatados por MARCUS *et al.* (1985); COHEN *et al.* (1992) e SANTINO *et al.* (1998) com relação ao parasitismo de seres humanos por

carrapatos e soropositividade para *B. burgdorferi*. FRITRIKSDÓTTIR *et al.* (1992) observaram ovinos infestados com carrapatos e com sinais clínicos semelhantes aos de caninos e eqüinos com borreliose de Lyme. Segundo MAGNARELLI *et al.* (1989), potros de região intensamente infestada por carrapatos, de um total de 122 soros examinados, 34% foram considerados positivos para borreliose de Lyme pelo teste ELISA. MAGNARELLI *et al.* (1998) mostram correlação entre a época do ano com maior infestação de carrapatos e exame sorológico compatível com *B. burgdorferi*.

O teste sorológico de 137 amostras de soros de eqüinos provenientes do Instituto Vital Brazil apresentou os seguintes resultados: 17,5% (24 animais) foram reagentes ao ELISA indireto, dos quais 13,1% (18 animais) apresentaram títulos de 1:800, 2,9% (4 animais) com título 1:1600 e 1,4% (2 animais) com título de 1:3200; e um total de 82,5% (113 animais) foram negativos (Tabela7).

Os exames realizados nos 208 animais procedentes da Polícia Militar apresentaram os seguintes resultados: 2,9% (6 animais) foram reagente ao teste de ELISA indireto, dos quais 2,4% (5 animais) apresentaram títulos de 1:800 e 0,4% (1 animal) com título de 1:1600; com um total de 97,1% (202 animais) negativos (Tabela 8).

O teste de ELISA indireto realizado nos animais procedentes do Instituto de Biologia do Exército mostrou um animal positivo (0,9%) com título de 1:800; com 99,1% (113 animais) negativos (Tabela 9).

Quando comparou-se os animais positivos procedentes de Seropédica e Instituto Vital Brazil, encontrou-se $X^2 = 11,49$ ($p=0,006$), mostrando diferença significativa, com maior positividade em Seropédica. Comparando os casos positivos de Seropédica com animais da Polícia Militar, encontrou-se $X^2 = 64,34$ ($p=0,001$), mostrando diferença significativa, com maior positividade em Seropédica. Comparando os casos positivos de Seropédica e do Instituto de Biologia do Exército, encontrou-se $X^2 = 46,72$ ($p=0,001$), mostrando diferença significativa, com maior positividade em Seropédica. Comparando os casos positivos do Instituto Vital Brazil e da Polícia Militar, encontrou-se $X^2 = 22,28$ ($p=0,001$), mostrando diferença significativa, com maior positividade no Instituto Vital Brazil. Comparando os casos positivos do Instituto Vital Brazil e do Instituto de Biologia do Exército, encontrou-se $X^2 = 17,40$ ($p=0,001$), mostrando diferença significativa, com maior positividade no Instituto Vital Brazil. Comparando os casos positivos da Polícia Militar e animais do Instituto de Biologia do Exército, encontrou-se $X^2 = 0,61$ ($p=0,43$), mostrando não ter havido diferença significativa entre estes locais, positividade com diferença puramente aleatória.

Tabela 6 - Prevalência e títulos dos soros de 42 eqüinos, procedentes de pequenos criadores de Seropédica, RJ para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *B. burgdorferi*

Título	Positivos	Prevalência	
		Relativa* (n=18)	Absoluta** (n=42)
1:800	12	66,7% (12/18)	28,6% (12/42)
1:1600	5	27,8% (5/18)	11,9% (5/42)
1:3200	1	5,5% (1/18)	2,3% (1/42)
Total de positivos	18	100% (18/18)	42,8% (18/42)

* = Amostras de positivos

** = Total de casos

Tabela 7 - Prevalência e títulos dos soros de 137 eqüinos, procedentes do Instituto Vital Brazil, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *B. burgdorferi*

Título	Positivos	Prevalência (%)	
		Relativa* (n=24)	Absoluta** (n=137)
1:800	18	75% (18/24)	13,1% (18/137)
1:1600	4	16,7% (4/24)	2,9% (4/137)
1:3200	2	8,3% (2/24)	1,4% (2/137)
Total de positivos	24	100% (24/24)	17,5% (24/137)

* = Amostras de positivos

** = Total de casos

Tabela 8 - Prevalência e títulos dos soros de 208 equinos, procedentes da Policia Militar (Rp Mont Campo Grande e Sulacap), para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *B. burgdorferi*

Título	Positivos	Prevalência	
		Relativa* (n=6)	Absoluta** (n=208)
1:800	5	5/6	2,4% (5/208)
1:1600	1	1/6	0,4% (1/208)
Total de positivos	6	6/6	2,9% (6/208)

* = Amostras de positivos

** = Total de casos

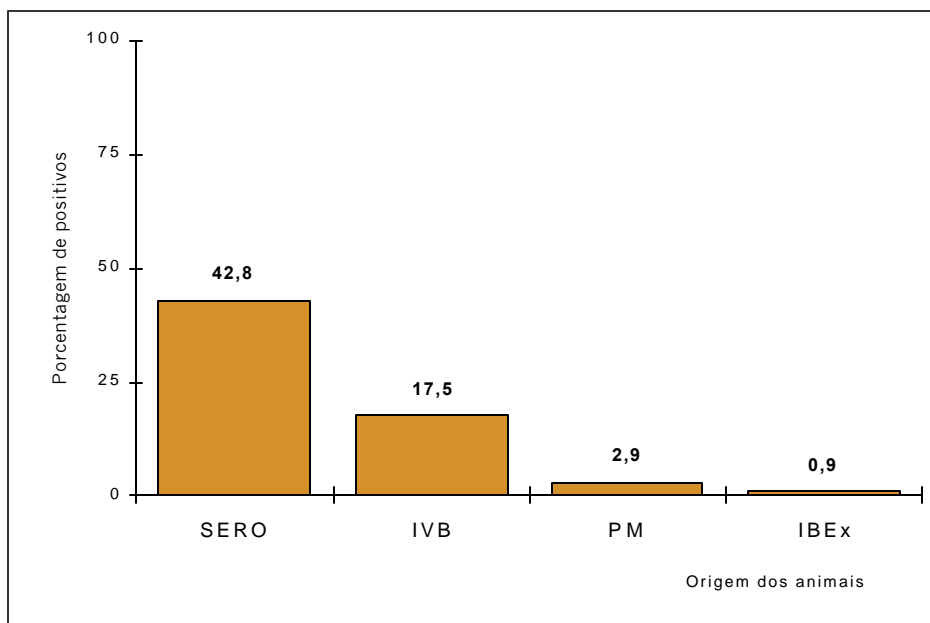
Tabela 9 - Prevalência e títulos dos soros de 114 eqüinos, procedentes do Instituto de Biologia do Exercito, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *B. burgdorferi*

