

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

Freqüência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro

Renata Cunha Madureira

2004



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

**FREQÜÊNCIA DE ANTICORPOS HOMÓLOGOS ANTI-
BORRELIA BURGDORFERI EM EQÜINOS DOS MUNICÍPIOS DE
TRÊS RIOS, VASSOURAS E VALENÇA, ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

RENATA CUNHA MADUREIRA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca
e Co-orientação do Professor
Carlos Luiz Massard e
Roberto de Souza Salles

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae** em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2004

636.108969

M183f

T

Madureira, Renata Cunha, 1977-
Frequência de anticorpos homólogos
anti-Borrelia burgdorferi em equinos dos
municípios de Três Rios, Vassouras e
Valença, Estado do Rio de Janeiro/Renata
Cunha Madureira. - 2004.
40f.:il., grafs., tabs.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.
Bibliografia: f.29-37

1. Borrelia burgdorferi-
Teses 2. Imunoglobulinas- Teses. 3. Teste
imunoenzimático- Teses. 4. Equino-
Imunologia- Teses. 5. Equino- Doenças-
Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique
da, 1953- II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Instituto de
Veterinária.

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

RENATA CUNHA MADUREIRA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/02/2004

Aivaldo Henrique da Fonseca PhD. UFRRJ
(Orientador)

Cleber Oliveira Soares PhD. Embrapa/Gado de Corte

Angela Oliveira PhD. UFRRJ

Dedico essa dissertação aos que mais amo: meu pai, Marcos e minha mãe, Carmen Lucia, que me ensinaram com amor, respeito e confiança a lutar pelos meus sonhos. E a Gabriela, minha irmã mais do que amada, amiga e companheira de todos os momentos. Mais essa conquista só tem valor porque vocês estão ao meu lado.

Aos mestres,

**Prof. Aivaldo Henrique da Fonseca pela orientação,
dedicação, apoio incondicional e amizade.**

**Dr. Cleber Oliveira Soares por me ensinar o verdadeiro valor
da pesquisa e do trabalho em equipe, através da confiança e amizade.**

Agradecimentos

Ao Prof. Carlos Luiz Massard pela co-orientação mostrando-se sempre atencioso e disponível.

Ao Prof. Roberto de Souza Salles da UFF pelo auxílio fundamental para a realização deste trabalho e pelo apoio integral.

Ao Prof. Nathalino Hajime Yoshinari pela fundamental ajuda para a execução desse trabalho e pela hospitalidade de toda sua família. Gostaria de agradecer também a Virgínia Lúcia Nazario Bonoldi, Francisca Valtemar de Souza e Cleonice Bueno, do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia/USP que me ajudaram em todo o processamento realizado em São Paulo.

Ao Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes por ter cedido gentilmente o Laboratório de Coccídios e Coccidioses para a execução do ensaio de imunoadsorção enzimática e a todos desse laboratório, em especial ao Dr. Walter Flausino por sua amizade e confiança incentivando-me em todos os momentos.

Ao Dr. Godofredo Mendes de Avelar, Dra. Alzelina e Júlio César Reis pela enorme ajuda levando-nos as fazendas e haras dos municípios de Vassouras, Valença e Três Rios. E meu muito obrigada também aos proprietários dos animais, Médicos Veterinários e funcionários das propriedades visitadas.

Às grandes amigas Alessandra Scofield Amaral, Carina Elisei de Oliveira e Nathalie Costa da Cunha pela paciência, incentivo diário, e profunda amizade sem as quais seria muito difícil a realização desse trabalho.

À Isis Abel Bezerra e Jaime da Silva Pena pelo carinho e amizade. À Cátia Marques da Costa por sua generosidade e apoio. Aos bolsistas do Laboratório de Doenças Parasitárias, Carlo José Freire de Oliveira, Charles Passos Rangel, Daniel da Silva Guedes Jr., Fábio Jorge Moreira da Silva, Fabíola do Nascimento Corrêa e Raquel Silva Lisbôa pela grande ajuda nas coletas de soro e processamento do material. Além da Abisair Andrade de Castro, André Luis Costa de Azevedo, Luciana Rodrigues de Almeida, Patrícia Magalhães Ferreira pelo convívio e amizade.

À todos os meus amigos do curso de Pós-Graduação em especial a Bruno Gomes de Castro, Clarissa Pimentel de Souza, Everton Kort Kemp, Fabiana Valadão Massad, Luiz Eduardo Tavares, Marcel Teixeira e Thiago Campanharo Bahiense.

Aos animais sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro indispensável.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada.

Biografia

Renata Cunha Madureira, filha de Marcos Pinto Madureira e Carmen Lucia Cunha Madureira, nasceu em 17 de setembro de 1977, na cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro (RJ), onde cursou o ensino fundamental e médio no Colégio São Vicente de Paulo, concluindo em 1994.

No ano de 1996, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 8 de setembro de 2001.

Foi bolsista de Iniciação Científica pelo PIBIC no período de julho de 1999 a agosto de 2001, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia. Foi bolsista de Aperfeiçoamento Científico do CNPq de setembro de 2001 a fevereiro de 2002, na mesma linha de pesquisa.

Durante o período acadêmico participou de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública e, no Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ. Colaborou no desenvolvimento de projetos de pesquisa em conjunto com a Universidade de São Paulo, Universidade Federal Fluminense, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Embrapa Gado de Corte. Participou de 26 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais e internacionais.

Em março de 2002 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Área de Concentração Parasitologia Veterinária (CPGCV-PV), em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) entre março de 2002 até o presente momento. E nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RESUMO

Madureira, Renata Cunha. **Freqüência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro.** Seropédica: UFRRJ, 2004. 40p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária).

Borreliose de Lyme é uma espiroquetose transmitida por carrapatos, de ampla distribuição geográfica, que acomete animais domésticos e o homem, tendo como reservatório 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 mais comuns. O presente estudo teve como objetivo determinar a freqüência de eqüinos soropositivos de três municípios do Estado do Rio de Janeiro para *Borrelia burgdorferi*, por meio de inquérito soroepidemiológico utilizando o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto. Procedeu-se a análise sorológica de 769 soros de eqüinos, onde 431 eram do município de Três Rios, 316 eram de Vassouras e 22 eram do município de Valença. Um total de 216 (28,1%) animais foram positivos para borreliose de Lyme. Destes, 169 (22%) apresentaram título de 1:400, 37 (4,8%) título de 1:800, 7 (0,9%) título de 1:1600, 2 (0,3%) título de 1:3200 e 1 (0,1%) título de 1:6400. Os resultados observados foram similares aos descritos nos EUA, onde foram relatadas freqüências de soropositivos variando entre 7 e 34% em eqüinos assintomáticos. Não foram observadas diferenças significativas quanto à raça, sexo e idade. A utilização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi latu sensu* mostrou-se eficiente no auxílio a inquéritos epidemiológicos e diagnóstico. A resposta humoral dos eqüinos estudados, apresentou bom reconhecimento antigênico para *B. burgdorferi* cepa G39/40 e a freqüência de soropositivos reforça a hipótese de ocorrência de uma borreliose semelhante a borreliose de Lyme no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras chave: soroepidemiologia, ensaio imunoenzimático, anticorpos

ABSTRACT

Madureira, Renata Cunha. **Frequency of homologs antibodies against *Borrelia burgdorferi* in found in equines from the municipalities of Três Rios, Vassouras and Valença, state of Rio de Janeiro.** Seropédica: UFRRJ, 2004. 40p (Dissertation, Masters in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology).

Lyme Borreliosis is a widely distributed spirochetosis hosted by wild animals, which is transmitted to domestic animals as well as man by ticks. It can either develop asymptotically or multisystemically. In the equines, this borreliosis has been responsible for dermatologic, oftalmologic, neurologic and articular symptoms, with the most common clinical symptoms being the arthritis and polyarthritis. The present study aims to determine the frequency of equines tested positive in the three municipalities of the state of Rio de Janeiro to *Borrelia burgdorferi* by means of a seroepidemiologic inquiry utilizing the indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A serologic analysis was conducted 769 equines specimens, where 431 were from the municipality of Três Rios, 316 were from Vassouras and 22 were from Valença. A total of 216 (28.1%) animals tested positive for Lyme borreliosis. Of these, 169 (22%) presented a rate of 1:400, 37 (4.8%) a rate of 1:800, 7 (0.9%) a rate of 1:1600, 2 (0.3%) a rate of 1:3200 and 1 (0.1%) a rate of 1:6400. The results observed were similar to those found in the USA, where some frequencies of seropositive varying from 7 to 34% were reported in asymptomatic equines. There have been no significant differences in regards to race, gender or age. The utilization of the test ELISA indirect for detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* has been proved to be efficient in assisting the epidemiologic inquiries and diagnosis. The humoral response of the studied equines, presented good antigenic recognition to *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 and the frequency of seropositives reinforces the hypothesis of occurrence of a similar borreliosis to the Lyme borreliosis in the State of Rio de Janeiro.

Key words: seroepidemiology, enzyme immunoassay, antibodies

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, determinada pelo ELISA indireto.....	12
Tabela 2. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto.....	13
Tabela 3. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto.....	14
Tabela 4. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária determinada pelo ELISA indireto.....	15
Tabela 5. Freqüência e títulos dos soros de 431 eqüinos, procedentes do município de Três Rios, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>Borrelia burgdorferi</i>	16
Tabela 6. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=431) do município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto.....	17
Tabela 7. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=431) do município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto.....	17
Tabela 8. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=431) do município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária, determinada pelo ELISA indireto.....	18
Tabela 9. Freqüência e títulos dos soros de 316 eqüinos, procedentes do município de Vassouras, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>Borrelia burgdorferi</i>	19
Tabela 10. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=316) do município de Vassouras, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto.....	19
Tabela 11. Freqüência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=431) do município de Vassouras, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto.....	20

Tabela 12. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=431) do município de Vassouras, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária determinada pelo ELISA indireto.....	20
Tabela 13. Frequência e títulos dos soros de 22 eqüinos, procedentes do município de Valença, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra <i>Borrelia burgdorferi</i>	21
Tabela 14. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=22) do município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto.....	21
Tabela 15. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=22) do município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto.....	22
Tabela 16. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>B. burgdorferi</i> em eqüinos (n=22) do município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária determinada pelo ELISA indireto.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Mapa do Estado do Rio de Janeiro.....	9
Gráfico 1. Frequência de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em eqüinos (n= 769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro. Distribuição segundo os municípios estudados.....	23

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Borrelia</i> sp.....	3
2.2. Borreliose em animais e humanos.....	4
2.2.1. Borreliose de Lyme.....	4
2.3. Diagnóstico.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. animais estudados.....	9
3.2. Obtenção de antígeno.....	10
3.3. Obtenção do controle positivo.....	10
3.4. Obtenção dos controles negativos.....	10
3.5. Ensaio de imunoadsorção enzimática indireto.....	11
3.6 Análise estatística.....	11
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
8. ANEXOS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Borreliose é uma enfermidade produzida por hemoparasitos do gênero *Borrelia* e acomete diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem. Ocorrem em todos os continentes do mundo e de acordo com a espécie, podem determinar patologias severas levando inclusive ao óbito. A transmissão desses parasitos se dá pela picada de carrapatos ou piolhos, os quais inoculam saliva infectada nos hospedeiros vertebrados contaminando-os, e pode ocorrer também de forma passiva através do líquido coxal (SOARES et al., 2000).

