

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

DISSERTAÇÃO

**Pesquisa de Anticorpos Homólogos anti-*Borrelia*
burgdorferi em Búfalos (*Bubalus bubalis*)
do Estado do Pará**

Fabíola do Nascimento Corrêa

2007



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

**PESQUISA DE ANTICORPOS HOMÓLOGOS ANTI-*BORRELIA*
BURGDORFERI EM BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*)
DO ESTADO DO PARÁ**

FABÍOLA DO NASCIMENTO CORRÊA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre** em Ciências
Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade
Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007

636.293098115

C824p

T

Corrêa, Fabíola do Nascimento, 1980-
Pesquisa de anticorpos homólogos
anti-*Borrelia Burgdorferi* em búfalos
(*Bubalus bubalis*) do Estado do Pará /
Fabíola do Nascimento Corrêa. - 2007.
36 f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da
Fonseca.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 26-36.

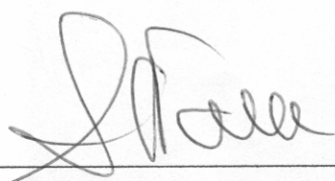
1. Búfalo - Pará - Teses. 2.
Búfalo - Doenças - Pará - Teses. 3.
Búfalo - Imunologia - Teses 4. Teste
imunoenzimático - Teses. 5. *Borrelia*
Burgdorferi - Teses. I. Fonseca,
Adivaldo Henrique da, 1953- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Veterinária.
III. Título.

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

FABÍOLA DO NASCIMENTO CORRÊA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2007.



Adivaldo Henrique da Fonseca (Dr.) UFRRJ
(Orientador)



Carina Elisei de Oliveira (Dr.^a) EMBRAPA/CNPQC



Rita de Cássia Campbell Machado Botteon (Dr.^a) UFRRJ

Este trabalho é dedicado a minha família que sempre me incentivou a seguir em frente e me apoiou de todas as formas.

Aos meus padrinhos Flávio Roberto Ramos e Marinalva Alcioly Ramos por todo apoio e a minha avó Elvira Gomes Corrêa por de alguma forma estar sempre presente.

Ao meu orientador Adivaldo Henrique da Fonseca pela confiança e paciência.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho e a ação. E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo. O de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída.”

Mahatma Ghandi

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por sempre ter me acompanhado dando forças para seguir a diante e iluminando um caminho quando parece não haver mais nada a fazer.

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), por ter me recebido, incentivado e confiado.

À Dr^a.Alessandra Scofield Amaral da Universidade Federal do Pará (UFPA), pelas valiosas instruções e apoio nos passos iniciais deste trabalho.

Ao Dr. Walter Flausing da UFRRJ, principalmente por toda ajuda e tempo dedicado ao meu auxílio.

À Central de Diagnóstico Veterinário (CEDIVET) da UFPA/Castanhal, que colaborou com as coletas de soros.

À Tatiane Teles Albernaz discente da UFPA, pela paciência, informação e ajuda.

A Dr^a. Maria Cacília Damé pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado/Pelotas-RS e ao zootecnista André Reis da Carioca Engenharia, pelo empenho em fornecer os controles negativos necessários para este estudo.

À EMBRAPA Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial ao técnico Geraldo Cruz Baeta, pela disponibilidade dos equipamentos, além da atenção e vontade de ajudar.

À Dr^a. Isis Abel Bezerra pelo empenho em ajudar mesmo à distância.

Ao Dr. Flávio Araújo da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC)/Campo Grande-MS, pelas importantes informações concedidas para realização do trabalho.

À Prof^a. Marília Massard da Fonseca, pela forma gentil e carinhosa com que sempre nos recebeu em sua casa.

Aos amigos e bolsistas do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio da Sanidade Animal do Convênio EMBRAPA/UFRRJ, Daniel da Silva Guedes Júnior e Renata Cunha Madureira pelo auxílio e instruções durante a realização do trabalho. À Jania de Rezende e Rafaella Câmara Teixeira pelo eficiente e prazeroso trabalho em equipe durante a análise das amostras. Aos amigos Fábio Jorge Moreira da Silva, Cátia Marques da Costa, Charles Passos Rangel, Charles Santos, Jenevaldo Barbosa da Silva, Luciana Rodrigues de Almeida, Matheus Dias Cordeiro, Nathalie Costa da Cunha, Rafael Ferreira de Araújo e Raquel Silva Lisbôa, pelo convívio, amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos grandes amigos da UFRRJ, principalmente a Vanessa de Almeida Raia por compartilhar sua experiência em dosagem de proteínas, à Ana Paula Rodrigues Moraes e Arisa Mandarinho pelos divertidíssimos momentos de descontração e ao Tiago Marques pela dupla que formamos nos trabalhos realizados durante o mestrado.

Aos queridos amigos que me acompanharam durante o curso de Medicina Veterinária na UFRRJ e que de alguma forma não se deixaram esquecer mesmo após o término da graduação, Daniel Washington Evangelista, Renata Rezende Coelho, Rosa do Espírito Santo e Rosângela Antunes da Silva.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos.

Aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo.

À inesquecível UFRRJ pela acolhida durante o curso de Graduação e Mestrado.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o período de Mestrado.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

Fabíola do Nascimento Corrêa, filha de Antônio Cláudio Gomes Corrêa e Joséfa Bezerra do Nascimento Corrêa, nasceu em 5 de Março de 1980, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro. Concluiu o ensino fundamental no Colégio Estadual Professora Isabel dos Santos Soares de Mello e o ensino médio na Associação Brasileira de ensino Universitário (ABEU), concluído em dezembro de 1997, ambos localizados na cidade de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro.

No ano de 2000, ingressou no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em Fevereiro de 2005.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Participou de 11 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas e indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais.

Foi bolsista do CNPq de agosto de 2002 a fevereiro de 2005, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia no Laboratório de Doenças Parasitárias do prédio da Sanidade Animal do convênio com a EMBRAPA/UFRRJ.

Em março de 2005 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Sanidade Animal, em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES até o presente momento. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

RESUMO

CORRÊA, Fabíola do Nascimento. **Pesquisa de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do estado do Pará.** 2007. 36p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

A criação de búfalos tem expandido no Brasil deixando de ser um simples elemento de ocupação de terras pouco férteis para tornar-se sinônimo de produção pecuária rentável. No entanto, os pecuaristas e profissionais de saúde carecem de informações consistentes sobre sanidade desses animais. A borreliose é uma enfermidade sistêmica, infecciosa e cosmopolita, causada por microrganismos do gênero *Borrelia*, que acometem diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem. A espécie de *Borrelia* mais comumente reportada em ruminantes é *B. theileri*. Estes animais também podem ser infectados por *B. burgdorferi sensu lato*, agente da borreliose de Lyme e *B. coriaceae* que causa o aborto epizootico bovino. No entanto, não há estudos soroepidemiológicos sobre borreliose em bubalinos. Com o objetivo de conhecer a frequência de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* de búfalos provenientes dos municípios Castanhal, Santa Isabel, Nova Timboteua e Santarém Novo, na parte continental do estado do Pará e Cachoeira do Arari na Ilha de Marajó foram coletados soros de 491 búfalos, os quais foram analisados por meio do teste ELISA indireto. A análise sorológica das amostras revelou que 412 soros (83,91%) foram positivos, não ocorrendo diferença estatística significativa entre os animais positivos provenientes da Ilha de Marajó 81,69% (232/284) e da porção continental do estado 86,96% (180/207). Quanto à frequência de soropositivos por município estudado, a análise de correspondência, indicou a formação de três grupos distintos, o primeiro formado pelos municípios de Cachoeira do Arari e Castanhal, o segundo formado pelos municípios de Nova Timboteua e Santarém Novo e o terceiro formado apenas pelo município de Santa Isabel. Este último apresentou estatisticamente menor frequência de anticorpos em relação aos outros quatro municípios. No entanto, foi observado que búfalos dos cinco municípios estudados possuem alta frequência de anticorpos homólogos contra espiroquetas *B. burgdorferi*. A alta frequência de animais soropositivos encontrada pode ser explicada pela presença do carrapato *Boophilus microplus* e pela existência de relato sobre *Borrelia* sp. infectando búfalo na região estudada. Estes fatos sugerem reação cruzada entre a cepa americana g39/40 de *B. burgdorferi* utilizada como substrato antigênico e a espécie de *Borrelia* que infecta os búfalos no estado do Pará. Apesar da baixa especificidade do ELISA indireto usado neste estudo, este teste constitui-se em um bom exame para triagem e monitoramento de indivíduos infectados por microrganismos do gênero *Borrelia*.

Palavras chave: *Borrelia*, búfalo, ELISA

ABSTRACT

CORRÊA, Fabíola do Nascimento. **Research of homologous antibodies anti-*Borrelia burgdorferi* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) of Pará state, Brazil.** 2007. 36p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences, Animal Health). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Rearing buffaloes in Brazil has been increasing notoriously and leaving of being a simple activity to justify the use of poor fertility lands. Right now the rearing buffalo is considered a promissory lucrative activity, but the information about sanitary aspects to improve buffaloes health are not consistent. Borreliosis is a systemic infectious disease caused by many *Borrelia* species, which have a cosmopolitan distribution, and affects various species of domestic and wild animals, including human beings. *Borrelia theileri* is the specie more commonly reported in ruminants. However, these animals can also be infected by *B. burgdorferi sensu lato* and *B. coriaceae*, which cause Lyme borreliosis and abortion epizootic bovine, respectively. Meanwhile, there are no seroepidemiologic studies of borreliosis in buffaloes. The aim of this study was to know the frequency of anti-*B. burgdorferi* homologous antibodies in buffaloes serum samples proceeding from Castanhal, Santa Isabel, Nova Timboteua and Santarém Novo, in the continental part of Pará state and Cachoeira do Arari in Marajó Island were collected. Serums of 491 buffaloes were analyzed by indirect ELISA test. The serologic analysis of the samples showed that 412 serums (83.91%) were positive, without different statistical significance between positive animals from Marajó Island 81.469% (2362/284) and from the continental part 86.96% (180/207). Was observed that buffaloes of these five municipalities studied have high antibodies frequency against spirochetes *B. burgdorferi*. The Correspondence Analysis test showed the formation of three different municipalities groups of according with seropositives animals number. The first group was formed by Cachoeira do Arari and Castanhal, the second by Nova Timboteua and Santarém Novo. The third group was constituted by Santa Isabel only, which presented statisticment loss antibodies frequency than others municipalities. The high frequency of positives animals found can be explained by presence of tick *Boophilus microplus* and by the existence of report on *Borrelia* sp. infecting buffalo in the studied region. These facts suggest cross-reactivity between strain g39/40 of *B. burgdorferi* used as antigenic substratum and *Borrelia* species that infect buffaloes in Pará state. Despite of low specificity of indirect ELISA test used in this study, it is a good method to select e screen infected animals in studies about *Borrelia* sp. in buffaloes.

Key words: *Borrelia*, buffaloes, ELISA

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em búfalos quanto à região de origem dos animais, Ilha de Marajó ou porção continental do estado do Pará, determinada pelo ELISA indireto.....	18
Tabela 2. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em búfalos por município de origem dos animais, determinada pelo ELISA indireto.....	20

LISTA DE QUADROS

	Páginas
Quadro 1. Esquema da placa de ELISA utilizada para adaptação do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra <i>Borrelia burgdorferi</i> em búfalos.....	14

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Mapa do estado do Pará dividido em microrregiões e municípios.....	12
Figura 2. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) dos municípios de Cachoeira do Arari, Castanhal, Santa Isabel, Nova Timboteua e Santarém Novo, estado do Pará, analisados pelo teste ELISA indireto.....	16
Figura 3. Infestação por <i>Boophilus microplus</i> no pavilhão auricular de búfalo nativo do município de Castanhal - PA.....	19
Figura 4. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) por município, analisados pelo teste ELISA indireto.....	21

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Borrelia</i> spp.....	3
2.2 Borreliose de Lyme e Lyme <i>simile</i>	4
2.3 Outras Borrelioses de Ruminantes.....	6
2.4 Diagnóstico.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Coleta dos Soros.....	11
3.2 Obtenção do Antígeno.....	12
3.3 Obtenção do Controle Positivo.....	13
3.4 Obtenção dos Controles Negativos.....	13
3.5 Adaptação do Teste ELISA Indireto Padronizado para Bovinos à Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em Búfalos.....	13
3.6 ELISA Indireto.....	14
3.7 Análise Estatística.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Modificações do Teste ELISA Indireto.....	16
4.2 Frequência de Anticorpos Homólogos Contra <i>Borrelia burgdorferi</i>	16
5 CONCLUSÕES.....	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

A criação de búfalos é uma atividade em expansão no Brasil, principalmente pela sua facilidade de adaptação aos mais diversos ambientes naturais, e vem deixando de ser um simples elemento de ocupação de terras pouco férteis e alagadiças para tornar-se sinônimo de rentável produção de carne, leite, couro e trabalho.

As características anatômicas e fisiológicas dos búfalos tendem a fazer com que a maioria das enfermidades ocorra de maneira subclínica, ou que os sintomas evidenciados somente quando em estado bastante avançado. No entanto, os pacuári profissionais de saúde carecem de estudos mais detalhados sobre as enfermidades acometem bubalinos que contribuam para o êxito de sua criação.

A borreliose é uma enfermidade infecciosa, sistêmica e cosmopolita, causada por microrganismos do gênero *Borrelia*, que acometem diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem. Sua transmissão ocorre principalmente pela picada de carrapatos, mas também por piolhos, que inoculam saliva infectada, ou transmitem passivamente por contato direto com o líquido coxal. Uma variedade de pequenos animais silvestres, incluindo roedores, lagomorfos e aves, pode agir como hospedeiro reservatório. As aves migratórias são capazes de disseminar larvas e ninfas de carrapatos infectados a longas distâncias. Animais domésticos como caninos, felinos, eqüinos e ruminantes, além de contraírem a infecção, são disseminadores de carrapatos infectados para o ambiente peridomiciliar. A sorologia realizada em animais tem contribuído principalmente para o mapeamento das áreas de risco para a borreliose de Lyme.