Título	Positivos	Prevalência	
		Relativa* (n=1)	Absoluta** (n=114)
1:800	1	1/1	0,9% (1/114)
Total de positivos	1	1/1	0,9% (1/114)

* = Amostras de positivos

** = Total de casos

Figura 4 Percentual de positividade comparativa ao teste ELISA para *Borrelia burgdorferi*, entre eqüinos de pequenos criadores de Seropédica (SERO), Instituto Vital Brazil (IVB), Polícia Militar (PM) e Instituto de Biologia do Exército (IBEx).



4.4 Exames sorológicos para diagnóstico diferencial entre brucelose, anemia infecciosa eqüina e leptospirose

O exame sorológico constitui em importante auxílio ao clínico e ao estudo epidemiológico, mas este deve ser interpretado em conjunto com o histórico dos animais e da procedência e, para conclusão do diagnóstico com mais segurança é recomendável a utilização de mais de uma colheita em períodos diferentes para eliminar a possibilidade de estímulos antigênicos diversos.

A borreliose de Lyme exige atenção especial pois, devido à possibilidade da existência de espécies diferentes ou variantes antigênicas dentro do gênero *Borrelia* na mesma região e acometendo o mesmo hospedeiro, as reações cruzadas entre estas e a necessidade de padronização dos ensaios com utilização de antígenos adequados para cada região, torna este procedimento trabalhoso e oneroso para ser estabelecido.

No presente estudo, foi realizado exame sorológico para leptospirose em 98 amostras de soros, sendo 49 de animais soropositivos para *B. burgdorferi* e 49 negativos no teste ELISA. Não foi observada diferença quando comparados os dois grupos pelo teste χ^2 (Apêndices 3 e 4). De um total de 50 cavalos selecionados aleatoriamente, MARCUS *et al.* (1985) encontraram, pela imunofluorescência

indireta, 12 cavalos que reagiram positivamente para borreliose. Nenhum destes animais reagiu positivamente para *Lepospira* sp.

De acordo com WELLS *et al.* (1993) e ISHIKAWA, (1997) não existe associação entre a soropositividade para borreliose de Lyme e soropositividade para leptospirose, o que foi confirmado no presente estudo.

Nos eqüinos, a produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* mostrou ser influenciada por alguns estímulos aos quais os animais são freqüentemente submetidos durante o manejo (REES & AXFORD 1994). As vacinas utilizadas rotineiramente podem interferir na interpretação dos resultados sorológicos, especialmente quando associadas com outros estímulos como estresse e infecção parasitária. No entanto, quando esta influência ocorre, geralmente é discreta e pouco persistente (MAGNARELLI *et al.*, 1998; ISHIKAWA, 2000). Na presente pesquisa não foram observadas reações cruzadas significativas entre os dois grupos, ELISA positivo e negativo para *B. burgdorferi*, com *L. interrogans* e *L. biflexa*, *B. abortus* e antígenos da anemia infecciosa eqüina.

Tabela 10 - Distribuição de freqüência dos soros de eqüinos analisados para borreliose de Lyme, brucelose, anemia infecciosa eqüina (AIE), leptospirose, em diferentes localidades, no estado do Rio de Janeiro

Local	Borreliose		Brucelose		AIE		Leptospirose	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Pequenos criadores de Seropédica	18	18	-	36	-	36	4	32
Instituto Vital Brazil -	24	24	1	47	-	48	1	47
Polícia Militar -	6	6	-	12	-	12	1	11
Inst. Biol. Exército -	1	1	-	2	-	2	-	2
Total	49	49	1	97	-	98	6	92

Tabela 11 - Análise comparativa para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *B. burgdorferi* segundo os locais de origem

Locais	Positivos	Negativos	Total
Pequenos criadores de Seropédica	18	24	42
Instituto Vital Brazil	24	113	137
Polícia Militar	6	202	208
Inst. Biol. Exército	1	113	114
Total	49	452	501

$\chi^2 = 82,82$ (p=0.001) Diferença significativa entre os locais

4.5 Análise sorológica utilizando o método “Western blotting” em amostragem de equinos positivos e negativos para o teste ELISA

Na presente pesquisa, o exame sorológico positivo pelo teste de ELISA foi confirmado pela formação de bandas no “Western blotting”. A análise do resultado permitiu considerar que existe uma similaridade entre a cepa padrão G 39/40 de *B. burgdorferi* e o espiroquetídeo estudado no presente trabalho. Este fato pode ser demonstrado pela formação das bandas no “Western blotting” (Figura 5).

A análise dos resultados mostrou que as amostras de soro dos equinos das áreas com alto índice de infestação por carrapatos apresentavam, ao exame, formação de bandas compatíveis com os resultados observados no teste ELISA.