A borreliose de Lyme é uma doença infecto-contagiosa de caráter sistêmico e que tem, atualmente, como agentes descritos *Borrelia burgdorferi* ocorrendo em vários continentes; *Borrelia garinii* BARANTON et al. (1992), *Borrelia lusitaniae* LE FLECHE et al. (1997) e a *Borrelia valaisiana* WANG et al. (1997) ocorrendo na Europa; *Borrelia afzelli* CANICA et al. (1993) na Europa e Japão; *Borrelia japonica* KAWABATA et al. (1993) no Japão; *Borrelia miyamotoi* na Ásia POSTIC et al. (1993); *Borrelia andersoni* MARCONI et al. (1995) e *Borrelia lonestari* BARBOUR et al. (1996) na América do Norte e *Borrelia bissetti* POSTIC et al. (1998) nos Estados Unidos da América. Esses agentes e suas variantes antigênicas são responsáveis pelos vários espectros de apresentação clínica da borreliose de Lyme (BENNETT 1995; SILVA & FIKRIG 1997). Na América do Sul, Austrália e África o agente etiológico da borreliose de Lyme ainda não foi isolado (YOSHINARI et al., 1997).

Somente em 1975 a etiologia desta enfermidade foi conhecida depois de reportado em humanos de três vilarejos de Connecticut, EUA. Nesta ocasião, STEERE et al. (1977a; 1977b) detectaram um surto de artrite associada a eritema crônico migratório com histórico de picadas por *Ixodes dammini*, sendo esta doença denominada de artrite de Lyme. BURGDORFER et al., em 1982, detectaram espiroquetas em *I. dammini* em área endêmica para essa artrite, e em 1984, após cultivo e classificação, JOHNSON et al. descrevem *B. burgdorferi* como agente da doença de Lyme.

O agente etiológico da borreliose de Lyme é transmitido pela picada de carrapatos Ixodídeos e, experimentalmente, por carrapatos Argasídeos, insetos hematófagos ou ainda, por contato direto entre roedores (BURGESS, 1986; BUTTER & DENMARK, 1990). Nos carrapatos este agente é transmitido transovariana e tanestadialmente. A borreliose de Lyme acomete cães, gatos, bovinos, eqüinos, cervídeos, roedores silvestres, aves e homem, constituindo-se em zoonose emergente. Os animais silvestres são reservatórios assintomáticos (SOARES et al., 2000).

Em determinada região, o risco de infecção depende da concentração e estágio do vetor no local, sendo o estágio de ninfa do carrapato o mais importante epidemiologicamente. Outros fatores importantes são a concentração e a disponibilidade dos reservatórios naturais.

A borreliose de Lyme é de difícil diagnóstico e o ensaio imunoenzimático (ELISA) é um importante referencial para o seu estudo epidemiológico (STEERE, 1989; MAGNARELLI et al., 1995). Para suporte de diagnóstico outras técnicas como imunofluorescência, imunoblotting e a reação de polimerase em cadeia, têm sido utilizadas (GRODZICKI & STEERE, 1988; LIEBLING et al., 1993).

No Brasil, estudos soropidemiológicos da borreliose de Lyme foram realizados em humanos (YOSHINARI et al., 1993; 1995), em cães (JOPPERT, 1995; SOARES et al. 1999), em bovinos (FONSECA et al., 1996; ISHIKAWA, 2000), e em eqüinos (SALLES et al., 2002). A soroprevalência em todos os estudos apresentaram valores

próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte (MAGNARELLI et al., 1990; COHEN et al., 1992).

A borreliose de Lyme em eqüinos só está bem definida nos EUA, onde foram observado em áreas endêmicas animais com dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, sugerindo importantes implicações para a indústria eqüina no futuro (COHEN et al., 1988)

O plantel de eqüinos no Brasil, é estimado em 5.801.055 cabeças. As regiões Sudeste e Nordeste são consideradas as principais produtoras desses animais com respectivamente 1.634.182 e 1.403.297 cabeças. O Estado do Rio de Janeiro possui 85.230 animais de acordo com o IBGE (2001). Os municípios de Vassouras, Valença e Três Rios são considerados áreas rurais com uma grande quantidade de fazendas. A presença de eqüinos é marcada tanto por animais mestiços para trabalho, quanto por animais de raça para competições e exposições.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a freqüência de animais soropositivos de três municípios do Estado do Rio de Janeiro para *Borrelia burgdorferi* por inquérito soropidemiológico utilizando o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Borrelia* sp.

Borrelia sp. é membro da ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae. A diferenciação morfológica entre as borrelíias e os demais gêneros desta família pode ser realizada pela morfometria, uma vez que estas são as maiores delas, e através de microscopia eletrônica, pela visualização dos flagelos. As borrelíias possuem maior número de flagelos periplasmáticos (15-20) e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994); embora dentro de uma mesma espécie possa existir pleomorfismo, de acordo com a cepa (BENNETT, 1995). Estas são bactérias Gram negativas; microaerófilas e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993). Crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais e podem ser visualizadas à microscopia de campo escuro, contraste de fase e em tecidos por impregnações à base de prata (BARBOUR & HAYES, 1986; QUINN et al., 1994).

Os membros do gênero borrelíias têm como principais vetores os carrapatos, mas também podem ser transmitidas por piolhos (HOOGSTRAAL, 1979). Os carrapatos responsáveis pela transmissão das borrelíias, podem ser tanto da família Argasidae, também conhecidos como carrapatos moles quanto da família Ixodidae, chamados de carrapatos duros. Entre os carrapatos Argasídeos que transmitem espiroquetose nos homens e animais tem-se diversas espécies do gênero *Ornithodoros* e *Argas*. E entre os carrapatos Ixodídeos tem-se os gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Boophilus* e *Rhipicephalus* (SOARES, 1998). Dentre as espiroquetas apenas as borrelíias são transmitidas por ectoparasitas hematófagos, porém em 1956 ocorreu a descrição de carrapatos da espécie *Ornithodoros turicata* transmitindo *Leptospira pomona* (BURGDORFER, 1956). Porém a relação parasita versus vetor é tão estreita que a espiroqueta pode ser isolada e identificada com o auxílio do xenodiagnóstico (APPEL et al., 1993).

HOOGSTRAAL (1979) afirmava que os espiroquetídeos viviam em simbiose com seus vetores, mas posteriormente foi observado que maciça infecção do carrapato fêmea por *Borrelia* sp. poderia leva-lo à infertilidade, havendo danos na formação e deposição da cutícula do ovo (BURGDORFER et al., 1989).

Acreditava-se que a espiroqueta era inoculada junto com o refluxo intestinal do carrapato. Foi, então descoberto que as borrelíias começam a se multiplicar no intestino do carrapato, logo após a fixação desse no hospedeiro vertebrado. Posteriormente migram para hemocele disseminando-se pelos órgãos, chegando a glândula salivar onde são inoculadas durante o período de osmorregulação (BENACH, et al., 1987; RIBEIRO et al., 1987). Nos carrapatos argasídeos a principal forma de transmissão de borrelíia é através do líquido coxal, ocorrendo raramente transmissão por via salivar (BURGDORFER et al., 1989).

DORWARD et al. (1991) encontraram *B. burgdorferi* na urina, sangue, fragmentos de bexiga, baço, fígado e cérebro de roedores experimentalmente infectados, além de urina e sangue de humanos e cães que apresentavam manifestações clínicas compatíveis com borreliose de Lyme. Isto indica que a transmissão desse espiroquetídeo pode ocorrer através de transfusão sangüínea ou transplante de tecido. A transmissão congênita em cães, também já foi relatada (GUSTAFSON et al., 1993).

2.2. Borreliose em animais e humanos

Borrelia theileri é um espiroquetideo comum de bovinos e eqüinos em países tropicais. Esta espécie também pode ser encontrada parasitando ovinos e cervídeos (SMITH et al., 1998). A maioria dos autores que descreveram espiroquetas do gênero *Borrelia* em bovinos consideraram-na como sendo *B. theileri*, porém a diferenciação bioquímica entre as diferentes espécies de *Borrelia* e identificação sorológica são difíceis devido a variação antigênica (HADANI et al., 1985). Torna-se necessário para definição da espécie levar-se em conta o carrapato vetor, os hospedeiros, a infectividade em animais de laboratório, além das características morfológicas das espiroquetas (MARTINS et al., 1996).

Existem relatos incriminando o carrapato *B. microplus* como vetor de *B. theileri*, na Austrália e África do Sul (CALLOW, 1967), no Brasil (MARTINS et al., 1996) e México (VIVAS et al., 1996). Outras espécies de carrapatos também já foram descritas como vetores de *B. theileri*, como *Boophilus decoloratus*, *Boophilus annulatus*, *Rhipicephalus evertsi*, *Ixodes ricinus* e *Haemaphysalis cinnabarina punctata* (VIVAS et al., 1996). SMITH et al., (1978) observaram o tropismo dessa espiroqueta pelos hemócitos, ovário e gânglio central de *B. microplus* e sugeriram a glândula salivar como o primeiro órgão invadido pela espiroqueta, logo após o início do repasto sanguíneo, porém aparentemente nenhum tipo de prejuízo ao carrapato foi observado, evidenciando um relacionamento benigno entre *B. theileri* e o seu vetor (MARTINS et al., 1996).

A transmissão de *B. theileri* para o hospedeiro vertebrado ocorre apenas pelos estágios de ninfa e adulto. Apesar de ocorrer a transmissão transovariana, acredita-se que a larva é incapaz de transmitir a espiroqueta por poucas delas conseguirem invadir a glândula salivar, tornando-se difícil a sua transmissão (SMITH et al., 1978, SMITH & ROGERS, 1998).

Outra espiroqueta que acomete bovinos é *Borrelia coriaca*, causadora do aborto epizootico bovino, e que também pode acometer cervídeos, transmitida por *Ornithodoros coriaceus* (SOARES et al., 2000).

Nas aves, as borrelírias determinam uma doença denominada espiroquetose aviária, causada pela *Borrelia anserina* transmitida pelos carrapatos do gênero *Argas*. E em humanos existe o grupo da *Borrelia recurrentis* causando a febre recorrente humana que tem como vetor os carrapatos do gênero *Ornithodoros*. Espiroquetas do grupo da febre recorrente, *Borrelia parkeri*-*Borrelia turicatae*, também já foram associadas a aborto em éguas, nos EUA (WALKER et al., 2002).

2.2.1. Borreliose de Lyme

Borrelia burgdorferi é o agente da borreliose de Lyme, também conhecida como espiroquetose ou doença de Lyme. Esta é a mais importante das borrelioses por ser uma doença de caráter sistêmico e por se tratar de uma zoonose, tendo como vetor os carrapatos da família Ixodidae. Os animais domésticos atuam como carreadores de vetores às áreas domiciliares (ANDERSON, 1988), enquanto os silvestre caracterizam-se como reservatórios naturais, não apresentando sintomatologia clínica.

Os primeiros indícios da borreliose de Lyme foram reportados na Europa, por BUCHWALD em 1883 que descreveu uma atrofia de pele em humanos de caráter idiopático, sendo mais tarde denominado de Acrodermatite Atrófica Crônica, por HERXHEIMER & HARTMAN. Em 1902, AFZELIUS demonstrou esta lesão associada à picada de *Ixodes ricinus*, referindo-a como eritema migratório. GARIN & BUJADOUX, em 1922, observaram meningorradiculite e eritema em pacientes com

histórico de picada por *Ixodes hexagonus*, sugerindo que o quadro poderia ter sido causado por espiroqueta.

Várias pesquisas foram realizadas com o intuito de se conhecer mais sobre a etiologia desta enfermidade, até que em 1975, na comunidade de Lyme, Connecticut, EUA, o Dr. Allen C. Steere, reumatologista do Departamento de Medicina Interna da Universidade de Yale, New Haven, acompanhou um grupo de crianças apresentando sintomas similares à Artrite Reumatóide Juvenil associada ao eritema, com histórico de picadas de *I. dammini*. STEERE et al. (1977a; 1977b) denominaram a enfermidade observada de artrite de Lyme, descrevendo as manifestações e caracterizando-a como enfermidade sistêmica. BURGDORFER et al. (1982) detectaram espiroquetas em *I. dammini*, de uma área endêmica para esta artrite, e após cultivo e classificação, JOHNSON et al. (1984) descreveram *B. burgdorferi* como agente etiológico da borreliose de Lyme.