Atualmente são descritas cinco enfermidades atribuídas às espiroquetas do gênero *Borrelia*: (1) Febre recorrente causada por *B. recurrentis sensu lato* com mais de 20 espécies, cujos vetores são carrapatos *Ornithodoros* sp. e piolhos *Pediculus* sp.; (2) espiroquetose aviária determinada por *B. anserina*, transmitida por carrapatos *Argas* sp. para diferentes espécies de aves; (3) borreliose bovina causada por *B. theileri*, que também pode infectar outros ruminantes e eqüinos, e é transmitida por carrapatos ixodídeos, principalmente *Boophilus microplus*; (4) aborto epizoótico bovino, que tem como agente etiológico *B. coriaceae* e como vetor *O. coriaceus*; e (5), borreliose de Lyme transmitida por carrapatos Ixodídeos, principalmente *Ixodes* sp. e tendo como agente causal o complexo *B. burgdorferi sensu lato*, constituído por três espécies de espiroquetas: *B. burgdorferi sensu stricto* (Estados Unidos, Europa e Ásia), *B. afzelii* e *B. garinii* (Europa) e borreliose de Lyme *simile americana*, causada por *B. lonestari*, que é geneticamente semelhante a *B. theileri*. No hemisfério sul também há relatos de enfermidade semelhante à borreliose de Lyme, porém o agente etiológico ainda não foi isolado.

A primeira descrição de espiroquetas no sangue de ruminantes foi registrada por Arnold Theiler em 1902, na África do Sul, ao pesquisar a etiologia da anaplasnose. O agente descrito originalmente como *Spirochaeta theileri*, recebeu a posterior denominação de *Borrelia theileri*. Esta espécie foi observada em bovinos, ovinos, eqüinos, cervídeos, ímpalas e outros ruminantes silvestres como causador ocasional de febre, hemoglobinúria e anemia. Posteriormente, *B. burgdorferi* foi recuperada de uma vaca com artrite e doença sistêmica e constatou-se que bovinos também podiam carrear o agente da borreliose de Lyme. A espécie de *Borrelia* sp. mais recentemente descrita em bovinos é a que causa o aborto epizoótico bovino, tendo como agente *B. coriaceae*, o qual ainda não foi descrito no Brasil.

O diagnóstico de *Borrelia* spp. por meio de esfregaços sanguíneos pode ser utilizado. No entanto, é necessário que haja alta espiroquetemia no momento da execução, o que não é

muito freqüente. Nestes casos é recomendado o uso de testes sorológicos como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto.

O ELISA indireto é amplamente utilizado na pesquisa de anticorpos contra *B. burgdorferi* em todas as regiões onde tem sido descrita a borreliose de Lyme, contribuindo assim para o conhecimento epidemiológico da doença. Contudo, há também outras técnicas que podem ser empregadas nos estudos das borrelioses, como a imunohistoquímica, imunofluorescência indireta (IFI), western blotting e a reação em cadeia da polimerase (PCR).

As características epidemiológicas das borrelioses podem variar de acordo com a área geográfica, presença de carrapatos vetores, ecossistemas, espécies e cepas diferentes. Por isso são necessários mais estudos para determinar a freqüência destas espiroquetas em distintas regiões. No Brasil, pesquisas de anticorpos contra *B. burgdorferi* já foram realizadas em humanos, caninos, eqüinos e bovinos, em sua maior parte observando-se valores de soroprevalência próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte.

A primeira observação de *Borrelia* sp. em búfalos ocorreu em um bubalino nativo do município de Castanhal, estado do Pará. No entanto, não há estudos soroepidemiológicos sobre borreliose em bubalinos. Assim, fundamentado na hipótese de que búfalos do estado do Pará podem ser infectados por microrganismos do gênero *Borrelia*, este trabalho teve como objetivo avaliar a freqüência de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* por meio de um teste ELISA indireto, em soros de búfalos provenientes de cinco municípios distribuídos entre as microrregiões do Arari, Castanhal e Bragantina no estado do Pará.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Borrelia* spp.

O gênero *Borrelia* é constituído por bactérias Gram negativas, microaerófilas, móveis, pertencentes à família Spirochaetaceae da ordem Spirochaetales. Todas as espécies descritas possuem formato helicoidal que pode variar de 3 a 10 espiras, medem de 4 a 30 µm e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993; PFISTER et al., 1994; SOARES et al., 2000). Do ponto de vista estrutural, são formadas por um cilindro protoplasmático constituído por uma membrana interna preenchida por citoplasma e peptídeoglicano coberta por uma membrana celular externa. Possuem flagelos que, em estrutura, são semelhantes aos de outras bactérias flageladas, localizados no espaço periplasmático, inseridos na terminação do cilindro de protoplasma (KRIEG; HOLT, 1984; BARBOUR; HAYES, 1986).

As espécies de *Borrelia* spp. podem ser distinguidas morfométricamente dos demais gêneros da família Spirochaetaceae por serem maiores, com maior número de flagelos periplasmáticos e menor número de espiras (AUSTIN, 1993; PFISTER et al., 1994). Entretanto, pode ocorrer polimorfismo entre espiroquetas de uma mesma espécie (BARBOUR; HAYES, 1986).

A primeira observação de uma espiroqueta foi feita por Leeuwenhoek, em 1681, na mucosa bucal e intestinal do homem. No entanto, sua importância só foi reconhecida em 1863, após Obermeier observá-la no sangue de pacientes com febre recorrente (PESSÔA, 1963; PAVLOVSKY, 1965). E a partir de 1948, após receber diversas classificações, bacteriologistas e sistematistas as colocaram em um grupo especial entre as bactérias.

As diferentes espécies de espiroquetas dentro do gênero *Borrelia* foram classificadas de acordo com a especificidade da relação parasita-vetor-hospedeiro (HOOGSTRAAL, 1985), porém, existem espiroquetas que não são transmitidas por uma única espécie de vetor, assim como, não infectam uma única espécie de hospedeiro. Desta forma, atualmente sua identificação ocorre pela associação entre estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (BARBOUR; HAYES, 1986; MARCONI et al., 1995; SILVA; FIKRIG, 1997; SOARES et al., 2000).

Dentre os membros da ordem Spirochaetales apenas *Borrelia* spp. são transmitidas por artrópodes hematófagos, primordialmente por carrapatos e, em raros casos, por tabanídeos, culicídeos e sifonápteros (MAGNARELLI et al., 1986; 1987; BUTLER; DENMARK, 1990). Contudo, já foi observado na natureza carrapato *Ornithodoros turicata* transmitindo *Leptospira pomona* (BURGDORFER, 1956). A infecção por *Borrelia* sp. pode também ocorrer pelo contato com urina de animais infectados, por transfusão sanguínea, transplante de tecido e congenitamente em cães (BARBOUR; HAYES, 1986; BURGESS, 1986; BURGESS et al., 1986; HYDE et al., 1989; DORWARD et al., 1991; GUSTAFSON et al., 1993).

Burgdorfer et al. (1982) foram os primeiros a observar espiroquetas em carrapatos a partir de lâminas preparadas com intestino de *Ixodes dammini* de área endêmica para borreliose de Lyme, conseguindo realizar o isolamento da espiroqueta em meio Barbour Stoenner e Kelly (BSK). Desde então, diferentes espécies de carrapatos tem sido implicadas na transmissão de espiroquetas aos homens e animais. Entre os argasídeos encontram-se diversas espécies de *Ornithodoros* sp. e *Argas* sp., transmitindo *Borrelia* spp. principalmente via líquido coxal; já entre os ixodídeos como *Ixodes* sp., *Amblyomma* sp., *Boophilus* sp. e *Rhipicephalus* sp. a transmissão ocorre por meio da inoculação de saliva infectada (BALASHOV, 1972; HOOGSTRAAL, 1985; BURGdorfer et al., 1989).

Em relação aos carrapatos ixodídeos a transmissão de *Borrelia* spp. ocorre principalmente pela fase de ninfa, tendo este estágio maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão da espiroqueta. No entanto, todos os ínstares possuem habilidade para transmiti-las. Estudos demonstraram que para esses vetores é necessário um tempo de fixação no hospedeiro superior a 48 horas para que ocorra a transmissão (BENACH et al., 1987; LANE; BURGDORFER, 1987; LANE; MANWEILER, 1988).

A infecção do carrapato vetor ocorre pela ingestão de sangue contendo *Borrelia* spp., por transmissão transovariana e transestadial (SMITH et al., 1978; HOOGSTRAAL, 1985). A transmissão transovariana, porém, não ocorre em todas as espécies de vetor (BURGDORFER et al., 1989). Logo após a infecção do carrapato as espiroquetas iniciam uma fase de multiplicação em nível intestinal e, posteriormente, migram para a hemocele disseminando-se pelos órgãos, chegando à glândula salivar (BENACH et al., 1987; RIBEIRO et al., 1987).

As diferentes espécies de *Borrelia* spp. desenvolvem-se em simbiose com seus vetores, porém seu crescimento e multiplicação no interior do carrapato são afetados por processos fisiológicos do ciclo vital deste artrópode e muitas espiroquetas podem morrer após a mudança de estágio do carrapato. Da mesma forma, o carrapato também pode sucumbir por um número excessivo de espiroquetas que podem lesar seus órgãos ou tornar-se infértil por danos a formação de seus ovos (BURGDORFER, 1956; BURGDORFER et al., 1989; BALASHOV, 1972; SMITH et al., 1978; HOOGSTRAAL, 1979; 1985; PIESMAN et al. 1990).

2.2 Borreliose de Lyme e Lyme *simile*

A borreliose de Lyme é uma antropozoonose infecciosa, sistêmica e cosmopolita causada por espiroquetas do gênero *Borrelia*. A enfermidade foi primeiro observada por Buchwald (1883) na Alemanha, sendo descrita como uma atrofia difusa de pele com caráter idiopático, que em 1902, recebeu o nome de acrodermatite atrófica crônica (HERXHEIMER; HARTMANN, 1902). Somente em 1975, após ser reportada nos Estados Unidos, Connecticut e mais tarde em Old Lyme, com sintomas semelhantes à artrite reumatóide juvenil, foi caracterizada como uma desordem multissistêmica denominada artrite de Lyme ou doença de Lyme (STEERE et al., 1977a;b). Porém o reconhecimento do agente causal e seu isolamento só foram realizados em 1981, quando Burgdorfer et al. (1982) ao pesquisar filarídeos no trato digestivo de carrapatos encontraram estruturas espiraladas móveis que receberam de Johnson et al. (1984) o nome de *B. burgdorferi*.

Outras espécies, além de *B. burgdorferi sensu strictu*, já foram identificadas causando enfermidade semelhante à borreliose de Lyme observada nos Estados Unidos, porém apresentando pequenas variações genéticas, como *B. lusitaniae* (LE FLECHE et al., 1997) e *B. valaisiana* (WANG et al., 1997) na Europa; *B. japonica* (KAWABATA et al., 1993) e *B. miyamotoi* no Japão (POSTIC et al., 1993); *B. andersoni* (MARCONI et al., 1995), *B. lonestari* (BARBOUR et al., 1996) e *B. bissetii* (POSTIC et al., 1998) na América do Norte. Na América do sul, Austrália e África também há relatos de enfermidade com manifestações clínicas similares à borreliose de Lyme, associada à picada de carrapatos e a organismos espiralados semelhantes à *Borrelia* spp. No entanto, a etiologia não é totalmente esclarecida, pois o agente ainda não foi isolado (YOSHINARI et al., 2000).

Atualmente, sabe-se que a borreliose de Lyme clássica de ocorrência no hemisfério norte tem como agentes etiológicos *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* e *B. garinii*, cujos vetores são principalmente carrapatos *Ixodes* spp. (STEERE, 2001). Uma enfermidade semelhante, encontrada no sul dos Estados Unidos, foi definida como borreliose de Lyme *simile* americana, causada por *B. lonestari*, que é uma espécie de espiroqueta incultivável em

meio BSK, transmitida por carrapatos *Amblyomma* sp. e geneticamente semelhante à espiroqueta bovina *B. theileri*.

A primeira observação de *Borrelia* spp. no Brasil ocorreu em 1988, quando Filgueira et al. analisaram um paciente com eritema crônico migratório de crescimento centrífugo e prurido discreto, cuja biópsia revelou organismos com morfologia compatível com este agente. Porém, a primeira publicação alertando para a possibilidade da existência de borreliose de Lyme no Brasil foi realizada por Yoshinari et al. (1989) devido à presença do vetor e da espiroqueta no país; e em 1992 foram descritas as primeiras observações da doença em humanos (YOSHINARI et al., 1993a;b). Desde então, casos humanos de borreliose de Lyme *simile* brasileira, bem como a presença de anticorpos contra *Borrelia* sp. em animais têm sido reportados no Brasil, principalmente na região sudeste (FONSECA et al., 1995a; b, 1996; YOSHINARI et al., 1995; 1997; ISHIKAWA, 1996; 2000; SOARES, 1998; SOARES et al., 1999; SALLES et al., 2002; MADUREIRA, 2004; GALO, 2006).

Os vetores de *Borrelia* spp. no Brasil ainda não estão bem estabelecidos (ABEL et al., 2000), e como a espécie de *Borrelia* que ocorre no Brasil ainda não foi isolada especula-se que ocorra uma reação cruzada entre ela e a cepa de *B. burgdorferi* empregada nos ensaios sorológicos (FONSECA et al., 2005).