Apesar de inúmeras tentativas no Brasil, não se conseguiu o isolamento da *Borrelia* sp, devido a exigência nutricional específica desta espiroqueta (YOSHINARI *et al.*, 1989; SOARES *et al.*, 2000; ABEL *et al.*, 2000). Outro fator que dificulta o isolamento é a alta frequência de contaminações, por fungos e outras bactérias, do meio de cultivo BSK, mesmo adicionado de antibióticos (OLIVEIRA 2000). O isolamento é determinante para a identificação do agente etiológico específico, existindo a possibilidade de tratar-se de novo espiroquetídeo, que acomete humanos e animais domésticos causando manifestações clínicas

equivalentes às da borreliose de Lyme no Brasil. YOSHINARI *et al.* (2000) propuseram a denominação de Doenças de “Lyme-like” para a Borreliose de Lyme em humanos no Brasil.

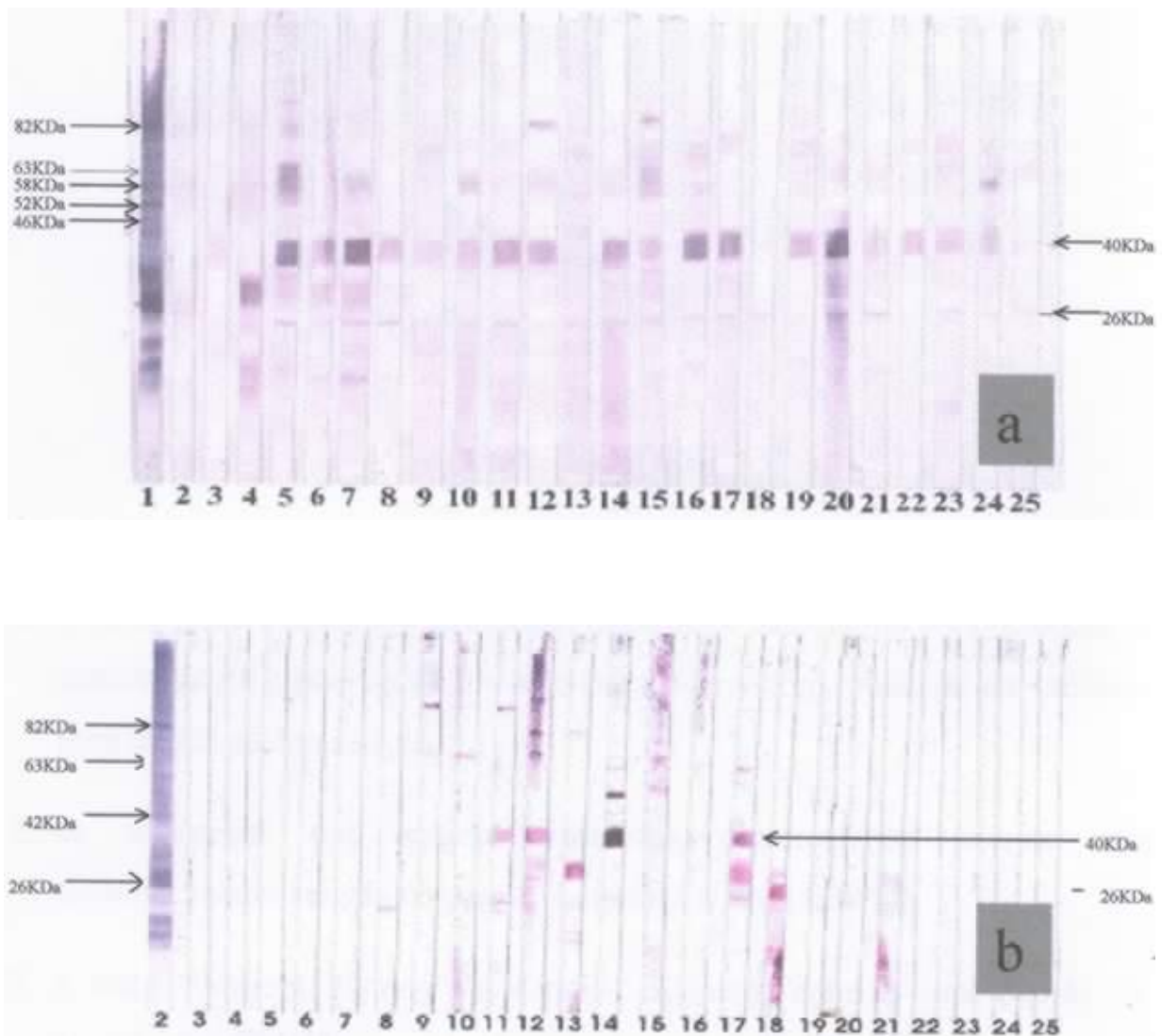


Figura 5 - a. Blotting correspondente a animais oriundos de propriedades de pequenos criadores de eqüinos do município de Seropédica (SERO). Animais intensamente parasitados por carrapatos e com maior número de bandas, confirmando maior número de animais positivos observados no teste ELISA. b. Blotting correspondente a animais oriundos da Polícia Militar (PM), e Instituto de Biologia do Exército (IBEx), onde ocorre severo controle de carrapatos.

5. CONCLUSÕES

1. O teste ELISA indireto padronizado mostrou-se satisfatório para detecção de anticorpos da classe IgG homólogo para *Borrelia* sp, podendo ser utilizado para estudo epidemiológico;
2. os anticorpos dos equinos estudados demonstraram possuir bom reconhecimento antigênico para *B. burgdorferi* cepa G39/40;
3. o teste “Western blotting” evidenciou diferença entre a cepa padrão, *B. burgdorferi* G39/40, com o espiroquetídeo presente em nosso meio;
4. a frequência de soros positivos corrobora a hipótese da ocorrência de *Borrelia* sp no estado do Rio de Janeiro;
5. a infestação de equinos por carrapatos evidenciou relação direta com o grau de positividade para borreliose de Lyme;

6. não foi observada reação cruzada entre os antígenos de *B. burgdorferi* com os antígenos de leptospirose, brucelose e anemia infecciosa equina.