Desde a primeira descrição, há três décadas, esta enfermidade tem sido assinalada em todo mundo, sendo descrita na América do Norte, América Central, América do Sul, Ásia, África, Europa e Austrália; apresentando quadro clínico muitas vezes distinto, porém sempre transmitida por carrapatos da família Ixodidae e determinada por *Borrelia* sp. (BARBOUR et al., 1986; KANTOR, 1994; BENNETT, 1995).

Em cães, o primeiro relato de borreliose foi descrito em um cão Doberman de três anos, residente em área endêmica para doença de Lyme, em Nova York. Esse animal apresentava dor nos quatro membros e febre. Foram realizados vários exames laboratoriais e pesquisa para *Rickettsia* sp. e *Babesia* sp., porém todos apresentaram-se negativos. Em cultura de sangue, foi possível isolar espiroquetas e através de sorologia o cão apresentou-se positivo para *Borrelia* sp. (LISSMAN et al., 1984). Posteriormente BURGESS (1986) isolou espiroquetas de cães clinicamente saudáveis e sugeriu esses animais como potenciais reservatórios para *B. burgdorferi*.

A transmissão para os cães ocorre pela picada de carrapatos infectados, sendo o gênero *Ixodes* com as espécies *I. scapularis*, *I. pacificus* e *I. ricinus* os mais importantes vetores epidemiologicamente, mas *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum* também transmitem (MATHER et al., 1994). A transmissão pode ser realizada de forma intrauterina, o que foi demonstrado experimentalmente em cães da raça Beagle com *B. burgdorferi* (GUSTAFON et al., 1993).

Os sintomas clínicos primários na borreliose canina envolvem uma síndrome musculoesquelética, invariável quanto à idade, raça ou sexo do animal, caracterizada pelo comprometimento das articulações, principalmente carpiana e tarsiana, com quadro de artrite progressiva (LISSMAN et al., 1984). Em conjunto com febre, letargia, inapetência e dor articular (MAGNARELLI et al., 1985); sendo frequente o envolvimento de mais de uma articulação (KORNBLATT et al., 1985; LEVY & MAGNARELLI, 1992). Em casos crônicos podem ocorrer cardiopatias, havendo bloqueio átrio-ventricular e alteração de ritmo (LEVY & DREESSEN, 1992; AZUMA et al., 1994; MCKENNA et al., 1995). No cão como no homem, pode ocorrer uma glomerulonefrite com espessamento glomerular, decorrido da deposição de imunocomplexo (GREENE, 1990; DURAY, 1993).

A borreliose de Lyme em bovinos apresenta-se, em sua maioria, de forma assintomática, mesmo em animais provenientes de regiões com soroprevalência alta (BENXIU & COLLINS, 1994; FONSECA et al., 1995b; 1996; ISHIKAWA, 1996).

BURGESS, et al. (1988) isolaram *B. burgdorferi* da urina e colostro de bovinos de uma região do Estado de Wisconsin, onde não existe *I. dammini*, sugerindo a

infecção oral e através de dípteros hematófagos. Espiroquetas também foram isoladas do fluido sinovial de animais com manqueira e aumento articular. Nesse mesmo estudo, ainda foi isolado *B. burgdorferi* do sangue de um bezerro recém nascido e encontrado anticorpos em um bezerro abortado, comprovando a transmissão transplacentária. A presença de espiroquetas no sangue de vacas que sofreram aborto sugere que a infecção por esse espiroquetídeo cause problemas reprodutivos em vacas.

Outras manifestações clínicas também foram reportadas, como mialgia, febre, laminite, queda de produção (PARKER & WHITE, 1992; WELLS et al., 1993). BLOWEY et al. (1994) e GRUND et al. (1995), detectaram na Europa e América do Norte a ocorrência de dermatite digital como outro sinal ocasionado por *B. burgdorferi*.

MARCELIS et al. (1987) caracterizaram os eqüinos como reservatórios para *B. burgdorferi*. Observaram também que a infecção por essa espiroqueta nesses animais levava a quadro clínico.

Observou-se que animais sorologicamente positivos para *B. burgdorferi* em áreas endêmicas para borreliose de Lyme, nos EUA, apresentavam hipersensibilidade da pele, com perda de pêlo e descamação nas áreas onde previamente havia carrapato fixado (MAGNARELLI et al., 1988).

COHEN, et al. (1988) realizaram inquérito sorológico para *B. burgdorferi* e relataram até 60% de animais positivos em áreas endêmicas, observando animais com dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, sugerindo importantes implicações para a indústria eqüina no futuro. Ainda foi destacada a possibilidade desse espiroquetídeo ter entrado nos EUA através de eqüinos vindos da Europa e alertaram para o risco de introdução em áreas livres através desses animais.

Perda de peso, claudicação esporádica, laminite, febre, aumento articular, enrijecimento muscular, uveíte anterior e sinais neurológicos como depressão, mudança de comportamento, disfagia, balanço de cabeça e encefalite também já foram descritas em eqüinos (COHEN & COHEN, 1990; PARKER & WHITE, 1992).

BOSLER et al. (1988) analisaram por sorologia cavalos clinicamente sadios e cavalos com clínica para borreliose de Lyme e alertaram para a possibilidade de animais assintomáticos, soropositivos, não tratados, apresentarem manifestações clínicas posteriormente.

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

ANDERSON et al. (1985) isolaram *B. burgdorferi* no sangue e diversos tecidos de pequenos roedores, caracterizando *Peromyscus leucopus* como principal reservatório desse agente em áreas endêmicas dos EUA. Os animais silvestres atuam como reservatórios e carreadores de *Borrelia* sp. transportando-a do ambiente silvestre ao peridomicilar, dificilmente adoecendo.

Algumas aves silvestres têm importante papel na dispersão de espiroquetas. STAFFORD III, et al. (1995) observaram a presença de larvas e ninfas de carrapatos vetores de *B. burgdorferi* em aves silvestres e alertaram para o envolvimento desses animais na manutenção e transmissão desse agente, agindo como bons reservatórios.

DURDEN, et al. concordou com essa hipótese em trabalho publicado em 2001, incluindo as espécies de aves migratórias na disseminação de espiroquetas, tanto por serem bons reservatórios, quanto por carregarem carrapatos infectados.

No Brasil estudos demonstraram que os marsupiais podem participar na epidemiologia da borreliose de Lyme (BATTESTI et al., 1997; YOSHINARI et al., 1995; 1997), sendo observado espiroquetas com características morfológicas de

Borrelia sp. em sangue periférico de *Didelphis (marsupialis) aurita* (ABEL, 1996; FONSECA et al., 1995a).

Em artigo de revisão sobre borreliose de Lyme no Brasil, YOSHINARI et al. (1995) caracterizaram esta enfermidade como uma zoonose emergente de interesse multidisciplinar. Relataram a identificação e estudo de 25 pacientes portadores desta doença, traçando o perfil clínico, sorológico e epidemiológico e, discutiram a participação dos animais domésticos e silvestres no ciclo desta enfermidade em nosso meio.

Os vetores para *Borrelia* sp. no Brasil ainda não estão bem estabelecidos, porém um estudo com carrapatos de pequenos mamíferos do Estado de São Paulo, sugeriu o *Ixodes* sp. como um possível vetor para o agente da borreliose de Lyme-like (ABEL et al., 2000).

Recentemente, YOSHINARI, et al. (2003) publicaram um estudo feito em Cotia, estado de São Paulo, onde dois irmãos apresentavam histórico de contato com carrapato e sintomatologia compatível com borreliose de Lyme. Foi observada presença de anticorpos homólogos contra *B. burgdorferi* e *Babesia bovis* em ambos irmãos. E em Manaus, Estado do Amazonas, foi visualizado pela primeira vez, nesta região, *Borrelia* sp. de um paciente com diagnóstico clínico de eritema crônico migratório através de cortes histológicos corados pela técnica de Warthin Starry (Melo et al., 2003).

Os animais domésticos são conhecidos e importantes reservatórios de *Borrelia* sp. no ambiente domiciliar, favorecendo, assim, ao carrapato veicular o patógeno até o homem e outros animais (MATHER et al., 1994); contudo faz-se necessário a realização de mais estudos fisiográficos com a finalidade de definir a situação regional da enfermidade no Brasil (SOARES et al., 2000).

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico de borreliose de Lyme pode ser conclusivo levando em consideração vários fatores, destacando-se a sintomatologia clínica, a epidemiologia e a sorologia positiva.

O cultivo e isolamento de *Borrelia* sp. é um método muito utilizado em todo mundo, sendo realizado a partir de saliva, hemolinfa e tecido de carrapatos, além de soro, fluidos corporais e tecidos de homens e animais (ANDERSON, 1989; EWING et al., 1994; LANE et al., 1994; DICKINSON & BATTLE, 2000). Porém, tem limitações já que nem todas as *B. burgdorferi latu sensu* são de fácil cultivo (SMITH, 2001; OLIVEIRA, 2000).

O ensaio imunoenzimático ELISA indireto tem sido o método de diagnóstico mais empregado e reconhecido para diagnosticar com segurança a borreliose. Diversos tipos de antígenos são utilizados, como antígenos de extrato de célula total sonicada (GORDILLO et al., 1999), proteínas recombinantes (WILSKE et al., 1999) e peptídeos (CRAFT et al., 1986). No entanto, os ensaios devem ser estabelecidos para cada laboratório com os padrões de controle adequados, com título mínimo e linha de corte (*cut-off*) seguros.

ROGERS et al. (1999) em estudo feito com bovinos, observaram reação cruzada entre *B. burgdorferi*, *B. theileri* e *B. coriaceae*. Estes autores utilizaram a reação de imunofluorescência (RIF) e constataram que nas regiões onde ocorre a coexistência desses parasitos, os estudos soroepidemiológicos podem ser comprometidos. Avaliaram também o teste ELISA, sugerindo esse ensaio como o de eleição para estudos epidemiológicos, pois não observaram reações cruzadas entre esses três agentes. O

ELISA também foi utilizado para avaliar a frequência de gado leiteiro positivo para borreliose na Eslováquia, onde obtiveram 25,2% de animais positivos. De 33 animais que apresentavam quadro clínico de borreliose de Lyme, com manqueira e inchaço nas articulações, 20 amostras de soros foram positivas para *B. burgdorferi* no ensaio ELISA e também pela técnica de *western blotting* (STEFANCIKOVA et al., 2002).

Reações cruzadas entre *Borrelia* sp. e *Leptospira* sp., também têm sido relatadas embora não significativas (WELLS et al., 1993; JOBERT, 1995). Em levantamentos soropidemiológicos realizados em bovinos (ISHIKAWA, 2000), cães (SOARES et al., 1999) e eqüinos (SALLES et al., 2002) no Brasil, com auxílio do teste ELISA indireto não foi observado reações cruzadas entre esses dois gêneros de espiroquetas.

A utilização de proteínas recombinantes específicas para *B. burgdorferi*, como a de peso molecular de 31kDa (OspA), 34kDa (OspB) e 110kDa, têm sido empregadas em imunoenaios, com soros de humanos, cães e eqüinos, a fim de aumentar a sensibilidade desses testes (GREENE et al., 1988; CAPUTA et al., 1991).

Ensaio como o *western blotting* tem sido empregados para confirmação do resultado, após triagem realizada com o método ELISA, pois demonstram maior sensibilidade e especificidade que este (GRODZICKI & STEERE, 1988). A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é o mais preciso dos ensaios, pois garante o resultado específico por meio da amplificação do DNA do agente (LIENBLING et al., 1993).

