

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI - *Borrelia burgdorferi* EM  
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E DE INFECÇÕES  
NATURAIS EM BOVINOS**

**MÁRCIA MAYUMI ISHIKAWA**

**2000**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI - *Borrelia burgdorferi* EM  
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E DE INFECÇÕES  
NATURAIS EM BOVINOS**

MÁRCIA MAYUMI ISHIKAWA

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

Dr. ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de *Philosophiae*  
*Doctor* em Medicina Veterinária  
Parasitologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

MARÇO, 2000

**TÍTULO DA TESE****PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- *Borrelia burgdorferi* EM  
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E DE INFECÇÕES  
NATURAIS EM BOVINOS****AUTORA****MÁRCIA MAYUMI ISHIKAWA**

APROVADA EM 24/03/2000

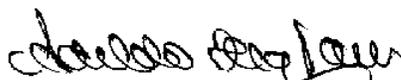
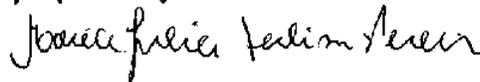
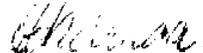
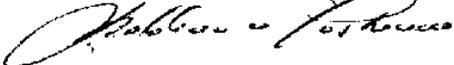
Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca

Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

Prof. Dr. Cláudio Roberto Madruga

Prof. Dr. Carlos Luiz Massard

Prof. Dra. Maria Julia Salim Pereira

Dedico este trabalho,

Ao verdadeiro Amor,

Meus Pais e Minhas irmãs

Meu Marido e Minha Filha,

“Tudo vale a pena, se a alma não é pequena”

Fernando Pessoa.

## **Agradecimento Especial**

Ao Professor e amigo Adivaldo Henrique da Fonseca  
Pelo apoio, carinho, dedicação, e por tudo.

Ao Dr. Natalino Hajime Yoshinari  
Pela amizade, colaboração e incentivo

## AGRADECIMENTOS

Aos amigos Cleber Oliveira Soares e Virgínia L.N. Bonoldi, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos. .

A Profa. Marília Massard da Fonseca pelo apoio e pelos momentos dedicados a todos que participaram deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Luiz Massard pelo apoio e auxílio na execução do trabalho.

Aos estagiários e bolsistas do laboratório Alessandra Scofield, Carina de Oliveira, Kátia, Renata, Natalie e Wanderson C.P. Silva pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, especialmente, pelo companheirismo e amizade.

A Profa. Ângela de Oliveira por dividir idéias e esforços; pela amizade, carinho e companheirismo.

Ao Prof. Cláudio R. Madruga da EMBRAPA – CNPGC, Campo Grande - MS pelo apoio e fornecimento de reagentes para execução de sorologia para babesiose e anaplasnose.

Ao Prof. Silvio Arruda Vasconcellos do Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - FMVZ/USP, pelo apoio, amizade e por permitir a realização das provas de soroaglutinação microscópica para leptospirose e soroaglutinação de brucelose.

A Ozeas Cabral Perrut da Estação Experimental de Itaguaí – PESAGRO, Rio pelo fornecimento dos dados climatológicos.

Aos funcionários João Luiz Bastos, Jaime da Silva Pena e José Carlos Baeto pela ajuda na manipulação dos animais, manutenção das instalações e cuidados especiais com os animais.

As funcionárias Zenaide Maria de Moraes e Sônia R. P. Ferraz do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela paciência e realização das provas de soroaglutinação microscópica para leptospirose e soroaglutinação para brucelose.

A todos os Colegas do Curso de Pós-Graduação pelos momentos compartilhados de dedicação, esforço e alegrias.

Aos professores e funcionários que participaram do Curso de Pós-Graduação e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A Cargill S.A. pelo fornecimento de ração destinado à manutenção dos animais em confinamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos animais que humildemente contribuíram para o benefício da humanidade que possibilitaram a realização deste trabalho, nosso respeito e eterna gratidão.

## **BIOGRAFIA**

Márcia Mayumi Ishikawa, filha de Akio Ishikawa e Toshico Kishi Ishikawa, nasceu a 10 de Janeiro de 1971, na cidade de Lucélia, Estado de São Paulo.

Concluiu o primeiro grau na Escola Estadual de Primeiro Grau Navarro de Andrade, no município de Adamantina, Estado de São Paulo. Realizou o segundo grau no Colégio Integrado Objetivo, na cidade de São Paulo no período de 1986 à 1988.

No ano de 1989, ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, tendo obtido o título de Médica Veterinária em janeiro de 1994.

Durante a vida acadêmica, desenvolveu projeto de pesquisa em Iniciação Científica no setor de Dermatologia do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo.

Em março de 1994, iniciou o Curso de Aperfeiçoamento/Pesquisa no Laboratório de Doença de Lyme na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Concluiu a Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em janeiro de 1996.

Exerceu o cargo de Professora Substituta na disciplina IV-127 Higiene e Saúde Pública no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro durante o segundo Semestre de 1996.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nível de Doutorado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em março de 1996.

## ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1-Estudo do perfil da produção de anticorpos IgG nos bovinos utilizados em padronização do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti <i>B. burgdorferi</i> em bovinos.....	14
3.2- Estudo da relação proteína rBm86 x <i>Borrelia burgdorferi</i> em condições experimentais.....	17
3.3- Estudo sorológico em bovinos em condições naturais.....	18
3.4-Estudo sorológico em bovinos na mesorregião Norte Fluminense e na mesorregião Médio Paraíba.....	19
3.5-Estudo de dados climatológicos.....	21
3.6-Meio de Cultura BSK.....	21
3.7-Preparo do Antígeno de <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	23
3.8-Esaio Imunoenzimático – ELISA para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	24
3.9-Ensaio Imunoenzimático – ELISA para <i>Babesia bigemina</i> .....	25

3.10-Ensaio Imunoenzimático – ELISA para <i>Babesia bovis</i> .....	26
3.11-Ensaio Imunoenzimático – ELISA para <i>Anaplasma marginale</i> .....	28
3.12-Soroaglutinação microscópica para Leptospirose.....	29
3.13-Soroaglutinação para Brucelose.....	30
3.14-Identificação e Cultura dos Carrapatos.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1-Estudo do perfil da produção de anticorpos IgG nos bovinos utilizados em padronização do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti <i>B. burgdorferi</i> em bovinos.....	33
4.2- Estudo da relação proteína rBm86 x <i>Borrelia burgdorferi</i> em condições experimentais.....	47
4.3-- Estudo sorológico em bovinos em condições naturais.....	51
4.4-Estudo sorológico em bovinos na mesorregião Norte Fluminense e na mesorregião Médio Paraíba.....	57
4.5-Estudo de dados climatológicos.....	60
4.6-Considerações Gerais.....	65
5. CONCLUSÕES.....	68
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01- Resultados dos testes de soroaglutinação microscópica para Leptospirose e soroaglutinação para Brucelose das 14 amostras do bovino inoculado (590).....	36
Tabela 02- Resultados dos testes de soroaglutinação microscópica para Leptospirose e soroaglutinação para Brucelose das 14 amostras do bovino testemunha (591).....	37
Tabela 03- Resultados dos testes do Kit anti rBm86 nos bovinos inoculado e testemunha.....	46
Tabela 04- Resultados dos testes do Kit anti rBm86 nos bovinos 122,140 e 165 mantidos a campo.....	50
Tabela 05- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para <i>B. bigemina</i> dos bovinos provenientes de Marica, Queimados e Alegre.....	55
Tabela 06- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para <i>B. bovis</i> dos bovinos provenientes de Marica, Queimados e Alegre.....	55
Tabela 07- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para <i>A. marginale</i> dos bovinos provenientes de Marica, Queimados e Alegre.....	56
Tabela 08- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para <i>B. burgdorferi</i> dos bovinos provenientes de Marica, Queimados e Alegre.....	56
Tabela 09- - Resultados obtidos no teste ELISA indireto para <i>B. burgdorferi</i> dos bovinos provenientes da mesorregião Norte Fluminense e mesorregião Médio Paraíba.	59

**ÍNDICE DE TABELAS****continuação**

Tabela 10- Médias mensais de temperatura e umidade relativa do ano de 1996 com a densidade óptica do teste ELISA (D.O.) dos animais inoculado (590) e testemunha (591).....	62
.....	
Tabela 11- Médias mensais de temperatura e umidade relativa do ano de 1997 com a densidade óptica do teste ELISA (D.O.) dos animais inoculado (590) e testemunha (591).....	63
.....	
Tabela 12- Médias mensais de temperatura e umidade relativa do ano de 1998 com a densidade óptica do teste ELISA (D.O.) dos animais inoculado (590) e testemunha (591).....	64
.....	

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti <i>B. burgdorferi</i> nos bovinos inoculado (590) e testemunha (591) durante infestação natural por carrapatos e após vacinas de carbúculo sintomático, brucelose e leptospirose .....	35
Gráfico 02- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> , <i>A.marginale</i> e <i>B. burgdorferi</i> no bovino inoculado (590).....	40
Gráfico 03- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> , <i>A.marginale</i> e <i>B. burgdorferi</i> no bovino testemunha (591).....	41
Gráfico 04- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti <i>B. burgdorferi</i> nos bovinos inoculado (590) e testemunha (591) após vacina com proteína Bm86 recombinante de carrapato <i>Boo.microplus</i> .....	45
Gráfico 05- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti <i>B. burgdorferi</i> nos bovinos touro, 28, 140 e 144 mantidos a campo.....	49

## RESUMO

Realizou-se estudo do perfil de produção de anticorpos da classe IgG anti *Borrelia burgdorferi* em dois bovinos mestiços utilizados em padronização de teste ELISA indireto e em 15 outros bovinos mantidos a campo no município de Seropédica, RJ. Analisou-se as possíveis interferências na soropositividade para *B. burgdorferi* nestes animais frente as vacinações e infecções naturais por *B. burgdorferi*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e infestações naturais por *Boophilus microplus*. Os dois bovinos utilizados em padronização receberam vacinas para brucelose, leptospirose e carbúnculo sintomático. Todos os 17 animais receberam o imunógeno de proteína rBm86. Utilizou-se ensaio imunoenzimático ELISA indireto para detecção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* para estudar a produção de anticorpos IgG nos animais utilizados. Utilizou-se teste de soroaglutinação microscópica para leptospirose, testes de soroaglutinação rápida e lenta para brucelose e o Kit para detecção de

anticorpos anti rBm86. Para conhecer o título de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* nos bovinos provenientes das regiões estudadas, realizou-se estudo sorológico em 16 bovinos mantidos na fazenda Pilar, Maricá, 15 bovinos da fazenda Alto da Serra, Queimados, situados na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro; 28 animais procedentes de Alegre, região sul do Espírito Santo, 436 da mesorregião do Norte Fluminense e 122 da mesorregião do Médio Paraíba. Neste estudo, observou-se altos títulos de anticorpos anti *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, demonstrando a ocorrência de infecção simultânea desses agentes na população animal estudada. Observou-se aumento na produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* em bovinos após vacina para leptospirose e após associação de estímulos. Não houve interferência na soropositividade dos ensaios imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos anti *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* nos bovinos utilizados em padronização.

## SUMMARY

A study about the profile of the production of antibodies from Ig G against *Borrelia burgdorferi* in two bovines half-breed was made. They were used for the standadization of the serum assay, and in 15 others bovines that stayed in camp in the city of Seropédica, RJ. Some possible interferences in the seropositive for Lyme borreliosis in animals that were used for vaccination and natural infection for *B. burgdorferi*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* and infestation for *Boophilus microplus* were analyzed. The two bovines that was used in the standardization received vaccine to brucellosis, leptospirosis and sintomatic carbuncle. All the 17 animals received the immunogenum of rBm86 protein. The indirect immunoenzymatic assay ELISA was used for the detection of the antibodies of Ig G class against *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* and *A. marginale* to study the production of IgG antibodies in the utilized animals. The assay of microscopic serumagglutination for leptospirosis, the fast and slow assay of serumagglutination for brucellosis and the Kit of antibodies against rBm86

detection were utilized. The serologic study of 16 bovines maintained in the Pilar farm, municipality of Maricá, 15 bovines from Alto da Serra farm, municipality of Queimados, that stay in the metropolitan region of the state of Rio de Janeiro; 28 animals came from Alegre, south region of Espírito Santo, 436 from the mesorregion Norte Fluminense, 122 from the mesorregion Médio Paraíba were realized to know the titer of IgG antibodies in the bovines from the studied regions. This study presented high titers of antibodies against *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* and *A. marginale* showing the occurrence of the simultaneous infection of these agents in the animals population studied. Increases were observed in the production of IgG antibodies against *B. burgdorferi* after the vaccine for leptospirosis and after the stimulus association. There wasn't interference in the seropositivity of the immunoenzymatic assay against *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* and *A. marginale* in the bovines used for standardization.

## 1-INTRODUÇÃO

O gênero *Borrelia* (Swellengerbel, 1907) inclui espiroquetas patogênicas que acometem o homem, mamíferos e aves. Historicamente, as espécies do gênero *Borrelia* foram diferenciadas com base nos seus vetores.

As *Borrelias* atualmente conhecidas por acometerem bovinos são: *Borrelia theileri* (Laveran, 1903), transmitida pelos carrapatos *Boophilus microplus*, *Boophilus decoloratus* e *Boophilus annulatus*, a qual pode estar associada a febre, hemoglobinúria e anemia; *B. coriacea* (Johnson, Burgdorfer, Lane, Barbour, Hayes & Hyde, 1987), cujos carrapatos transmissores pertencem ao gênero *Ornithodoros spp* estando associado ao aborto epizoótico bovino; *B. burgdorferi* (Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner, 1984) *lato sensu* que possui principalmente, os carrapatos *Ixodes* como vetores, associado a artrites, sinovites e aumento de volume de articulação.

A Borreliose de Lyme apresenta características clínicas variáveis conforme a região geográfica, e admite-se que esta resposta heterogênea decorra da existência de espécies distintas dentro do gênero *Borrelia*, explicando porque é necessário a realização de ensaios sorológicos (ELISA ou Western-blotting), com antígenos adequados para cada área geográfica. Esta Borreliose tem sido descrita no homem, em canídeos, felídeos, equídeos, bóvidos e um grande número de animais silvestres e aves. O quadro clínico em animais não é totalmente conhecido. A associação da *B. burgdorferi* com carrapatos parasitos de roedores e aves migratórias, sugerem uma ampla distribuição geográfica do agente, incluindo áreas onde a doença está ausente em humanos.