6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I.S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N.H.; SCHUMAKER, T.T.S.

Borrelia-like Spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia county, state of Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95(5):621-624, 2000.

AFZELIUS, A. Erythema chronicum migrans. **Acta Derm. Venereol.**, 2: 120-125, 1921.

ANDERSON, J.F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 539: 190, 1988.

ANDERSON, J.F.; JOHNSON, R.C.; MAGNARELLI, L.A.; HYDE, F.W.

involvement of birds in the epidemiology of Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. **Infection and Immunity**, 51: 394-396, 1986.

BANNWARTH, A. Zur klinik und pathogene der "chronischen lymphocytaren meningitis." **Arch. Psychiatr. Nervenkr.**, 117: 161, 1944.

BARANTON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIROS, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with Lyme Borreliosis. **Int J. Sys. Bacteriol.**, 42:378-83, 1992.

BARBOUR, A.G. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 475-8, 1988.

BARBOUR, A.G.; HEILAND, R.A.; HOWE, T.R. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. **J. Infect. Dis.**, 152: 478-84, 1985.

BARBOUR, A.G.; HEYES, S.F., Biology of *Borrelia* Species. **Microbiol. Ver.**, 50: 381- 400, 1986.

BARROS, P.J.L. Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e reação em cadeia de

polimerase. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 163pp, 2000.

BARROS, P.J.L.; LEVY, L.H.; MONTEIRO, F.G.V.; YOSHINARI, N. H.

Borreliose de Lyme: acometimento cutâneo e tratamento das fases iniciais. **Rev. Ass. Med. Brasil**, 39: 170-172, 1993.

BENACH, J.L.; BOSLER, E.M.J.P.; COLEMAN, J.L.; HABICHT, G.S.;

BAST, T.F.; CAMERON, D.J.; ZIEGLER, J.L.; BARBOUR, A.G.;

BURGDORFER, W.; EDELMAN, R.; KASLOW, R.A. Spirochetes

isolated from the blood of two patients with Lyme Disease. **New Engl. J.**

Med., 308: 740, 1983.

BENACH, J.L.; COLEMAN, J.L.; SKINNER, R.A. Adult *Ixodes dammini* on

rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia*

burgdorferi. **J. Infect. Dis.**, 155: 1300-1306, 1987.

BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H.; PAGANELLI, C.H.; YOSHINARI, N.H.;

GREGORY, L.; BIERGEL Jr.E.H.; ATAYDE, P.F. Lyme disease in

cattle in Brasil. **Vector Ecol. Newsl.** 26: 5-6, 1995.

BENNETT C.E. Ticks and Lyme disease. **Adv. Parasitol.** 36:343-405, 1995.

- BENXIU & COLLINS, M. Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin. **Am. J. Vet Res.**, 55:1228-1231, 1994.
- 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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 196:1255-1258, 1990.
- BURGDORFER, W.; BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Lyme Disease: a tick borne spirochetosis? **Science**, 216: 1319,1982.
- BURGESS E.C., GILLETTE D. & PICKETT J.P. Arthritis and panuveitis as manifestation of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 189:1340-1342. 1986 b.
- BURGESS, E.C. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. **Ann. NY Acad. Sci.**, 539: 235-43, 1989.
- 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. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 35: 355-359, 1986.

BURGESS, E.C.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; WRIGHT, W.O. Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow. **JAVMA**, 191: 1468-1470, 1987.

CAROLINE, N.H.; MAYHEW, I.G.; WHITWELL, K.E.; SMITH, K.C.; CAREY, D.; CARTER, S.D.; READ, R.A. A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. **Equine Vet. J.**, 28:84-88, 1996.

CARTER, S.D.; MAY, C.; BARNES, A.; BENNETT, D. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. **Equine vet. J.**, 26: 187-190, 1994.

CARTER, S.D.; MAY, C.; BARNES, A.; BENNETT, D. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. **Equine vet. J.**, 26: 187-190, 1994.

CHANG, Y.F.; NOVOSO, V.; McDONOUGH, S.P.; CHANG, C.F.; FACOBSON, R.H.; DIVERS, T.; QUIMBY, F.W.; SHIN, S.; LEIN, D.H. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. **Vet. Patol.**, 37:68-76, 2000.

COHEN N.D. & COHEN D. 1990. Borreliosis in horses: a comparative review. **The Compendium.**, 12:1449-1458.

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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 201:1030-1034, 1992.

COLES, H. **Veterinary Clinical Pathology**. 4a ed. Philadelphia. W.B. Saunders Comp: 486p., 1986.

COYLE, P.K. Lyme Disease. **Mosby Year Book**, St. Louis, Missouri, 235 pp., 1993.

DRESSLER, F.; ACKERMAN, R.; STEERE, A.C. Antibody responses to the three genomic of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis. **The Journal of Infection Diseases**, 169: 313-318, 1994.

EUZEBY, J.P. Les espèces et les genres bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 1994. **Rev. de Med. Vét.**, 146, 1995.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 1344 p. 2000.

FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Borreliose de Lyme. **Rio Dermatol.**, 2: 4-5, 1989.

FONSECA A.H., ISHIKAWA M.M., SOARES C.O., MASSARD C.L. & YOSHINARI N.H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Revta. Univ. Rural. Sér. Cienc. da Vida**, 18:85-89, 1996.

FONSECA, A.H.; SOARES, C.O; ISHIKAWA, M.M.; MASSARD, C.L.;
 YOSHINARI, N.H. Detection of *Borrelia* sp in opossum (Marsupialia:
 Didelphidae) in Brazil. **Anais XXV Congress of the World Veterinary
 Association**. Yokohama, Japão, Setembro, 1995.

FONSECA, A.H.; SOARES, C.O; ISHIKAWA, M.M.; MASSARD, C.L.;
 YOSHINARI, N.H. Lyme Borreliosis sorology in cattle and dogs in
 Brazil. **Anais XXV Congress of the World Veterinary Association**.
 Yokohama, Japão, Setembro, 1995.