A PCR têm sido muito utilizada para identificação de *Borrelia* sp. em animais e fragmentos de carrapatos. LI et al. (1998) analisaram 59 amostras de cultura de *Borrelia* sp. obtida de *Ixodes persulcatus* e pequenos roedores da China, pela técnica de RFLP, identificando *B. garinii* e *B. afzelii*, não observando nenhuma *B. japonica*. Carrapatos oriundos de Portugal, foram analisados por essa técnica, sendo possível a identificação de grande variedade genética de *B. burgdorferi* *latu sensu* nesse país (MICHELIS et al., 2000). E no noroeste dos EUA foi determinado três espécies de *Borrelia* sp. principais infectando carrapatos e pequenos roedores, *B. burgdorferi* *strictu sensu*, *B. andersonii* e *B. bissettii* (LIN et al. 2001).

Recentemente, GOOSSENS et al. (2003) discutiram a validade dos ensaios imunoenzimáticos para diagnosticar borreliose de Lyme em populações de cães na Holanda. Nesse trabalho os autores afirmaram que embora sorologicamente grande parte dos animais estão infectados com *B. burgdorferi*, a forma clinica da doença é incomum nos cães desse país. Porém não levaram em consideração que quanto mais um individuo tem contato com a espiroqueta, mais imunidade ele adquire, tornando-se mais resistente a doença (MULLER et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais estudados

Procedeu-se a coleta de 769 soros de eqüino dos municípios de Três Rios (n=431), Vassouras (n=316) e Valença (n=22) do estado do Rio de Janeiro (**Figura 1**). As amostras de soro foram colhidas por conveniência de eqüinos jovens e adultos, aparentemente saudáveis, de diferentes raças, entre os meses de março a junho de 2003. Coletou-se assepticamente o sangue destes animais, através da venopunção jugular, e, os soros obtidos foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados à -20°C até o momento da análise sorológica. Foi utilizado o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto padronizado por SALLES et al. (2002) com modificações.

Por meio de um questionário foram registrados dados como raça, sexo e idade dos animais, onde foram agrupados em 5 faixa-etárias distintas, sendo elas: animais até 12 meses; maiores de 12 meses a 72 meses; maiores de 72 meses a 120 meses; maiores de 120 meses a 180 meses; e maiores de 180 meses de idade. Observou-se também, por ocasião da coleta, presença ou ausência de carrapatos (**Anexo 1**).



Figura 1. Mapa do Estado do Rio de Janeiro

3.2. Obtenção do antígeno

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

Na obtenção do antígeno 1,0mL de cultura de *B. burgdorferi stricto sensu* cepa G39/40 de origem americana, foi acrescido a 500ml do meio BSK, mantendo-o em estufa a 33 °C por uma semana. Centrifugou-se o meio (12.000xg/20 min. a 4 °C); o sedimento foi ressuspenso em tampão salino fosfatado (PBS) 0,001M MgCl₂.6H₂O pH 7,4 e submetido ao tratamento anterior por duas vezes. O "pellet" formado foi lavado com PBS e finalmente suspenso na mesma solução ao volume de 6,0mL. A suspensão

foi submetida à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, model 300, Dynatech) por três minutos, com intervalos de 15 segundos; posteriormente filtrada a 0,45µm e aliqüotada, obtendo-se assim, o extrato total de antígeno para uso nos procedimentos de ensaios imunológicos, o qual foi armazenado entre 20 a 70°C negativos até o momento de uso conforme sugeriu GRODZICKI & STEERE (1988).

Determinou-se a concentração protéica do extrato total de antígeno por meio da técnica do reagente de Folin, segundo metodologia descrita por LOWRY et al. (1951), obtendo-se 1,4mg/mL de conteúdo protéico.

3.3. Obtenção do controle positivo

O soro para o controle positivo foi obtido a partir da inoculação experimental de um potro macho, sadio, com três meses e meio de idade, pesando 113Kg de peso vivo, originário da fazenda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada no município de Cachoeiras de Macacu-RJ.

Foram realizados quatro inoculações, com intervalos de 15 dias, de antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa G39/40, com adjuvante (Freünd), por via subcutânea, com agulhas e seringas descartáveis de 10mL, na dose de 1,0mg/15 Kg. Obteve-se soro do animal uma hora antes do primeiro inóculo (coleta 0) e a cada cinco dias, até completar 125 dias (coleta 25). Procedeu-se a obtenção da curva de anticorpos IgG do animal imunizado e selecionou-se o soro da coleta 20 (45 dias pós quarto inóculo) como controle padrão positivo ideal, conforme descrito por SALLES (2001).

3.4. Obtenção dos controles negativos

Para obtenção dos controles negativos foram utilizados oito soros de potros puro-sangue inglês (PSI), oriundos do Jockey Clube do Rio de Janeiro, com idades variando de 12 a 24 meses. Os animais encontravam-se clinicamente sadios, mantidos em baias individuais, recendo alimentação apropriada, sem histórico de contato com carrapatos.

A colheita do sangue foi realizada como descrito anteriormente (item 3.1), assim como aliqüotagem e armazenamento.

3.5. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto

As 769 amostras coletadas dos três municípios foram analisadas através do ELISA indireto modificado de SALLES et al. (2002).

Realizou-se o ensaio para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi* *latu 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 microplacas de poliestireno com 96 orifícios (M-4043, Sigma Chemical), incubadas em câmara úmida a 4 °C "overnight".

Após sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS tween 20 0,05% pH 7,4 (PBS T 20) e bloqueadas com soro de coelho diluído a 1% em PBS T 20,

por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Posteriormente lavou-se as placas como descrito anteriormente.

Os oito soros controles negativos bem como os soros testes foram diluídos a 1:400 e o soro controle positivo foi diluído em série, a partir de 1:400 até 1:51600, todos em PBS T 20; esta etapa do ensaio foi incubada e lavada como a anterior. Adicionou-se às placas conjugado IgG de coelho anti IgG equina ligado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical) na diluição de 1:1000 em PBS T 20. A incubação e lavagem seguiram a fase anterior.

As placas foram forradas com a solução reveladora composta pelo substrato para-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) (Sigma Chemical) diluído em tampão glicina pH 10,5 na concentração de 1mg/mL. Estas permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e momento de leitura em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Microplate Reader model 550, Bio-Rad Laboratories), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200µL de solução por orifício. A linha de corte do ensaio foi estabelecida pela média aritmética dos valores de densidade óptica dos soros controles negativos mais três vezes o desvio padrão destes (**Anexo 2**).

3.6. Análise estatística

Foram utilizados os testes não paramétricos Qui-quadrado e Fisher, por meio do programa computacional INSTAT (Copyright 1990-1994, Graphpad Software. v.2.05a), para observação de possíveis diferenças significativas entre as frequências encontradas nos grupos de animais de diferentes raças, sexos e idades, assim como entre as frequências dos municípios analisados. Adotou-se o nível de significância de 95% de confiança. Utilizou-se também o programa de Comparação Múltipla de Proporções (Quenoville, 1966), afim de confirmar os resultados obtidos pelo programa acima citado.

4. RESULTADOS

A análise soroepidemiológica das 769 amostras de soros revelou que 216 (28,1%) animais foram reagentes positivos ao ELISA indireto, com anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* dos quais 22% apresentaram título de 1:400, 4,8% título de 1:800, 0,9% título de 1:1600, 0,3% título de 1:3200, 0,1% título de 1:6400, enquanto 553 (71,9%) amostras foram negativas (**Tabela 1**).

Tabela 1. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, determinada pelo ELISA indireto

Título	Positivos (n)	Frequência				Negativos (n)	
		Raças (n=769)		Raças (n=769)		Raças (n=769)	
		Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
1:400	169	78,3%	169	22%	-	-	-
1:800	37	Mestiço 17,1%	37	Mangalarga 4,8%	Outras raças	-	-
1:1600	7	0,9%	7	0,9%	-	-	-
1:3200	2	0,3%	2	0,3%	-	-	-
Positivo	216	34,3%	216	27,7%	23,1%	25,4%	2,0%
1:6400	1	0,5%	1	0,1%	-	-	-
	(23/67)	(23/769)	(178/643)	(178/769)	(15/59)	(15/769)	
Total positivos	216	100%	216	28,1%	-	-	-
Negativo	553	65,7%	553	72,3%	60,5%	74,6%	5,7%
	(44/67)	(44/769)	(465/643)	(465/769)	(44/59)	(44/769)	
Total negativos	-	-	-	71,9%	39,5%	553	
Total	769	100%	769	100%	53,6%	769	
	(67/67)	(67/769)	(643/643)	(643/769)	(59/59)	(59/769)	

Os dados obtidos a partir do questionário revelaram a presença de 643 animais da raça Mangalarga, 20 PSI, 8 Brasileiro de Hipismo, 4 Crioula, 4 Árabe, 2 Ânglo-Árabe, 3 Campolina, 18 Pônei e 67 animais mestiços. Desses animais, 216 animais eram machos e 553 eram fêmeas. Observou-se também 121 animais com idade de até 12 meses, 248 entre >12 e 72 meses, 289 entre > 72 e 120 meses, 83 entre >120 e 180 meses e 28 com > de 180 meses.

A análise segundo as diferentes raças revelou que: 34,3% dos animais mestiços, 27,7% dos animais da raça Mangalarga e 25,4 % dos animais de outras raças eram soropositivos para anticorpos da classe IgG contra *B. burgdorferi* (**Tabela 2**). A análise estatística não revelou diferença significativa entre as frequências dos animais das diferentes raças.

Tabela 2. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto

* Não houve diferença significativa (P>0,05) entre as raças.

A análise segundo o sexo revelou que 30 % dos machos e 27% das fêmeas eram positivos (**Tabela 3**) não apresentando diferença significativa.

Tabela 3. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto* Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os sexos.

	Sexo (n=769)			
	Macho		Fêmea	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivos	29,6%	8,3%	27,5%	19,8%
	(64/216)	(64/769)	(152/553)	(152/769)
Negativos	70,4%	19,8%	72,5%	52,1%
	(152/216)	(152/769)	(401/553)	(401/769)
Total	100%	28,1%	100%	71,9%
	216/216	(216/769)	(553/553)	(553/769)

* Não houve diferença significativa (P>0,05) entre as raças.

A análise segundo a faixa etária, dividida em cinco grupos revelou a frequência relativa de: 3% dos animais até 12 meses foram positivos, 9,9% dos animais entre >12 a 72 meses foram positivos, 11,1% dos animais entre >72 a 120 meses foram positivos, 3,3% dos animais entre >120 a 180 meses foram positivos e 0,9% dos animais com >180 meses foram positivos (**Tabela 4**). A análise estatística não revelou diferença significativa entre as diferentes idades.

Tabela 4. Frequência sorológica de anticorpos anti *B. burgdorferi* em equinos (n=769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária determinada pelo ELISA indireto

		Faixa Etária									
		Até 12 meses		>12-72 meses		>72-120 meses		>120-180 meses		>180 meses	
		Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivo		19,0%	3,0%	30,6%	9,9%	29,4%	11,1%	30,1%	3,3%	25,0%	0,9%
		(23/121)	(23/769)	(76/248)	(76/769)	(85/289)	(85/769)	(25/83)	(25/769)	(7/28)	(7/769)
Negativo		81,0%	12,7%	69,4%	22,4%	70,6%	26,5%	69,9%	7,5%	75%	2,7%
		(98/121)	(98/769)	(172/248)	(172/769)	(204/289)	(204/769)	(58/83)	(58/769)	(21/28)	(21/769)
Total		100%	15,7%	100%	32,3%	100%	37,6%	100%	10,8%	100%	3,6%
		(121/121)	(121/769)	(248/248)	(248/769)	(289/289)	(289/769)	(83/83)	(83/769)	(28/28)	(28/769)

* Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as faixas etárias.

Através da análise sorológica do município de Três Rios pode-se observar 23,7% dos animais reagentes ao ensaio ELISA indireto, onde 19,8% apresentaram título de 1:400, 3,5% título de 1:800 e 0,2% título de 1:1600 e 1:3200. Foram negativos ao ensaio 76,3% dos animais (**Tabela 5**).