O cultivo e a visualização da espiroqueta a partir de material suspeito constituem procedimentos pouco produtivos no diagnóstico das Borrelioses; assim, os testes sorológicos tornam-se importantes na abordagem do paciente suspeito. O ensaio imunoenzimático ELISA indireto constitui em um importante procedimento laboratorial no diagnóstico e no estudo epidemiológico da Borreliose de Lyme.

Os objetivos do presente trabalho foram estudar o perfil de produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* em associação com diferentes estímulos antigênicos em bovinos e conhecer o título de anticorpos em bovinos de diferentes regiões.

## 2-REVISÃO DE LITERATURA

Em 1903, Laverán observou que espiroquetas foram vistas pela primeira vez em sangue de bovinos por Arnold Theiler em 1902 na África do Sul e estas espiroquetas apresentavam características do gênero *Spirillum*. Em 1923, no Bergey's Manual estes organismos foram descritos como *Spironema theileri* (Laverán). Mulhearn (1946), na Austrália, observou espiroqueta em bovino referindo-a como *Spirochaeta theileri*. Seddon (1952) reportou que a espiroqueta havia sido descrita originalmente como *Spirochaeta theileri*, mas que, aparentemente poderia ser conhecida como *Treponema theileri*. Em 1957, no Bergey's Manual os organismos de Laverán foram classificados como *Borrelia theileri*.

A *Borrelia theileri* foi descrita acometendo bovinos, ovinos, eqüinos, cervídeos, impala e outros ruminantes silvestres, no entanto, causando apenas

uma febre e anemia moderada sendo pouco patogênica quando não está associada a outros hematozoários (Irvin *et al.*,1972; Smith *et al.*, 1985).

Lane *et al.* (1985) isolaram espiroquetas de carrapatos *Ornithodoros coriaceus* Koch no nordeste da Califórnia e as caracterizaram como *Borrelia-like* com base em sua morfologia e imunoreatividade com anticorpo monoclonal gênero-específico. Johnson *et al.* (1987) descreveram-nas como uma nova espécie, baseado nas suas propriedades genéticas e fenotípicas, nomeando-a como *Borrelia coriaceae*. Estudos tem evidenciado que esta *Borrelia* pode ser o agente causal do aborto epizootico bovino (Osebold *et al.*, 1986, 1987).

Aspectos clínicos e epidemiológicos da Borreliose de Lyme foram estudados desde o início do século. A lesão crônica da doença de Lyme, chamada de acrodermatite crônica atrófica foi descrita em 1902 por Herxheimer e Hartman. Afzelius (1921) e Lipschultz (1923) relataram o eritema crônico migratório associado com a picada de carrapatos e em 1944, Bannwarth , associou a meningorradiculite com algum agente infeccioso, transmitido por carrapatos da espécie *Ixodes ricinus*.

A Borreliose de Lyme foi inicialmente reconhecida nos Estados Unidos em 1975, na comunidade de Lyme (Connecticut), onde um grupo de crianças apresentando sintomas similares à artrite reumatóide juvenil, chamou a atenção

de Allen C. Steere, reumatologista do Departamento de Medicina Interna da Universidade de Yale, New Haven.

Em 1977, Steere *et al.*, publicaram uma descrição da artrite de Lyme, caracterizando a doença por uma erupção cutânea seguida de ataques recorrentes de artrites. Posteriormente, Steere publicou um trabalho descrevendo o caráter sistêmico da enfermidade, descrevendo outras manifestações da doença além de artrite.

Em 1982, Barbour e Burgdorfer isolaram espiroquetas de carrapatos da espécie *Ixodes dammini*, e posteriormente no sangue (Benach *et al.*, 1983), articulação (Johnston *et al.*, 1985), líquido (Preac-Mursic *et al.*, 1984) e pele (Steere *et al.*, 1984) de portadores desta enfermidade. O agente que é do gênero das *Borrelias* passou a se chamar *B. burgdorferi* (em homenagem à Burgdorfer que primeiro descreveu o agente nos vetores).

Atualmente a Borreliose de Lyme apresenta ampla distribuição geográfica e tem como agentes a *Borrelia burgdorferi stricto sensu*, presente em vários continentes; *B. garinii* (Baranton *et al.*, 1992), presente na Europa; *B. afzelli* (Canica *et al.*, 1993), ocorrendo na Europa e Japão; *B. japonica* (Kawabata *et al.*, 1993) no Japão; *B. miyamotoi* (Postic *et al.*, 1993) na Ásia; *B. andersoni* (Marconi *et al.*, 1995) e *B. lonestari* (Barbour *et al.*, 1996) na América do Norte;

*B. lusitaniae* (Le Fleche *et al.*, 1997) e *B. valaisiana* (Wang *et al.*, 1997) na Europa, *B. bissettii* (Postic *et al.*, 1998) nos Estados Unidos.

Após a identificação desta doença em humanos, a *B. burgdorferi* foi descrita em animais silvestres, domésticos e aves (Anderson *et al.*, 1986). Durante a década de 80 a incidência da doença cresceu . Nos países onde a doença é endêmica, os roedores e veados (Magnarelli *et al.*, 1986) são os reservatórios naturais, enquanto que os animais domésticos como cachorros, cavalos, ovelhas, comportam-se como agentes transportadores de vetores aos domicílios (Anderson, 1988). Em contraste com a infecção inaparente nos animais silvestres, esta enfermidade causa doença clínica nos animais domésticos (Burgess *et al.*, 1987a,1987b; Magnarelli *et al.*, 1987).

Em 1984, Lissman *et al.* reportaram o primeiro caso em cães, causando uma síndrome musculoesquelética, comprometendo principalmente as articulações carpiana e tarsiana; podendo ainda apresentar febre, letargia, inapetência e dor articular (Magnarelli *et al.*, 1985). O cão pode atuar como importante reservatório no ambiente domiciliar, favorecendo o contato do carrapato vetor com o homem (Appel, 1990; Bosler, 1993). Os gatos também são conhecidos como suscetíveis à Doença de Lyme, no entanto, poucos casos tem sido relatados (Appel, 1990).

Bosler *et al.* (1986) demonstraram espiroquetas a partir de urina e sangue de animais infectados.

Em 1987a, Burgess descreveu caso clínico com altos títulos de anticorpos no soro, leite e líquido sinovial em um bovino proveniente de área não endêmica.

Burgess (1989) demonstrou espiroquetas a partir de colostro de animais infectados não sendo obtido a partir do leite.

Em 1990, Brand descreveu altos níveis de anticorpos em bovinos velhos, sugerindo repetidas infecções anuais.

Parker & White (1992) apresentaram uma revisão sobre a Borreliose de Lyme em bovinos e equinos, relatando a dificuldade do diagnóstico clínico, a dificuldade em isolar a *B. burgdorferi*, e a ocorrência de animais assintomáticos com sorologia positiva.

Em 1993, Wells *et al.* observaram associação entre a ocorrência de altos títulos de anticorpos para *B. burgdorferi* com manifestação clínica de laminite em bovinos leiteiros provenientes de Minnesota e Wisconsin. Obtiveram também, uma maior sensibilidade e especificidade do teste ELISA do que no teste de imunofluorescência indireta.

Ji & Collins (1994) observaram uma correlação entre a distribuição geográfica de rebanho bovino leiteiro soropositivos para *B. burgdorferi* com a distribuição geográfica do carrapato *I. scapularis*, em Wisconsin, Estados

Unidos. Obtiveram apenas 7% de soropositivos para *B. burgdorferi* dos animais provenientes de Wisconsin e 17% de bovinos soropositivos provenientes do município de Barron, localidade onde tem ocorrido alta incidência anual de infecção de *B. burgdorferi* em humanos.

Walker (1995) relatou o isolamento de espiroquetas a partir de lesões de dermatite papilomatosa digital em bovinos leiteiros com características mais consistentes com o gênero *Treponema*.

O diagnóstico da *Borrelia* através de esfregaços sanguíneos periféricos tem sido de grande utilidade, no entanto, é necessário que o animal apresente no momento da execução uma alta espiroquetemia, o que não ocorre naturalmente na maioria das vezes. A coloração de escolha nestes casos tem sido realizado com o corante de Giemsa ou coloração de Fontana (Pessoa, 1963).

Esfregaços de intestino ou hemolinfa do carrapato vetor, corados pelo Giemsa foram utilizados com sucesso no estudo das Borrelioses. (Burgdorfer *et al.*, 1982; Vivas *et al.*, 1996).

O isolamento de *Borrelia* tem sido feito semeando-se sangue, fragmentos de tecidos de pacientes suspeitos, carrapatos ou partes do carrapato em meio de cultura BSK, mantidos em estufa a 33°C em aproximadamente sete dias (Kuiper *et al.*, 1994; Lebech *et al.*, 1995).

Matton & Van Melckebeke (1990) estudaram comparativamente métodos simples para detecção de espiroquetas no sangue de bovinos. Observaram que o exame direto da interface pelet-plasma obtido de tubo capilar de microhematócrito após centrifugação foi capaz de detectar parasitemia em bovinos que não foi obtido através de esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa. Notaram que infecção crescente de *B. bigemina* suprimiu a parasitemia de *Borrelia* e detectaram espiroquetas em carrapatos *Boophilus decoloratus* obtidos de bezerro infectado.

A técnica da imunofluorescência indireta foi testada inicialmente (Steere *et al.*, 1983), sendo utilizada como triagem ou associada a dados clínicos e epidemiológicos, porém foi substituída com vantagens pelo ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), que se revelou mais sensível e específico (Magnarelli *et al.*, 1984). O Western blotting tem sido utilizado para confirmar o ELISA nos casos de dúvida, sendo superior aos outros ensaios, mas exigindo maiores habilidades técnicas e cuidados na interpretação da qualidade e quantidade das bandas (Dressler *et al.*, 1993).

Reações cruzadas entre os membros do gênero *Borrelia*, principalmente entre os bovinos tem sido relatadas (Donoghue *et al.*, 1989). Rogers *et al.*, 1999 observaram estas reações entre *B. burgdorferi*, *B. theileri* e *B. coriaceae*,

ressaltando os cuidados que se deve ter no sorodiagnóstico das Borrelioses que acometem os bovinos.

Mitchell *et al.*, 1994 descreveram reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *Leptospira interrogans*. Em 1988, Magnarelli & Anderson observaram reações cruzadas não significativas entre *B. burgdorferi* e *Treponema sp* e não observaram reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa* e *L. wolffi*. Wells *et al.*, 1993 não observaram associação entre a soropositividade para *B. burgdorferi* e soropositividade para 6 sorotipos de *L. interrogans*.

Magnarelli *et al.* (1995) observaram a coexistência de anticorpos para *Babesia sp*, *Ehrlichia sp* e *Borrelia sp* em pacientes humanos provenientes de áreas de risco para estas enfermidades e não relataram haver reações cruzadas. Piesman (1988) realizou experimento com infecção simultânea de *B. burgdorferi* e *Babesia microti* em roedores e estes animais apresentaram infecção por pelo menos 7 meses. Gerber *et al.* (1994) determinaram um risco muito baixo de adquirir Borreliose de Lyme e Babesiose através de transfusão sanguínea.

Em 1989, Yoshinari *et al.* publicaram o primeiro artigo no Brasil ("Revisão da Borreliose de Lyme"), alertando a classe médica sobre a possibilidade da existência desta enfermidade no país. Neste ano reuniu-se na Universidade de

São Paulo uma equipe multidisciplinar voltada para a investigação desta doença infecciosa, onde criou-se laboratório voltado a realização de sorologias e cultura de *B. burgdorferi* em meio BSK. Embora o isolamento do agente infeccioso não tenha sido possível, casos clínicos com confirmação sorológica foram identificados (Barros *et al.*, 1993; Yoshinari *et al.*, 1991 e 1993).

Em 1991, Azulay *et al.* no Rio de Janeiro e Talhari *et al.*(1992), em Manaus, igualmente relataram casos de Doença de Lyme, porém com manifestações clínicas exclusivamente cutâneas, sem avaliações sorológicas.

Barros (1995) padronizou ensaio imunoenzimático ELISA indireto e ensaio de Western blotting para detecção de anticorpos anti *B. burgdorferi* em humanos e estudou 13 pacientes portadores de Borreliose de Lyme no Brasil.

Joppert (1995), estudou a soroepidemiologia da Borreliose de Lyme em cães na região de Cotia, estado de São Paulo. Observou soropositividade em 8,4% dos animais estudados e que não houve associação entre os resultados positivos para *B. burgdorferi* e os positivos para *Leptospira sp.*

Em 1995b, Fonseca *et al.* relataram altos títulos de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos e caninos provenientes do estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo, Brasil. Referem também, o isolamento de espiroquetas em gambás (*Didelphis marsupialis*) no município de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, onde se discute a importância epidemiológica, uma vez que estes

animais são encontrados com muita frequência em áreas urbanas (Fonseca *et al.*, 1995a). Em 1996, Abel estudou a ocorrência de *Borrelia sp* em marsupiais (*Didelphis marsupialis*) na cidade do Rio de Janeiro e demonstrou o parasitismo mútuo de *Borrelia sp* e *Babesia brasiliensis* .

O primeiro caso de meningite de Lyme no Brasil e a ocorrência de três casos clínicos da doença de Lyme no Estado de Mato Grosso do Sul, identificados por critérios clínicos e laboratoriais foram relatados por Costa *et al.* (1996).

Yoshinari *et al.* (1997) identificaram desde 1989, 25 pacientes com doença de Lyme no Brasil, dos quais 15 no estágio agudo e 10 na fase latente, definiram um perfil clínico, realizaram mapeamento das áreas de risco e realizaram ensaios sorológicos demonstrando anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* .

No Brasil o ensaio imunoenzimático ELISA indireto para detecção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* em bovinos foi padronizado por Ishikawa *et al.* (1997).