Animais silvestres, em especial os pequenos roedores, são considerados os maiores reservatórios do agente etiológico (STEERE et al., 1983; GILL et al., 1994; MASUZAWA et al., 1995; BATTISTI et al., 1997) enquanto aves migratórias são capazes de disseminar larvas e ninfas de carrapatos infectados a longas distâncias (ANDERSON, 1988; COMSTEDT et al., 2006). Animais domésticos também contraem a infecção e são potenciais agentes transportadores de carrapatos para o ambiente peridomiciliar (BOSLER, 1993; MATHER et al., 1994; ISHIKAWA, 1996; SOARES et al., 1999). Foi observado que em áreas onde ocorrem casos humanos de borreliose o agente etiológico tem sido encontrado parasitando mamíferos domésticos (BURGESS et al., 1987).

Em todo o mundo a borreliose de Lyme tem sido reportada em caninos, felinos, eqüinos, bovinos e ovinos. Uma grande parte dos animais domésticos expostos ao agente causal *B. burgdorferi sensu lato* é assintomaticamente infectada. Aqueles animais que desenvolvem sinais clínicos evidentes exibem principalmente manqueira e edema das articulações, com ou sem febre (BURGESS, 1988; APPEL, 1990; COHEN; COHEN, 1990). Com a possível exceção dos bovinos, animais domésticos geralmente não demonstram lesão eritematosa de pele no local de fixação do carrapato, embora *B. burgdorferi* já tenha sido isolada deste local mesmo com a pele estando aparentemente normal (BOSLER, 1993; APPEL et al., 1993; BLOWEY et al., 1994).

Em bovinos, a infecção por *B. burgdorferi* é frequentemente assintomática mesmo em animais provenientes de regiões com alta soroprevalência (BENXIU; COLLINS, 1994; FONSECA et al., 1995b; 1996; ISHIKAWA, 1996). Entre os sinais da doença que podem ser apresentados por bovinos estão principalmente os problemas articulares, como manqueira e menos freqüentemente laminite; assim como febre, perda de peso, depressão da produção leiteira e aborto (POST et al., 1986; BURGESS, 1988; PARKER; WHITE, 1992; BUSHMICH, 1994). A detecção de *Borrelia* sp. em sangue de feto e em tecidos fetais abortados confirma a transmissão transplacentária e chama atenção para problemas reprodutivos que podem ser causados pela espiroqueta (BURGESS, 1988; BUSHMICH, 1994).

Por meio de estudos sorológicos de borreliose de Lyme Wells et al. (1993) reportaram associação entre soropositividade para *B. burgdorferi* e problemas articulares em bovinos de Minnesota e Wisconsin, EUA. No Brasil, Benesi et al. (1995) encontraram prevalência de 23,8% de soros positivos na população bovina de Bragança Paulista e na mesma região identificaram um bovino com artrite e três funcionários com lesão cutânea compatível com

eritema migratório, um dos quais foi soropositivo; Ishikawa (1996) observou em bovinos da região sudeste alta reatividade de anticorpos da classe IgG (60,04%) contra antígenos de *B. burgdorferi* cepa G39/40, sendo que em 37 amostras do Espírito Santo, em área onde bovinos apresentavam sinais clínicos sugestivos de borreliose, 86,50% mostraram-se reativos. Mais recentemente, Guedes Junior (2006) encontrou 54,90% de bovinos provenientes do estado do Pará, positivos para borreliose.

Como os bovinos podem servir como hospedeiros para carrapatos *Ixodes* spp. adultos, principais vetores de *B. burgdorferi* nos Estados Unidos, Europa e Ásia, além de outras espécies de ixodídeos (BUSHMICH, 1994; YOSHINARI et al., 1997), pode-se cogitar um papel relevante desses animais no ciclo zoonótico da borreliose de Lyme.

Borrelia burgdorferi tem sido demonstrada (raramente) em sangue, colostro, leite, fluido sinovial e urina de bovinos. Estudos preliminares indicam que vacas leiteiras com borreliose de Lyme clínica podem ser melhores disseminadoras de espiroquetas na urina do que vacas assintomáticas (BUSHMICH, 1994). Também já foi observado que *B. burgdorferi* pode sobreviver em leite refrigerado por longo período de tempo. No entanto, a pasteurização pode matar o organismo, diminuindo ao mínimo o potencial de difusão desta zoonose quando tomado as devidas precauções (FARRELI; MARTH, 1991).

A habilidade de *B. burgdorferi* sobreviver ao ambiente ácido do estômago humano é desconhecida, mas inoculação oral em gatos usando grande número de organismos em cultura tem sido realizada experimentalmente com sucesso (BURGESS, 1992).

2.3 Outras Borrelioses de Ruminantes

Espiroquetas vivas foram primeiramente observadas em sangue bovino na África do Sul, por Arnold Theiler, em 1902. Em 1903, Laveran observando esfregaços sanguíneos confeccionados por Theiler chamou-as de *Spirillum theiler*. No Brasil, em 1919, Brumpt *apud* Neitz (1956), registrou a presença de *S. theileri* em bovinos e a transmissão através de carrapatos. Entretanto, somente em 1957 estas espiroquetas foram incluídas dentro do gênero *Borrelia* recebendo o nome de *B. theileri*, conforme publicado no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (SMITH; ROGERS, 1998).

Borrelia theileri é a espécie mais comumente reportada em bovinos, mas também pode parasitar eqüinos e outros ruminantes domésticos e silvestres como ovelhas, cervos e ímpalas (NEITZ, 1935; IRVIN et al., 1973). Contudo, os mamíferos, de uma forma geral, são hospedeiros acidentais que podem servir como portadores para a preservação e disseminação do agente (MARTINS et al., 1996).

Segundo Laveran (1903) *B. theileri* possui tamanho que pode variar entre 8 -30 µm de tamanho, podendo apresentar de 5 a 10 flagelos (NEITZ, 1956) e 3 a 7 espiras (CALLOW, 1967), similar a espiroqueta *B. burgdorferi*.

Esta espiroqueta é considerada não patogênica, apesar de existirem relatos de doença clínica. Durante a fase parasitêmica os bovinos infectados por *B. theileri* podem exibir suave elevação de temperatura, letargia, anemia e hematúria (CALLOW, 1967; SMITH et al., 1978). Esses sinais caracterizam uma síndrome parecida com babesiose que poderia complicar o diagnóstico clínico de *Babesia* sp. feito a campo, mas não confirmada por exame de esfregaços sanguíneos em laboratório (CALLOW, 1967).

Rogers et al. (1999) observaram espiroquetemia em bovinos com elevação da temperatura e letargia, mas anemia e hematúria não foram encontradas. Sharma et al. (2000) observaram dois bovinos adultos de um rebanho de 23 animais com febre, linfonodos pré-escapulares e parótideos enfartados, anemia, hemoglobínúria, inapetência e diarreia. Um dos animais foi a óbito e o exame do esfregaço sanguíneo deste animal apresentava grande

quantidade de *B. theileri* e poucos parasitos *B. bovis* e *Theileria mutans*. O animal sobrevivente se recuperou após antibióticoterapia com oxitetraciclina.

Borrelia theileri é detectável em esfregaços sanguíneos 2 a 4 semanas após a exposição a carrapatos infectados, mas em poucos dias desaparecem (SMITH et al., 1978). Eventualmente podem ocorrer novos picos de parasitemia, mas sem sinais de doença (CALLOW, 1967). Segundo Smith et al. (1978) os curtos períodos de febre coincidem com a presença de espiroquetas observáveis em esfregaço sanguíneo.

Embora a infecção por *B. theileri*, na maioria das vezes, curse de forma assintomática em bovinos, esta espiroqueta permanece importante por ser bastante difundida geograficamente e pelo seu potencial para ser confundida com *B. burgdorferi*, agente causal da borreliose de Lyme; com *B. coriaceae*, provável agente do aborto epizoótico bovino; e com espécies de *Borrelia* ainda não isoladas implicadas em doença semelhante e borreliose de Lyme (SMITH et al., 1978; SMITH; ROGERS, 1998).

A distribuição geográfica de *Borrelia* sp. em bovinos está diretamente relacionada a distribuição de seus vetores. *B. theileri* tem sido reportada quase exclusivamente em latitudes tropicais, correlacionada com a distribuição de carrapatos vetores conhecidos, como: *B. microplus*, *B. annulatus*, *B. decoloratus*, *B. australis*, *Rhipicephalus evertsi*, *I. ricinus* e *Haemaphysalis cinnabarina punctata* (CALLOW, 1967; VIVAS et al., 1996; SHARMA et al., 2000), nos continentes Australiano (CALLOW, 1967), Africano (NEITZ, 1956; TREES, 1978) e na América do Sul (BRUMPT, 1919 *apud* NEITZ, 1956; HADANI et al., 1985; MARTINS et al., 1996). Contudo, também já foi relatada no Zaire (SCHWETZ, 1935 *apud* MATTON; MELCKEBEKE, 1990), Holanda (SHILLHORN VAN VEEN; LEYENDEKKERS, 1971), México (SMITH et al., 1978), Estados Unidos (SMITH et al., 1985), Sul da Rússia e Bulgária (YAKIMOFF et al., 1933 *apud* SMITH; ROGERS, 1998; JANEFF, 1943 *apud* UILENBERG et al., 1988).

Conforme observado em *B. microplus*, parece que a replicação de *B. theileri* ocorre em maior intensidade no vetor do que no sangue bovino (SMITH et al., 1985; SMITH; ROGERS, 1998). Segundo Smith et al. (1978), o ovário, gânglio central e a hemolinfa do carrapato parecem ser os locais preferidos por *B. theileri*, com extensiva multiplicação ocorrendo nos hemócitos, sendo que a glândula salivar é o primeiro órgão invadido pelas espiroquetas após a ingestão de sangue infectado.

Borrelia theileri parece ser não patogênica para o carrapato (CALLOW, 1967; SMITH et al., 1978). Somente os estágios de ninfa e adulto transmitem a espiroqueta aos bovinos (CALLOW, 1967), apesar de ocorrer infecção transovariana e espiroquetas serem detectadas 72 horas após larvas se alimentarem em hospedeiros infectados. Não está claro por que larvas de *B. microplus* são incapazes de transmitir *B. theileri* aos bovinos. Acredita-se que poucas espiroquetas conseguem invadir a glândula salivar após infecção no estágio larval (SMITH et al., 1978; MARTINS et al., 1996).

A borreliose bovina determinada por *B. theileri* geralmente ocorre associada à babesiose e/ou anaplasmose agravando o quadro hematológico do animal, especialmente em animais esplenectomizados (SCHWETZ, 1935 *apud* MATTON; MELCKEBEKE, 1990; SMITH et al., 1985; UILENBERG, 1986; MATTON; MELCKEBEKE, 1990). No Brasil, *B. theileri* foi relatada em bovinos ao se estudar rickettsias em animais esplenectomizados (LOPES, 1976). Na África observou-se borreliose associada à babesiose, theileriose, anaplasmose e eperitrozonose (KOCH et al., 1990). Matton e Melckebeke (1990), no entanto, reportam que espiroquetas deixaram de ser observáveis em esfregaços sanguíneos enquanto havia a presença de *B. bigemina* e reapareceram quando esta infecção foi controlada. Conhecer as implicações destas relações entre estes agentes etiológicos é importante, pois nas regiões tropicais e subtropicais do globo *B. microplus* é o principal vetor

de *B. bigemina*, *B. bovis* e de *A. marginale*, assim como para *B. theileri* (NEITZ, 1956; SMITH et al., 1978).

Como ocorre com *B. burgdorferi*, *B. coriaceae* tem sido detectada principalmente em regiões de clima temperado e tem como vetor conhecido o carrapato *O. coriaceus* (CALLOW, 1967). Infecção por *B. coriaceae* tem sido associada com aborto epizoótico bovino (JOHNSON et al., 1987) podendo também infectar cervídeos (ZINGG; LEFEBVRE, 1994 *apud* SOARES et al., 2000).

A distinção entre as três espécies de espiroquetas que acometem ruminantes (*B. theileri*, *B. burgdorferi* e *B. coriaceae*) é importante uma vez que a distribuição geográfica dos vetores e hospedeiros vertebrados são coincidentes. E a caracterização de espécies potencialmente zoonóticas, incluindo *B. theileri*, é de grande relevância para a saúde animal e humana (SMITH; ROGERS, 1998).

Recentemente foi registrada a primeira ocorrência de *Borrelia* sp. em *B. bubalis* no Brasil (SCOFIELD et al., 2005). Formas típicas de um espiroquetídeo semelhante a *B. theileri* foram observadas em esfregaço sanguíneo de um búfalo fêmea do estado do Pará com suspeita clínica de Leucose Enzoótica Bovina que em seguida foi a óbito. Porém, devido ao polimorfismo encontrado entre os organismos observados ao exame hemoscópico, apenas a identificação do gênero foi possível.

Segundo Madella-Oliveira et al. (2005) a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, em 2004, estimou aproximadamente quatro milhões de bubalinos no país distribuídos em todos os estados brasileiros. Entretanto, o IBGE (2005) contou 1.173.629 cabeças de búfalos, sendo o estado do Pará o que possui a maior população com 466.210 cabeças.

Até o momento atual, não são encontradas informações sobre a frequência de infecção por *Borrelia* spp. em bubalinos bem como as possíveis implicações da borreliose nesses animais e sua capacidade como reservatório. De uma forma geral, muitos aspectos das doenças de búfalos não são conhecidos, e comumente, os procedimentos adotados para diagnóstico e controle da enfermidade em bubalinos são baseados no conhecimento que se tem da infecção em bovinos (MATHIAS et al., 1998). A possibilidade do aumento na exploração comercial de búfalos e o fato destes serem portadores de muitos parasitas de bovinos têm estimulado interesse científico sobre a sanidade bubalina (CHARLES; JOHNSON, 1972; MOHAN, 1968 *apud* CALLOW, 1976). Além disso, o conhecimento das peculiaridades sanitárias dos bubalinos, excepcionalmente dos animais jovens, é de fundamental importância para o êxito de sua criação (LAÚ, 1999).