FRIDRIKSDÓTTIR, V.; OVERNES, G.; STUEN, S. Suspected Lyme
 borreliosis in sheep . **The Vet. Rec.**, 130: 323-324, 1992.

GERHARDS H. & WOLLANKE, B. Antibody titers against *Borrelia* in horses
 in serum and in eyes and occurrence of equine recurrent uveitis. **Berl
 Munich Tierarztl Wochenschr**, 109:273-278, 1996

HERXHEIMER, K. & HARTMANN, K.U. Acrodermatitis chronica
 atrophicans. **Arch. Dermatol. Syph.**, 61: 255-300, 1902.

HOOGSTRAAL H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv.
 Parasitol.** 24:135-238, 1985.

ISHIKAWA M.M., FONSECA A.H., SOARES C.O., MASSARD C.L. &
 YOSHINARI N.H. Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA

indireto para pesquisa de anticorpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. **Revta. Bras. Med. Vet.** 19:166-168, 1997.

ISHIKAWA, M. M. Pesquisa de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em condições experimentais e de infecções naturais em bovinos. **Tese de Doutorado.** Medicina Veterinária (Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2000.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology.** Philadelphia. Lea & Febiger 417p. 1993.

JOHNSON, R.C.; SCHIMID, G.P.; HYDE, F.W.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etilogic agent of Lyme disease. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34: 496, 1984.

JOHNSTON, Y.E.; DURAY, P.H.; STEERE, A.C. Lyme Arthritis: spirochetes found in synovial microangiopathic lesions. **Amer. J. Pathol.**, 118: 26-34, 1985.

JOPPERT, A.M. Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo. **Tese de Mestrado.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 83 pp. 1995.

KANEKO,J.J; HARVEY,J.W. & BRUSS,M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5a ed. **Philadelphia. Ac. Press.:**932p., 1997.

LIPSCHULTZ, B. Weiterer beitrage zur kenntnis des "erythema chronicum migrans". **Arch. Dermatol Syph.**, 143: 365-374, 1923.

LIPSKER, D.; CRIBIER, B.; GRSSHANS, É. Manifestations cutanées des borrelioses. *Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris)* , **Dermatol.**, 98-345-A-10, 8p, 1999.

MAGNARELLI, L.A. & ANDERSON, J.F. Class-specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids. **JAVMA**, 195:1365-1368, 1989.

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 Carolina. **J. Wildl. Dis.**, 22: 178-188, 1986.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; SCHREIER, A.B.; FICKE, C.M. Clinical and serologic studies of canine Borreliosis. **JAVMA**, 191: 1089-1094, 1987.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; SHAW, E.; POST, J.E.; PALKA, F.C. Borreliosis in equids in Northeastern United States. **Am. J. Vet. Res.**, 49: 359-362, 1988.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; SHAW, E.; POST, J.E.; PALKA, F.C. Borreliosis in equids in Northeastern United States. **Am. J. Vet. Res.**, 49: 359-362, 1988.

MAGNARELLI, L.A.; MEEGAN, J.M.; ANDERSON, J.F.; CHAPPELL, W.A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme Disease. **J. Clin. Microbiol.**, 20: 181-184, 1984.

MARCUS L.C., PATTERSON M.M. & GILFILLAN R.E. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses. **Am. J. Vet. Res.** 46:2570, 1985.

MCKENNA, P.; CLEMENTE, J.; VAN DIJCK, D.; LAUWERYS, M.; CAREY, D.; VAN DEN, B. & BIGAIGNON, G. 1995. Canine Lyme disease in Belgium. **Vet. Rec.** 136:224-247, 1995

MEYER, D & HARVEY, J.W. **Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation e Diagnosis.** 2^a ed. Philadelphia. W.B. Saunders Comp: 373p.1998

MYERS, D. M *Manual de Metodos para el diagnostico de la leptospirose.*

Centro Panamericano de Zoonoses, **Nota Tecnica**, 30 p.,1985.

NEITZ W.O. A consolidation of our knowledge of the transmission of tick-

borne diseases. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 27:115-163, 1956.

NOCTON, J. J.; DRESSLER, F.; RUTLEDGE, B. J.; RYS, P. N.; PERSING,

D. H.; STEERE, A.C. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by

polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme

arthritis. **N. Engl. J. Med.**, 330: 229-34, 1994.

OLIVEIRA, A. Cultivo de *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales:

Spirochaetaceae) em diferentes meios. **Tese de Doutorado**. Curso de Pós-

Graduação em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária. UFRRJ,

114pp., 2000.

OLIVER Jr., J.H.; OWSLER, M.R.; HUTCHENSON, H.J.; JAMES, A.M.;

CHEN, C.; IRBY, W.S.; DOTSON, E.M.; McLAIN, D.K. Conspecificity

of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). **J. Med.**

Entomol., 30: 54-63, 1993.

PARKER, J.L.; WHITE, K.W. Lyme Borreliosis in cattle and horses: a review

of the literature. **Cornell-Veterinarian**, 82: 253-274, 1992.

PIESMAN, J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. **J. Infect. Dis.**, 167: 1082-5, 1993.

PREAC-MURSIC, V.; WILSKE, B.; SCHIERZ, G.; PFISTER, H.W. & EINHAUPL, K. Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis. **Bannwarth. Eur. J. Clin. Microbiol**, 3: 564-565, 1984.

QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B.K. & CARTER G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. First Edition. Wolfe Publishing, London, p.292-303, 1994.

REES, D.H.E. & AXFORD, J.S. Lyme disease: A rare but clinically important disease in the UK. **Equine Vet. J.** 26: 175-177. 1994.

SANTINO, I.; IORI, A.; SESSA, R.; SULLI, C.; FAVIA, G.; PIANO, M. D. *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Ehrlichia chaffeensis* in the National Park of Abruzzo. **FEMS Microbiol. Letters**, 164: 1-6, 1998.