Em 1999b, Soares *et al.* padronizaram o ensaio imunoenzimático ELISA indireto para detecção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* em cães. Ainda em 1999a, Soares *et al.* realizaram estudo sorológico em 150 amostras sanguíneas de cães aparentemente saudáveis, procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro e detectaram 20% de amostras positivas pelo ensaio imunoenzimático ELISA indireto.

Soares *et al.* (2000) publicaram uma revisão da Borreliose de Lyme abordando aspectos gerais da *Borrelia* , analisando com detalhes sua transmissão, seus vetores, hospedeiros, diagnóstico e epidemiologia.

### **3-MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1-Estudo do perfil da produção de anticorpos IgG nos bovinos utilizados em padronização do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti *B. burgdorferi* em bovinos**

O teste imunoenzimático ELISA indireto, padronizado no trabalho de Ishikawa, 1996 foi aprimorado para interpretação mais detalhada dos seus resultados frente aos diferentes desafios aos quais estes animais são submetidos. Dois bovinos machos, nascidos em julho de 1995, provenientes da Estação Experimental de Itaguaí – Área de bovino de leite da PESAGRO-Rio foram utilizados. Durante experimento de padronização, um deles foi inoculado com *Borrelia burgdorferi* inativada pelo calor (animal inoculado de nº 590), e outro foi inoculado com PBS estéril, servindo como controle

(animal testemunha de nº 591). Receberam 3 inoculações por via sub-cutânea em intervalos de 15 dias. Após a padronização do ensaio em trabalho de Ishikawa (1996), estes animais foram submetidos a diferentes desafios vacinais e naturais, mantidos em biotério e coletado amostras de soro sanguíneo antes e após cada desafio, estocado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior realização do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *Borrelia burgdorferi*. Utilizou-se vacinas contra carbúnculo sintomático, brucelose, leptospirose e proteína Bm86 recombinante de carrapato *Boophilus microplus*. Os animais receberam 2,0 ml por via sub-cutânea da vacina para carbúnculo sintomático um ano após o terceiro inóculo de *B. burgdorferi* inativada pelo calor e PBS estéril utilizados na padronização do teste ELISA indireto. Receberam 2,0 ml por via sub-cutânea da vacina para brucelose (Abor-Vac, amostra 19, partida 010/95) um mês e 10 dias após a vacina para carbúnculo sintomático. Receberam 3,0 ml por via sub-cutânea da vacina para leptospirose (Lepto-Bac 6, partida 009/96, suspensão inativada de *Leptospira pomona*, *L. grypotyphoza*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. wolfi* e *L. hardjo*) 5 meses após a vacina para brucelose. Receberam 2,0 ml por via intramuscular da primeira dose do imunógeno da proteína rBm86 do carrapato *B. microplus* (GAVAC) 2 meses após a vacina para leptospirose. Receberam a segunda dose quatro semanas após a primeira dose, a terceira dose três

semanas após a segunda dose e a quarta dose seis meses após a primeira dose. Utilizou-se teste de soroaglutinação microscópica para leptospirose e teste de soroaglutinação rápida e lenta para brucelose em 14 amostras de soro dos bovinos inoculado e testemunha. A resposta ao imunógeno rBm86 foi avaliada através de um Kit anti-rBm86 que utiliza sondas de ouro coloidal marcada com proteína A. Os animais foram naturalmente infestados por *Boophilus microplus* e descarrapatizados com acaricidas químicos (deltametrina, amitraz, triclorfon e ivermectina). Vinte e oito amostras de soro sanguíneo de cada bovino foram submetidos ao teste imunoenzimático ELISA para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. Durante o experimento realizou-se esfregaços sanguíneos de cada bovino, fixado com metanol e corado pelo Giemsa para pesquisa de *Borrelias*. Coletou-se 4 amostras de carrapatos desses animais que foram identificados segundo a chave de Aragão e Fonseca e utilizados para confecção de lâminas de ovos e hemolinfa; fixados pelo metanol e corado pelo Giemsa. Realizou-se a cultura de conteúdo intestinal desses carrapatos em meio BSK, mantidos em estufa a 33°C e observados semanalmente em microscopia de campo escuro e contraste de fase. Os animais foram castrados no dia em que receberam a terceira dose da proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus*, sendo necessário repetir uma dose da vacina para confirmar os resultados. A

castração ocorreu de acordo com a rotina do biotério da EMBRAPA - Sanidade Animal com conseqüente complicações pós-cirúrgicas. Após a recuperação total dos animais realizou-se uma quinta dose de reforço para confirmar os resultados. Realizou-se esta quinta dose 1 ano e 2 meses após a quarta dose.

### **3.2-Estudo da relação proteína rBm86 x *Borrelia burgdorferi* em condições experimentais**

Quinze bovinos adultos, mestiços leiteiros, mantidos no biotério da EMBRAPA-Sanidade Animal foram imunizados com proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus* por via intramuscular em 4 doses durante o período de um ano. As aplicações seguiram as indicações do fabricante; primeira dose na semana 1, segunda dose na semana 2, terceira dose na semana 7 e quarta dose 6 meses após a primeira dose. Coletou-se amostras de soro sanguíneo após cada desafio que foram estocadas em freezer -20°C e posteriormente submetidos ao teste imunoenzimático ELISA indireto para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* . Coletou-se três amostras de carrapatos dos animais para confecção de lâminas de ovos e

hemolinfa e realizou-se três amostras de esfregaços sanguíneos de cada animal, fixados em metanol e corados pelo Giemsa para pesquisa de *Borrelias*. Avaliou-se a imunização pela proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus* através de um Kit anti-rBm86 que utiliza sondas de ouro coloidal marcada com proteína A.

### **3.3-Estudo sorológico em bovinos em condições naturais**

Nesta etapa obteve-se amostras de soro sanguíneo de animais suspeitos ou animais com sintomas clínicos de Borreliose ou outro hemoparasita de importância para este estudo. Soros de quatorze bovinos adultos, da raça Brahman, importados do Texas, EUA e que foram utilizados em trabalho de premunização para Tristeza Parasitária Bovina e mais dois animais, todos mantidos na fazenda Pilar, Maricá, Rio de Janeiro foram utilizados para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi*. Soros de dez bovinos adultos e cinco bezerros, da raça Holandês provenientes da fazenda Alto da Serra, em Queimados, Rio de Janeiro, onde alguns animais foram acometidos por anaplasmoses foram utilizados para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi*. Soros de vinte oito bovinos, mestiços leiteiros

provenientes do município de Alegre, Espírito Santo, área onde se obteve a maior percentagem de animais soropositivos para Borreliose de Lyme em estudo realizado por Ishikawa (1996) foram utilizados para novo estudo sorológico. Todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidos ao teste imunoenzimático ELISA indireto para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. Realizou-se esfregaços sanguíneos de cada animal que foram fixados com metanol e corados pelo Giemsa

### **3.4-Estudo sorológico em bovinos na mesorregião Norte Fluminense e na mesorregião Médio Paraíba**

Utilizou-se neste estudo duas áreas divididas segundo divisão político-administrativa da Fundação Cide: : a mesorregião Norte do Estado do Rio de Janeiro cuja população bovina é estimada em 518.465 de cabeças, em uma área total de 663.198 hectares com uma produção leiteira de 81.806.000 litros anuais e a mesorregião do Médio Paraíba, com população bovina estimada em 211.658 cabeças, numa área total de 234.375 hectares, com uma produção leiteira de 841.450.000 litros anuais, (CIDE 1997). Na Região Norte predomina a pecuária de corte com rebanhos formados por raças indianas e

seus cruzamentos e na região do Médio Paraíba há predominância de pecuária leiteira sendo esta a mais importante bacia leiteira do Estado do Rio de Janeiro, com rebanhos constituídos por raças européias e seus cruzamentos (que são mais susceptíveis as infecções pelo carrapato *Boophilus microplus* do que animais da raça indiana), com melhor nível de assistência técnica

Realizou-se estudo sorológico dessas áreas de pecuária distribuídas da seguinte maneira: na mesorregião do Norte Fluminense foram analisadas um total de 436 amostras de soro sanguíneo, sendo composto pelos municípios de Campos (n=185), Macaé (n=91), São Fidélis (n=55), Quissamã (n=21), Conceição de Macabú (n=19), São Francisco de Itabapoama (n=35), Cardoso Moreira (n=12) e São João da Barra (n=18); e na mesorregião do Médio Paraíba foram analisadas um total de 122 amostras de soro dos municípios de Rio das Flores (n=8), Piraí (n=9), Itatiaia (n=7), Rio Claro (n=10), Barra do Piraí (n=20), Valença (n=29), Barra Mansa (n=16) e Resende (n=23).

As amostras de soro foram gentilmente cedidas pelo Serviço de Sanidade Animal da Delegacia Federal de Agricultura no Estado do Rio de Janeiro. Foram obtidas através de venopunção jugular em animais jovens e adultos clinicamente sadios e mantidos à -20°C no laboratório de imunodiagnóstico do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, até o momento do uso.

Realizou-se ensaio imunoenzimático ELISA indireto para detecção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* utilizando-se técnica padronizada por Ishikawa (1996) e descrita no ítem 3.8.

### **3.5-Estudo de dados climatológicos**

Estudou-se as variações climatológicas observadas no Posto da Estação Experimental de Itaguaí - RJ (médias diárias e mensais da temperatura e umidade) durante três anos, período em que se processou o experimento com os bovinos. Estes dados foram utilizados para avaliar a influência das variações climatológicas na produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* pelos bovinos estudados.

### **3.6-Meio de Cultura BSK**

O meio de cultura BSK ou meio de Barbour, Stoenner e Kelly foi preparado de acordo com o seguinte esquema (Barbour *et al.*, 1984):

Dissolveu-se 17g de gelatina em 300 ml de água destilada que foi autoclavada a 120°C por 15 minutos, obtendo-se gelatina a 5,7% que foi mantida dentro de câmara de fluxo estéril até a etapa final. Aqueceu-se 300 ml

de água destilada entre 50°C - 70°C e acrescentou-se: 5,0 g de Neopeptone, 1,0 g de triptone e 1,0 g de yeastolate. Depois de dissolvido, esfriou-se a solução a temperatura ambiente, obtendo-se a Solução A que foi reservada até a etapa seguinte.

Meio de cultura de célula CMRL 1066 (9,8 g) (SIGMA Chemical) com glutamina foi dissolvido em 600 ml de água destilada e em seguida acrescentado: 6,0 g de tampão hepes forma ácida, 0,7 g de citrato de sódio, 5,0 g de glicose alfa D+, 0,8 g de piruvato de sódio, 0,4 g de N-acetil glucosamina, 2,2 g de bicarbonato de sódio, 0,3 g  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ , 0,1 g de glutamine, 143 ml de albumina bovina fração V (35%) e finalizando, a solução A preparada anteriormente. O pH foi ajustado para 7,55 com o auxílio de NaOH 10 M e dessa forma obtida a Solução B.

Em uma câmara de fluxo estéril, 100 ml de soro de coelho a 37°C e a Solução B foram filtrados em microfiltro (Nalgene) de 0,45 $\mu$ m e 0,20 $\mu$ m. Após a filtração, o soro de coelho, a Solução B e a gelatina autoclavada foram misturados em um balão previamente esterilizado. Finalmente, o volume obtido foi transferido para 2 frascos de cultura de 500 ml e o restante distribuído em tubos de cultura com aproximadamente 6,0 ml de meio em cada tubo.

O meio de cultura foi conservado a 4°C quando utilizado dentro de 2 semanas ou a -20°C por um período de até 1 ano. Uma alíquota do meio de cultura resultante de cada preparo foi mantida em estufa a 33°C por 48 h para teste de esterilidade e outra alíquota com uma gota de cultura de *B. burgdorferi* em estufa a 33°C por uma semana para teste de qualidade.

### **3.7-Preparo do Antígeno de *Borrelia burgdorferi***

Para obtenção do antígeno, 1,0 ml de cultura de *B. burgdorferi* cepa G39/40 (origem americana) foi adicionada em um frasco com 500 ml de meio de cultura e mantido em estufa a 33°C por uma semana.

A cultura obtida foi centrifugada a 12.000G por 20 minutos a 4°C (Sorvall Rc2.b), o sedimento resultante foi ressuspensão em PBS 0,001M MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, pH 7,4 e submetido ao processo anterior por mais 2 vezes, dessa forma, o pellet obtido foi lavado e em seguida, suspenso na mesma solução completando o volume final em 6,0 ml.

No preparo do antígeno para sorologia (ELISA) a suspensão foi submetida a sonicação por 3 minutos (Fisher Sonic Dismembrator, model 300 - Dynatech) com intervalos de 15 segundos, filtrada em microfiltro de 0,45µm,

aliquotada e estocada a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso (Grodizicki *et al.*, 1988). A concentração proteica desse antígeno foi dosada pelo método de Folin obtendo-se 3,0 mg/ml.

O preparo do meio de cultura BSK e o preparo do antígeno de *B. burgdorferi* foram realizados no Laboratório de Doença de Lyme do Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob a supervisão do Dr. Natalino Hajime Yoshinari.

### **3.8-Esaio Imunoenzimático - ELISA para *Borrelia burgdorferi***

O antígeno foi diluído em tampão Coating buffer pH=9,6, na concentração de 15ug/ml, para em seguida sensibilizar a placa Immulon 1 , que foi mantida em câmara úmida à  $4^{\circ}\text{C}$  "over-nigth". A placa foi bloqueada com gelatina à 1% em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4 e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Os soros testes foram diluídos na concentração de 1:400 em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4, o soro padrão conhecido foi diluído em oito concentrações, iniciando-se com 1:400. Os oito soros negativos foram obtidos de acordo com o ensaio padronizado por Ishikawa (1996) . Após uma hora de incubação, utilizou-se o conjugado anti-IgG bovino-fosfatase alcalina na diluição de 1:1000. Após mais

uma hora de incubação empregou-se o substrato PNPP, diluído em Tampão Glicina à 1mg/ml. Antes de cada etapa, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS Tw 20-0,05%. A leitura foi feita no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 405 nm.