2.4 Diagnóstico

Diagnóstico clínico de borreliose em animais domésticos é difícil devido aos sinais da enfermidade, quando ocorrem, não serem específicos. Em bovinos com claudicação e edema articular, por exemplo, outras causas devem ser consideradas além da borreliose de Lyme (BUSHMICH, 1994). Por isso, é complexo estabelecer uma clara definição de caso e o diagnóstico presuntivo desta enfermidade tem sido baseado em um conjunto de informações como histórico, vetores, sinais clínicos, sorologias e resposta a terapia (POST, 1990).

Isolamento de *Borrelia* spp. pode ser realizado em meios artificiais, como BSK, a partir de saliva, hemolinfa, tecidos de carrapatos, além de soro, fluidos corporais e tecidos de homens e animais, obtendo-se crescimento da espiroqueta à temperatura de 33°C em aproximadamente sete dias (ANDERSON, 1988; EWING et al., 1994; LANE et al., 1994; DICKINSON; BATTLE, 2000). No entanto há limitações, pois nem todas as espécies de *Borrelia* são de fácil cultivo ou ainda não são cultiváveis (SMITH; ROGERS, 1998; OLIVEIRA et al., 2004). A visualização destas espiroquetas pode ser realizada em

microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou em tecidos corados pela prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994). Segundo Hadani et al. (1985) a identificação de espécies de *Borrelia* baseada em características bioquímicas não é possível, pois não há diferença entre as espécies.

O diagnóstico de borreliose pode ser realizado por meio de esfregaços sanguíneos periféricos. No entanto, é necessário que o animal apresente uma alta espiroquetemia no momento da execução da técnica, o que não ocorre naturalmente na maioria das vezes (PÊSSOA, 1963). Conseqüentemente, análises laboratoriais são baseadas principalmente em técnicas imunológicas (MAGNARELLI et al., 2004).

Cada método de detecção de anticorpos tem vantagens e desvantagens quanto à sensibilidade, especificidade, facilidade de padronização e custo (MAGNARELLI et al., 2004). Em todas as regiões onde se tem relatado a borreliose de Lyme, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto tem sido utilizado para diagnóstico e levantamentos epidemiológicos, representando a principal ferramenta imunológica, devido às suas sensibilidade e especificidade altas (MAGNARELLI et al., 1987; SOARES et al., 2000). Contrariamente, kits ELISA comerciais para diagnóstico não conferem resultados fiéis a realidade, devido à variação antigênica fisiográfica, além de fatores físico-químicos (CALLISTER et al., 1990 *apud* SOARES, 2000).

Outras técnicas sorológicas como a IFI e o western blotting podem ser utilizadas para o diagnóstico de borrelioses. A IFI é uma prova subjetiva que pode ser usada para triagem ou ocasionalmente, quando dados clínicos e epidemiológicos fortalecem o diagnóstico (BENNETT, 1995), porém o ELISA indireto a supera quanto à especificidade, sensibilidade e operacionalidade (MAGNARELLI et al., 1984). O western blotting possui alto custo de realização e tem sido empregado secundariamente para definição do resultado junto ao ELISA (ENGSTROM et al., 1995; SOOD et al., 1995; MAGNARELLI et al., 2004), pois é mais sensível e específico (DRESSLER et al., 1993).

A biologia molecular é outra ferramenta de diagnóstico que vem crescentemente sendo utilizada no estudo de diversas enfermidades incluindo as borrelioses. A PCR garante resultado bastante específico, pois se baseia na amplificação do DNA do agente pesquisado, se apresentando como o mais preciso dos ensaios. Essa técnica tem sido empregada em fluidos e tecidos de humanos e animais e fragmentos de carrapatos (LIENBLING et al., 1993; MOTER et al., 1994; ZBINDEN et al., 1994), porém sua principal desvantagem é o custo elevado (SOARES et al., 2000).

A descoberta da etiologia da borreliose de Lyme tem promovido estudos sobre a reatividade cruzada entre membros dos gêneros *Borrelia*, *Leptospira*, e *Treponema* em testes sorológicos, como foi reportado por Magnarelli et al. (1987). Reações cruzadas entre *Borrelia* sp. e *Leptospira* sp. têm sido relatadas em algumas variantes sorológicas, entretanto em números não significativos (MAY et al., 1990; JOBERT, 1995; ISHIKAWA, 1996). No Brasil, o uso do teste ELISA indireto para estudos soropidemiológicos de borreliose em animais (SOARES et al., 1999; SALLES et al., 2002), não evidenciaram reações cruzadas entre esses dois gêneros de espiroquetas.

Segundo Rogers et al. (1999) reações cruzadas devem ser levadas em conta quando for feito sorodiagnóstico de borreliose de Lyme ou aborto epizoótico bovino em estudos epidemiológicos envolvendo bovinos, pois observaram que bezerros infetados com *B. theileri* produzem anticorpos que reagem contra antígenos totais de *B. burgdorferi* e *B. coriaceae*, quando usado o teste de IFI, porém com títulos de anticorpos mais baixos do que quando usado *B. theileri* como antígeno. No entanto, reações falso-positivas não foram encontradas quando usado teste ELISA, que consistia em um kit comercial para infecção por *B. burgdorferi* em cães (ROGERS et al., 1999).

Na pesquisa de anticorpos contra *Borrelia* spp. por meio do ELISA indireto podem ser usados diversos tipos de antígeno, como o extrato de célula total sonicada (GORDILLO et al., 1999), proteínas recombinantes (WILSKE et al., 1999) e peptídeos (CRAFT et al., 1986). Espiroquetas íntegras também podem ser usadas, porém têm demonstrado resultado inferior (BENNETT, 1995; OKSI et al., 1995). Segundo Soares et al. (2000) o ensaio deve ser padronizado para cada laboratório com padrões de controle adequados, com o título mínimo e linha de corte (cut-off) seguros.

Antígeno de célula total de *B. burgdorferi* tem sido usado em imunofluorescência direta, imunoblotting e ELISA em estudos com bovinos (BURGESS et al., 1987) e é o tipo de antígeno mais comumente usado nos estudos sorológicos. O uso de proteínas recombinante altamente específicas como as de peso molecular de 31 kDa (OspA), 34 kDa (OspB) e 110kDa em teste ELISA tem melhorado a sensibilidade e especificidade da detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* em humanos, cães e eqüinos (GREENE et al., 1988; CAPUTA et al., 1991; MAGNARELLI et al., 1997), porém há pouca informação disponível sobre o desempenho e adequabilidade do ELISA com antígenos recombinante para estes animais (MAGNARELLI et al., 2004).

Magnarelli et al. (2004) com o objetivo de comparar os resultados do teste ELISA usando antígenos recombinantes e célula total de *B. burgdorferi* observaram que o número de soros positivos detectados pelo ELISA com antígenos recombinante foi marcadamente menor e afirmaram que o uso de antígeno de células totais é mais prático para iniciar a pesquisa em grande número de soros bovino. No mesmo estudo foram conduzidos testes para avaliar reprodutibilidade e especificidade do ELISA e os resultados de soropositividade foram altamente reprodutíveis, sem considerar os antígenos usados. O uso de células totais como antígeno aumentou a sensibilidade do teste, porém a especificidade foi menor.

O ELISA indireto para bubalinos apresenta um problema devido não haver comercialmente disponível conjugado anti-IgG bubalina. Porém, baseados na estreita relação filogenética entre bovinos e búfalos (TOSI et al., 1973 *apud* CALLOW et al., 1976), Callow et al. (1976) observaram homologia entre imunoglobulinas de ambas as espécies, particularmente IgG, demonstrando que tanto o conjugado bovino quanto o bubalino poderia ser utilizado com boa sensibilidade e especificidade, corroborando as recomendações oficiais da Organização Mundial de Saúde Animal (CORBEL; MACMILLAN, 1996).

Desta forma, a técnica de ELISA indireto empregando conjugado bovino já foi usada para detecção de anticorpos bubalinos em diversos estudos sorológicos, como por exemplo, para pesquisa de anticorpos contra *Listeria monocytogenes*, vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e diarréia viral bovina, entre outros (MOLNÁR et al., 2001; SILVA et al., 2001; BARBUDDHE et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos Soros

Foram coletados soros de 491 búfalos jovens e adultos, aparentemente sadios e predominantemente da raça Murrah. Destes, 284 eram provenientes do município de Cachoeira do Arari, na Ilha de Marajó, e 207 de quatro municípios situados na porção continental do estado do Pará, sendo 66 animais de Castanhal, 22 de Santa Isabel, 63 de Santarém Novo e 55 de Nova Timboteua (**Figura 1**).

O sangue dos animais foi coletado de forma asséptica, por venopunção jugular em tubos sem anticoagulante. Após a coagulação as amostras foram centrifugadas e os soros obtidos foram aliquotados em tubos *ependorf* e armazenados a -20°C até o momento da análise sorológica.

Os soros dos animais foram coletados e aliquotados pela equipe da Central de Diagnóstico Veterinário – CEDIVET da Universidade Federal do Pará (UFPA), campus Castanhal. A coleta foi realizada segundo amostragem por conveniência, baseada na primeira observação de *Borrelia* sp. feita no município de Castanhal e na proximidade e fácil acesso às criações de bubalinos existentes neste e nos demais municípios estudados.

Após a coleta os soros foram encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Projeto Sanidade Animal, convênio Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)/EMBRAPA, onde foram realizadas as análises laboratoriais.

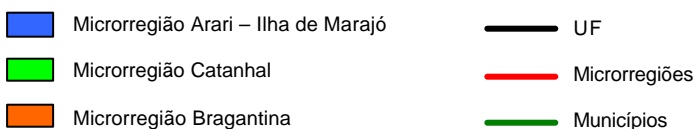
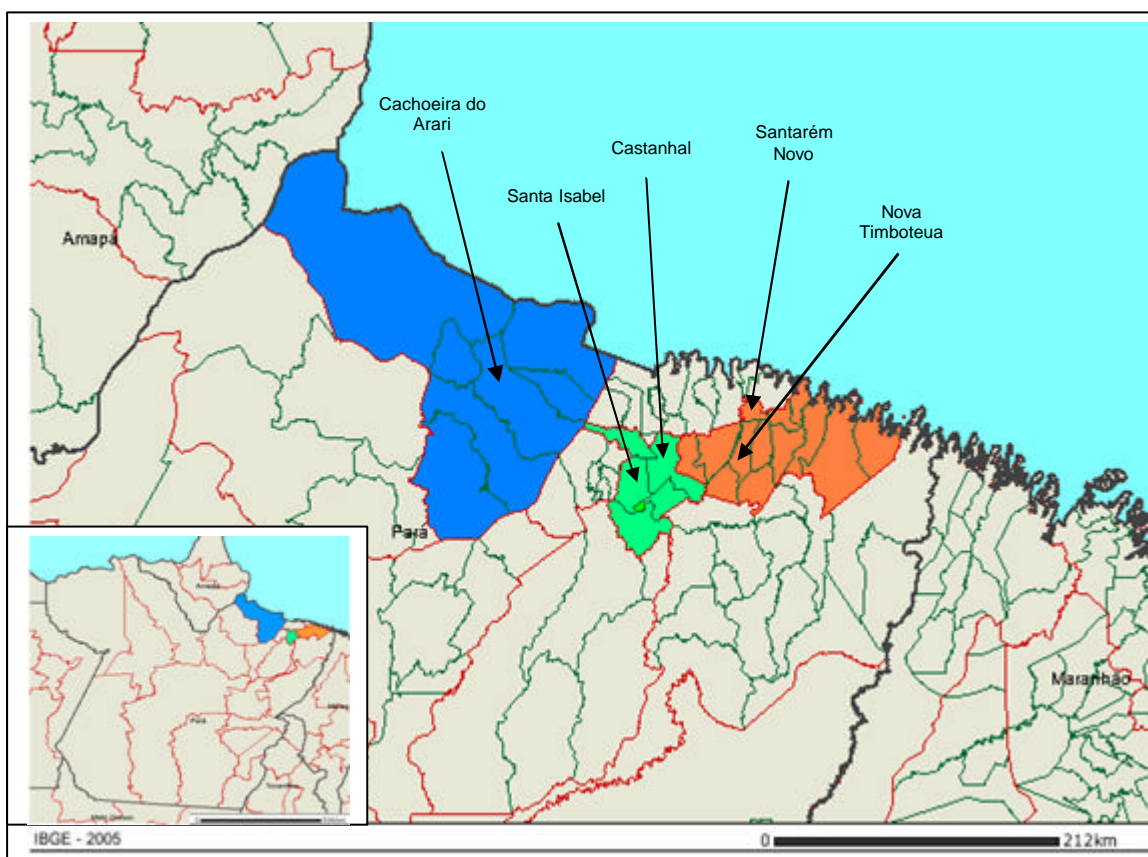


Figura 1. Mapa do Estado do Pará dividido em microrregiões e municípios.

3.2 Obtenção do Antígeno

Para produção do antígeno de *B. burgdorferi* foram utilizados o meio BSK (Sigma Chemical), e a cepa G39/40 de *B. burgdorferi sensu stricto* de origem americana, gentilmente cedida pelo Laboratório de Integração Artrite e Microrganismo - Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, 1,0 mL de cultura da cepa foi acrescido a 500 mL do meio BSK, mantendo-o em estufa a 33 °C por 7 dias. Após o crescimento, o meio foi centrifugado (12.000xg/20 min. a 4 °C) e o “pellet” formado foi lavado em tampão salino fosfatado (PBS) 0,001M MgCl₂.6H₂O pH 7,4. O procedimento de centrifugação e lavagem foi repetido por mais duas vezes e finalmente o sedimento obtido foi suspenso em 6,0 mL da mesma solução. Esta suspensão foi submetida à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, model 300, Dynatech) por 10 minutos, com intervalos de 30 segundos a cada seção de 30 segundos de sonicação e posteriormente filtrada a 0,45 µm, obtendo-se assim o extrato total de antígeno para uso nos

procedimentos de ensaios imunológicos, o qual foi armazenado a -20°C até o momento de uso como sugeriu Grodzicki e Steere (1988).