SCHRESTA, M.; GRODZICKI, R.L. & STEERE, A.C. Diagnosing early Lyme Disease. **Am. J. Med.**, 78: 235-240, 1985.

SMITH, Jr., L. G.; Pearlman, M.; Smith, L. G. ; Faro, S. Lyme disease: a review with emphasis on the pregnant woman. **Obstet. Gynecol. Survey**, 46: 125-30, 1991.

SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesq. Vet. Bras.** 20: 1-19, 2000.

SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; MANERA, G.B.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Sorologia para borreliose em cães da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **R. bras. Med. Vet.**, 21: 111-114, 1999.

STANEK, G.; KLEIN, J.; BITTNER, R.; GLOGAR, D. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with long-standing cardiomyopathy. **N. Engl. J. Med.**, 322: 249-52, 1990.

STEERE, A. C.; BARTENHAGEN, N. H.; CRAFT, J. E. The early clinical manifestations of Lyme disease. **Ann. Intern. Med.** 99: 7682, 1983.

STEERE, A. C.; DURAY, P. H.; BUTCHER, E. C. Spirochetal antigens and lymphoid cell surface markers in Lyme synovitis. **Arthritis Rheum.**, 31: 487-95, 1988.

STEERE, A. C.; SCHOEN, R. T.; TAYLOR, B. A. E. The clinical evolution of Lyme arthritis. **Ann. Intern. Med.**, 107: 725-31, 1987.

STEERE, A. C.; TAYLOR, E.; WILSON, M. L. Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. **J. Infect Dis.**, 154: 295-300, 1986.

STEERE, A.C. Lyme Disease. **N. Engl. J. Med.**, 321: 586-596, 1989

STEERE, A.C.; BATSFORD, W.P.; WEINBERG, M.; ALEXANDER, J.; BERGER, H. J.; WOLFSON, S.; MALAWISTA, S. E. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. **Ann. Intern. Med.**, 93: 8-16, 1980.

STEERE, A.C.; GRODZICKI, R.L.; CRAFT, J.E.; SCHRESTA, M.; KORNBLATT, A.N.; MALAWISTA, S.E. Recovery of Lyme Disease spirochetes from patients. **Yale J. Biol. Med.**, 57: 557-560, 1984.

TALHARI, S.; SCHETTINI, A. P. M. ; PARREIRA, V. J. Eritema crônico migrans / Borreliose de Lyme - In: Estudo de três casos. **XLII Congresso Brasileiro de Dermatologia**. Goiânia, 1987.

WEINSTEIN, A.; BUJAK, D. I. Lyme disease: a review of its clinical features. **N.Y.State. J. Med.**, 566-71, 1989.

WELLS, S. J.; TRENT, A.M.; ROBINSON, R.A.; KNUTSON, K.S. & BEY, R.F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.**, 54: 398-405, 1993.

WHITWELL, K.E.; SMITH, K.C.; HAHN, C.; MAYHEW, I.G.; CARTER, S.D.; CAREY, D. An equine case of Lyme disease: lesions found at postmortem examination. **Ann. Rheum. Dis.**, 52: 407, 1993.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A.C.; COSSERMELLI, W. Revisão da borreliose de Lyme. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 35: 34-7, 1989.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; FONSECA, A.H.; BONOLDI, V.L.N.; BATTESTI, D.M.B.; SCFITJMAKER, T.S.; COSSERMELLI, W. Borreliose de Lyme - Zoonose emergente de interesse multidisciplinar. **News Lab**, Ano III - 12: 90-104, 1995.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; YASSUDA, P.; BAGGIO, D.; STEERE, A.C.; PAGLIARINE, R.C.; COSSERMELLI, W. Estudo epidemiológico da Borreliose de Lyme no Brasil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 47: 71-5, 1992.

YOSHINARI, N.H.; OYAFUSO, L.K.; MONTEIRO, F.G.V.; BARROS, P.J.L.; CRUZ, F.C.M.; FERREIRA, L.G.E.; BONASSER, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Borreliose de Lyme: Relato de um caso

observado no Brasil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 48: 170-174, 1993.