### **3.9-Ensaio Imunoenzimático – ELISA para *Babesia bigemina***

Avaliou-se a produção de anticorpos anti *B. bigemina* dos bovinos para estudo comparativo com a produção de anticorpos anti *B. burgdorferi* . Avaliou-se 28 amostras do bovino inoculado, 28 amostras do bovino testemunha, 16 amostras de bovinos da fazenda Pilar, Maricá, Rio de Janeiro, 15 amostras de bovinos provenientes da fazenda Alto da Serra em Queimados, Rio de Janeiro e 28 amostras de bovinos provenientes do município de Alegre, Espírito Santo.

O ensaio imunoenzimático ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Parasitologia Animal –Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

O antígeno foi cedido pelo Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA/Gado de Corte, Campo Grande MS sob a responsabilidade do Dr. Cláudio Roberto Madruga. Foi diluído em tampão Coating buffer pH=9,6, na concentração de

6,0ug/ml, em seguida sensibilizou-se a placa Immulon 1 , que foi mantida em câmara úmida à 4°C "over-nigth". A placa foi bloqueada com soro de coelho a 1% em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4 e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Os soros testes foram diluídos na concentração de 1:500 em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4, o soro padrão conhecido foi diluído em oito concentrações, iniciando-se com 1:500. Os oito soros negativos foram obtidos de acordo com o ensaio padronizado . Após uma hora e meia de incubação, utilizou-se o conjugado anti-IgG bovino-fosfatase alcalina na diluição de 1:1000. Após mais uma hora de incubação empregou-se o substrato PNPP, diluído em Tampão Glicina à 1mg/ml. Antes de cada etapa, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS Tw 20-0,05%. A leitura foi feita no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 405 nm.

### **3.10-Ensaio Imunoenzimático – ELISA para *Babesia bovis***

Avaliou-se a produção de anticorpos anti *B. bovis* dos animais para estudo comparativo com a produção de anticorpos anti *B. burgdorferi* . Avaliou-se 28 amostras do bovino inoculado, 28 amostras do bovino testemunha, 16 amostras de bovinos da fazenda Pilar, Maricá, Rio de Janeiro, 15 amostras de bovinos

provenientes da fazenda Alto da Serra em Queimados, Rio de Janeiro e 28 amostras de bovinos provenientes do município de Alegre, Espírito Santo.

O ensaio imunoenzimático ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Parasitologia Animal –Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

O antígeno foi cedido pelo Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA/Gado de Corte, Campo Grande MS , Campo Grande MS sob a responsabilidade do Dr. Cláudio Roberto Madruga. Foi diluído em tampão Coating buffer pH=9,6, na concentração de 7,5ug/ml, em seguida sensibilizou-se a placa Immulon 1 , que foi mantida em câmara úmida à 4°C "over-night". A placa foi bloqueada com soro de coelho a 1% em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4 e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Os soros testes foram diluídos na concentração de 1:500 em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4, o soro padrão conhecido foi diluído em oito concentrações, iniciando-se com 1:500. Os oito soros negativos foram obtidos de acordo com o ensaio padronizado . Após uma hora e meia de incubação, utilizou-se o conjugado anti-IgG bovino-fosfatase alcalina na diluição de 1:1000. Após mais uma hora de incubação empregou-se o substrato PNPP, diluído em Tampão Glicina à 1mg/ml. Antes de cada etapa, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS Tw 20-0,05%. A leitura foi feita no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 405 nm.

### **3.11-Ensaio Imunoenzimático – ELISA para *Anaplasma marginale***

Avaliou-se a produção de anticorpos anti *A. marginale* dos animais para estudo comparativo com a produção de anticorpos anti *B. burgdorferi* . Avaliou-se 28 amostras do bovino inoculado, 28 amostras do bovino testemunha, 16 amostras de bovinos da fazenda Pilar, Maricá, Rio de Janeiro, 15 amostras de bovinos provenientes da fazenda Alto da Serra em Queimados, Rio de Janeiro e 28 amostras de bovinos provenientes do município de Alegre, Espírito Santo.

O ensaio imunoenzimático ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Parasitologia Animal –Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

O antígeno foi cedido pelo Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA/Gado de Corte, Campo Grande MS, Campo Grande MS sob a responsabilidade do Dr. Cláudio Roberto Madruga. Foi diluído em tampão Coating buffer pH=9,6, na concentração de 8,0ug/ml, em seguida sensibilizou-se a placa Immulon 1 , que foi mantida em câmara úmida à 4°C "over-night". A placa foi bloqueada com soro de coelho a 1% em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4 e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Os soros testes foram diluídos na concentração de 1:500 em PBS Tw 20-0,05% pH=7,4, o soro padrão conhecido foi diluído em oito concentrações, iniciando-se com 1:500. Os oito soros negativos foram

obtidos de acordo com o ensaio padronizado . Após uma hora e meia de incubação, utilizou-se o conjugado anti-IgG bovino-fosfatase alcalina na diluição de 1:1000. Após mais uma hora de incubação empregou-se o substrato PNPP, diluído em Tampão Glicina à 1mg/ml. Antes de cada etapa, a placa foi lavada por 3 vezes com PBS Tw 20-0,05%. A leitura foi feita no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 405 nm.

### **3.12-Soroaglutinação Microscópica para Leptospirose**

Realizou-se teste de soroaglutinação microscópica para leptospirose em 14 amostras de soro do bovino inoculado e 14 amostras de soro do bovino testemunha para avaliar a eficiência da vacina utilizada.

Este teste foi realizado pelo Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos. O método utilizado pelo Laboratório foi baseado na “Microtécnica”, descrita por Galton *et al.* (1965) e Cole *et al.* (1973). Utilizou-se para avaliação de Leptospirose 24 variantes sorológica (*Australlis australis*, *Australis bratis lava*, *Autumnalis autumnalis*,

*Autumnalis butembo, Ballum castellonis, Batavia batavie, Canicola canicola, Celledoni whicombi, Cynapteri cynapteri, Grippatyphosa grippatyphosa, Hebdomadis hebdomadis, Icterohaemorrhagiae copenhageni, Icterohaemorrhagiae icterohaemorrhagiae IV, Javanica javanica, Panama panama, Pomona pomona, Pyrogenes pyrogenes, Sejroe hardjo, Sejroe wolffi, Shemani shemani, Tarassovi tarassovi, Andamana andamana, Seramanga patoc, Djasiman sentat).*

Os soros classificados como reatores na diluição de triagem de 1:100, frente a coleção completa de antígenos, foram titulados com estas variantes em uma série geométrica de diluições de razão dois.

### **3.13-Soroaglutinação para Brucelose**

Realizou-se teste de soroaglutinação para brucelose em 14 amostras de soro do bovino inoculado e 14 amostras de soro do bovino testemunha para avaliar a eficiência da vacina utilizada.

Este teste foi realizado pelo Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do

Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos. O método utilizado pelo Laboratório obedeceu a Técnica Internacional recomendada pelo Ministério da Agricultura. O antígeno consistiu em suspensão celular inativada de *Brucella abortus*, amostra 1119-B.

Utilizou-se as provas de:

Soro Aglutinação Rápida – com antígeno na concentração de 10 a 12% com corante de azul de metileno e violeta de genciana.

Soro Aglutinação Lenta – com antígeno na concentração final de 0,45% sem corante.

Soro Aglutinação com antígeno acidificado – com antígeno contendo 8% do corante Rosa de Bengala.

### **3.14-Identificação e cultura dos carrapatos**

Os carrapatos obtidos dos animais foram encaminhados ao Laboratório e identificados segundo chave específica. Após a identificação, uma amostra de teleóginas foram mantidas em placas de petri em estufa Bioclimatizada (70% de umidade e 28°C) até aproximadamente o quinto dia de postura, quando foram preparadas lâminas dos ovos, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa. Uma parte dos ovos foi macerada e cultivada em meio BSK, mantida

em estufa a 33°C e examinada semanalmente através de microscopia de contraste de fase. Uma amostra dos ectoparasitos foi processada para cultura em meio BSK. Foram lavados em água oxigenada 3% durante 3 minutos, em seguida com álcool 70% por mais 3 minutos e o resíduo de soluções de lavagem retirados com o uso de uma pequena quantidade do próprio meio BSK. Finalmente, os ectoparasitos foram macerados e cultivados em meio BSK, mantidos em estufa a 33°C e examinados semanalmente através de microscopia de contraste de fase.

## **4-RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1- Estudo do perfil da produção de anticorpos IgG nos bovinos utilizados em padronização do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti *B. burgdorferi* em bovinos**

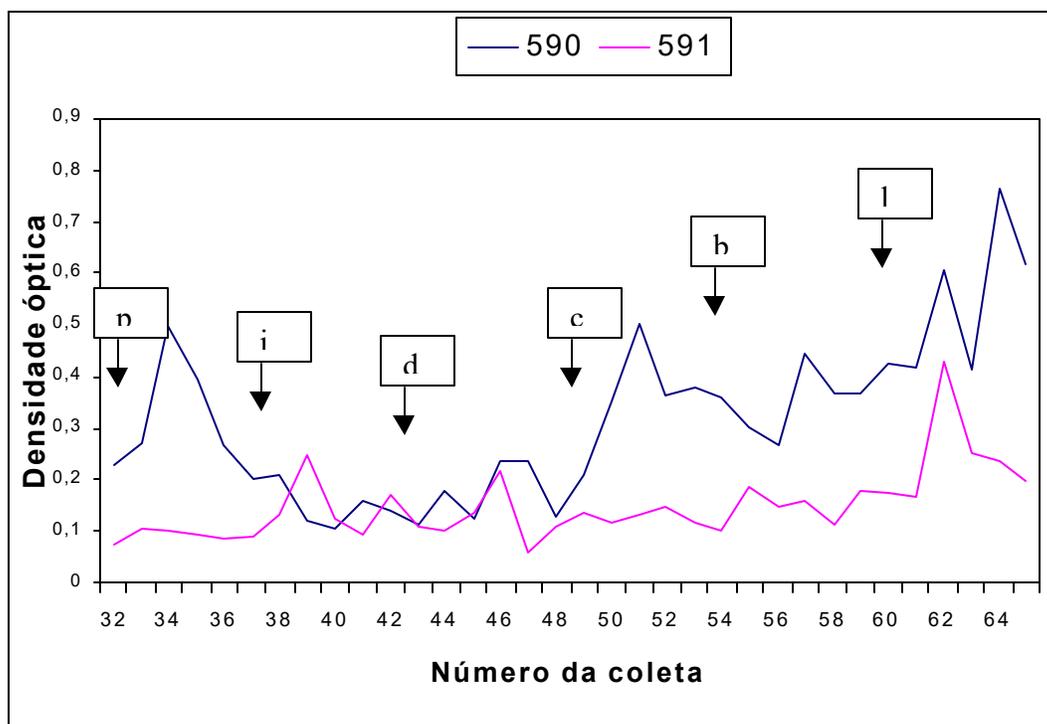
Observou-se alteração na produção de anticorpos após a vacina contra leptospirose, especialmente no bovino inoculado com *B. burgdorferi* (590). No animal testemunha (591), houve aumento na produção de anticorpos que foi mais discreto e menos persistente (Gráfico 01). Os testes de soroaglutinação microscópica para leptospirose mostraram que os animais produziram anticorpos apenas para uma variante sorológica de *Leptospira interrogans*, (Tabelas 01 e 02) no entanto, o aumento na produção de

anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* nos animais, demonstrou que esta vacina interferiu na produção de anticorpos anti *B. burgdorferi* (Gráfico 01).

De acordo com Wells *et al.* (1993) e Ishikawa (1996) não existe associação entre a soropositividade para *B. burgdorferi* e soropositividade para *Leptospira sp*, porém, neste trabalho, observou-se que a soropositividade para *B. burgdorferi* sofreu influências da vacina para leptospirose. Os animais apresentaram aumento no título de anticorpos anti *B. burgdorferi* sem manifestação de sintoma clínico, e no caso do animal inoculado, resultou-se em um animal soropositivo assintomático.

As coletas de soro sanguíneo dos animais inoculado e testemunha com as respectivas datas utilizadas nos gráficos 01, 02 e 03 foram as seguintes: coleta de número 6= 22/09/95; coleta 11= 07/10/95; coleta 14= 16/10/95; coleta 23= 12/11/95; coleta 25= 18/11/95; coleta 30= 03/12/95; coleta 32= 03/01/96; coleta 33= 24/01/96; coleta 34= 24/01/96; coleta 35= 11/03/96; coleta 36= 25/03/96; coleta 38= 24/04/96; coleta 40= 24/05/96; coleta 42= 24/06/96; coleta 44= 17/07/96; coleta 46= 13/08/96; coleta 48= 13/09/96; coleta 50= 04/10/96; coleta 52= 16/10/96; coleta 54= 05/11/96; coleta 56= 11/11/96; coleta 58= 20/11/96; coleta 60= 01/04/97; coleta 62= 07/04/97; coleta 64= 16/04/97.

Gráfico 01- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* nos bovinos inoculado (590) e testemunha (591) durante infestação natural por carrapatos e após vacinas de carbúculo sintomático, brucelose e leptospirose.



p = infestação natural por carrapatos, saída em piquete

i = intensa infestação natural por carrapatos

d = animais doentes

c = vacina para carbúculo sintomático

b = vacina para brucelose

l = vacina para leptospirose

média do *cut off* = 0,500

Tabela 01- Resultados dos testes de soroaglutinação microscópica para leptospirose e soroaglutinação para brucelose das 14 amostras do bovino inoculado (590).

Número da Coleta	Resultado Leptospiriose		Resultado Brucelose		
	SAM		SAR	AA	SAL
38	Negativo		N	N	NR
43	Negativo		N	N	NR
48	Negativo		N	N	NR
49	Negativo		N	N	NR
54	Negativo		N	N	NR
55	Negativo		+	N	NR
56	Negativo		++++	P	++++
58	Negativo		++++	P	++++
60	Negativo		+	N	NR
61	Negativo		+	N	NR
63	Negativo		+	N	NR
65	H = 100		+	N	NR
67	Negativo		N	N	NR
68	Negativo		N	N	NR

SAM = Soroaglutinação Microscópica SAR = Soroaglutinação Rápida

AA = Antígeno Acidificado SAL = Soroaglutinação Lenta

P = Positivo N = Negativo NR = Não Realizado

H = Sorogrupo *Serjoe* Variante Sorológica *hardjo*

Tabela 02- Resultados dos testes de soroaglutinação microscópica para leptospirose e soroaglutinação para brucelose das 14 amostras do bovino testemunha (591).