A concentração protéica do extrato total do antígeno foi dosada através da técnica do reagente de Folin, segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

Todos os procedimentos para produção do antígeno de *B. burgdorferi* foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias do Projeto Sanidade Animal, convênio UFRRJ/EMBRAPA.

3.3 Obtenção do Controle Positivo

Como controle positivo do teste foi utilizado soro positivo bovino para *B. burgdorferi* produzido no Laboratório de Doenças Parasitárias do Projeto Sanidade Animal, convênio UFRRJ/EMBRAPA a partir da inoculação experimental de uma bezerra de 50 dias de idade, sadia, 36 Kg de peso vivo, originário do setor de reprodução animal, Instituto de Zootecnia, da UFRRJ, segundo Ishikawa (1996).

3.4 Obtenção dos Controles Negativos

Como controles negativos foram utilizados 12 soros de bubalinos gentilmente cedidos pela EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas - Rio Grande do Sul, proveniente de animais da raça Murrah, criados em área isolada do convívio com outros animais, aparentemente saudáveis e sem histórico de carrapatos. Os soros foram coletados, aliquotados e armazenados conforme descrito no item 3.1.

Para comprovar a negatividade os soros foram diluídos a 1:400 em PBS Tween 20 0,05% pH 7,4 e submetidos ao teste ELISA indireto descrito por Ishikawa (1996). Foi utilizado como controle positivo o soro positivo bovino citado no item 3.3.

Estes soros foram utilizados para definir o “cut off” do ensaio, discernindo os animais positivos e negativos com margem de acerto de 99,0%, segundo metodologia descrita por Frey et al. (1998), sendo a fórmula matemática expressa como o desvio-padrão multiplicado por um fator que é baseado no número de controles negativos e no intervalo de confiança:

$$\text{Cutoff} = \bar{X} + SD \sqrt{1 + (1/n)}$$

\bar{X} = média das densidades ópticas dos controles negativos.

SD = desvio padrão das densidades ópticas dos controles negativos.

n : número de controles negativos.

3.5 Adaptação do Teste ELISA Indireto Padronizado para Bovinos à Pesquisa de Anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em Búfalos

Anteriormente as análises sorológicas para pesquisa de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* em búfalos se fez necessário estabelecer qual diluição de antígeno, de soro e de conjugado concediam maior clareza aos resultados obtidos por meio do teste ELISA indireto.

Para isso foi sensibilizada uma placa de ELISA com três diferentes diluições de antígeno (10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL) e utilizadas duas diferentes diluições de soro

(1:400; 1:800) e duas diferentes diluições de conjugado (1:5000; 1:10000), como mostra o esquema representado na **Quadro 1**.

Os resultados em densidades ópticas obtidos após a leitura em espectrofotômetro foram cruzados para verificar qual combinação entre diluição do antígeno, do soro e do conjugado fornecia maior diferença entre as densidades ópticas dos soros positivos e negativos.

Quadro 1. Esquema da placa de ELISA utilizada para adaptação do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em búfalos

Padronização													Conjugado		
Soro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1 : 400	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	1: 5000		
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-			
1 : 800	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+		1: 10000	
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-			
1 : 400	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+			1: 10000
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-			
1 : 800	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	1: 10000		
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-			
Antígeno	10µg/ml				15µg/ml				20µg/ml						

A+ e B+: soros positivos bovino

C- e D-: soros negativos bubalino

3.6 ELISA Indireto

O teste sorológico utilizado foi o ELISA indireto padronizado por Ishikawa (1996) para bovinos com as modificações obtidas no item anterior. Neste ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (Costar ®) sensibilizadas com o antígeno de *B. burgdorferi sensu stricto* cepa G39/40 diluído a 20 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas durante 12 horas em câmara úmida à 4°C.

Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 à 0,05% pH 7,4 (Tw20) e bloqueadas com gelatina a 1% em PBS Tw20 e incubadas por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas novamente as três lavagens da placa.

Os 12 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:400 em PBS Tw20 e dispostos nas placas, que foram incubadas por 90 minutos em câmara úmida e, posteriormente lavadas como na etapa anterior. Então, foi disposto o conjugado IgG de coelho anti IgG bovina ligado a fosfatase alcalina (SIGMA Chemical) na diluição de 1:5000 em PBS Tw20 com mais 1 hora de incubação nas mesmas condições anteriores e seguida das lavagens das placas.

Após esta última incubação foi empregado o substrato revelador do teste para-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) (SIGMA Chemical) diluído em tampão glicina pH 10,5 na concentração de 1 µg/mL. Em seguida as placas foram lidas em espectrofotômetro para

microplacas de 96 orifícios (Labsystems iEMS Reader MF) sob comprimento de onda de 405nm. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200 µL de solução por orifício.

3.7 Análise Estatística

Para comparação entre número de animais positivos provenientes da Ilha de Marajó e porção continental do estado foi utilizado o teste de Mantel-Hanszel para razão de chances comum e para observação das possíveis semelhanças entre os cinco municípios, foi realizado teste de Análise de Correspondência (Vernables & Ripley, 2002) para formação de grupos semelhantes quanto à ocorrência da doença. O software utilizado foi o R.2.4.1 (R Development Core Team-2006). Os gráficos foram produzidos utilizando o programa computacional Microsoft Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modificações do teste ELISA indireto

A concentração de antígeno que forneceu melhores resultados na presente pesquisa foi de 20 µg/mL, diferindo do padrão estabelecido para bovinos (15 µg/mL) segundo Ishikawa (1996). As diluições de soro e conjugado de 1:400 e 1:5000 respectivamente, em conjunto com a melhor concentração de antígeno encontrada forneceram uma maior diferença (3,2 vezes) entre as densidades ópticas observadas nos soros positivos e negativos e foram usadas como padrão neste trabalho.

Em estudos sorológicos de *B. burgdorferi* encontrados na literatura a diluição de conjugado encontrada foi de 1:1000 (ISHIKAWA, 1996; 2000; SOARES et al., 1999; SALLES, 2002; MADUREIRA, 2004; GALO, 2006; GUEDES JÚNIOR, 2006), no entanto, no presente trabalho o uso desta concentração implicou em reação muito rápida exigindo instantânea leitura das placas. Além disso, o uso do conjugado mais diluído contribui para redução do custo do teste.

4.2 Frequência de anticorpos homólogos contra *B. burgdorferi*.

A análise soroepidemiológica das 491 amostras de soros bubalino revelou que 412 possuíam anticorpos homólogos da classe IgG anti-*B. burgdorferi*, portanto, positivas ao teste ELISA indireto (**Figura 2**). A alta frequência de búfalos soropositivos para *B. burgdorferi* encontrada neste estudo (83,91%) se destaca entre os valores observados na maioria dos trabalhos já realizados com animais domésticos.

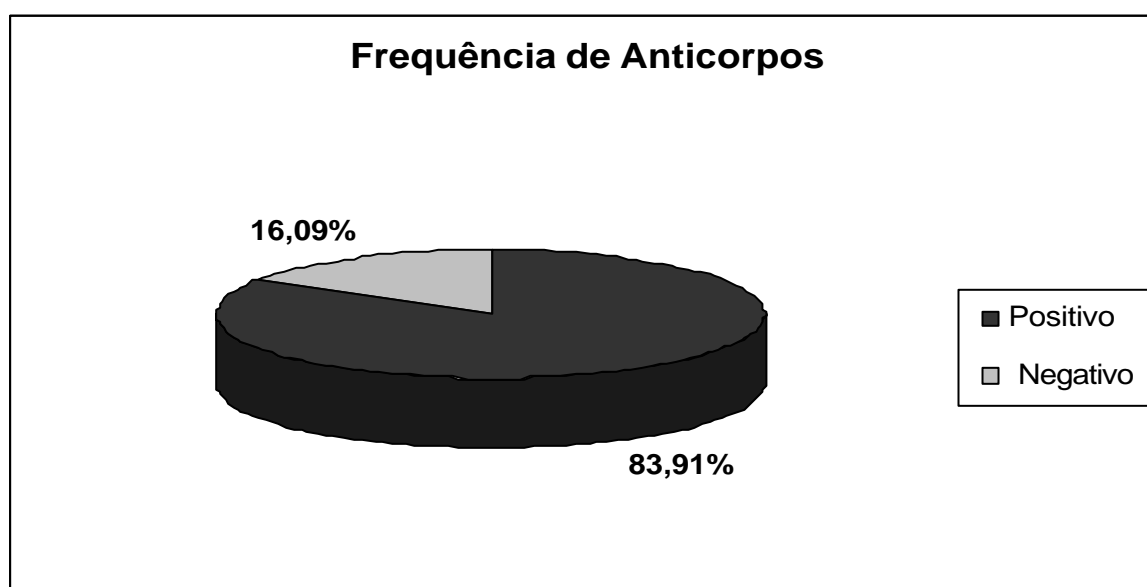


Figura 2. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*) dos municípios de Cachoeira do Arari, Castanhal, Santa Isabel, Nova Timboteua e Santarém Novo, estado do Pará, analisados pelo teste ELISA indireto.

Estudos sorológicos para *B. burgdorferi* em outros animais domésticos conduzidos no estado do Rio de Janeiro revelaram positividade em 20,0% dos cães da Baixada Fluminense (SOARES et al., 1999); assim como em 42,9% e 28,1% dos eqüinos de diferentes regiões, segundo Salles et al. (2002) e Madureira (2004) respectivamente. No estado do Pará, Galo (2006) encontrou 26,8% de eqüinos positivos para *B. burgdorferi* na mesorregião metropolitana de Belém. Porém, estudos soroepidemiológicos conduzidos em bovinos de diferentes estados do país revelaram freqüências variadas de animais positivos. Ishikawa (1996) observou 36,0% (36/100) de bovinos positivos em São Paulo, 59,6% (224/376) no Rio de Janeiro e 86,0% (32/37) no Espírito Santo. Guedes Júnior (2006) encontrou 54,9% de sorologia positiva em bovinos dos municípios de Castanhal e São Miguel do Guamá, estado do Pará. De uma forma geral, estudos sobre *B. burgdorferi* em bovinos no Brasil demonstram soropositividade acima de 50%.

A flutuação entre altas e baixas freqüências de animais soropositivos para *B. burgdorferi* pode estar relacionada a diversos fatores que implicam em características variadas de acordo com as regiões. Entre esses fatores destacam-se, a existência de ecossistemas distintos com diferentes espécies, genoespécies e cepas de *Borrelia* spp.; a presença de carrapatos vetores e a interação vetor-patógeno (BARATON et al., 1992; COYLE, 1993; YOSHINARI et al., 1997), além de fatores intrínsecos aos hospedeiros e o manejo ao qual os animais são submetidos. Esta situação acentua a necessidade de estudos fisiográficos que estabeleçam a situação regional do agente etiológico (SOARES et al., 2000), sendo os animais domésticos competentes reservatórios de *B. burgdorferi* no ambiente domiciliar (MATHER et al., 1994).

Como a transmissão de *Borrelia* spp. ocorre principalmente pela picada do artrópode vetor (HOOGSTRAAL, 1979; STEERE et al., 1983), a freqüência de animais soropositivos depende fundamentalmente da população de seus vetores. Salles et al. (2002) em seu estudo com eqüinos comparou animais mantidos sob diferentes tipos de sistemas de controle de carrapatos e encontrou claramente relação entre a produção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* e histórico de contato com carrapatos. Entre os animais com alta infestação por carrapatos, 42,9% apresentaram-se reagentes ao ELISA indireto, em contraste com 0,9% de soropositivos entre animais que viviam sob controle rigoroso de ectoparasitos. A positividade dos animais foi confirmada pela formação de bandas no western blotting, onde soros dos eqüinos provenientes de áreas com alto índice de infestação por carrapatos apresentaram número de positivos compatíveis com os resultados observados no teste ELISA. A análise dos resultados permitiu também considerar a existência de similaridades entre a cepa padrão G39/40 de *B. burgdorferi* utilizada como antígeno e o espiroquetídeo de eqüinos no Brasil.

Não foi evidenciada, neste trabalho, diferença estatística significativa entre os animais positivos provenientes da microrregião Arari, na Ilha de Marajó (81,69%) e das microrregiões Castanhal e Bragançã (86,96%) localizadas na porção continental do estado do Pará (**Tabela 1**). Inicialmente, foi suposto que poderia ser encontrada uma menor freqüência de anticorpos no município de Cachoeira do Arari devido à localização deste ser na Ilha de Marajó e, conseqüentemente, a infestação por carrapatos neste ambiente seria menos comum. Contudo, tráfego de animais ocorre entre as duas regiões (ilha-continente) e são observados bubalinos infestados por carrapatos, principalmente *B. microplus*, entre os animais que vivem na Ilha.

Tabela 1. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos quanto à região de origem dos animais, Ilha de Marajó ou porção continental do estado do Pará, determinada pelo ELISA indireto.

	Local de Origem (n=491)			
	Ilha de Marajó*		Continente*	
	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto
Positivo	81,69%	47,25%	86,96%	36,66%
	(232/284)	(232/491)	(180/207)	(180/491)
Negativo	18,31%	10,59%	13,04%	5,50%
	(52/284)	(52/491)	(27/207)	(27/491)
Total	100%	57,84%	100%	42,16%
	(284/284)	(284/491)	(207/284)	(207/491)

* Não houve diferença significativa, segundo o teste de Mantel-Hanszel.

