

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

TESE

**Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em eqüinos do
Estado do Pará e caracterização genotípica de
isolados de *Borrelia* spp.**

Renata Cunha Madureira

2007



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

**SOROLOGIA PARA *Borrelia burgdorferi* EM EQÜINOS DO ESTADO
DO PARÁ E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Borrelia spp.**

RENATA CUNHA MADUREIRA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação da Doutora
Grácia Maria Soares Rosinha

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Setembro de 2007

636.108969

24

M183s

T

Madureira, Renata Cunha, 1977-
Sorologia para *Borrelia*
burgdorferi em eqüinos do Estado do
Pará e caracterização genotípica de
isolados de *Borrelia* spp. / Renata
Cunha Madureira. - 2007.
73f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da
Fonseca.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 49-60.

1. Eqüino - Doenças - Pará -
Teses. 2. Eqüino - Imunologia -
Teses. 3. *Borrelia burgdorferi* -
Teses. 4. Imunodiagnóstico - Teses.
I. Fonseca, Adivaldo Henrique da,
1953-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Instituto
de Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____

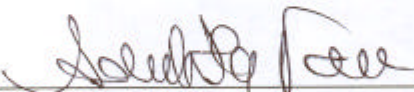
Data: ___/___/___

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

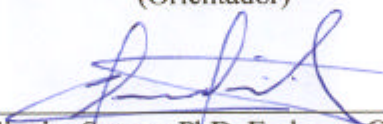
RENATA CUNHA MADUREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.


TESE APROVADA EM 17/09/2007




Aivaldo Henrique da Fonseca. PhD. UFRRJ
(Orientador)



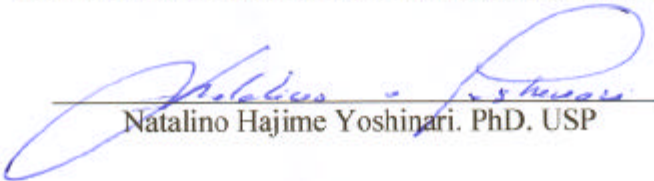
Cleber Oliveira Soares. PhD. Embrapa Gado de Corte



Grácia Maria Soares Rosinha. PhD. Embrapa Gado de Corte



Carina Elisei de Oliveira. PhD. Embrapa Gado de Corte



Natalino Hajime Yoshinari. PhD. USP

**Dedico essa tese a minha família:
meus pais Marcos e Carmen Lucia;
minha irmã Gabriela e a minha
pequena sobrinha Carolina, que me dão
força, segurança e coragem para nunca
desistir de meus sonhos.**

Ao mestre,

**Prof. Adivaldo Henrique da Fonseca por sua orientação,
estando sempre ao meu lado com respeito, carinho,
compreensão e confiança.**

Agradecimentos

À Dra. Grácia Maria Soares Rosinha pela co-orientação, amizade e apoio incondicional, mostrando-se sempre atenciosa e disponível.

À Dra. Carina Elisei de Oliveira pela supervisão técnica e científica, além da amizade sincera, sendo meu alicerce durante a estada no MS.

Ao Dr. Cleber Oliveira Soares que sempre me dá oportunidade de aprender cada dia mais.

Ao Dr. Carlos Luiz Massard por seus ensinamentos e por ceder gentilmente o equino enfermo para que pudessem ser realizadas as análises morfométrica e genotípica da espiroqueta.

Aos professores da UFPA: Alessandra Scofield Amaral, José Diomedes Barbosa, Valéria Duarte Cerqueira, Marcos Dutra Duarte e Carlos Magno Chaves Oliveira, além dos estagiários, pela enorme ajuda na coleta de material em Castanhal e na Ilha de Marajó- PA e incentivo durante esse etapa do projeto.

Ao Dr. Raul Kessler por ceder gentilmente a cultura de célula de carrapato

Ao técnico da Embrapa Agrobiologia, Geraldo Cruz Baeta por ter cedido gentilmente o uso do espectrofotômetro para leitura do ensaio de imunoabsorção enzimática.

Ao Dr. Stênio Fragoso Perdigão e Adriana Umaki do Instituto de Biologia Molecular do Paraná pelo sequenciamento das amostras, sendo sempre gentis e atenciosos.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte que me receberam com grande carinho, me ajudando prontamente sempre que solicitado.

Aos grandes amigos Nathalie Costa da Cunha e Luiz Eduardo Roland Tavares pela companhia diária, sempre pacientes e dedicados fazendo com que a vida na Rural- RJ fosse especial.

À Jania Rezende, Fabíola do Nascimento Corrêa, Raquel Silva Lisboa, Luciana Rodrigues de Almeida e Cátia Marques da Costa pela amizade de anos e convívio diário baseado no respeito e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, Charles Passos Rangel, Daniel da Silva Guedes Jr., Fábio Jorge Moreira da Silva, Rafaella Câmara Teixeira e Matheus Dias Cordeiro pelo convívio e amizade.