Número da Coleta			Resultado Leptospirrose	Resultado Brucelose		
			SAM	SAR	AA	SAL
	38		Negativo	N	N	NR
	43		Negativo	N	N	NR
	48		Negativo	N	N	NR
	49		Negativo	+	N	NR
	54		Negativo	N	N	NR
	55		Negativo		N	NR
	56		Negativo	+++	P	+++
	58		Negativo	+++	P	+++
	60		Negativo		N	NR
	61		Negativo		N	NR
	63		Negativo		N	NR
	65		H = 100		N	NR
	67		Negativo	N	N	NR
	68		Negativo	N	N	NR

SAM = Soroaglutinação Microscópica SAR = Soroaglutinação Rápida

AA = Antígeno Acidificado SAL = Soroaglutinação Lenta

P = Positivo N = Negativo NR = Não Realizado

H = Sorogrupo *Serjoe* Variante Sorológica *hardjo*

Os dados obtidos na sorologia para *B. burgdorferi* frente aos desafios vacinais demonstraram a necessidade dos cuidados na interpretação dos resultados dos ensaios, pois a resposta imunológica dos animais para a *B. burgdorferi* pode estar relacionada com estímulo anterior ao qual o animal possa ter sido submetido, como no caso do animal que foi previamente imunizado com cepa inativada de *B. burgdorferi* (590). Este animal teve uma resposta mais evidente aos estímulos utilizados do que o animal testemunha (591). Nota-se que seria necessário a utilização de um número maior de animais pois, esta diferença pode se tratar de uma variação individual na resposta imunológica entre os animais inoculado e testemunha.

Os testes de soroaglutinação para brucelose confirmaram a efetividade da vacina, ou seja, os animais produziram anticorpos contra o antígeno utilizado (Tabelas 01 e 02). Não houve interferência significativa na produção de anticorpos anti *B. burgdorferi* após a vacina para brucelose. Os sinais clínicos da brucelose podem ser confundidos com os da Borreliose de Lyme, no entanto os ensaios sorológicos demonstraram ser eficientes no diagnóstico diferencial.

Após a vacina para carbúnculo sintomático houve um pequeno aumento na produção de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* no animal inoculado, mas

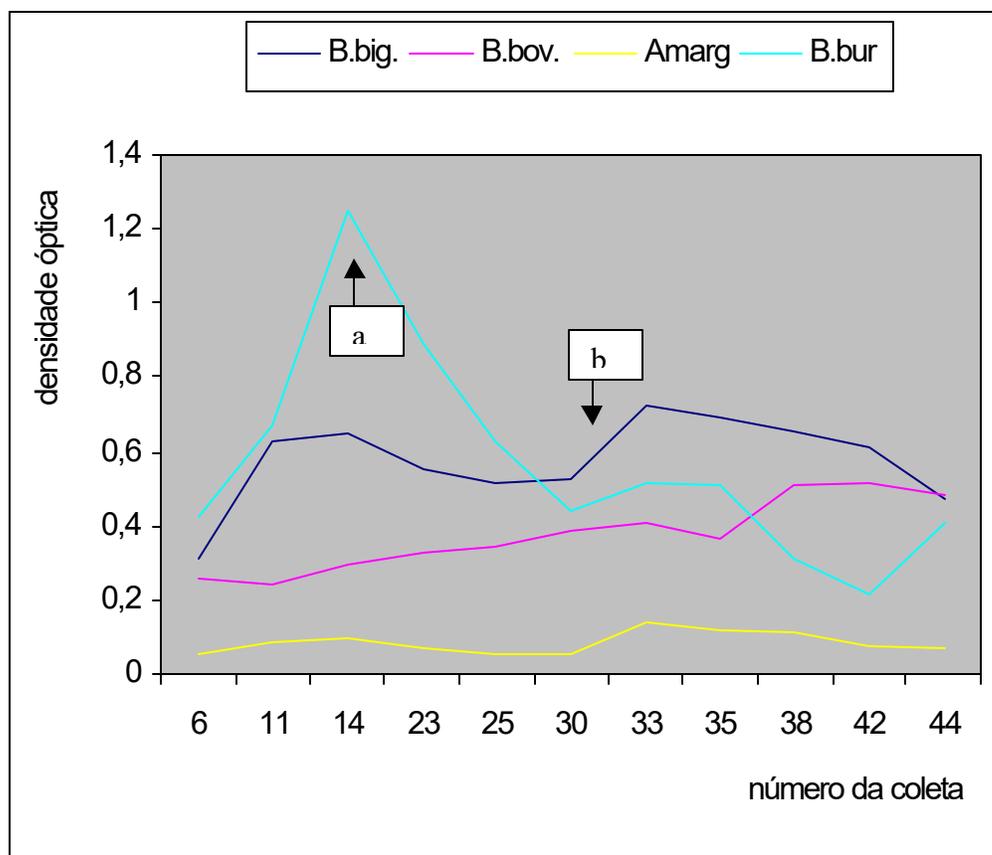
que não foi significativa, visto que não houve positividade e a produção de anticorpos já estava aumentando antes do uso da vacina.

Após uma infestação natural por carrapatos que os bovinos tiveram logo após terem saído para piquete e iniciado a convivência com outros animais adultos mantidos a campo, pode-se notar um pequeno aumento na produção de anticorpos (Gráfico 01) que foi mais evidente no animal previamente imunizado com *B. burgdorferi* (inoculado). Esta alteração não chegou a produzir positividade, mas causou uma alteração no perfil de produção de anticorpos que deve ser considerado.

No período em que os animais adoeceram apresentando sinais clínicos de Tristeza Parasitária Bovina, confirmado com esfregaços sanguíneo corado pelo Giemsa, não apresentaram alteração na produção de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* (Gráfico 01).

Na sorologia para babesiose e anaplasmosose pode-se notar que o aumento na produção de anticorpos anti *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* não acarretaram em aumento simultâneo de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* (Gráficos 02 e 03). Na coleta de número 14, 14 dias depois que o animal inoculado recebeu o terceiro inóculo de *B. burgdorferi* inativada pelo calor, observou-se como demonstrado por Ishikawa (1996) e

Gráfico 02- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *B. burgdorferi* no bovino inoculado (590).



a = 14 dias após o terceiro inóculo (*B. burgdorferi* inativada)

b = animais doentes

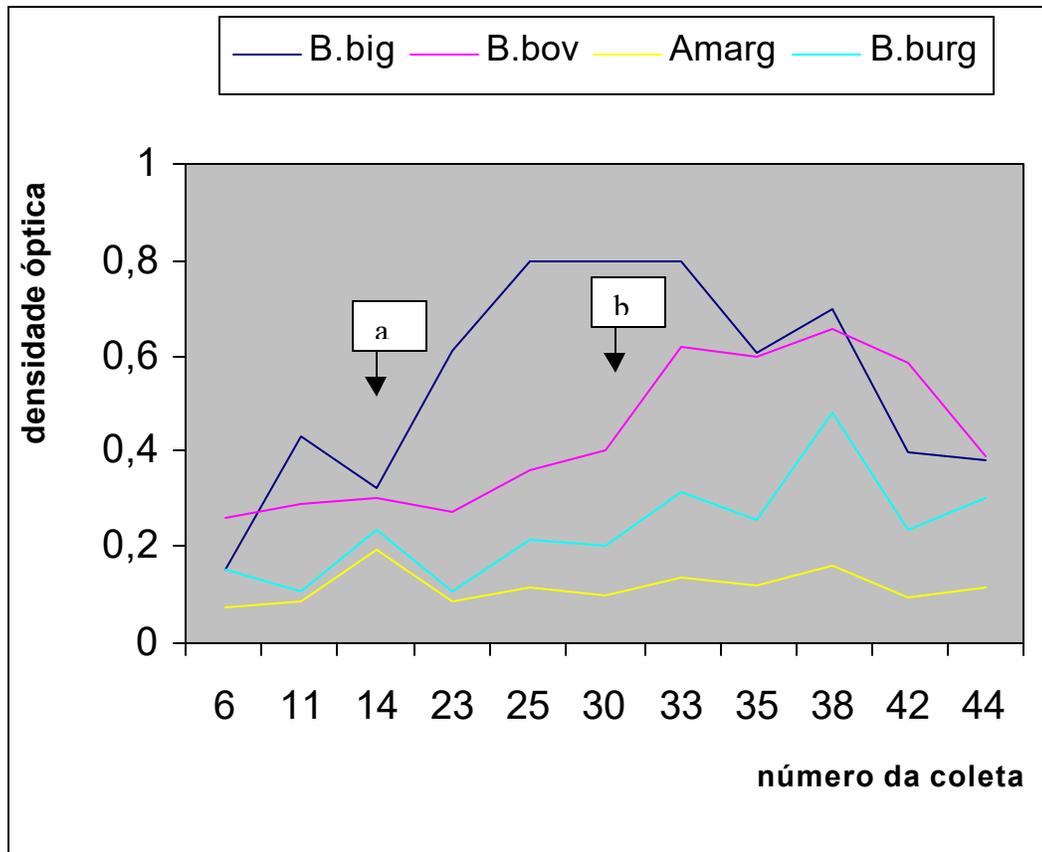
*cut off B. burgdorferi* = 0,500

*cut off B. bigemina* = 0,362

*cut off B. bovis* = 0,492

*cut off A. marginale* = 0,064

Gráfico 03- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *B. burgdorferi* no bovino testemunha (591).



a = 14 dias após o terceiro inoculo (PBS)

b = animais doentes

*cut off B. burgdorferi* = 0,500

*cut off B. bigemina* = 0,362

*cut off B. bovis* = 0,492

*cut off A. marginale* = 0,064

no Gráfico 02 que houve um aumento na produção de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* que não acompanhou um aumento significativo na produção de anticorpos IgG anti *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. Estas observações sugerem que infecções naturais por *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* não acarretaram em reações cruzadas com a *B. burgdorferi*.

Observou-se alteração no perfil de anticorpos após a terceira e quarta dose da imunização com proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus* que coincidiu com o período da castração, não sendo observado após uma quinta dose de reforço (Gráfico 04). A castração ocorreu de acordo com a rotina do biotério da EMBRAPA - Sanidade Animal com consequente complicações pós-cirúrgicas que podem ter prejudicado os resultados dessa etapa do experimento. De acordo com estes dados pode-se concluir que associação de estímulos pode causar uma interferência significativa na produção de anticorpos anti *B. burgdorferi*, podendo prejudicar a interpretação dos resultados do ensaio sorológico.

O aumento na produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* observado após a terceira e quarta dose da vacina sugere uma consequência na associação de estímulos como antígeno vacinal, castração e debilidade decorrente de complicações pós-cirúrgica. Após a recuperação total dos animais realizou-se uma quinta dose de reforço para confirmar os resultados e

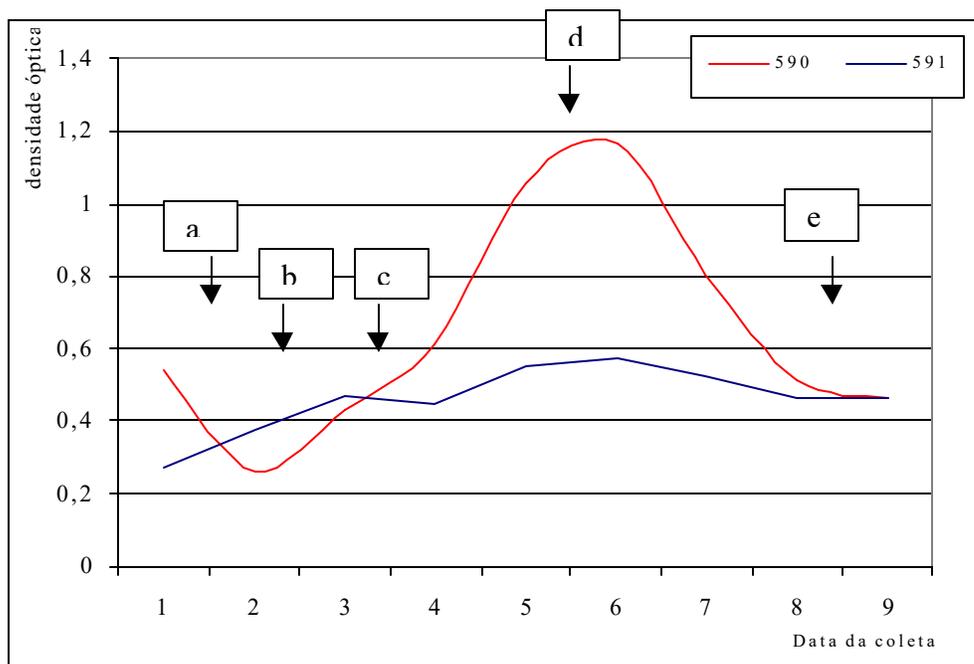
neste caso não houve alteração significativa na produção de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* e pode-se observar a necessidade de se estudar os desafios utilizados neste trabalho associados entre si (Gráfico 04). Estes dados sugerem também que os animais podem ter apresentado uma alteração na produção de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* após estímulo seguidos dessa proteína que os animais receberam em intervalos de poucas semanas. Como foi observado, o aumento ocorreu após a terceira dose e esta alteração não foi observada após a primeira, segunda e quinta dose. Portanto, os resultados soropositivos para Borreliose de Lyme em bovinos que estejam recebendo imunização de proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus*, devem ser analisados com certos critérios, principalmente se os animais estiverem em fase inicial do esquema de imunização dessa proteína, período em que os animais recebem 3 doses em intervalos de 4 semanas e 3 semanas, ou seja, estímulos seguidos dessa proteína.

Os resultados do teste ELISA indireto padronizados devem ser interpretados em associação ao histórico clínico e vacinal de cada animal, pois estes estão sujeitos a alterações segundo os desafios aos quais os animais são submetidos no seu manejo.

Através do Kit anti-rBm86 que utiliza sondas de ouro coloidal marcada com proteína A, pode-se comprovar a efetividade da imunização pela proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus* nestes animais (Tabela 03).