Os bubalinos utilizados no presente trabalho pertenciam a fazendas de criação mista (bovinos x bubalinos), e foram relatadas freqüentes infestações por carrapatos pelos proprietários ou trabalhadores das fazendas. Na **Figura 3**, está registrada a alta infestação por larvas e ninfas de *B. microplus* no pavilhão auricular de um búfalo nativo do município de Castanhal. Na maioria das propriedades em que os soros de búfalos foram coletados não havia controle preventivo eficiente contra carrapatos. Sendo que na Ilha de Marajó não era feito controle algum.

Quanto à freqüência de soropositivos por município estudado (**Tabela 2**), a análise de correspondência indicou a formação de três grupos, sendo um grupo formado pelos municípios de Cachoeira do Arari e Castanhal, o segundo formado pelos municípios de Nova Timboteua e Santarém Novo e o terceiro, apenas pelo município de Santa Isabel. Os grupos foram formados com base na semelhança entre os números de casos positivos e negativos. O município de Santa Isabel apresentou estatisticamente menor freqüência de anticorpos em relação aos outros quatro municípios, possivelmente devido à interferência do pequeno tamanho amostral obtido. Este resultado é ilustrado na **Figura 4**.



Figura 3. Infestação por *Boophilus microplus* no pavilhão auricular de búfalo nativo do município de Castanhal - PA.

Tabela 2. Frequência sorológica de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos por município de origem dos animais, determinada pelo ELISA indireto.

Município de Origem (n=491)										
	Cachoeira do Arari		Castanhal		Santa Isabel		Nova Timboteua		Santarém Novo	
	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto
Positivo	81,69%	47,25%	86,36%	11,61%	63,64%	2,85%	92,86%	10,59%	90,48%	11,61%
	(232/284)	(232/491)	(57/66)	(57/491)	(14/22)	(14/491)	(52/56)	(52/491)	(57/63)	(57/491)
Negativo	18,31%	10,59%	13,64%	1,83%	36,36%	1,63%	7,14%	0,82%	9,52%	1,22%
	(52/284)	(52/491)	(9/66)	(9/491)	(8/22)	(8/491)	(4/56)	(4/491)	(6/63)	(6/491)
Total	100,00%	57,84%	100,00%	13,44%	100,00%	4,48%	100,00%	11,41%	100,00%	12,83%
	(284/284)	(284/491)	(66/66)	(66/491)	(22/22)	(22/491)	(56/56)	(56/491)	(63/63)	(63/491)

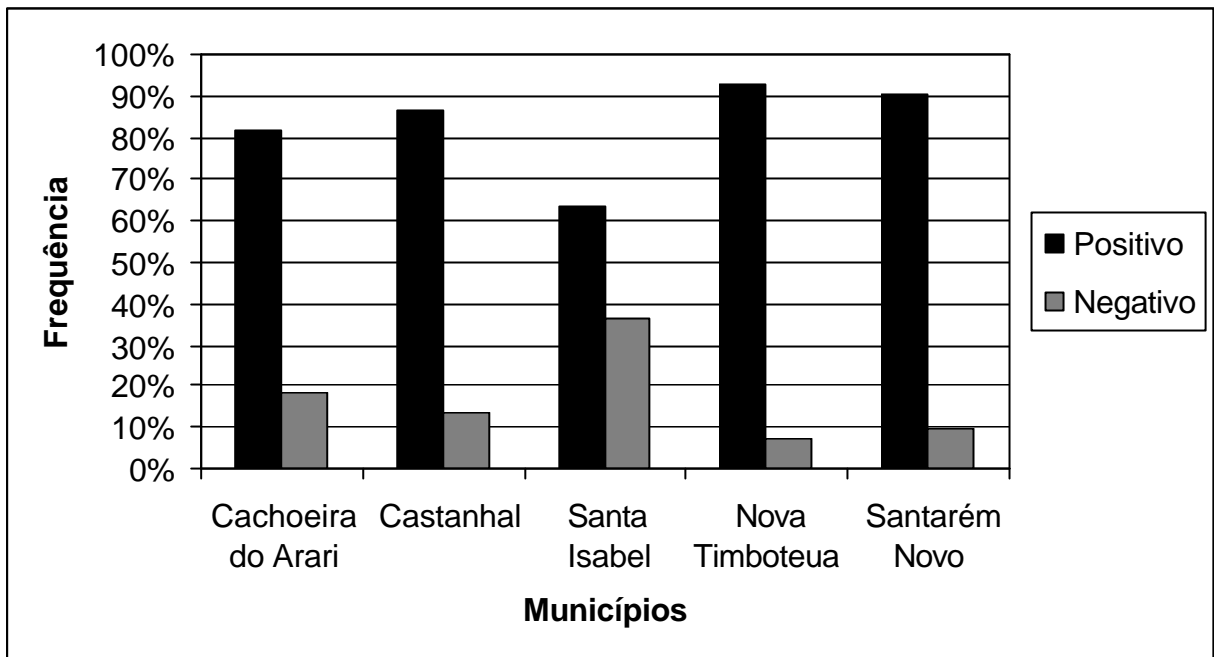


Figura 4. Frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*) por município, analisados pelo teste ELISA indireto.

O teste ELISA indireto, aplicado neste estudo, é relativamente rápido, de baixo custo e eficiente para uso em estudos soropidemiológicos de borrelioses em animais. Segundo Yoshinari et al. (1995), o ELISA indireto é muito útil no monitoramento de pacientes quando o resultado revela-se positivo para a doença. Ensaio sorológico compreendem uma importante ferramenta para o conhecimento da epidemiologia das borrelioses em diferentes regiões, e o teste ELISA com antígeno de célula total tem mostrado maior praticidade para uma triagem inicial de um grande número de indivíduos (MAGNARELLI et al., 2004).

No Brasil, a ausência do isolado autóctone de espiroquetas do gênero *Borrelia* dificulta a interpretação dos testes sorológicos que são executados em laboratório com cepas estrangeiras. Neste estudo, foi utilizada a cepa G39/40 de *B. burgdorferi* de origem norte americana, com a finalidade de obter o antígeno total sonificado empregado no ensaio sorológico. O Brasil possui dimensões continentais e por isso as chances de serem encontradas diferentes espécies de *Borrelia* causando enfermidade são grandes, principalmente devido à migração de animais e diferentes ecossistemas (YOSHINARI et al., 1997).

Diferentes espécies de *Borrelia* têm sido descritas em todos os continentes, e os resultados sorológicos mais expressivos são obtidos com as espécies regionais. Conforme relatam Yoshinari et al. (1997), os estudos sorológicos realizados no Brasil sugerem a existência de outra(s) espécie(s) de *Borrelia* em nosso meio, pois observaram que quando cepas européias de *B. garinii* e *B. afzelii* e a cepa americana de *B. burgdorferi* foram utilizadas como antígenos em ensaio sorológico os resultados obtidos foram próximos. Além de que, ao realizarem PCR com primer de *B. burgdorferi* nas culturas de cepas européias e em

soros de humanos, de animais e carrapatos do Brasil, observaram resultados negativos. Só foi observado ocorrer positividade com *B. burgdorferi*. Desta forma, os autores demonstraram alta especificidade do primer empregado e a necessidade de isolamento da espécie de *Borrelia* nacional, sugerindo que esteja ocorrendo reatividade cruzada entre a cepa brasileira e *B. burgdorferi*, de modo que os resultados sorológicos são semelhantes e paralelos, porém de menor intensidade imunológica.

Em ruminantes, *B. burgdorferi*, *B. theileri* e *B. coriaceae* têm sido reportadas e a coincidente distribuição geográfica de seus vetores e hospedeiros vertebrados torna importante a distinção entre estes microrganismos (SMITH; ROGERS, 1998; ROGERS et al., 1999). *Borrelia theileri* pode ser especialmente importante neste contexto, pois pode ser rapidamente transmitida entre herbívoros mantendo-se freqüentemente na forma subclínica (ROGERS et al., 1999), podendo atuar como agente agravante de outras enfermidades (IRVIN et al., 1973; SMITH et al., 1985).

Embora *B. theileri* cause doença pouco severa em bovinos seu diagnóstico diferencial é de suma importância, pois esta espiroqueta é potencialmente confundível com os agentes da borreliose de Lyme (ROGERS et al., 1999) e Lyme *simile* em estudos sorológicos (FONSECA et al. 2005). Segundo Barbour e Hayes (1986), provavelmente a reação cruzada entre essas espécies é, em parte, devida ao compartilhamento do antígeno flagelar 41kDa, gênero específico de *Borrelia*, portanto, não compartilhado com *Leptospira* ou *Treponema*. Ji et al. (1994) também reportaram reação cruzada para antígeno flagelar de 41 kDa de *B. burgdorferi* e *B. coriaceae* em teste ELISA usando soro bovino infectado com *B. theileri*.

Rogers et al. (1999) observaram que bezerros infectados com *B. theileri* produzem anticorpos que fazem reação cruzada com antígenos totais de *B. burgdorferi* e *B. coriaceae*, quando usado o teste de IFI, porém reações falso-positivas não foram encontradas quando usado teste ELISA. Contudo, os autores citam a hipótese de que, embora célula total sonicada de *B. burgdorferi* tenha sido usada como antígeno em ambos os testes, é possível que na formulação do kit ELISA comercial foram empregadas pequenas concentrações de proteínas flagelares comuns entre as espécies de *Borrelia* sp., ou que estas proteínas não tenham se ligado aos anticorpos de captura. Desta forma, foi ressaltada a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas em locais onde esses agentes coexistam, principalmente quando envolve o uso do extrato de célula total de *B. burgdorferi*.

Relações genéticas entre *B. theileri* e outras espécies de *Borrelia* vêm também sendo explorada. Fragmentos altamente conservados de flagelina e gene 16S rDNA de *B. burgdorferi*, *B. theileri*, entre outras espécies, têm sido amplificados, seqüenciados e comparados (ARMSTRONG et al., 1996 *apud* RICH et al., 2001). A estreita associação filogenética entre *B. theileri* e outras espiroquetas do gênero *Borrelia* responsáveis pelas manifestações clínicas de borreliose de Lyme em todo mundo (RICH et al., 2001) corroboram com a possibilidade de reações cruzadas entre esses agentes.

Além da reatividade cruzada, Hadani et al. (1985) relatam que as espécies de *Borrelia* spp sofrem variações antigênicas que podem dificultar a identificação sorológica em nível de espécie. Liang et al. (2004) também demonstraram que *B. burgdorferi* muda a expressão de sua superfície antigênica em resposta ao ataque imune. Entretanto, pouco se sabe sobre como este microrganismo extracelular sobrevive ao hostil ambiente imune durante a infecção em mamíferos.

Em ensaios sorológicos no Brasil, reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *B. theileri* não podem ser descartadas, uma vez que *B. theileri* é um espiroquetídeo que acomete comumente bovinos e eqüinos, tendo como principal vetor o carrapato *B. microplus*, disseminado em todo o país. Ishikawa (2000) levanta esta hipótese ao encontrar alta prevalência de bovinos positivos nas mesorregiões do Norte Fluminense e Médio Paraíba do estado do Rio de Janeiro, observando respectivamente 69,7% e 75,4% de animais com

anticorpos homólogos contra *B. burgdorferi*. Além disso, percebeu que as porcentagens mais altas de animais positivos se encontravam entre os que possuíam alto índice de infestação por carrapatos, particularmente *B. microplus*. No Rio Grande do Sul, Martins et al. (1996) optaram por diagnosticar como *B. theileri* os microorganismos espiralados identificados em carrapatos da espécie *B. microplus*, seguindo os achados de alguns autores e levando em consideração o carrapato vetor e as características morfológicas das espiroquetas encontradas.

É importante considerar que, assim como descrito para bovinos, possa ocorrer reação cruzada entre as espécies de *Borrelia* que possivelmente acometem bubalinos. No entanto, não foram encontradas informações sobre borreliose nestes animais além do relato de Scofield et al. (2005) sobre a ocorrência de espiroquetas morfométricamente sugestivas de *B. theileri* em um búfalo fêmea do município de Castanhal, estado do Pará.

Pesquisas soropidemiológicas em animais têm demonstrado não haver relação entre anticorpos contra *B. burgdorferi* e *Leptospira* sp. que leve a reação cruzada e nos casos em que foi registrada não mostrou ser significativa (MAGNARELLI et al., 1984; MAY, 1990; JOPPERT, 1995; BENNETT, 1995; ISHIKAWA, 1996; SOARES et al., 1999). Magnarelli et al. (1987) observaram que em 15 soros positivos para *Treponema* sp. três reagiram ao antígeno de *B. burgdorferi* e em 17 soros positivos para *Leptospira* nenhuma reação ocorreu. Porém, em 22 soros positivos para outras espécies de *Borrelia*, dez foram positivos para *B. burgdorferi*. Posteriormente, Magnarelli e Anderson (1998) reportaram que reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *Treponema* sp. não são significativas.

Reação cruzada entre *B. burgdorferi* e *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* não é observada (ISHIKAWA, 2000). Alta especificidade (97%) foi encontrada quando 16 soros bovinos contendo anticorpos contra *L. interrogans*, *Brucella* sp., *A. marginale* ou *A. phagocytophilum* foram testados pelo ELISA com células total ou antígeno recombinante de *B. burgdorferi* (MAGNARELLI et al., 2004).

A inexistência de um ensaio sorológico mais específico, que faça distinção entre espécies de *Borrelia* que acometem ruminantes no Brasil, aponta para a necessidade de se buscar isolados autóctones, apesar das dificuldades de isolamento e cultivo. Segundo Magnarelli et al. (2004), o uso de antígenos recombinantes em testes ELISA tem melhorado a sensibilidade e especificidade da detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* em humanos, cães e equinos. Porém este método deve ser aperfeiçoado, pois observaram que há um padrão variável de reatividade para cada antígeno recombinante, provavelmente devido à diferenças na resposta imune do hospedeiro para proteínas chave imunodominantes, ou devido, em parte, o agente variar suas proteínas antigênicas de superfície como forma de evadir-se da resposta imune (LIANG et al., 2004).