Quanto às raças, 23,5% dos animais Mangalarga e 50% dos animais de outras raças apresentaram-se positivos ao ensaio. Não foram analisados soros de animais mestiços (**Tabela 6**). Os machos e fêmeas apresentaram 16,7% e 24,8% de positividade, respectivamente (**Tabela 7**).

A análise quanto à idade revelou que 10,8%, 24,1%, 28,3%, 23,5% e 12,5% dos animais até 12 meses, >12-72 meses, >72-120 meses, >120-180 e >180 meses, respectivamente, foram reagentes ao ELISA indireto (**Tabela 8**).

Tabela 5. Frequência e títulos dos soros de 431 equinos, procedentes do município de Três Rios, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *Borrelia burgdorferi*

Título	Positivos	Frequência (n=431)		
		Relativa	Absoluta	Negativos
1:400	85	83,3%	19,8%	-
1:800	15	14,7%	3,5%	-
1:1600	1	1,0%	0,2%	-
1:3200	1	1,0%	0,2%	-
Total de positivos	102	100% (102/102)	23,7% (102/431)	-
Total de negativos	-	-	76,3% (329/431)	329

Tabela 6. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=431) do município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto

	Raças (n=431)	
	Frequência	
	Mangalarga	Outras raças
Positivo	23,5% (101)	50% (1)
Negativo	76,5% (328)	50% (1)
Total	100% (429)	100% (2)

Tabela 7. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=431) do município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto

	Sexo (n=431)	
	Frequência	
	Macho	Fêmea
Positivo	16,7% (10)	24,8% (92)
Negativo	83,3% (50)	75,2% (279)
Total	100% (60)	100% (371)

Tabela 8. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=431) do município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária em meses, determinada pelo ELISA indireto

Faixa etária (n=431)					
Frequência					
	Até 12	>12-72	>72-120	>120-180	>180
Positivo	10,8% (7)	24,1% (33)	28,3% (53)	23,5% (8)	12,5% (1)
Negativo	89,2% (58)	75,9% (104)	71,7% (134)	76,5% (26)	87,5% (7)
Total	100%(65)	100% (137)	100% (187)	100% (34)	100% (8)

A análise sorológica do município de Vassouras observou-se que 34,8% dos animais reagentes ao ensaio ELISA indireto, onde 25,9% apresentaram título de 1:400, 6,7% título de 1:800 e 1,9% título de 1:1600 e 0,3% título de 1:3200. Foram negativos ao ensaio 65,2% dos animais (**Tabela 9**).

Quanto às raças, 37,9% de animais mestiços foram reagentes ao ELISA indireto, 35,8% dos Mangalarga e 26,1% de outras raças também apresentaram-se positivos ao ensaio (**Tabela 10**). Os animais machos e fêmeas apresentaram 36,2% e 33,7% de positividade, respectivamente (**Tabela 11**).

A análise quanto à idade revelou que 28,6%, 39,6%, 32,3%, 38,1% e 31,6% dos animais até 12 meses, >12-72, >72-120, >120-180 e >180 meses, respectivamente, foram reagentes ao ELISA indireto (**Tabela 12**).

Tabela 9. Frequência e títulos dos soros de 316 eqüinos, procedentes do município de Vassouras, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *Borrelia burgdorferi*

Título	Positivos	Frequência (n= 316)		Negativos
		Relativa	Absoluta	
1:400	82	74,5%	25,9%	-
1:800	21	19,1%	6,7%	-
1:1600	6	5,5%	1,9%	-
1:3200	1	0,9%	0,3%	-
Total de positivos	110	100% (110/110)	34,8% (110/316)	-
Total de negativos	-		65,2% (206/316)	206

Tabela 10. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=316) do município de Vassouras, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto

	Raças (n=316)		
	Frequência		
	Mestiço	Mangalarga	Outras raças
Positivo	37,9% (22)	35,8% (76)	26,1% (12)
Negativo	62,1% (36)	64,2% (136)	73,9% (34)
Total	100% (58)	100% (212)	100% (46)

Tabela 11. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=316) do município de Vassouras, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto

	Sexo (n=316)	
	Frequência	
	Macho	Fêmea
Positivo	36,2% (51)	33,7% (59)
Negativo	63,8% (90)	66,3% (116)
Total	100% (141)	100% (175)

Tabela 12. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=316) do município de Vassouras, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária em meses determinada pelo ELISA indireto

	Faixa etária (n=316)				
	Frequência				
	Até 12	>12-72	>72-120	>120-180	>180
Positivo	28,6% (16)	39,6% (42)	32,3% (30)	38,1% (16)	31,6% (6)
Negativo	71,4% (40)	60,4% (64)	67,7% (63)	61,9% (26)	68,4% (13)
Total	100% (56)	100% (106)	100% (93)	100% (42)	100% (19)

Pela análise sorológica do município de Valença foi observado 18,2% dos animais reagentes ao ensaio ELISA indireto, onde 9,2% apresentaram título de 1:400 e 4,5% apresentaram títulos de 1:800 e 1:1600. Foram negativos ao ensaio 81,8% dos animais (**Tabela 13**).

Quanto às raças, 11,1% de animais mestiços foram reagentes ao ELISA indireto, 50% dos Mangalarga e 18,2% de outras raças também apresentaram-se positivos ao ensaio (**Tabela 14**). Os animais machos e fêmeas apresentaram 20% e 14,3% de positividade, respectivamente (**Tabela 15**).

A análise quanto à idade revelou que 20% dos animais entre >12-72 meses reagiram ao ensaio; 22,2% dos animais entre >72-120 e 14,3% dos animais entre >120-180 também foram reagentes ao ELISA indireto (**Tabela 16**). Apenas um animal com idade superior a 15 anos foi analisado, apresentando-se negativo. Não houve análise de soros de animais com idade até 12 meses.

Tabela 13. Frequência e títulos dos soros de 22 eqüinos, procedentes do município de Valença, RJ, para pesquisa de anticorpos da classe IgG, homólogos, reagentes contra *Borrelia burgdorferi*

Título	Positivos	Frequência (n=22)		Negativos
		Relativa	Absoluta	
1:400	2	50%	9,2%	-
1:800	1	25%	4,5%	-
1:1600	1	25%	4,5%	-
Total de positivos	4	100% (4/4)	18,2% (4/22)	-
Total de negativos	-	-	81,8 (18/22)	18

Tabela 14. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em eqüinos (n=22) do município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à raça determinada pelo ELISA indireto

	Raças (n=22)		
	Frequência		
	Mestiço	Mangalarga	Outras raças
Positivo	11,1% (1)	50% (1)	18,2% (2)
Negativo	88,9% (8)	50% (1)	81,8% (9)
Total	100% (9)	100% (2)	100% (11)

Tabela 15. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=22) do município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto ao sexo determinada pelo ELISA indireto

	Sexo (n=22)	
	Frequência	
	Macho	Fêmea
Positivo	20,0% (3)	14,3% (1)
Negativo	80,0% (12)	85,7% (6)
Total	100% (15)	100% (7)

Tabela 16. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=22) do município de Valença, Estado do Rio de Janeiro, quanto à faixa etária em meses determinada pelo ELISA indireto

	Faixa etária (n=22)				
	Frequência				
	Até 12	>12-72	>72-120	>120-180	>180
Positivo	-	20% (1)	22,2% (2)	14,3% (1)	-
Negativo	-	80% (4)	77,8% (7)	85,7% (6)	100% (1)
Total	-	100% (5)	100% (9)	100% (7)	100% (1)

A análise estatística das frequências de anticorpos anti-*B. burgdorferi* encontradas em equinos dos três municípios avaliados, Três Rios, Vassouras e Valença, demonstrou diferença significativa entre, Vassouras e Três Rios (**Gráfico 1**).

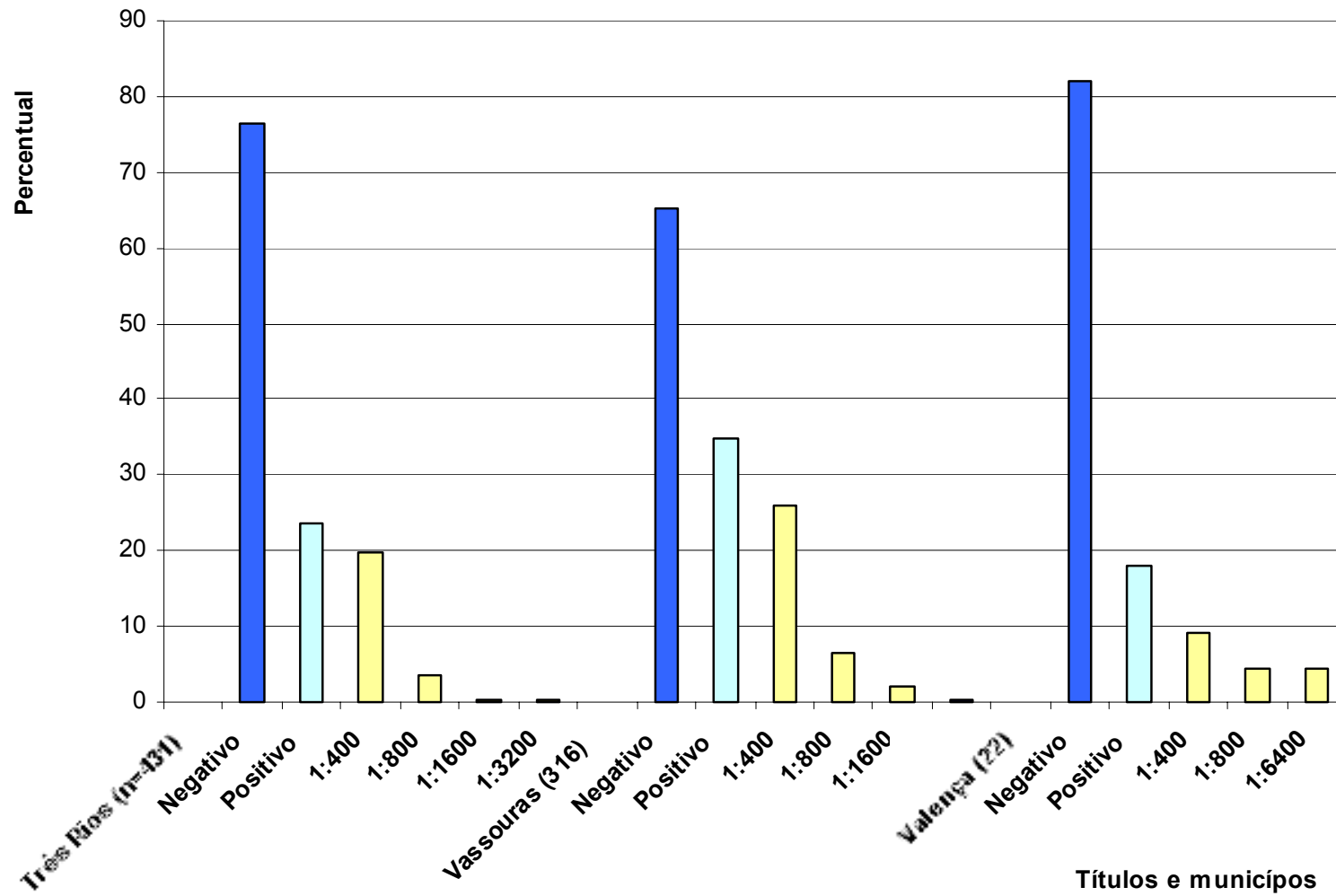


Gráfico 1. Frequência de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n= 769) dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. Distribuição segundo os municípios estudados.

Houve diferença significativa entre Três Rios e Vassouras ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O resultado obtido no presente estudo de 28,1% (216/769) de eqüinos soropositivos corroboram com os valores observados em outros trabalhos de inquéritos sorológicos realizados no Brasil em animais domésticos como bovinos (ISHIKAWA, 1996; 2000), cães (SOARES, 1998) e eqüinos (SALLES et al., 2002). Esse resultado revela frequência semelhante às de áreas endêmicas para borreliose de Lyme nos Estados Unidos da América, onde foi encontrado prevalência de eqüinos soropositivos entre 10 e 60% (COHEN et al., 1988; BERNARD et al., 1990).