Todos os exemplares de carrapatos adquiridos foram da espécie *B. microplus*. Não se obteve sucesso nas tentativas de isolamento de *Borrelia* nos esfregaços corados pelo Giemsa e no cultivo em meio BSK. Estes métodos, embora simples, não demonstraram praticidade para o estudo realizado neste trabalho, servindo apenas como complemento para o estudo sorológico. Nota-se a necessidade de se avaliar e aperfeiçoar outros métodos simples para a detecção de *Borrelias* em bovinos com o objetivo de facilitar os futuros estudos epidemiológicos.

Gráfico 04- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* nos bovinos inoculado (590) e testemunha (591) após vacina com proteína rBm86 de carrapato *B. microplus*.



a = 1ª dose (06/06/97) b = 2ª dose (04/07/97)

c = 3ª dose e castração (25/07/97)

d = 4ª dose (04/12/97) e = 5ª dose (25/02/99)

Tabela 03- Resultados dos testes do Kit anti rBm86 nos bovinos inoculado (590) e testemunha (591).

<b>Animal / número da dose</b>	<b>Resultados</b>
590 1ª dose	-----
590 2ª dose	-----
590 3ª dose	+++--
590 4ª dose	++---
590 5ª dose	+++++
590 6ª coleta	+++++
591 1ª dose	-----
591 2ª dose	+++--
591 3ª dose	+++++
591 4ª dose	+++++
591 5ª dose	+++++
591 6ª coleta	+++++

+ = Reação fraca ++ = Reação média +++ = Reação boa

++++ = Reação forte +++++ = Reação excelente

#### **4.2- Estudo da relação proteína rBm86 x *Borrelia burgdorferi* em condições experimentais**

Pelos resultados obtidos pode-se observar que não houve interferência entre a produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* e imunização com a proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus* (Gráfico 05). Ou seja, não houve aumento significativo na produção de anticorpos após cada desafio realizado com esta imunização. No caso do touro, animal adulto, clinicamente saudável, com mais de 10 anos de idade, e que apresentou altos títulos de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi* durante todo o experimento, observou-se uma diminuição na produção de anticorpos durante a imunização com a proteína utilizada. Através do Kit anti-rBm86 que utiliza sondas de ouro coloidal marcada com proteína A, pode-se comprovar a efetividade da imunização pela proteína Bm86 recombinante de carrapato *B. microplus* nestes animais (Tabela 04).

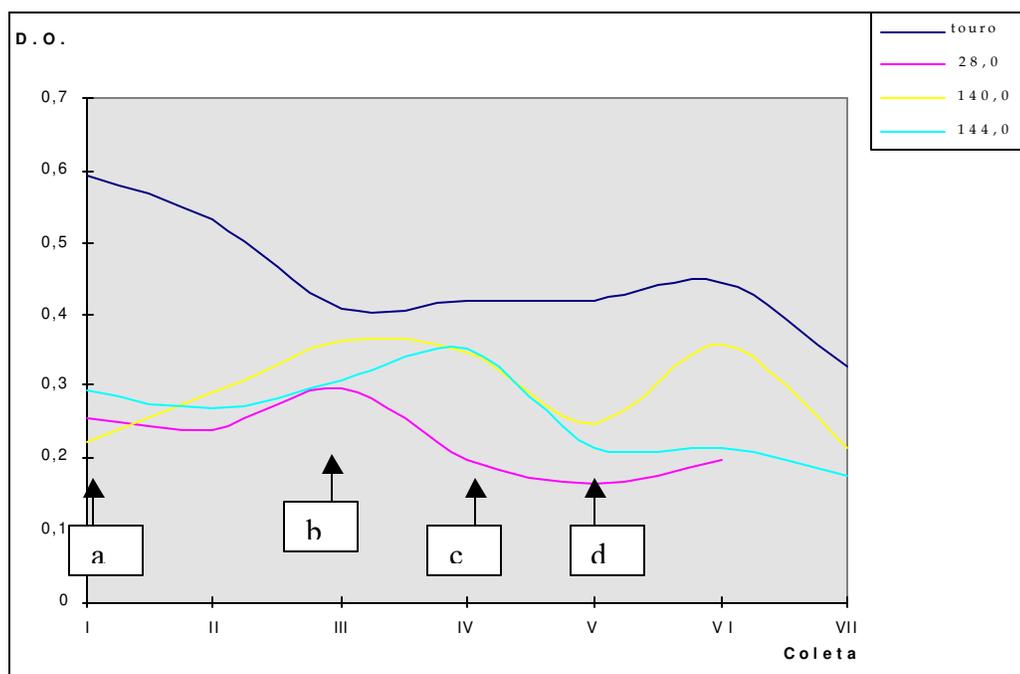
Como observado nos bovinos inoculado e testemunha, não se obteve sucesso nas tentativas de isolamento de *Borrelia* nos esfregaços corados pelo Giemsa.

As características clínicas da Borreliose se confundem com as de outras doenças, o isolamento da *Borrelia* através do meio de cultura assim como sua

coloração são procedimentos de pouco sucesso. Dessa maneira, pode-se comprovar que como citado por Steere *et al.*, 1984 e Schresta *et al.* (1985) os ensaios sorológicos complementares tornam-se importantes na abordagem do paciente suspeito.

Matton & Van Melckebeke (1990) detectaram espiroquetas através de método de exame direto de interface pelet-plasma de microhematócrito que não foram detectadas através de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, reforçando dessa forma, a dificuldade no isolamento de *Borrelia* através de esfregaços sanguíneos.

Gráfico 05- Perfil da produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* nos bovinos touro, 28, 140 e 144 mantidos a campo.



a = 1ª dose (06/12/96) b = 2ª dose (03/01/97)

c = 3ª dose (24/01/97) d = 4ª dose (06/06/97)

Tabela 04- Resultados dos testes do Kit anti rBm86 nos bovinos 122, 140 e 165 mantidos no biotério

<b>Animal / número da dose</b>	<b>Resultados</b>
122 1ª dose	- - - - -
122 2ª dose	+ + + + -
122 3ª dose	+ + + + -
122 4ª dose	+ + + +
140 1ª dose	+ + - - -
140 2ª dose	+ + + - -
140 3ª dose	+ + + + +
140 4ª dose	+ + + + -
140 5ª coleta	+ + + + -
165 1ª dose	- - - - -
165 2ª dose	+ - - - -
165 3ª dose	+ + + - -
165 4ª dose	+ + + - -
165 5ª coleta	+ + + + +

+ = Reação fraca    ++ = Reação média    +++ = Reação boa

++++ = Reação forte    +++++ = Reação excelente

### 4.3- Estudo sorológico em bovinos em condições naturais

Nos dezesseis bovinos mantidos na fazenda Pilar, Maricá, Rio de Janeiro, sendo quatorze animais importados do Texas, EUA e submetidos a trabalho de premunização para Tristeza Parasitária Bovina obteve-se 11 (68,8%) bovinos negativos em sorologia para *B. bigemina*, 3 (18,8%) com título de 1/500, 1 (6,2%) com título 1/1000 e 1 (6,2%) com título 1/2000 (Tabela 05). Na sorologia para *B. bovis*, 12 (75%) foram negativos, 3 (18,75%) com título 1/500 e 1 (6,25%) com título 1/1000 (Tabela 06). Na sorologia para *A. marginale*, 9 (56,25%) foram negativos e 7 (43,75%) com título 1/500 (Tabela 07). Os animais dessa propriedade apresentavam-se clinicamente saudáveis e foram provenientes de local livre de carrapatos. Como constatado pela sorologia, trata-se de animais com baixos títulos de anticorpos anti *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. A sorologia para *B. burgdorferi* também apresentou animais com baixos títulos de anticorpos, obteve-se 11 (68,8%) bovinos negativos, 1 (6,25%) com títulos de 1/400 e 4 (25%) com títulos de 1/800 (Tabela 08), ou seja, uma grande percentagem de animais negativos e poucos animais com sorologia positiva. Animais provenientes de propriedades com pouca infestação de carrapatos são por consequência animais com baixos títulos de anticorpos anti hemoparasitas transmitidos por carrapatos, os animais podem apresentar-se

simultaneamente infectados por parasitas que possuem o mesmo vetor e na ausência deste vetor podem apresentar-se simultaneamente livre desses parasitas. Nesta propriedade, foram obtidos animais com baixos títulos de anticorpos anti *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. Estes dados sugerem que pode existir uma relação entre infestação por carrapatos *B. microplus* associado a manejo qualificado com produção de anticorpos anti *B. burgdorferi*.

Nos quinze animais provenientes da fazenda Alto da Serra em Queimados, Rio de Janeiro, onde foram diagnosticados casos de animais acometidos por Anaplasmosose obteve-se 2 (13,3%) bovinos negativos para *B. bigemina*, 4 (26,7%) com títulos 1/500, 6 (40%) com títulos 1/1000, 2 (13,3%) com títulos 1/2000 e 1 (6,7%) com títulos 1/4000 (Tabela 05). Na sorologia para *B. bovis*, 4 (26,7%) foram negativos, 2 (13,3%) com títulos 1/500, 6 (40%) com títulos 1/1000, 1 (6,7%) com título 1/2000 e 2 (13,3%) com títulos 1/4000 (Tabela 06). Na sorologia para *A. marginale*, nenhum bovino (0%) foi negativo, 4 (26,7%) tiveram títulos 1/500 e 11 (73,3%) títulos 1/1000 (Tabela 07). Nesta propriedade, observou-se alta percentagem de animais soropositivos para *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, confirmando o diagnóstico clínico de Anaplasmosose. Observou-se também alta percentagem de animais soropositivos para *B. burgdorferi*, sendo 3 (20%) bovinos negativos, 4 (26,7%) com títulos

1/800, 2 (13,3%) com títulos 1/1600 e 6 (40%) com títulos 1/3200 (Tabela 08). Estes dados sugerem uma infecção simultânea desses parasitas analisados, sendo importante considerar a alta percentagem de animais (40%) soropositivos com títulos 1/3200 para *B. burgdorferi* e também a alta percentagem de soropositivos (100%) para *A. marginale*. Reações cruzadas são freqüentes nos ensaios sorológicos, dependendo da padronização da técnica e do preparo do antígeno, segundo Meredith *et al.* (1995), estas reações podem ser evitadas realizando-se diluições seriadas altas. Nesta propriedade observou-se a ocorrência de animais com altos títulos de anticorpos para os parasitas estudados, especialmente para *B. burgdorferi*, sugerindo a presença deste agente nesta localidade analisada. A associação de estímulos parasitários, vacinais e de manejo, como observado anteriormente nos bovinos inoculado e testemunha, podem estar sendo responsáveis pelo aparecimento de altos títulos de anticorpos e neste caso, a associação desses hemoparasitas podem estar favorecendo a produção desses altos títulos de anticorpos.

Nos vinte e oito bovinos provenientes do município de Alegre, Espírito Santo obteve-se 6 (21,5%) bovinos negativos para *B. bigemina*, 12 (42,8%) com títulos 1/500, 5 (17,8%) com títulos 1/1000, 3 (10,7%) com títulos 1/2000, 1 (3,6%) com títulos 1/4000 e 1 (3,6%) com títulos 1/8000 (Tabela 05). Na sorologia para *B. bovis*, 14 (50%) foram negativos, 10 (35,7%) com títulos 1/500,

3 (10,7%) com títulos 1/1000 e 1 (3,6%) com títulos 1/2000 (Tabela 06). Na sorologia para *A. marginale*, 3 (10,7%) foram negativos, 11 (39,3%) com títulos 1.500, 11 (39,3%) com títulos 1/1000, 2 (7,1%) com títulos 1/2000 e 1 (3,6%) com títulos 1/4000 (Tabela 07). Neste caso observou-se também uma alta percentagem de animais soropositivos para os parasitas estudados. Na sorologia para *B. burgdorferi* 18 (64,3%) bovinos foram negativos, 6 (21,4%) com títulos 1/400, 3 (10,71%) com títulos 1/800 e 1 (3,6%) com título 1/1600 (Tabela 08). Neste estudo observou-se uma alta percentagem de animais soronegativos para *B. burgdorferi*, contrariando os dados obtidos em trabalho de Ishikawa (1996). Esta diferença pode ser explicada por se tratar de amostragens diferentes, e também pelo fato do ensaio ELISA ter sido aperfeiçoado para este novo estudo.

Tabela 05- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para *B. bigemina* dos bovinos provenientes de Maricá, Queimados e Alegre.

<b>Município (n)</b>	<b>Negativos</b>	<b>1/500</b>	<b>1/1000</b>	<b>1/2000</b>	<b>1/4000</b>	<b>1/8000</b>	<b>1/16000</b>
<b>Marica (16)</b>	11 (68,8%)	3 (18,8%)	1 (6,2%)	1 (6,2%)			
<b>Queimados (15)</b>	2 (13,3%)	4 (26,7%)	6 (40%)	2 (13,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,7%)
<b>Alegre (28)</b>	6 (21,5%)	12 (42,8%)	5 (17,8%)	3 (10,7%)	1 (3,6%)	1 (3,6%)	

Tabela 06- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para *B. bovis* dos bovinos provenientes de Maricá, Queimados e Alegre.

<b>Município (n)</b>	<b>Negativos</b>	<b>1/500</b>	<b>1/1000</b>	<b>1/2000</b>	<b>1/4000</b>
<b>Marica (16)</b>	12 (75%)	3 (18,75%)	1 (6,25%)		
<b>Queimados (15)</b>	4(26,7%)	2 (13,3%)	6 (40%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)
<b>Alegre (28)</b>	14 (50%)	10 (35,7%)	3 (10,7%)	1 (3,5%)	

Tabela 07- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para *A. marginale* dos bovinos provenientes de Maricá, Queimados e Alegre.

<b>Município (n)</b>	<b>Negativos</b>	<b>1/500</b>	<b>1/1000</b>	<b>1/2000</b>	<b>1/8000</b>
<b>Marica (16)</b>	9 (56,25%)	7 (43,75%)			
<b>Queimados (15)</b>	0 (0%)	4 (26,7%)	11 (73,3%)		
<b>Alegre (28)</b>	3 (10,7%)	11 (39,3%)	11 (39,3%)	2 (7,1%)	1 (3,6%)

Tabela 08- Resultados obtidos no teste ELISA indireto para *B. burgdorferi* dos bovinos provenientes de Maricá, Queimados e Alegre.