O uso de conjugado bovino para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG de búfalos mostrou-se eficiente. No entanto, deve ser considerado que apesar da semelhança entre imunoglobulinas de ambas as espécies a resposta imune de búfalos e bovinos podem ser diferentes em intensidade, duração ou desenvolvimento. Isso explica o porquê dos soros bubalinos analisados neste estudo não terem sido titulados uma vez que foi usado um padrão de positivo bovino.

Os resultados de testes sorológicos podem ser afetados também pelas diferenças quanto à persistência de anticorpos, como resultado de uma única ou múltipla infecção ao longo do tempo. Sabe-se que em bovinos com sinais de manqueira, anticorpos contra *B. burgdorferi* persiste por até oito meses (WELLS et al., 1993). Não está claro, porém, como que cada classe específica de imunoglobulina é produzida em resposta a cada patógeno após a exposição a carrapatos infectados. Nem tampouco se sabe ao certo como os anticorpos persistem em bovinos com doença subclínica. Estudos devem ser feitos para melhor caracterizar a resposta humoral e para determinar mudanças na concentração de anticorpos

IgM e IgG em ruminantes durante muitas semanas ou meses de doença subclínica ou clínica (MAGNARELLI et al., 2004).

Apesar da pouca informação disponível sobre a imunidade de bubalinos existem relatos de diferenças entre as respostas produzidas por bovinos e búfalos. Bubalinos, de uma forma geral, são considerados mais resistentes a enfermidades que bovinos, porém existem exceções como ocorre, por exemplo, em infecções por *Pasteurella multocida* que afeta mais gravemente búfalos do que bovinos, podendo levá-los a septicemia hemorrágica (SINGH et al., 1995). No Brasil, há pouca informação sobre hemoparasitos em bubalinos, que de uma forma geral é uma espécie pouco estudada. Este trabalho constitui um passo inicial no estudo sobre *Borrelia* sp. nesses animais, sobre os quais as possíveis implicações deste agente ainda são desconhecidas.

5 CONCLUSÕES

As modificações inseridas no teste ELISA indireto padronizado para bovinos, tornaram o ensaio satisfatório para detecção de anticorpos do tipo IgG anti-*B. burgdorferi* em búfalos (*B. bubalis*).

Búfalos dos municípios de Cachoeira do Arari na Ilha de Marajó, Castanhal, Santa Isabel, Nova Timboteua e Santarém Novo, estado do Pará são frequentemente infectados por microrganismos do gênero *Borrelia*.

A alta frequência de animais soropositivos encontrada, a presença do carrapato vetor *B. microplus* e a ocorrência de búfalo infectado com *Borrelia* sp. na região, sugerem reação cruzada entre a cepa G39/40 de *B. burgdorferi*, usada como antígeno no teste ELISA e a espécie de *Borrelia* que infecta búfalos no estado do Pará.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia county, state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 5, p. 621-624, 2000.
- ANDERSON, J. F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 25, n. 8, p. 1495-1497, 1988.
- APPEL, J. F. Lyme disease in dogs and cats. *The Compendium*, v. 12, n. 5, p. 617, 1990.
- APPEL, M. J. G.; ALLAN, S.; JACOBSON, R. H.; LAUDERDALE, T. L.; CHANG, Y. F.; SHIN, S. J.; THOMFORD, J. W.; TODHUNTER, R.J.; SUMMERS, B. A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 167, p. 651-664, 1993.
- AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbon dioxide in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 1103-1110, 1993.
- AZUMA, Y.; ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; KAWAMURA, K. Canine disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *The Veterinary Record*, v. 134, p. 369-372, 1994.
- AZULAY, R. D.; AZULAY-ABULAFIA, L.; SODRÉ, C. T.; AZULAY, D. R.; AZULAY, M. M. Lyme Disease in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Dermatology*, v. 30, n. 8, p. 569-571, 1991.
- BALASHOV, Y. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. *Misc Entomological Society of America*, v. 8, n. 5, p. 159-376, 1972.
- BARANTON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIROS, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 42, n. 3, p. 378-83, 1992.
- BARBOUR A.G. *Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 57, p.521-525, 1984.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. *Clinical Microbiology Reviews*. v.50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BARBOUR, A. G.; MAUPIN, G. O.; TELTOW, G. J.; CARTER, C. J.; PIESMAN, J. Identification of a uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: Possible agent of Lyme Disease-like illness. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 173, p. 403-409, 1996.
- BARBUDDHE, S. B.; CHAUDHARI, S. P.; MALIK, S. V. S. The Occurrence of Pathogenic *Listeria Monocytogenes* and Antibodies against Listeriolysin-O in Buffaloes. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 49, n. 4, p. 181-184, 2002.
- BATTESTI, D. M.; SOARES, C. O.; ZEITUNE, A. D.; YOSHINARI, N. H.; ARZUA, M. Estudo de *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) como reservatório da borreliose de Lyme, através de método sorológico. *Anais do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia*. p. 252, 1997.

- BENACH, J. L.; COLEMAN, J. L.; SKINNER, R. A.; BOSLER, E. M. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 155, n. 6, p. 1300-1306, 1987.
- BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; PAGANELLI, C. H.; YOSHINARI, N. H.; GREGORY, L.; BIRGEL JR, E. H.; ATHAIDE, P. F. Lyme disease in cattle in Brazil. *Vector Ecology News Letter*, v. 26, n. 2, p. 5-6, 1995.
- BENNETT, C. E. Ticks and Lyme disease. *Advances in Parasitology*, v. 36, p. 343-405, 1995.
- BENXIU, J.; COLLINS, M. Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin. *American Journal of Veterinary Research*, v. 55, n. 9, p. 1228-1231, 1994.
- BLOWEY, R. W.; CARTER, S. D.; WHITE, A. D.; BARNES, A. *Borrelia burgdorferi* infections in UK cattle: a possible association with digital dermatitis. *The Veterinary Record*, v. 135, n. 24, p. 577-578, 1994.
- BOSLER, E. M. *Tick vectors and hosts*. In: COYLE, P. K. (ed.) Lyme Disease. Mosby Year Book, Boston. p. 18-26, 1993.
- BUCHAWALD, A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. *Derm Vierteljahressch*, v. 10, p. 553-556, 1883.
- BURGDORFER, W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae. I. Transmission of *Lepstopira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. *Experimental Parasitology*, v. 5, n. 6, p. 571-579, 1956.
- BURGDORFER, W.; BARBUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science*, v. 216, n. 4552, p. 1317-1319, 1982.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodes ticks. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 11, n. 6, p. 51442-51449, 1989.
- BURGESS, E. C. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme Disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Laboratory Animal Science*, v. 36, n. 3, p. 288-290, 1986.
- BURGESS, E. C.; AMUNDSON, T. E.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. A.; EDELMAN, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp. With *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, n. 2, p. 355-359, 1986.
- BURGESS, E. C.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; WRIGHT, W. O. Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* in a cow. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 191, n. 11, p. 1468-1470, 1987.
- BURGESS, E. C. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 539, p. 235-243, 1988.
- BURGESS, E. C. Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, n. 9, p. 1507-1511, 1992.
- BUSHMICH, S. L. Lyme Borreliosis in Domestic Animals. *Journal of Spirochaetal and Ticks-Borne Diseases*, v. 1, n. 1. p. 24-28, 1994.

- BUTLER, J. F.; DENMARK, H. A. Tick (Acari: Ixodidae) vectors of Lyme disease organisms (*Borrelia burgdorferi*) in Florida. *Fla Department of Agriculture and Consumer Service Division of Plant Industry. The Entomology*. 1990. Circular n° 326.
- CALLOW, L. L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. *British Veterinary Journal*, v. 123, n. 11, p. 492-497, 1967.
- CALLOW, L. L.; PARKER, R. J.; RODWELL, B. J.; OTTLEY, M. L. Piroplasmosis in buffaloes and its serological diagnosis based on a homology between buffalo and bovine immunoglobulins. *Australian Veterinary Journal*, v. 52, n. 1, p. 40-41, 1976.
- CAPUTA, A. C.; MURTAUGH, M. P.; BEY, R. F.; LOKEN, K. I. 110-Kilodalton recombinant protein which is immunoreactive with sera from humans, dogs, and horses with Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 11, p. 2418-2423, 1991.
- CHARLES, D. D.; JOHNSON, E. R. Liveweight gains and carcass composition of buffalo (*Bubalus bubalis*) steers on four feeding regimes. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 26, n. 2, p. 407-413, 1972.
- COHEN, N. D.; COHEN, D. Borreliosis in horses: a comparative review. *The Compendium*, v. 12, n. 10, p. 1449-1458, 1990.
- COMSTEDT, P.; BERGSTRÖM, S.; OLSEN, B.; GARPMO, U.; MARJAVAARA, L.; MEJLON, H.; BARBOUR, A. G.; BUNIKIS, J. Migratory Passerine Birds as Reservoirs of Lyme Borreliosis in Europe. *Emerging Infectious Disease*, v. 12, n. 8, p. 1085-1095, 2006.
- CORBEL, M. J.; MACMILLAN, A. P. *Bovine brucellosis*. In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE, Paris, France. p. 242-255, 1996.
- COYLE, P. K. *Lyme disease*. Mosby Year Book, Boston. 235p, 1993.
- CRAFT, J. E.; FISCHER, D. K.; SHIMAMOTO, G. T.; STEERE, A. C. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme Disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 78, n. 4, p. 934-939, 1986.
- DICKINSON, F. O.; BATTLE, M. C. Lyme borreliosis. *The Infections Diseases Review*, v. 2, n. 1, p. 23-26, 2000.
- DORWARD, D. W.; SCHWAN, T. G.; GARON, C. F. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n.6, p. 1162-1170, 1991.
- DRESSLER, F.; WHALEN, J. A.; REINHARDT, B. N.; STEERE, A. C. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 167, n. 12, p. 392-400, 1993.
- ENGSTROM, S. M.; SHOOP, E.; JOHNSON, R. C. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 419-427, 1995.
- EWING, C.; SCORPIO, A.; NELSON, D. R.; MOTHER, T. N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 3, p. 755-758, 1994.
- FARRELI, G. M.; MARTH, E. H. *Borrelia burgdorferi*: Another cause of foodborne illness? *International journal of food microbiology*, v. 14, n. 3-4, p. 247-260, 1991.
- FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Doença de Lyme. *Rio Dermatológico*, v. 2, n. 1, p.1, 1988.

- 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. *Annals of XXV Congress Of World Veterinary Association, XX Congress of World Small Animal Of Veterinary Association*, Yokohama, Japão. p. 283, 1995a.
- FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis serology in cattle and dogs in Brazil. *Annals of XXV Congress Of World Veterinary Association, XX Congress of World Small Animal Of Veterinary Association*, Yokohama, Japão. p. 283, 1995b.
- FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. *Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida*, v. 18, n. 1/2, p. 85-89, 1996.
- FONSECA, A. H.; SALLES, R. S.; SALLES, S. A. N.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.
- FREY, A.; CANZIO, J. D.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, v. 221, p. 35-41, 1998.
- GALO, K. R. *Freqüência de anticorpos anti- Borrelia burgdorferi em eqüinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará*. 2006. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará. 48p, 2006.
- GILL, J. S.; MCLEAN, R. G.; SHRINER, R. B.; JOHNSON, R. C. Serologic surveillance for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 444-451, 1994.
- GORDILLO, G.; TORRES, J.; SOLÓRZANO, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; TAPIA-CONYER, R.; MUÑOZ, O. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. *Archives of Medical Research*, v. 30, n. 1, p. 64-68, 1999.
- GREENE, R. T.; WALKER, R. L.; NICHOLSON, W. L.; HEIDNER, H. W.; LEVINE, J. F.; BURGESS, E. C.; WYAND, M.; BREITSCHWERDT, E. B.; BERKHOFF, H. A. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimental and naturally exposed dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 648-653, 1988.
- GRODZICKI, R. L.; STEERE, A. C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 157, n. 4, p. 790-797, 1988.
- GUEDES JÚNIOR, D. S. *Prevalência de anticorpos para agentes da Tristeza Parasitária Bovina, Trypanosoma vivax e Borrelia sp. em bovinos do nordeste do estado do Pará, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 40p, 2006.
- GUSTAFSON, J. M.; BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; STEINBERG, H. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. v. 54, n. 6, p. 882-890, 1993.
- HADANI, A.; GUGLIELMONE, A. A.; BERMÚDEZ, A. C. Detección de espiroquetas del genero *Borrelia* en bovinos de la provincia de Salta, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria Argentina*, v. 66, n. 5, p. 292-294, 1985.

- HERXHEIMER, K.; HARTMANN, K. U. Acrodermatitis chronica atrophicans. *Archives of Dermatology and Syphilology*, v. 61, n. 57, p. 255-3000, 1902.
- HOOGSTRAAL, H. Ticks and spirochetes. *Acta Tropica*. v.36, p. 133-136, 1979.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, v. 24, p. 135-238, 1985.
- HYDE, F. W.; JOHNSON, R. C.; WHITE, T. J.; SHELburne, C. E. Detecting of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 58-61, 1989.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2005. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>.
- 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. *The Veterinary Record*, v. 93, n. 7, p. 200-203, 1973.
- ISHIKAWA, M. M. *Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 51p, 1996.
- ISHIKAWA, M. M. *Perfil da produção de anticorpos anti-Borrelia burgdorferi em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 80p, 2000.
- Jl, B.; THOMAS, C. B.; COLLINS, M. T. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses the 41-kd flagellin as the antigen for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 1213-1219, 1994.
- JOHNSON, R. C.; SCHIMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Journal of Systematic Bacteriology*, v. 34, p. 496, 1984.
- JOHNSON, R. C.; BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; HYDE, F. W. *Borrelia coriaceae* sp. nov. putative agent of epizootic bovine abortion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 37, p. 72-74, 1987.
- JOPPERT, A. M. *Estudo soro-epidemiológico da infecção por Borrelia burgdorferi em cães da região de Cotia, São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo, São Paulo. 83p, 1995.
- KAWABATA, H.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 37, n. 11, p. 843-848, 1993.
- KOCH, H. T.; KAMBEVA, L.; OCAMA, J. G. R.; MUNATSWA, F. C.; FRANSSEN, F. R. J.; UILENBERG, G.; DOLAN, T. T.; NORVAL, R. A. I. Immunization of cattle against *Theileria parva bovis* and their exposure to natural challenge. *Veterinary Parasitology*, v. 37, p. 185-196, 1990.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Sitematic Bacteriology*. v. 1, 8th Edition, Williams; Wilkins, London. p. 57-62, 1984.
- LANE, R. S.; BURGDORFER, W. Transovarial and transstadial passage of *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 37, n. 1, p. 188-192, 1987.