No presente estudo os animais avaliados pertenciam a propriedades que apresentavam infestação por carrapatos, sendo observado a presença desses parasitas em todos os animais que tiveram sangue coletado. Todas as propriedades realizavam banhos carrapaticidas no seu plantel em intervalos que variavam de semanal a bimestral.

A estreita associação filogenética entre *B. theileri* e outras espiroquetas do gênero *Borrelia* responsáveis pelas manifestações clínicas da borreliose de Lyme em todo mundo (RICH et al., 2001) sugerem a possibilidade de reações cruzadas entre esses agentes.

ROGERS et al. (1999) observaram reação cruzada entre *B. burgdorferi*, *B. coriaceae* e *B. theileri* a partir da técnica de imunofluorescência (IF), ao analisarem soros de bovinos. O mesmo resultado não foi encontrado ao utilizarem o ensaio ELISA indireto com antígenos de extrato de célula total. Porém alertaram para o potencial de falsos positivos principalmente em áreas onde esses agentes coexistem.

No Brasil reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *B. theileri* não podem ser descartadas, uma vez que *B. theileri* é um espiroquetídeo comum que acomete bovinos e eqüinos, tendo como vetor o carrapato *B. microplus*. ISHIKAWA (2000) levanta essa hipótese já que encontrou alta prevalência de animais positivos em trabalho feito com bovinos nas mesorregiões Norte Fluminense e Médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro, observando respectivamente 69,7% e 75,4% de animais soropositivos para *B. burgdorferi*. Os dados obtidos por esse autor sugeriram que as altas porcentagens de animais positivos devem-se ao alto índice de infestação dos animais por carrapatos do gênero *Boophilus*.

Estudo realizado com eqüinos mantidos sob diferentes tipos de sistemas de controle de carrapatos, no Estado do Rio de Janeiro, mostrou claramente a relação entre produção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* e histórico de contato com carrapatos nesses animais. Dos animais com alta infestação de carrapatos, 42,9% apresentaram-se reagentes ao ELISA indireto, em contraste com 0,9% de soropositivos em animais que viviam sob controle rigoroso de ectoparasitas (SALLES et al., 2002). Nesse mesmo estudo, houve a confirmação da positividade dos soros pela formação de bandas no *western blotting*, onde soro dos animais provenientes de áreas com alto índice de infestação por carrapatos apresentaram formação de bandas compatíveis com os resultados observados no teste ELISA. A análise dos resultados permitiu também considerar a existência de similaridade entre a cepa padrão G 39/40 de *B. burgdorferi* e o espiroquetídeo de eqüinos no Brasil.

Em seres humanos, existem trabalhos realizados no Brasil, relatando a presença de indivíduos com clínica compatível com a doença de Lyme e sorologicamente positivos para IgM e IgG contra *B. burgdorferi* (YOSHINARI et al., 1993a; 1993b; 1997; 2003), sendo denominada de doença de “Lyme-símile” por YOSHINARI et al. (2000).

YOSHINARI et al. (1997) relataram a visualização de microorganismos semelhantes à borrelia em culturas de soro humano, de gambás, roedores silvestres, bovinos e cultura de carrapatos, porém caracterizaram o isolamento dessa espiroqueta, como difícil, devido ao crescimento lento e contaminação por outras bactérias e fungos, mesmo com a utilização de antibióticos. No mesmo trabalho, YOSHINARI e colaboradores compararam a borrelia existente em nosso meio com as espécies européias *B. garinii* e *B. afzelii* e a norte americana *B. burgdorferi*, sugerindo que a espécie de borrelia existente no Brasil é distinta das três anteriormente citadas, fato aceitável uma vez que espécies distintas têm sido descritas em diferentes regiões.

Na Colômbia, estudo realizado com soro e fluido cérebro-espinhal de indivíduos com sinais clínicos compatíveis com a doença de Lyme, utilizando o ensaio ELISA e *western blotting*, indicou que a espiroqueta existente nesse país é de genoespécie distinta da *B. burgdorferi stricto sensu* ou é de gênero distinto de *Borrelia* (PALÁCIOS et al., 1999).

Em estudo realizado com cães do município de Itaguaí-RJ, foi encontrado 20% dos animais positivos para *B. burgdorferi*, identificando o ELISA indireto como ferramenta segura no auxílio diagnóstico e epidemiológico para esse agente (SOARES, 1998).

MARCUS et al. (1985) observaram 24% dos equinos de área endêmica para borreliose de Lyme, nos EUA, soropositivos para *B. burgdorferi*, e apenas 2% de soropositivos em áreas não endêmicas. Nesse trabalho os autores não observaram diferença estatística significativa entre sexo e raças, o que corrobora com os dados obtidos no presente estudo. O mesmo foi relatado por LISSMAN et al. (1984) onde observaram que a borreliose canina é invariável quanto à idade, raça ou sexo do animal.

No Noroeste dos EUA, foram analisados soros de 705 equinos dos quais nove animais (1,3%) apresentavam sintomas de febre branda, letargia, manqueira e relutância para andar. Todos os nove animais foram reagentes à IF para *B. burgdorferi* (MAGNARELLI et al., 1988). Em estudo feito em Nova Jersey, Pensilvânia, 10% dos equinos foram positivos para borreliose, utilizando-se o teste ELISA. Observou-se, também, áreas de foco para borreliose com soropositividade chegando a 60%, e animais com edema transitório dos membros e poliartrites (COHEN et al., 1988).

BOSLER et al. (1988) alertaram para o fato de que cães e cavalos assintomáticos, sorologicamente positivos para borreliose de Lyme, se não tratados poderiam vir a apresentar sinais clínicos posteriormente.

Em estudo feito no Estado de Wisconsin, EUA, foi isolado *B. burgdorferi* da sangue, colostro, leite e urina de equinos e bovinos dessa região. Nesse estado não existia a presença do carrapato *I. dammini*, principal vetor dessa espiroqueta, com isso os autores sugeriram outra forma de infecção, como a rota oral ou através de dípteros hematófagos. Assim avaliaram os riscos de infecção das pessoas que lidam diretamente com os animais e ressaltaram a possibilidade do leite cru ser um importante veículo de infecção desse espiroquetídeo (BURGESS et al., 1988). No mesmo Estado já havia sido descrito a presença de 53% dos cães sorologicamente positivos para *B. burgdorferi* através da reação de imunofluorescência indireta, alertando a comunidade científica para o risco de infecção zoonótica, principalmente em áreas endêmicas para borreliose de Lyme (BURGESS, 1986).

MAGNARELLI et al. (1989) analisaram a presença de IgM contra *B. burgdorferi* em 517 soros de equinos, observando que os maiores títulos eram encontrados em julho, época do ano onde as ninfas de *I. dammini*, vetor dessa espiroqueta, encontravam-se em abundância nos pastos. E caracterizaram o ELISA como sendo um teste específico para identificar infecções por *B. burgdorferi* em

eqüinos. De 181 soros de eqüinos provenientes do mid-Atlantic veterinary teaching hospital, apenas nove foram soropositivos. Os autores concluíram que as taxas de exposição a *B. burgdorferi* variam com a localização geográfica e época do ano em que a sorologia é realizada (BERNARD et al., 1990).

A diferença significativa de soropositivos observada entre os municípios de Três Rios (18,2%) e Vassouras (34,8%) no presente trabalho, provavelmente ocorreu por causa do diferente número de propriedades visitadas nos dois municípios. Todos os municípios foram visitados na mesma época do ano, e apresentavam manejos semelhantes, tendo freqüências na utilização de carrapaticidas similares e os animais sempre em contato com carrapatos.

No município de Três Rios foram analisados soros de apenas duas propriedades, fato que pode ter mascarado o resultado, uma vez que embora grande o número de amostras de soro obtidas, mostra a realidade dessas propriedades e não do município como um todo. Essas propriedades tinham como principal atividade a criação de eqüinos, com 100% de animais de raça. E estes viviam em piquetes em contato constante com carrapatos. No município de Vassouras, teve-se acesso a treze propriedades distintas, algumas delas com criação bovina. Na maioria das propriedades os eqüinos viviam soltos nos pastos durante o dia e estabulados à noite.

O município de Valença não pode ser comparado com os demais, devido ao pequeno número de amostras obtidas, a qual é estatisticamente insuficiente.

Trabalho utilizando o ELISA para triagem de animais positivos para *B. burgdorferi* e o *western blotting* para confirmação do resultado concluiu que a infecção por esse parasita é incomum em eqüinos do Texas Central (COHEN, 1992), assim como no Reino Unido (CARTER et al., 1994). Outro inquérito sorológico realizado no Reino Unido, também constatou a baixa prevalência dessa espiroqueta na região, alertando a necessidade de se conhecer melhor a borreliose de Lyme afim de evitar-se o diagnóstico incorreto (REES & AXFORD, 1994). E estudo semelhante feito no México com mais de 70.000 soros humanos revelou prevalência de 1,1% de pessoas soropositivas para *B. burgdorferi*, sugerindo a existência desse espiroquetídeo no país, ressaltando a necessidade do isolamento da bactéria em carrapatos afim de se demonstrar conclusivamente a presença da infecção no México (GORDILLO et al., 1999).

MULLER et al (2001) analisaram um total de 309 eqüinos, por imunoblot, pertencentes a fazendas da Áustria e Espanha, e observaram que a primeira infecção com *B. burgdorferi* *latu sensu*, ocorre no primeiro ano de vida dos animais e que re-infecções são caracterizadas por surgimento de bandas adicionais. Esses animais raramente desenvolviam quadro clínico da doença. E os animais que perdiam o contato com carrapatos, apresentavam diminuição no número de bandas com a idade, tornando-se mais susceptíveis à infecção.

O diagnóstico definitivo para borreliose de Lyme em eqüinos da Alemanha, tem se mostrado problemático uma vez que não foi possível demonstrar correlação clara entre quadro clínico, sorologia positiva e DNA específico para *Borrelia*. Os resultados encontrados sugeriram que os testes imunológicos devem ser confirmados com testes diretos, como o cultivo e PCR (SCHONERT et al., 2002). Em estudo realizado na Polônia com 249 eqüinos, também não foi possível observar interação entre quadro clínico e sorologia positiva em 86,2% das amostras, através do Kit ELISA (DZIERZECKA, 2002). Já na França, onde borreliose de Lyme é raramente diagnosticada, foi possível obter-se o diagnóstico conclusivo dessa enfermidade por meio da análise sorológica, após exame clínico de um pônei de quatro anos de idade que apresentava hipertermia, edema de membros e manqueira. Este animal apresentou título alto à sorologia (PORTIER et al., 2002).

O diagnóstico sorológico é de grande importância no auxílio clínico e em estudos epidemiológicos, contudo este deve ser interpretado em conjunto com dados clínicos e histórico dos animais, assim como das propriedades.