<b>Município (n)</b>	<b>Negativos</b>	<b>1/400</b>	<b>1/800</b>	<b>1/1600</b>	<b>1/3200</b>
<b>Marica (16)</b>	11 (68,75%)	1 (6,25%)	4 (25%)		
<b>Queimados (15)</b>	3 (20%)	0 (0%)	4 (26,7%)	2 (13,3%)	6 (40%)
<b>Alegre (28)</b>	18 (64,3%)	6 (21,4%)	3 (10,7%)	1 (3,6%)	

#### **4.4-Estudo sorológico em bovinos na mesorregião Norte Fluminense e na mesorregião Médio Paraíba**

Na mesorregião Norte Fluminense, onde predomina a pecuária de corte com rebanhos formados por raças indianas e seus cruzamentos, foram analisadas 436 amostras de soro sanguíneo, sendo observado 132 (30,3%) amostras negativas para *B. burgdorferi*, 58 (13,3%) com títulos 1/400, 120 (27,5%) com títulos 1/800, 68 (15,6%) com títulos 1/1600, 36 (8,3%) com títulos 1/3200, 15 (3,4%) com títulos 1/6400, 4 (0,9%) com títulos 1/12800, 2 (0,5%) com títulos 25600 e 1 (0,2%) com título 1/102400 (Tabela 09). Observou-se animais com altos títulos de anticorpos ( até 1/102400) e uma alta percentagem de animais soropositivos (69,7%) para *B. burgdorferi*, sugerindo a presença deste agente nesta mesorregião.

Na mesorregião Médio Paraíba, onde predomina a pecuária de leite com rebanhos formados por raças européias e seus cruzamentos, foram analisadas 122 amostras de soro sanguíneo, sendo observado 30 (24,6%) amostras negativas para *B. burgdorferi*, 16 (13,1%) com títulos 1/400, 35 (28,7%) com títulos 1/800, 25 (20,5%) com títulos 1/1600, 10 (8,2%) com títulos 1/3200, 3 (2,5%) com títulos 1/6400, 2 (1,6%) com títulos 1/12800 e 1 (0,8%) com título 1/51200 (Tabela 09). Observou-se animais com altos títulos de anticorpos (até

1/51200) e uma percentagem de soropositivos maior do que o encontrado na mesorregião Norte Fluminense (75,4%). As duas localidades estudadas apresentaram uma pequena diferença nos resultados, sendo que na mesorregião Médio Paraíba houve uma percentagem maior de soropositivos (5,7% maior) do que na mesorregião Norte Fluminense. A mesorregião Médio Paraíba possui rebanhos formados por raças européias e seus cruzamentos, sendo mais predispostos a infestação por carrapatos e conseqüentemente ao parasitismo e produção de anticorpos para os parasitas veiculados por estes vetores.

Tabela 09- - Resultados obtidos no teste ELISA indireto para *B. burgdorferi* dos bovinos provenientes da mesorregião Norte Fluminense e mesorregião Médio Paraíba.

<b>Mesorregião</b> <b>Títulos</b>	<b>Norte Fluminense</b>	<b>Médio Paraíba</b>
<b>Negativos</b>	132 (30,3%)	30 (24,6%)
<b>1/400</b>	58 (13,3%)	16 (13,1%)
<b>1/800</b>	120 (27,5%)	35 (28,7%)
<b>1/1600</b>	68 (15,6%)	25 (20,5%)
<b>1/3200</b>	36 (8,3%)	10 (8,2%)
<b>1/6400</b>	15 (3,4%)	3 (2,5%)
<b>1/12800</b>	4 (0,9%)	2 (1,6%)
<b>1/25600</b>	2 (0,5%)	0 (0%)
<b>1/51200</b>	0 (0%)	1 (0,8%)
<b>1/102400</b>	1 (0,2%)	0 (0%)

#### 4.5-Estudo de dados climatológicos

As variações climatológicas das regiões onde as estações do ano são bem definidas e onde a temperatura e umidade oscilam significativamente, poderiam influenciar diretamente nos animais causando estresse e baixa de imunidade ou indiretamente através da mudança na alimentação desses animais e condições apropriadas ou não ao desenvolvimento do carrapato vetor.

As variações climatológicas , médias mensais de temperatura e umidade relativa observadas, não oscilaram significativamente durante os meses utilizados neste experimento (Tabelas 10, 11 e 12). Os dados obtidos sugerem que essas pequenas variações climatológicas não influenciaram diretamente na produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* nos bovinos. Observou-se que os valores da densidade óptica obtida no ELISA indireto, aumentaram e diminuíram sem que houvesse alguma relação com as variações de temperatura e umidade, sendo mais provável, que os outros estímulos utilizados tenham causado essas modificações. Isogai *et al.* (1992) e Takahashi *et al.* (1993) observaram uma variação sazonal na frequência de soropositivos, mas relacionado com o ciclo de vida do carrapato vetor e não com a influência direta no animal.

As variações climatológicas poderiam atuar como predisposição a instalação de outras enfermidades como infecções por vírus, bactérias ou fungos e dessa forma favorecer a infecção simultânea com a Borreliose de Lyme ou mesmo, favorecer ou inibir a produção de anticorpos IgG anti *B. burgdorferi*.

Pelo que foi obtido nos ensaios sorológicos e nas observações dos dados climatológicos, os bovinos devem apresentar uma resposta imunológica conseqüente da associação de estímulos vacinais, parasitários e de manejo que devem ser levados em consideração na interpretação dos resultados sorológicos.

Tabela 10- Médias mensais de temperatura e umidade relativa do ano de 1996 com a densidade óptica do teste ELISA (D.O.) dos animais inoculado (590) e testemunha (591).

Mês	Média Temperatura °C	Umidade Relativa (%)	D.O.	
			590	591
Janeiro	27,6	67,7	0.522	0.315
Fevereiro	27,3	67,3	0.282	0.345
Março	26,5	74,6	0.320	0.218
Abril	22,8	51,7	0.310	0.482
Maiο	23,2	74,0	0.209	0.205
Junho	23,3	73,0	0.218	0.235
Julho	23,7	74,7	0.266	0.289
Agosto	23,4	72,0	0.295	0.105
Setembro	22,0	78,0	0.332	0.192
Outubro	24,4	75,0	0.498	0.418
Novembro	24,9	76,3	0.435	0.289
Dezembro	26,8	76,7		

Estação Experimental de Itaguaí / PESAGRO-Rio

Calculado por Ozeas Cabral Perrut

Tabela 11- Médias mensais de temperatura e umidade relativa do ano de 1997 com a densidade óptica do teste ELISA (D.O.) dos animais inoculado (590) e testemunha (591).

Mês	Média Temperatura °C	Umidade Relativa (%)	D.O.	
			590	591
Janeiro	26,5	81,2		
Fevereiro	28,3	67,7		
Março	25,4	78,3		
Abril	24,0	75,3	0.433	0.356
Maiο	22,2	67,7	0.358	0.374
Junho	21,2	67,7	0.544	0.272
Julho	22,1	65,3	0.429	0.475
Agosto	22,5	65,3	0.494	0.545
Setembro	23,1	70,3	0.615	0.449
Outubro	24,6	70,3		
Novembro	26,4	74,0	1.240	0.782
Dezembro	27,4	67,3	1.165	0.573

Estação Experimental de Itaguaí / PESAGRO-Rio

Calculado por Ozeas Cabral Perrut

Tabela 12- Médias mensais de temperatura e umidade relativa do ano de 1998 com a densidade óptica do teste ELISA (D.O.) dos animais inoculado (590) e testemunha (591).

Mês \ Média	Temperatura °C	Umidade Relativa (%)	D.O.	
			590	591
Janeiro	24,9	71,3		
Fevereiro	25,2	71,7		
Março	24,3	70,3	0.805	0.525
Abril	22,1	71,3	0.409	-----
Maiο	18,3	74,0		
Junho	15,7	73,3		
Julho	16,6	73,7	0.496	0.369
Agosto	21,0	66,0	0.484	0.536
Setembro	21,7	64,3		
Outubro	21,2	68,0		
Novembro	21,0	68,7		
Dezembro	24,2	65,7		

Estação Experimental de Itaguaí / PESAGRO-Rio

Calculado por Ozeas Cabral Perrut

#### 4.6-Considerações Gerais

A Borreliose de Lyme consiste em uma zoonose emergente e dessa forma, atinge o homem direta e indiretamente, causando doença e acarretando prejuízos na produção animal. O diagnóstico precoce de qualquer enfermidade é essencial no sucesso do tratamento, e para isto estudos clínicos e epidemiológicos são necessários.

O estudo imunológico consiste em uma importante ferramenta no inquérito epidemiológico. A Borreliose de Lyme exige atenção especial, pois devido a possibilidade da existência de espécies diferentes de *Borrelia* na mesma região e acometendo o mesmo hospedeiro, as reações cruzadas entre estas e a necessidade de padronização dos ensaios com utilização de antígenos adequados para cada região, torna este procedimento trabalhoso e oneroso para ser estabelecido.

Nos bovinos, a produção de anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi* mostrou ser influenciado por alguns estímulos que os animais são submetidos no seu manejo. As vacinas utilizadas nos animais podem causar erros na interpretação dos resultados sorológicos, especialmente quando associadas com outros estímulos como estresse e infecção parasitária. No entanto, quando esta influência ocorre, geralmente é discreta e pouco persistente.

A infestação natural por carrapatos *B. microplus*, pode alterar a produção de anticorpos IgG anti *B. burgorferi* não apenas pela sua injúria direta, mas por ser o vetor de muitos hemoparasitas de interesse, como a *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*.

A *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* não causaram reações cruzadas com a *B. burgdorferi*, no entanto, observou-se animais com infecções simultâneas e animais apresentando altos títulos de anticorpos para estes parasitas. Embora possa não haver reações cruzadas entre estes, uma infecção pode favorecer a outra, resultando em animais com altos títulos de anticorpos para mais de um parasita, ou também uma infecção pode estar suprimindo a outra, acarretando em infecção com pouca ou nenhuma resposta imunológica para o agente que foi suprimido. Pelo analisado, essa infecção simultânea deve estar ocorrendo, principalmente nos animais que são mais susceptíveis as infestações pelo carrapato *B. microplus*, vetor comum desses agentes.

Associações de estímulos devem ser estudados com mais detalhes para que se possa ter maior segurança na interpretação de um resultado sorológico em bovinos.

O diagnóstico sorológico constitui em importante auxílio ao clínico e ao estudo epidemiológico, mas este deve ser interpretado em conjunto com o histórico dos animais e da propriedade, e para conclusão do diagnóstico com

mais segurança é aconselhável que se faça mais de uma coleta em períodos diferentes para eliminar a possibilidade de estímulos diversos que possa estar atuando no momento da primeira coleta.

O diagnóstico da Borreliose de Lyme em bovinos deve ser realizado através de um acompanhamento clínico e imunológico da propriedade em questão.

## 5-CONCLUSÕES

- 1- Os ensaios sorológicos associados aos dados clínico e vacinal dos animais foram satisfatórios para o diagnóstico de animais soropositivos para *Borrelia burgdorferi*.
- 2- Os animais estudados desenvolveram pequenas oscilações na produção de anticorpos da classe IgG anti *Borrelia burgdorferi*.
- 3-Infecções naturais por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* não causaram modificações na soropositividade para *Borrelia burgdorferi* nos animais estudados.
- 4-Houve uma pequena diferença no estudo sorológico para *Borrelia burgdorferi* entre as mesorregiões Norte Fluminense e Médio Paraíba. Considerando a amostra estudada, houve uma maior soropositividade na mesorregião onde predomina a pecuária leiteira formada por rebanhos de raças européias e seus cruzamentos.

## 6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I. S. 1997. Estudo de *Borrelia* sp. em *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) naturalmente infectados. **Trabalho de Monografia**, -Bacharel em Ciências Biológicas. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio Janeiro. 40pp.
- AFZELIUS, A. Erythema Chronicum Migrans. **Acta Derm.Venereol.**, 2: 120, 1921.
- ANDERSON, J.F.; JOHNSON, R.C.; MAGNARELLI, L.A. & HYDE, F.W. Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme agent *Borrelia burgdorferi*. **Infection and Immunity**, 51: 394-396, 1986.
- ANDERSON, J.F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 539: 190, 1988.

- AZULAY,R.D.; ABULAFIA, L.; SODRE, C.S.; AZULAY,R.A.;  
AZULAY,M.M. Lyme disease in Rio de Janeiro. **Brazil. Int. J. Dermatol.**, 30: 569-571, 1991.
- BANNWARTH, A. Zur Klinik und Pathogene der "Chronischen Lymphocytaren Meningitis." **Arch. Psychiatr. Nervenkr.**, 117: 161, 1944.
- BARANTON, G., POSTIC, D. & SAINT GIROS, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp. nov.*, and VS461 associated with Lyme Borreliosis. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, 42:378-83, 1992.
- BARBOUR, A.G. Isolation and Cultivation of Lyme Disease Spirochetes. **Yale J. Biol. Med.**, 57: 521, 1984.
- BARBOUR, A. G., MAUPIN, G. O., TELTOW, G. J., CARTER, C. J. & PIESMAN, J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a lyme disease-like illness. **J. Infect. Dis.**, 173: 403-409, 1996.
- BARROS, P.J.L.; LEVY, L.H.; MONTEIRO, F.G.V.; YOSHINARI, N.H. Doença de Lyme: Acometimento cutâneo e tratamento das fases iniciais. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 39: 170, 1993.

BARROS, P.J.L. Contribuição ao conhecimento da doença de Lyme no Brasil.

**Tese Mestrado**. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 83 pp., 1995.

BENACH, J.L.; BOSLER, E.M.; HANRAHAN, J.P.; COLEMAN, J.H.;

HABICHT, G.S.; BAST, T.F.; CAMERON, D.J.; ZIEGLER, J.L.;

BARBOUR, A.G.; BURGDORFER, W.; EDELMAN, R.; KASLOW, R.A.