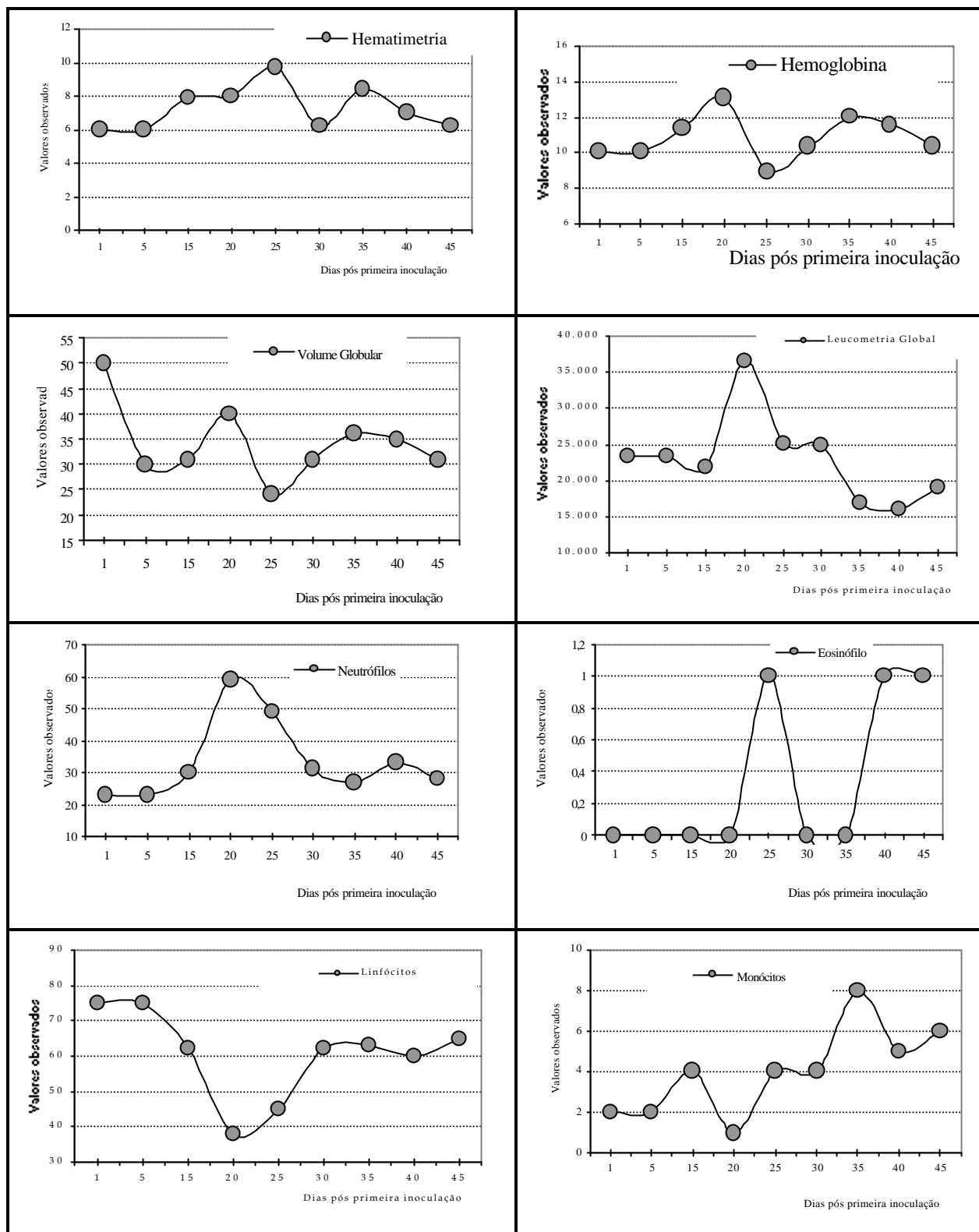
YOSHINARI, N.H.; SOARES, C.O.; FONSECA, A.H.; SCOFIELD, A.; BONOLDI, V.L.N.; ABRAHÃO, M.; BARROS-BATTESTI, D.M. & MADRUGA, C.R. Serology for *Babesia bovis* in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases. **Abstracts Book II – XXI International Congress of Entomology**, Foz do Iguaçu-Brazil. p.820. 2000.

YOSHINARI, N.H.; STEERE, A.C. & COSSERMELLI, W. Revisão da Borreliose de Lyme. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, 35: 34, 1989.

ZINGG B.C. & LEFEBVRE R.B. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriaceae*, putative agent of epizootic bovine abortion. **Am. J. Vet. Res.**, 55:1509-1515, 1994.