6. CONCLUSÕES

1. Eqüinos dos municípios estudados possuem anticorpos homólogos contra *Borrelia burgdorferi*.
2. Os anticorpos dos eqüinos estudados demonstraram possuir bom reconhecimento antigênico para *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40.
3. A frequência de soropositivos corrobora a hipótese da ocorrência de *Borrelia* sp. no Estado do Rio de Janeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, I. S. Estudo de *Borrelia* sp. em *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) naturalmente infectados. *Trabalho de Monografia*, Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro. 1996. 40p.
- 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 São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000. v.95, n. 5, p. 621-624.
- Afzelius, A. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Archives of Dermatology and Syphilology*. 1910. v. 101, p. 04-406.
- Anderson, J. F.; Johnson, R. C.; Magnarelli, L. A.; Hyde, F. W. Identification of endemic foci of Lyme Disease: Isolation of *B. burgdorferi* from feral rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*). *Journal of Clinical Microbiology*. 1985. v. 22, n. 1, p. 36-38.
- Anderson, J. F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. *Annals New York Academy of Sciences*. 1988. v. 25, n. 8, p. 1495-1497.
- Angela, O. Cultivo de *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae): cinética de crescimento em diferentes meios de cultivo e técnicas de coloração. *Tese de Doutorado*, UFRRJ, Rio de Janeiro. 2002. 80pp.
- Appel, M. J. G.; Allan, S.; Jacobson, R.H.; Lauderdale, T.L.; Chang, Y. F.; Shin, S. J.; Thomford, J. W.; Todhunter, R.J.; Summers, B.A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 1993. v. 167, p. 651-664.
- Austin, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbon dioxide in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*. 1993. v. 39, p. 1103-1110.
- Azuma, Y.; Isogai, E.; Isogai, H.; Kawamura, K. Canine disease: clinical and serological evolutions in 21 dogs in Japan. *The Veterinary Record*. 1994. v. 134, p. 369-372.
- Baranton, G., Postic, D. & Saint Giros, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1992. v. 42, p. 378-83.
- Barbour, A. G. & Hayes, S. F. Biology of *Borrelia* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 1986. v.50, n. 4, p. 381-400.
- Barbour, A. G.; Maupin, G. O.; Teltow, G. J.; Carter, C. J.; Piesman, J. Identification of a uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: Possible agent of Lyme Disease-like illness. *The Journal of Infectious Diseases*. 1996. v. 173, p. 403-409.
- Battesti, D. M.; Soares, C. O.; Zeitune, A. D.; Yoshinari, N. H.; Arzua, M. Estudo de *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) como reservatório da borreliose de Lyme, através de método sorológico. *Anais do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia*. 1997. p. 252.

- Benach, J. L.; Coleman, J. L., Skinner, R. A.; Bosler, E. M. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases*. 1987. v. 155, n. 6, p. 1300-1306.
- Benxiu, J. & Collins, M. Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin. *American Journal of Veterinary Research*. 1994. v. 55, n. 9, p. 1228-1231.
- Bennett, C. E. Ticks and Lyme disease. *Advances in Parasitology*. 1995. v. 36, p. 343-405.
- Bernard, W. V.; Cohen, D.; Bosler, E.; Zamos, D. Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses referred to a mid-Atlantic Veterinary Teaching Hospital. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1990, v. 196, n. 8, p. 1255-1258.
- Bosler, E. M.; Cohen, D. P.; Schulze, T. L.; Olsen, C.; Bernard, W.; Lissman, B. Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Annals New York Academy of Sciences*. 1988. v. 539, p. 221-233.
- Buchawald, A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. *Derm Vierteljahresschr*. 1883. v. 10, p. 553-554.
- Blowey, R. W.; Carter, S. D.; White, A. D.; Barnes, A. *Borrelia burgdorferi* infections in UK cattle: a possible association with digital dermatitis. *The Veterinary Record*. 1994. v. 135, p. 577-578.
- Burgdorfer, W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae. I. Transmission of *Lepstospira Pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. *Experimental Parasitology*. 1956. v. 5, p. 571-579.
- Burgdorfer, W.; Barbur, A. G.; Hayes, S. F. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science*. 1982. v.216, p. 1317-1319.
- Burgdorfer, W.; Hayes, S. F.; Corwin, D. Pathophysiology of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodes ticks. *Reviews of Infectious Diseases*. 1989. v. 11, n. 6, p. 51442-51449.
- Burgess, E. C. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Laboratory Animal Science*. 1986. v.36, n.3, p. 288-290.
- Burgess, E. C.; Amundson, T. E.; Davis, J. P.; Kaslow, R. A.; Edelman, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp. With *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986. v. 35, n. 2, p. 355-359.
- Burgess, E. C. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. *Annals New York Academy of Sciences*. 1988. v. 539, p. 235-243.
- Butler, J. F. & Denmark, H. A. Tick (Acari: Ixodidae) vectors of Lyme disease organisms (*Borrelia burgdorferi*) in Florida. *Fla Department of Agriculture and Consumer Service Division of Plant Industry. The Entomology*. 1990. Circular n° 326.
- Callow, L. L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. *British Veterinary Journal*. 1967. v. 123, p. 492-497.
- Caputa, A. C.; Murtaugh, M. P.; Bey, R. F.; Loken, K. I. 110-Kilodalton recombinant protein which is immunoreactive with sera from humans, dogs, and horses with Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991. v. 29, n. 11, p. 2418-2423.

- Canica, M.M.; Nato, F.; Merle, L.D.; Mazie J.C.; Baranton, G.; Postic, D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelli* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1993. v. 25, p. 441-448.
- Carter, S. D.; May, C.; Barnes, A.; Bennett, D. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. *Equine Veterinary Journal*. 1994. v. 26, n. 3, p. 187-190.
- Cohen, D.; Bosler, E. M.; Bernard, W.; Meirs II, D.; Eisner, R.; Schulze, T. C. Epidemiologic studies of Lyme Disease in horses and their public health significance. *Annals New York Academy of Sciences*. 1988. v. 539, p. 244-257.
- Cohen, N. D. & Cohen, D. Borreliosis in horses: a comparative review. *The Compendium*. 1990. v. 12, n. 10, p. 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. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1992. v. 201, n. 7, p. 1030-1034.
- Craft, J. E.; Fischer, D. K.; Shimamoto, G. T.; Steere, A. C. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme Disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 1986. v. 78, p. 934-939.
- Dickinson, F. O. & Battle, M. C. Lyme borreliosis. *The Infections Diseases Review*. 2000. v. 2, n. 1, p. 23-26.
- Dorward, D. W.; Schwan, T.G.; Garon, C. F. Immune capture and detection o *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991. v. 29, n.6, p. 1162-1170.
- Duray, P. H. Histopathology of human borreliosis. In: Coyle P. K.(ed.) *Lyme disease*. 1993. p. 49-58.
- Durden, L. A.; Oliver, J. H.; Kinsey, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) and spirochetes (Spirochaetaceae: Spirochaetales) recovered from birds on a Georgia Barrier Island. *Journal of Medical Entomology*. 2001. v. 38, n. 2, p. 231-236.
- Dzierzecka, M. Correlation between the presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and the clinical signs of Lyme disease. *Medycyna-Weterynaryjna*. 2002. v. 58, n. 7, p. 523-526.
- Ewing, C.; Scorpio, A.; Nelson, D. R.; Mther, T. N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994. v. 32, n. 3, p. 755-758.
- Fonseca, A. H.; Soares, C. O.; Ishikawa, M.M.; Masard, C. L.; Yoshinari, N. H. Detection of *Borrelia* sp. In opossum (Marsupialia: Didelphidae) in Brazil. *Annals of XXV Congress Of World Veterinary Association, XX Congress of Wordl Small Animal Of Veterinary Association, Yokohama, Japão*. 1995a. p. 283.
- Fonseca, A. H.; Soares, C. O.; Ishikawa, M.M.; Masard, C. L.; Yoshinari, N. H. Lyme borreliosis sorology in cattle and dogs in Brazil. *Annals of XXV Congress Of World Veterinary Association, XX Congress of Wordl Small Animal Of Veterinary Association, Yokohama, Japão*. 1995b. p. 283.

- Fonseca, A. H.; Ishikawa, M. M.; Soares, C. O.; Massard, C. L.; Yoshinari, N. H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. *Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida*. 1996. v. 18, n. 1/2, p. 85-89.
- Garin, C. H. & Bujadoux, C. H. Paralyse par les tiques. *Journal de Médecine Lyon*. 1922. v. 71, p. 765-767.
- Goossens, H. A.; Maes, J. H.; van den Bogaard, A. E. The prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, an indicator for Lyme borreliosis in dogs? A comparison of serological test. *Tijdschr Diergeneeskde*. 2003. v. 128, n. 21, p. 650-657.
- Gordillo, G.; Torres, J.; Solórzano, F.; Cedillo-Rivera, R.; Tapia-Conyer, R.; Muñoz, O. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. *Archives of Medical Research*. 1999. v. 30, p. 64-68.
- Greene, R. T.; Walker, R. L.; Nicholson, W. L.; Heidner, H. W.; Levine, J. F.; Burgess, E. C.; Wyand, M.; Breitschwerdt, E. B.; Berkhoff, H. A. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimental and naturally exposed dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988. v. 26, n. 4, p. 648-653.
- Greene, R. T. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1990. v. 4, p. 167-171.
- Grodzicki, R. L.; Steere, A. C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 1988. v. 157, n. 4, p. 790-797.
- Grund, S.; Nattermann, H.; Horsch, F. Electron-microscopic examination of spirochaetes in dermatitis digitalis lesions in cows. *Journal of Veterinary Medicine* 1995. v. 54, n. 6, p. 882-890.
- Gustafson, J. M.; Burgess, E. C.; Wachal, M. D.; Steinberg, H. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 1993. v. 54, n. 6, p. 882-890.
- Hadani, A.; Guglielmone, A. A.; Bermúdez, A. C. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en bovinos de la provincia de Salta, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria Argentina*. 1985. v. 66, n. 5, p. 292-294.
- Hoogstraal H. Ticks and spirochetes. *Acta Tropica*. 1979. v. 36, p. 133-136.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2001. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>>
- Ishikawa, M. M. Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico. *Tese de Mestrado*, UFRRJ, Rio de Janeiro. 1996. 51pp.
- Ishikawa, M. M. Perfil da produção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural. *Tese de Doutorado*, UFRRJ, Rio de Janeiro. 2000. 80pp.
- Johnson, R. C.; Schmid, G. P.; Hyde, F. W.; Steigerwalt, A. G.; Brenner, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp. Nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Journal of Systematic Bacteriology*. 1984. v. 34, p. 496.

- Joppert, A. M. Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo. *Tese de Mestrado*, FMVZ-USP, São Paulo. 1995. 83pp.
- Kantor, F. S. Disarming Lyme disease. *Scientific American*. 1994. v. September, p. 20-25.
- Kawabata, H.; Masuzawa, T.; Yanagihara, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Oral Microbiology and Immunology*. 1993. v. 37, p. 843-848.
- Kornblatt, A. N.; Urband, P. H.; Steere, A. C. Arthrits caused by *Borrelia burgdorferi* in dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1985. v. 186, n. 9, p. 960-964.
- Le Fleche, A.; Postic, D.; Grardete, K.; Peter, O.; Baranton, G. Characterization of *Borrelia lusitanae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *The International Journal of Bacteriology*. 1997. v.47, n. 4, p. 921-925.
- Lane, R. S.; Brown, R. N.; Piesman, J.; Peavey, C. A. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. *Journal of Medical Entomology*. 1994. v. 31, n. 3, p. 417-424.
- Levy, S. A. & Dresen, D. W. Lyme borreliosis in dogs. *Canine Practice*. 1992. v. 17, n. 2, p. 5-14.
- Levy, S. A. & Magnarelli, L. A. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J. Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1992. v.200, n. 3, p. 344-347.
- Li, M.; Masuzawa, T.; Takada, N.; Ishiguro, F.; Fujita, H.; Iwaki, A.; Wang, H.; Wang, J.; Kawabata, M.; Yanagihara, Y. Lyme disease *Borrelia* species in northeastern China resemble those isolated from far eastern Russia and Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. v. 64, n. 7, p. 2705-2709.
- Lienbling, M. R.; Nishio, M. J.; Rodriguez, A.; Sigal, L. H.; Jin, T.; Louie, J. S. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. *The Arthrits Rheumatology*. 1993. v. 36, n. 5, p. 665-675.
- Lin, T.; Oliver Jr., J. H.; Gao, L.; Kollars Jr., T. M.; Clark, K. L. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the southern United States based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. v. 39, n. 7, p. 2500-2507.
- Lissman, B. A.; Bosler, E. M.; Camay, H.; Ormiston, B. G.; Benach, J. L. Spirochete-associated arthritis (Lyme Disease) in a dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1984. v. 185, n. 2, p. 219-220.
- Magnarelli, L. A.; Anderson, J. F.; Kaufmann, A. F.; Lieberman, L.L.; Whitney, G. D. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1985. v. 189, p. 955-959.
- Magnarelli, L. A.; Anderson, J. F.; Shaw, E. ; Past, J. E.; Palka, F. C. Borreliosis in equids in northeastern United States. *American Journal of Veterinary Research*. 1988. v. 49, n. 3, p. 359-362.
- Magnarelli, L. A. & Anderson, J. F. Class specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids.