Spirochetes Isolated from the blood of two patients with Lyme Disease.

**New Engl. J. Med.**, 308: 740, 1983.

BERGEY, D.H.; HARRISON, F.C.; BREED, R.S.; HAMMER, B.W.; &

HUNTOON, F.M. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1 ed.

Baltimore: Williams & Wilkins, 1923.

BREED, R.S.; MAURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. *Bergey's Manual of*

*Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1957.

BOSLER, E.M.; SCHULZE, T.L. The Prevalence and Significance of *Borrelia*

*burgdorferi* in the Urine of Feral Reservoir Animals. **Zbl Bakt Mikrob**

**Hyg**, 263: 40-44, 1986.

BRAND, A. Comparative Seroepidemiological Studies of Lyme Disease Cattle

in the Southern Heaths and Weser Hills. Thesis, Tierärztlichen Hochschule

Hannover, **German Federal Republic**, VIII, 139 pp.; 266pp. fo ref., 1990.

- BURGDORFER, W.; BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Lyme Disease: A Tick-borne Spirochetosis? **Science**, 216: 1319, 1982.
- BURGESS, E.C.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; WRIGHT, W.O. Arthritis and Systemic Disease caused by *Borrelia burgdorferi* Infection in a Cow. **JAVMA**, 191: 1468-1470, 1987a.
- BURGESS, E.C.; MATTISON, M. Encephalitis Associated with *Borrelia burgdorferi* Infection in a Horse. **JAVMA**, 191: 1457-1458, 1987b.
- BURGESS, E.C. *Borrelia burgdorferi* Infection in Wisconsin Horses and Cows. **Ann. NY Acad. Sci.**, 539: 235-43, 1989.
- COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PURSEL, A.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, 25(6): 976-80, 1983.
- 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. **Scand. J. Infect. Dis.**, 25: 441-448, 1993

COSTA, I. P., YOSHINARI, N. H., BARROS, P. J. L., BONOLDI, V. L. N., LEON, E. P., ZEITUNE, A. D. & COSSERMELLI, W. Doença de Lyme em Mato Grosso do Sul: relato de três casos clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de lyme no Brasil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 51(6): 253-257, 1996.

DONOGHUE, A. R. & VAN VEEN, T. W. S. Investigating cross-reactions between *Leptospira* and *Borrelia*. **JAVMA**, 195(11): 1460-1462, 1989.

DRESSLER, F., WHALEN, J. A., REINHARDT, B. N. & STEERE, A. C. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme Disease. **J. Infect. Dis.**, 167: 392-400, 1993.

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

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

GALTON, M.M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C.A.; FIELDS, M.J.

Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, 13(1):81-85, 1965.

GERBER, M.A.; SHAPIRO, E.D.; KRAUSE, P.J.; CABLE, R.G.; BADON,

S.J.; RUAN, R.W. The risk of acquiring Lyme disease or babesiosis from a blood transfusion. **J. Infect. Dis**, 170 (1): 231-4, 1994.

GRODZICKI, R.L. & STEERE, A.C. Comparison of immunoblotting and

indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigens preparations for diagnosis early Lyme disease. **J. Infect. Dis.**, 157: 790, 1988.

HERXHEIMER, K. & HARTMANN, K.U. Acrodermatitis Chronica

Atrophicans. **Arch. Dermatol. Syph.**, 61 (57): 255-300, 1902.

IRVIN, A. D., OMWOYO, P., PURNELL, R. E., PIERCE, M. A. &

SCHIEMANN, B. Blood parasites of the impala (*Aepyceros melampus*) in the Serengeti National Park. **Vet. Rec.**, 93: 200-203, 1973.

ISHIKAWA, M.M. Soroepidemiologia da Borreliose de Lyme em bovinos na

região sudeste do Brasil. **Tese Mestrado**. Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

- ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; YOSHINARI, N.H. Padronização de Ensaio Imunoenzimático ELISA indireto para Pesquisa de Anticorpos da Classe IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. **Rev. Bras. de Med. Vet.**, 19 (04): 166-168, 1997.
- ISOGAI, H.; ISOGAI, E.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; MATSUBARA, M.; SHIMANUKI, M.; SETA, T.; FUKAI, K.; KUROSAWA, N.; ENOKIDANI, M.; et al. Seroepidemiological survey for antibody to *Borrelia burgdorferi* in cows. **Microbiol. Immunol.**, 36 (10): 1029-39, 1992.
- JI, B. & COLLINS, M.T. Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin. **Am. J. Vet. Res.**, 55(9): 1228-1231, 1994.
- JOHNSON, R.C.; BURGDORFER, W.; LANE, A.G.; BARBOUR, S.F.; HAYES, S.F. & HYDE, F.W. *Borrelia coriaceae* sp nov.: putative agent of epizootic bovine abortion. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 37: 72-74, 1987.
- JOHNSON, R.C. SCHIMID, G.P, HYDE, F.W., STEIGERWALT, A.G. & BRENNER, D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov. : etiologic agent of Lyme disease. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34:496, 1984.

- JOHNSTON, Y.E.; DURAY, P.H. & STEERE, A.C. Lyme Arthritis: Spirochetes found in Synovial Microangiopathic Lesions. **Amer. J. Pathol.**, 118: 26-34, 1985.
- JOPPERT, A.M. Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo. **Tese Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 83 pp., 1995.
- KAWABATA, H., MASUZAWA, T. & YANAGIHARA, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. **Microbiol. Immunol.**, 37: 843-848, 1993.
- KUIPER, H., VAN DAM, A. P., SPANJAARD, L., JONGH, B. M., WIDJOJOKUSUMO, A., RAMSELAAR, T. C. P., CAIRO, I., VOS, K. & DANKERT, J. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from biopsy specimens taken from healthy-looking skin of patients with lyme borreliosis. **J. Clin. Microbiol.**, 32(3): 715-720, 1994.
- LANE, R.S.; BURGDORFER, W.; HAYES, S.F. & BARBOUR, A.G. Isolation of a spirochete from the soft tick. *Ornithodoros coriaceus*: a possible agent of epizootic bovine abortion. **Science**, 230: 85-87, 1985.
- LAVÉLAN, A. **Acad. Sci. Paris**, 136: 939, 1903.

- LEBECH, A.-M., CLEMMENSEN, O. & HANSEN, K. Comparison of in vitro culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. **J. Clin. Microbiol.**, 33(9): 2328-2333, 1995.
- LE FLECHE A., POSTIC D., GIRARDET K., PETER O. & BARANTON, G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 47(4):921-925, 1997.
- LIPSCHULTZ, B. Weiterer Beitrag Zur Kenntniis des "Erythema Chronicum Migrans". **Arch. Dermatol. Syph.**, 143:365-374, 1923.
- LISSMAN, B.A.; BOSLER, E.M.; CAMAY, H., et. al. Spirochetes Associated Arthritis (Lyme Disease) in a Dog. **JAVMA**, 185: 219-220, 1984.
- MAGNARELLI, L.A.; MEEGAN, J.M.; ANDERSPM. J.F. & CHAPPELL, W.A. Comparison of an Indirect Fluorescent-Antibody Test With an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Studies of Lyme Disease. **J. Clin. Microbiol.**, 20: 181-184, 1984.
- MAGNARELLI, L. A., ANDERSON, J. F., KAUFMANN, A. F., LIEBERMAN, L. L. & WHITNEY, G. D. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 189: 955-959, 1985.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; APPERSON, C.S.; FISH, D.; JOHNSON, R.C.; CHAPPELL, W.A. Spirochetes in Ticks and Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in White tailed Deer from Connecticut, New York State, and North Carolina. **J. Wildl. Dis.**, 22: 178-188, 1986.

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

MAGNARELLI, L. A. & ANDERSON, J. F. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. **Am. J. Epidemiol.**, 127(4): 818-825, 1988.

MAGNARELLI, L. A., DUMLER, J. S., ANDERSON, J. F., JOHNSON, R. C. & FIKRIG, E. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and lyme borreliosis in human sera. **J. Clin. Microbiol.**, 33(11): 3054-3057, 1995.

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 andersonii* sp. nov.) isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 33(4): 2427-2434, 1995.

- MATTON, P.; VAN MELCKEBEKE, H. Bovine borreliosis: comparison of simple methods for detection of the spirochaete in the blood. **Trop. Anim. Health Prod.**, 22 (3): 147-52, 1990.
- MITCHELL, P. D., REED, K. D., ASPESLET, T. L., VANDERMAUSE, M. F. & MELSKI, J. W. Comparison of four immunoserologic assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with culture-positive erythema migrans. **J. Clin. Microbiol.**, 32(8): 1958-1962, 1994.
- MULHEARN, C.R. **Aust. Vet. J.**, 22: 118, 1985. 1946.
- OSEBOLD, J.W.; SPEZIALETTI, R.; JENNINGS, M.B.; PRITCHETT, R.F. & BUSHNELL, R.B. Congenital spirochetosis in calves: association with epizootic bovine abortion. **J. Am. Vet. Assoc.** 188: 371-376, 1986.
- OSEBOLD, J.W.; OSBURN, R.; SPEZIALETTI, R.; BUSHNELL, R.B. & STOTT, J.L. Histopathologic changes in bovine fetuses after repeated reintroduction of a spirochete-like agent into pregnant heifers: association with epizootic bovine abortion. **Am. J. Vet. Res.**, 48: 627-633, 1987.
- PACHNER, A.R. & STEERE, A.C. The Triad of Neurologic Manifestations of Lyme Disease: Meningitis, Cranial Neuritis, and Radiculoneuritis. **Neurology**, 35: 47-53, 1985.
- PARKER, J.L.; WHITE, K.W. Lyme Borreliosis in Cattle and Horses: a Review of the Literature. **Cornell-Veterinarian**, 82: 253-274, 1982.

PÊSSOA, S. B. Parasitologia Médica. Ed. Guanabara Koogan. 849p, 1963.

PIESMAN, J. Intensity and duration of *B. burgdorferi* and *Babesia microti* infectivity in rodent hosts. **Austr. Soc. Paras.**, 1988.

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. **Res. Microbiol.**, 144: 467-473, 1993.

POSTIC, D.; RAS, N.M.; LANE, R.S.; HENDSON, M.; BARANTON, G. Expanded diversity among California borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). **J. Clin. Microbiol.**, 36 (12): 3497-504, 1998.

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

ROGERS, A.B.; SMITH, R.D.; KAKOMA, I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi*, and *Borrelia coriaceae* in cattle. **Am J. Vet. Res.**, 60 (6): 695-7, 1999.

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

SEDDON, H.R. Diseases of Domestic Animals in Australia. IV. Protozoan and Viral Diseases. Commonw. **Aust. Dep. Hlth Serv. Publ.**, nº8, 1952.

SMITH, R.D.; MIRANPURI, G.S.; ADAMS, J.H. & AHRENS, E.H. *Borrelia theileri*: Isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. **Am. J. Vet. Res.**, 46 (6):1396-1398, 1985.

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. **Rev. Bras. de Med. Vet.**, 21(3);111-114, Maio/Junho,1999a.

SOARES, C.O.; SCOFIELD, A. ;MANERA, G.B.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Ensaio Imunoenzimático Indireto para Detecção de Anticorpos Homólogos da Classe IgG contra *Borrelia burgdorferi* em Cães. **Rev. Bras. de Med. Vet.**, 21(4);153-158, Julho/Agosto, 1999b.

SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Borrelioses, Agentes e Vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 20 (1): 1-19, 2000.

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. **Ann. Intern. Med.**, 86: 685, 1977a.

STEERE, A.C.; MALAWISTA, S.E.; SNYDMAN, D.R.; SHOPE, R.E.; ANDIMAN, W.A.; ROSS, M.R. & STEERE, R.M. Lyme Arthritis: an Epidemic of Oligoarticular Arthritis in Children and Adults in three Connecticut Communities. **Arth. and Rheum.**, 20: 7, 1977b.

STEERE, A.C.; GRODZICKI, R.L. & KORNBLATT, A.N. The Spirochetal Etiology of Lyme Disease. **N. Engl. J. Med.**, 308: 733-740, 1983.

STEERE, A.C.; GRODZICKI, R.L.; CRAF, J.E.; SHRESTA, M.; KORNBLATT, A.N.; & MALAWISTA, S.E. Recovery of Lyme Disease Spirochetes from Patients. **Yale J. Biol. Med.**, 57: 557-560, 1984.

TALHARI, S.; TALHARI, A.C.; FERREIRA, L.C.L. Eritema Chronicum Migrans, Eritema Migratório, Doença de Lyme ou Borreliose de Lyme. **Ann. Bras. Dermatol.**, 67: 205-209, 1992.

THEILER, A. Spirillosis of cattle. **J. Comp. Pathol. Ther.**, 17: 47-55, 1904.

- VIVAS, R. I. R., AGUILAR, F.C., ALPÍZAR, J. L. D., GALERA, L. A. C. & CALDERÓN, J. J. S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleóginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, **México. Vet. Méx.**, 27(2): 187-188, 1996.
- 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). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(4):927-932, 1997.
- WALKER, R.L.; READ, D.H.; LORETZ, K.L.; NORDHAUSEN, R.W. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. **Vet. Microb.**, 47: 343-355, 1995.
- WELLS, S. J.; TRENT, A.M.; ROBINSON, R.A.; KNUTSON, K.S. & BEY, R.F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.**, 54(3): 398-405, 1993.
- YOSHINARI, N.H.; STEERE, A.C. & COSSERMELLI, W. Revisão da Borreliose de Lyme. *Rev. Ass. Méd. Brasil.*, 35(1): 34, 1989.
- YOSHINARI, N.H.; REINHARDT, B.N. & STEERE, A.C. T Cell Responses to Polypeptide Fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme Arthritis. **Arth. and Rheum.**, 34: 707, 1991.

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. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 48: 170-174, 1993.

YOSHINARI, N. H., BARROS, P. J. L., BONOLDI, V. L. N., ISHIKAWA,  
M. M., BATTESTI, D. M. B., PIRANA, S., FONSECA, A. H. &  
SCHUMAKER, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Rev.  
Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, 52(2):111-117, 1997.