- LANE, R. S.; MANWEILER, S. A. *Borrelia coriacea* its tick vector, *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) with emphasis on transstadial and transovarial infections. *Journal of Medical Entomology*, v. 25, n. 3, p. 172-177, 1988.
- LANE, R. S.; BROWN, R. N.; PIESMAN, J.; PEAVEY, C. A. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. *Journal of Medical Entomology*, v. 31, n. 3, p. 417-424, 1994.
- LAÚ, H. D. *Doenças em búfalos no Brasil – Diagnóstico, epidemiologia e controle*. ed. Embrapa, 202p, 1999.
- LAVERAN, A. Sur la spirillose des bovides. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences*, v. 136, p. 939-941, 1903.
- LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; GRARDETE, K.; PETER, O.; BARANTON, G. Characterization of *Borrelia lusitanae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *The International Journal of Bacteriology*, v. 47, n. 4, p. 921-925, 1997.
- LIANG, F. T.; YAN, J.; MBOW, M. L.; SVIAT, S. L.; GILMORE, R. D.; MAMULA, M.; FIKRIG, E. *Borrelia burgdorferi* Changes Its Surface Antigenic Expression in Response to Host Immune Responses. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 10, 2004.
- LIENBLING, M. R.; NISHIO, M. J.; RODRIGUEZ, A.; SIGAL, L. H.; JIN, T.; LOUIE, J. S. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. *The Arthritis Rheumatology*, v. 36, n. 5, p. 665-675, 1993.
- LOPES, C. W. G. *Ocorrência de protofitas em ruminantes e suínos domésticos, ainda não descritos no Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 52p, 1976.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 2, p. 265-275, 1951.
- MADELLA-OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; NEWS, G. D.; GREGIO, S. L. S. Identificação de criatórios de búfalos nas regiões norte e baixadas litorâneas do Rio de Janeiro e sul do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 1, p. 28-33, 2005.
- MADUREIRA, R. C. *Frequência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 40p, 2004.
- MAGNARELLI, L. A.; MEEGAN, J. M.; ANDERSON, J. F.; CHAPPELL, W. A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 20, n. 2, p. 181-184, 1984.
- 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. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 22, n. 2, p. 178-188, 1986.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C. Cross-reactivity in Serological Tests for Lyme Disease and Other Spirochaetal Infections. *The Journal of Infectious Disease*, v. 156, n. 1, p. 183-187, 1987.

- MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIRKRIG, E. Serologic diagnosis of canine and equine borrelioses: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 169-173, 1997.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. *American Journal of Epidemiology*, v. 127, n. 4, p. 818-825, 1998.
- MAGNARELLI, L. A.; BUSHMICH, S. L.; SHERMAN, B. A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 45, n. 8, p. 667-674, 2004.
- MARCONI, R. T.; LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersoni* sp. nov.) isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 2427-2434, 1995.
- MARTINS, J. R.; CERESÉR, V. H.; CORRÊA, B. L.; SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: Observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 26, n. 3, p. 447-450, 1996.
- MASUZAWA, T.; SUZUKI, H.; KAWABATA, H.; ISHIGURO, F.; TAKADA, N.; YANO, Y.; YANAGIHARA, I. Identification of spirochaete isolated from wild rodents in Japan as *Borrelia japonica*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1392-1394, 1995.
- MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 205, n. 2, p. 186-188, 1994.
- MATHIAS, L. A., CHAVES, L. F., GÍRIO, R. J. S., DEL FAVA, C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 3-4, p. 111-114, 1998.
- MATTON, P.; MELCKEBEKE, H. V. Bovine borrelioses: comparison on simple methods for detection of spirochaete in the blood. *Tropical Animal Health Production*, v. 22, p. 147-152, 1990.
- MAY, C.; BENNET, D.; CARTER, S. D. Lyme disease in the dogs. *The Veterinary Record*, v. 126, n. 12, p. 293, 1990.
- MOLNÁR, E.; CAMELO, A. S. A.; SILVA, E. B.; MOLNÁR, L. Prevalência da infecção pelo vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em bubalinos no Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 2, p.252-254, 2001.
- MOTER, S. E.; HOFMANN, H.; WALLISH, R.; SIMON, M. M.; KRAMER, M. D. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronic atrophicans by ospA-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 12, p. 2980-2988, 1994.
- NEITZ, W. O. The transmission of *Spirochaeta theileri* to a Blesbuck (*Damaliscus albifrons*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, v. 5, n. 1, p. 7, 1935.
- NEITZ, W. O. A consolidations of our knowledge of the transmission of tick-borne disease. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 27, p. 115-163, 1956.

- OKSI, J.; UKSILA, J.; MARJAMAKI, M.; NIKOSKELAINEN, J.; VILJANEN, M. K. Antibodies against whole sonicated *Borrelia burgdorferi* spirochetes, 41-kilodalton flagellin, and P39 protein in patients with PCR or cultures-proven late Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 9, p. 2260-2264, 1995.
- OLIVEIRA, A.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; YOSHINARI, N. H. Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) em diferentes meios de cultivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 2, p. 61-64, 2004.
- PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Veterinary*, v. 82, p. 253-274, 1992.
- PAVLOVSKY, E. N. *Natural Nidality of Transmissible Disease*. Peace Publishers, Moscow. 250p, 1965.
- PÊSSOA, S. B. *Parasitologia Médica*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 849p., 1963.
- PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet*, v.343, p. 1013-1016, 1994.
- PIESMAN, J.; OLIVER, J. R.; SINSKY, R. J. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in the vector tick (*Ixodes dammini*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p. 352-357, 1990.
- POST, J. E.; SHAW, E. E.; WRIGHT, S. Suspected borreliosis in cattle. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 539, p. 488, 1986.
- POST, J. E. Lyme disease in large animals. *New Jersey Medicine: The Journal of the Medical Society of New Jersey*, v. 87, n. 7, p. 575-577, 1990.
- POSTIC, D.; BELFAZIA, J.; ISOGAI, E.; GIRON, I. S.; GRIMONT, P. A. D.; BARANTON, G. A new genomic species in *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated from Japanese ticks. *Research in Microbiology*, v. 144, p. 467-473, 1993.
- POSTIC, D.; MARTI RAS, N.; LANE, R. S.; HENDSON, M.; BARANTON, G. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *B. bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 12, p. 3497-3504, 1998.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Clinical Veterinary Microbiology*. First edition. Ed. Wolf Publishing, London. p. 292-303, 1994.
- RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N.; PIESMAN, J.; SPIELMAN, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme Disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 24, n. 2, p. 201-205, 1987.
- RICH, S. M.; ARMSTRONG, P. M.; SMITH, R. D.; TELFORD III, S. R. Lone star tick-infecting *Borrelia* are most closely related to the agent of bovine Borreliose. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 494-497, 2001.
- ROGERS, A. B.; SMITH, R. D.; KAKOMA, I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia coriaceae* in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 6, p. 694-697, 1999.
- SALLES, R. S.; FONSECA, A. H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R. C., YOSHINARI, N. H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi sensu lato* em equinos no estado do Rio de Janeiro. *A Hora Veterinária*, v. 127, p. 46-49, 2002.

- SCOFIELD, A.; MARQUES, C. C.; BARBOSA, J. D.; FONSECA, A. H. Ocorrência de *Borrelia* sp. em búfalo (*Bubalus bubalis*) no município de Castanhal, Estado do Pará. In: *Anais do V Congresso Brasileiro de Buiatria*. In CD-ROM, 2005.
- SHARMA, S. P.; AMANFU, W.; LOSHO, T. C. Bovine borreliosis in Botswana. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 67, n. 3, p. 221-223, 2000.
- SHILLHORN VAN VEEN, T. W.; LEYENDEKKERS, G. J. *Borrelia theileri* (Laveran, 1903) in cattle in the Netherlands. *Tijdschrift Voor Diergneeskunde*, v. 96, p. 1028-1031, 1971.
- SILVA, A. M.; FIRKRING, E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. *Parasitology Today*, v. 13, n. 7, p. 267-270, 1997.
- SILVA, R. R.; MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia bovina à vírus (VBVD) em bubalinos, no estado do Pará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 2, p. 256-258, 2001.
- SINGH, S.; GOELM. C.; MONGA, D. P. Activation of alternative complement pathway in serum of buffalo by different bacteria. *The Indian Journal of Animal Sciences*, v. 65, p. 266-268, 1995.
- SMITH, R. D.; BRENER, J.; OSORNO, M.; RISTIC, M. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 32, n. 2, p. 182-190, 1978.
- SMITH, R. D.; MIRANPURI, G. S.; ADAMS, J. H.; AHRENS, E. H. *Borrelia theileri*: Isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. *American Journal Veterinary Research*, v. 46, n. 6, p. 1396-1398, 1985.
- SMITH, R. D.; ROGERS, A. B. *Borrelia theileri*: A review. *Journal of Spirochetel and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.
- SOARES, C. O. *Estudo da Borreliose canina: imunodiagnóstico soropidemiologia e análise interativa com a babesiose canina*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 80p, 1998.
- SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 111-114, 1999.
- SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.
- SOOD, S. K.; ZEMEL, L. S.; ILOWITE, N. T. Interpretation of immunoblot in pediatric Lyme arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v. 22, n. 4, p. 758-761, 1995.
- STEERE, A. C.; GRODZICKI, R. L.; KORNBLATT, A. N. The spirochaetal etiology of Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 308, n. 13, p. 733-740, 1983.
- STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; HARDIN, J. A.; RUDDY, S.; ASKENASE, P. W.; ANDINAN, W. A. Erythema Chonicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. *Annals of Intern Medicine*, v. 86, p. 685, 1977a.
- STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; SNYDMAN, D. R.; SHOPE, R. E.; ANDINAN, W. A.; ROSS, M. R.; STEERE, R. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in

- children and adults in three Connecticut communities. *The Arthritis Rheumatology*, v. 20, n. 1, p. 7, 1977b.
- STEERE, A. C. Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, n. 2, p. 115-125, 2001.
- TREES, A. J. The transmission of *Borrelia theileri* by *Boophilus annulatus* (Say, 1821). *Tropical Animal Health Production*, v. 10, n. 2, p. 93-94, 1978.
- UILENBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne disease of domestic animals. *The Journal of Parasitology*, v. 72, n. 4, p. 485-491. 1986.
- UILENBERG, G.; HINAIDY, H. K.; PERIÉ, N. M.; FEENSTRA, T. *Borrelia* infections of ruminant in Europe. *The Veterinary Quarterly*, v. 10, n. 1, p. 63-67. 1988.
- VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition, Springer publisher, New York. 491p., 2002.
- VIVAS, R. I. R.; AGUILAR, F. C.; ALPIZAR, J. L. D.; GALERA, L. A. C.; CALDERÓN, J. J. S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. *The Veterinaria México*, v.27, n. 2, p. 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). *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n. 4, p. 927-932, 1997.
- WELLS, S. J.; TRENT, A. M.; ROBINSON, R. A.; KNUTSON, K. S.; BE, R. F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. *The American Journal Veterinary Research*, v. 54, n. 3, p. 398-405, 1993.
- WILSKE, B.; HABERMANN, C.; FINGLERLE, V.; HILLENBRAND, B.; JAURIS-HEIPKE, S.; LEHNERT, G.; PRADEL, I.; ROSSLER, D.; SCHOULTE-SPECHTEL, U. An improved recombinant IgG immunoblot for diagnosis of Lyme Borreliosis. *The Medicine Microbiology and Immunology*, v. 188, n. 3, p. 139-144, 1999.
- YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; COSSERMELLI, W. Revisão de borreliose de Lyme. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 35, n. 1, p. 34-37, 1989.
- YOSHINARI, N. H.; OYAFUSO, L. K.; MONTEIRO, F. G. V.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; FERREIRA, L. G. E. BONASSER, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. *Revista do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 48, n. 4, p. 170-174, 1993a.
- YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. M. C.; MENDONÇA, M.; OYAFUSO, L. K.; LEVY, L.; COSSERMELLI, W. Lyme disease in Brazil: report of five cases. *Revista Espanhola de Reumatologia*, v. 20, p. 6, 1993b.
- YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; BONOLDI, V. L. N.; BTTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. S.; COSSERMELLI, W. Borreliose de Lyme – zoonose emergente de interesse multidisciplinário. *News Lab*, v. 3, n. 12, p. 90-104, 1995.
- YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D. M. B.; PIRANA, S.; FONSECA, A. H.; SCHUMAKER, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Revista do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 52, n. 2, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; SOARES, C. O. FONSECA, A H.; SCOFIELD, A.; BATTESTI, D. B.; MADRUGA, C. R. Serology for *Babesia bovis* in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases. *Annals do XXI International Congress of Entomology*, v. 2, n. 1, p. 820-820, 2000.

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