Journal of American Veterinary Medicine Association. 1989. v. 195, n. 10, p. 1365-1368.

Magnarelli, L. A.; Anderson, J. F.; Schreier, A. B. Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1990. v. 196, n. 7, p. 1064-1068.

Magnarelli, L. A.; Anderson, J. F.; Johnson, R. C. Analyses of mammalian sera in enzyme-linked immunosorbent assays with different strain of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *The Journal of Wild Disease*. 1995. v.31, n. 2, p. 159-165.

Marcelis, L.; Maneffe de, P.; Chaidron, E.; Bigaignon, G.; Kageruka, P.; Goubau, P. Horse reservoir for *Borrelia burgdorferi*? *The Lancet*. 1987. April, 25, p. 977.

Marconi, R.T.; Liveris, D.; Schwartz, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersoni* sp. nov.) isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995. v. 33, n. 4, p. 2427-2434.

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

Martins, J. R.; Ceresér, V. H.; Corrêa, B. L.; Smith, R. D. *Borrelia theileri*: Observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*. 1996. v. 26, n. 3, p. 447-450.

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

Mckenna, P.; Clement, J.; Van Dijck, D.; Lauwerys, M.; Carey, D.; Van Den, B.; Bigaignon, G. Canine Lyme disease in Belgium. *The Veterinary Record*. 1995. v. 136, p. 224-247.

Melo, I. S.; Gadelha, A. R.; Ferreira, L. C. L. Estudo histopatológico de casos de eritema crônico migratório diagnosticados em Manaus. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2003. v. 78, n. 2, p. 169-177.

Michelis, S.; Sewell, H-S.; Collares-Pereira, M.; Santos-Reis, M.; Schouls, L. M.; Benes, V.; Holmes, E. C.; Kurtenbach, K. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. v. 38, n. 6, p. 2128-2133.

Muller, I.; Khanakah, G.; Kundi, M.; Stanek, G.; Suss, J.; Kahl, O.; Dautel, H. Horses and *Borrelia*: immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farm the Spanish Riding School in Viena. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001. v. 33, p. 80-87.

Oliveira, A. Cultivo de *B. burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em diferentes meios. 2001. *Tese de Doutorado*. UFRRJ, Rio de Janeiro. 114pp.

Palácios, R.; Osorio, L. E.; Giraldo, L. E.; Torres, A. J.; Philipp, M. T.; Ochoa, M. T. Positive IgG Western Blot for *Borrelia burgdorferi* in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999. v. 94, n. 4; p. 499-503.

- Parker, J. L. & White, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Veterinary*. 1992 v. 82, p. 253-274.
- Pfister, H. W.; Wilske, B.; Weber, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet*. 1994. v.343, p. 1013-1016.
- Portier, K.; Fortier, G.; Riffault, C.; Perrin, R. Suspected Lyme disease in a pony. *Pratique Veterinaire Equine*. 2002. v. 34, n. 134, p. 59-65.
- Postic, D.; Belfazia, J.; Isogai, E.; Girons, I.S.; Grimont, P.A.D.; Baranton, G. A new genomic species in *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated from Japanese ticks. *Research in Microbiology*. 1993. v. 144, p. 467-473.
- Postic, D.; Marti Ras, N.; Lane, R. S.; Henderson, M.; Baranton, G. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *B. bissetti* sp. Nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. v. 36, n. 12, p. 3497-3504.
- Quenouille, M. H. *Introductory Statistics*. Ed. Revista Instituto del Libro. Cuba. 1966. 249pp.
- Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. K.; Carter, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. First edition. Wolf Publishing, London. 1994. p. 292-303.
- Rees, D. H. E. & Axford, J. S. Lyme disease: A rare but clinically important disease in the UK. *Equine Veterinary Journal*. 1994. v. 26, n. 3, p. 175-177.
- Ribeiro, J. M. C.; Mather, T. N.; Piesman, J.; Spielman, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme Disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 1987. v. 24, n. 2, p. 201-205.
- Rich, S. M.; Armstrong, P. M.; Smith, R. D.; Telford III, S. R. Lone star tick-infecting *Borreliae* are most closely related to the agent of bovine Borreliose. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. v. 39, n. 2, p. 494-497.
- Rogers, A. B.; Smith, R. D.; Kakoma, I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia coriaceae* in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 1999. v. 60, n. 6, p. 694-697.
- Salles, R. S.; Fonseca, A. H.; Scofield, A.; Madureira, R. C., Yoshinari, N. H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi sensu lato* em equinos no estado do Rio de Janeiro. *A Hora Veterinária*. 2002. v. 127, p. 46-49.
- Schonert, S.; Grabner, A.; Heidrich, J.; Schonberg, A.; Nockler, K.; Bahn, P.; Luge, E.; Brem, S.; Muller, W. Lyme disease in the horse? Comparative studies of direct and indirect testing for *Borrelia burgdorferi*. *Praktische-Tierarzt*. 2002. v. 83, n. 12, p. 1064-1068.
- Silva, A. M. & Firkring, E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. *Parasitology Today*. 1997. v. 13, n. 7, p. 267-270.
- Smith, R. D.; Brener, J.; Osorno, M.; Ristic, M. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1978. v. 32, p. 182-190.
- Smith, R. D. & Rogers, A. B. *Borrelia theileri*: A review. *Journal of Spirochetal and Tick-borne Diseases*. 1998. v. 5, n. 4, p. 63-68.

- Soares, C. O. Estudo da borreliose canina: imunodiagnóstico, soropidemiologia e análise interativa com a babesiose canina. *Tese de Mestrado*. UFRRJ, Rio de Janeiro. 1998. 80pp.
- Soares, C. O.; Fonseca, A. H.; Ishikawa, M. M.; Manera, G. B.; Scofield, A.; Yoshinari, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 1999. v. 21, n. 3, p. 111-114.
- Soares, C. O.; Ishikawa, M. M.; Fonseca, A. H.; Yoshinari, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2000. v. 20, n. 1, p. 1-19.
- Stafford III, K. C.; Bladen, V. C.; Magnarelli, L. A. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds (Aves) and white-footed mice in Lyme, CT. *Journal of Medical Entomology*. 1995. v. 32, n. 4, p. 453-466.
- Stefancikova, A.; Stepanova, G.; Derdakova, M.; Pet'ko, B.; Kysel'ova, J.; Ciganek, J.; Strong, L.; Cislakova, L.; Travnicek, M. Serological evidence for *Borrelia burgdorferi* infection associated with clinical signs in dairy cattle in Slovakia. *Veterinary Research Commun.* 2002. v. 26, n. 8, p. 601-611.
- Step, D. L.; Cummings, J. F.; Lahunta, A.; Valentine, B. A.; Summers, B. A.; Rowland, P. H.; Mohammed, H. O.; Eckerlin, R. H.; Rebhun, W. C. Motor neuron degeneration in a horse. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1993. v. 202, n. 1, p. 86-88.
- Steere, A. C.; Malawista, S. E.; Hardin, J. A.; Ruddy, S.; Askenase, P.W.; Andinan, W. A. Erythema Chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. *Annals of Intern Medicine*. 1977a. v. 86, p. 685.
- Steere, A. C.; Malawista, S. E.; Snyderman, D. R.; Shope, R. E.; Andinan, W. A.; Ross, M. R.; Steere, R. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *The Arthritis Rheumatology*. 1977b. v. 20, p. 7.
- Steere, A. C. Lyme disease. *The England Journal of Medicine*. 1989. v.31, p. 586-597.
- Telford III, S. R.; Spielman, A. Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme Disease spirochete. *Journal of Medical Entomology*. 1989. v. 26, n. 2, p. 118-121.
- Vivas, R. I. R.; Aguilar, F. C.; Alpizar, J. L. D.; Galera, L. A. C.; Calderón, J. J. S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. *The Veterinaria México*. 1996. v.27, n. 2, p. 187-188.
- Walker, R. L.; Read, D. H.; Hayes, D. C.; Nordhausen, R. W. Equine abortion associated with the *Borrelia parkeri*-*B. turicatae* tick-borne relapsing fever spirochete group. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. v. 40, n. 4, p. 1558-1562.
- Wang, G.; Van Dam, A.P.; Le Fleche, A.; Postic, D.; Peter, O.; Baranton, G.; Boer, R.; Spanjaard, L.; Dankert, J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997. v. 47, n. 4, p. 927-932.
- Wells, S. J.; Trent, A. M.; Robinson, R. A.; Knutson, K. S.; Be, R. F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. *The American Journal Veterinary Research*. 1993. v. 54, n. 3, p. 398-405.

Wilske, B.; Habermann, C.; Finglerle, V.; Hillenbrand, B.; Jauris-Heipke, S.; Lehnert, G.; Pradel, I.; Rossler, D.; Schoulte-Spechtel, U. An improved recombinant IgG immunoblot for diagnosis of Lyme Borreliosis. *The Medicine Microbiology and Immunology*. 1999. v. 188, n. 3, p. 139-144.

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. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. *Revista do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*. 1993a. v. 48, n. 4, p. 170-174.

Yoshinari, N. H.; Steere, A. C.; Barros, P. J. L.; Cruz, F. M. C.; Mendonça, M.; Oyafuso, L. K.; Levy, L.; Cossermelli, W. Lyme disease in Brasil: report of five cases. *Revista Espanhola de Reumatologia*. 1993b. v. 20, p. 6.

Yoshinari, N. H.; Barros, P. J. L.; Fonseca, A. H.; Bonoldi, V. L. N.; Bttesti, D. M.; Schumaker, T. S.; Cossermelli, W. Borreliose de Lyme – zoonose emergente de interesse multidisciplinarity. *News Lab*. 1995. v. 3, n. 12, p. 90-104.

Yoshinari, N. H.; Barros, P. J. L.; Bonoldi, V. L. N.; Ishikawa, M.; Battesti, D. M. B.; Pirana, S.; Fonseca, A. H.; Schumaker, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Revista do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*. 1997. v. 52, n. 2, p. 111-117.

Yoshinari, N. H.; Soares, C. O. Fonseca, A H.; Scofield, A.; Battesti, D. B.; Madruga, C. R. Serology for *Babesia bovis* in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases. *Annals do XXI International Congress of Entomology*. 2000. v. 2, n. 1, p. 820-820.

Yoshinari, N. H.; Abrão, M. G.; Bonoldi, V. L. N.; Soares, C. O.; Madruga, C. R.; Scofield, A.; Massard, C. L.; Fonseca, A. H. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003. v. 98, n. 3, p. 311-318.

8. ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

IDENTIFICAÇÃO

Nome do Proprietário			
Nome da Propriedade			
Município :	Distrito	Localidade	
Acesso:			
Endereço para correspondência:		Cidade:	
CEP	TELEFONE	FAX	EMAIL

MANEJO

Nº total de animais (Eqüinos)	<i>Presença de carrapatos</i>	Utilização de Carrapaticida	<i>Periodicidade de aplicação</i>

DADOS DAS AMOSTRAS

Nº DO TUBO	IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS				DATA Coleta	Observações
	Nome/Nº	Sexo	Idade	Raça		

UFRRJ CPGCV-PV Renata C. Madureira
 Mapa para o acompanhamento imunoenzimático ELISA

Data:

Cont. posit.

Cont. neg.

Obs:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Soro	D.O	Título

ANÁLISE
Media =
Desvio Padrão =
“Cut-off” =