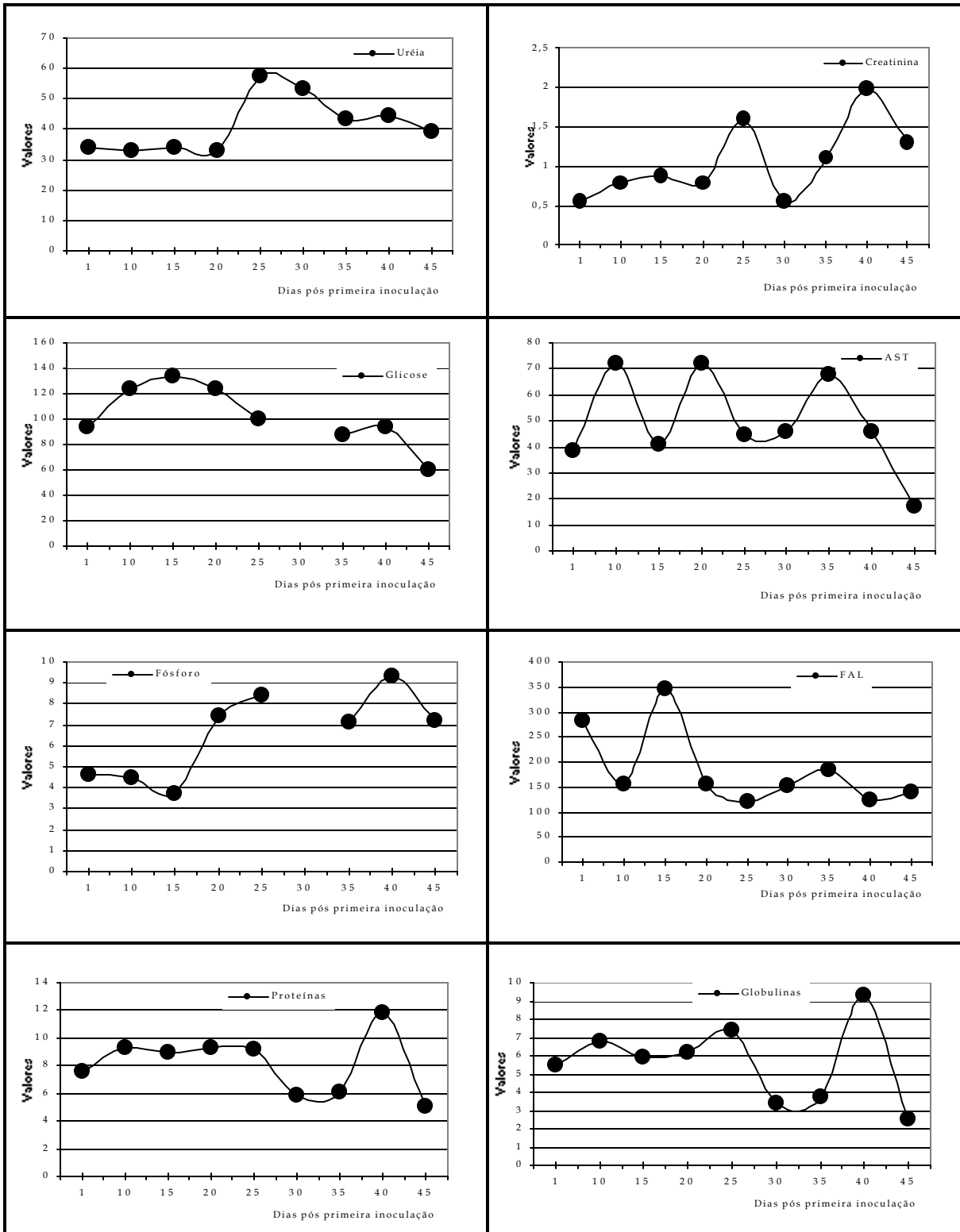
7. APÊNDICE

Apêndice 1 - Curvas obtidas para diferentes parâmetros referentes ao hemograma do potro controle positivo, submetido a quatro inoculações com antígeno sonicado de *Borrelia burgdorferi*



Apêndice 2 - Curvas obtidas para diferentes parâmetros referentes ao exame bioquímico do soro do potro controle positivo, submetido a quatro inoculações com antígeno sonicado de *Borrelia burgdorferi*

AST= Asparato Amino Transferase; FAL= Fosfatase Alcalina



Apêndice 3 - Resultado de exames sorológicos para anemia infecciosa eqüina (AIE), brucelose e leptospirose. Eqüinos soropositivos para borreliose de Lyme

Identificação do animal	AIE	Brucelose		Leptospirose
		SAR	AAT	
PESAGRO (Dez/2000)				
079	N	N		N
16/99	N	+++	N	N
20/99	N	++	N	N
49	N	N		N
53	N	N		N
073	N	N		N
55	N	N		N
03/99	N	N		N
04/99	N	N		N
44	N	N		N
54	N	N		N
14/99	N	++	N	N
84	N	N		P
32/99	N	N		N
51/99	N	N		P
05/99	N	N		N
83	N	N		N
31/99	N	N		P
JÓQUEI (Nov/2000)				
Ubirafiq	N	N		N
P.M.(SULACAP) – (Set/2000)				
Vanjo	N	N		N
Tufão	N	N		N
P.M.(EXÉRCITO) – (Jun/2000)				
218	N			N
P.M.(IVB)				
PI336	N	N		N
PI330	N	N		N
PI313	N	N		N
PI340	N	N		N
PI77	N	N		N
PI94	N	N		N
PI96	N	N		N
PI195	N	N		N
PI345	N	N		N
PI348	N	N		N
PI350	N	++++	P	P
PI361	N	N		N
PI362	N	N		N
TIII196	N	N		N
TIII104	N	N		N
TIII156	N	N		N
TIII268	N	N		N

E103	N	N	N
UFF110	N	N	N
RI109	N	N	N
RI14	N	N	N
RI43	N	N	N
RI51	N	N	N
RI184	N	N	N
C.G./RP.MONTE (Out/2000)			
167	N	N	N
287	N	N	N
711	N	N	N
609	N	N	N

- Soro Controle -

<i>Identificação do animal</i>	<i>AIE</i>	<i>Brucelose</i>		<i>Leptospirose</i>
		<i>SAR</i>	<i>AAT</i>	
Petro131	N	N		N

OBSERVAÇÕES:

N = *Negativo*

P = *Positivo*

AAT = *Antígeno Acidificado e Tamponado*

SAR = *Soro Aglutinação Rápida*

Apêndice 4 - Resultado de exames sorológicos para anemia infecciosa eqüina (AIE), brucelose e leptospirose. *Eqüinos soronegativos para borreliose de Lyme*

<i>Identificação do animal</i>	<i>AIE</i>	<i>Brucelose</i>		<i>Leptospirose</i>
		SAR	AAT	
PESAGRO (Dez/2000)				
050	N	N		N
19/99	N	++	N	N
86	N	N		N
72	N	N		N
80	N	N		N
81	N	N		N
43	N	N		N
01/99	N	N		N
09/99	N	N		N
56	N	N		N
88	N	N		N
85	N	N		P
71	N	N		N
77	N	N		N
82	N	N		N
89	N	N		N
052	N	N		N
11/99	N	+++	N	N
JÓQUEI (Nov/2000)				
Aliseu	N	N		N
P.M.(SULACAP) – (Set/2000)				
Ulisses	N	N		N
Xerox	N	N		N
P.M.(EXÉRCITO) – (Jun/2000)				
238	N			N
P.M.(IVB)				
PI334	N	++	N	N
PI333	N	N		N
PI328	N	N		N
PI322	N	N		N
PI341	N	N		N
PI357	N	N		N
PI311	N	N		N
PI327	N	N		N
PI316	N	N		N
PI310	N	N		N
PI359	N	N		N
PI319	N	N		N
PI202	N	N		N
TIII152	N	N		N
TIII188	N	N		N
TIII265	N	N		N
TIII200	N	N		N

Identificação do animal	AIE	Brucelose		Leptospirose
		SAR	AAT	
P.M.(IVB) - Continuação				
ES/Nº	N	N		N
UFF120	N	N		N
RI185	N	N		N
RI126	N	N		N
RI40	N	N		N
RI153	N	N		N
RI01	N	N		N
C.G./RP.MONTE (Out/2000)				
Argentino	N	N		N
Selma	N	N		N
688	N	N		N
306	N	N		P

- Soro Controle -

Identificação do animal	AIE	Brucelose		Leptospirose
		SAR	AAT	
Faros	N			N
Uruaga	N	N		N
Torbes	N	N		N
Ubatuba	N	N		N
Uga Uga	N	N		N
Troca	N	N		N
J. Donzela	N	N		N
Digitalis	N	N		N

OBSERVAÇÕES:

N = Negativo

P = Positivo

AAT = Antígeno Acidificado e Tamponado

SAR = Soro Aglutinação Rápida