À todos os meus amigos do curso de Pós-Graduação, em especial a Clarissa Pimentel de Souza, Everton Kort Kemp, Thiago Campanharo Bahiense, Marcel Teixeira, Fabiana Valadão Massad e Bruno Gomes de Castro, que estiveram comigo desde a graduação reforçando a cada dia nossos laços de amizade e carinho.

A paciente com borreliose de Lyme-*simile* que prontamente doou seu sangue em prol do desenvolvimento científico.

E aos animais sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

À UFRRJ, UFPA e Embrapa Gado de Corte por permitirem e apoiarem trabalhos realizados em colaboração.

À CAPES, FAPERJ e ao CPGCV da UFRRJ pelo apoio financeiro indispensável.

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

Biografia

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

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

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

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

Em março de 2002 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Área de Concentração Parasitologia Veterinária (CPGCV-PV), em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista do CNPq. Em março de 2004 ingressou no CPGCV – Área de Concentração Sanidade Animal, em nível de Doutorado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES nos dois primeiros anos e posteriormente ingressou no programa de bolsas de aluno nota 10 da FAPERJ onde permanece até o momento. E nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

RESUMO

MADUREIRA, Renata Cunha. **Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em equinos do Estado do Pará e caracterização genotípica de isolados de *Borrelia* spp.** 2007. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Espiroquetas do gênero *Borrelia* acometem animais e humanos em todo o mundo determinando diferentes tipos de doenças. A única espécie de *Borrelia* reconhecida e identificada no Brasil que infecta bovinos e equinos é *Borrelia theileri*, transmitida por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vários estudos têm sido feitos a fim de se identificar outro espiroquetídeo que circula em nosso meio e infecta animais e humanos, levando a quadro clínico semelhante à borreliose de Lyme (BL). O objetivo do presente trabalho foi determinar a frequência de animais soropositivos para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto em equinos da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, caracterizar morfometricamente *B. theileri* isolado de equino e genotipicamente isolados de espiroquetas obtidos de equino, carrapato *R. (Boophilus) microplus* e humano, por análise das seqüências parciais dos genes *16S rRNA*, *fla* e *rpoB*. Coletou-se 105 soros de equinos provenientes da Ilha de Marajó e 103 do município de Castanhal (n=208), os quais foram analisados pelo ELISA indireto. Observou-se 15 animais soropositivos (7,2%), sendo 10 (9,5%) animais da Ilha de Marajó e cinco (4,9%) de Castanhal. Para caracterização morfométrica e genotípica foi coletado sangue de um equino, proveniente do Estado do Rio de Janeiro. O isolado de carrapato foi obtido a partir de sobrenadante de cultura de células de carrapatos *R. (Boophilus) microplus*, proveniente do Estado do Mato Grosso do Sul. O isolado de humano foi obtido do sangue de um indivíduo do sexo feminino, residente no município de Seropédica-RJ, com BL-*simile*. Realizou-se a técnica de PCR utilizando iniciadores para o gene *16S rRNA*, *fla* e *rpoB*. Os produtos da amplificação foram clonados e sequenciados. A análise das seqüências do isolado de equino para os genes *16S rRNA* e *fla*, 99% (609/611) e 98% (222/226) de identidade com seqüências depositadas no “GeneBank” para *B. theileri*, respectivamente, em conjunto com a análise morfométrica ($17,2 \pm 3,6 \mu\text{m}$ de comprimento; 10 ± 2 espiras) revelou ser o microrganismo em questão, *B. theileri*. Para o gene *rpoB* observou-se 92% (250/270) de identidade com seqüências de *B. hermsii*. O sequenciamento do isolado de carrapato revelou 100% de identidade (177/177) para o gene *16S rRNA* com seqüências de *B. burgdorferi* depositadas no “GeneBank”, 100% de identidade (23/23) para o gene *fla* com *B. theileri* e 92% de identidade (250/270) para o gene *rpoB* com *B. hermsii*. O sequenciamento do gene *16S rRNA* de sangue humano com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile*, apresentou identidade de 99% (886/889) com *B. burgdorferi*. A presença de anticorpos homólogos contra *B. burgdorferi* em equinos na Ilha de Marajó e município de Castanhal é indicativo da presença de *Borrelia* sp. e, apesar da baixa frequência de animais soropositivos é necessário atenção para ocorrência de borreliose humana nas regiões estudadas, considerando a importância dessa enfermidade como zoonose emergente. Esta é a primeira descrição genotípica de isolado brasileiro de *B. theileri*, assim como o primeiro relato de espécie de *Borrelia* diferente de *B. theileri* infectando *R. (Boophilus) microplus* e confirmação da presença de espiroquetídeo do gênero *Borrelia* causando borreliose de Lyme-*simile* no Brasil.

Palavras chave: Spirochaetae, PCR, imunodiagnóstico

ABSTRACT

MADUREIRA, Renata Cunha. **Serology of *Borrelia burgdorferi* in equines of the State of Pará and genotypic characterization of isolates of *Borrelia* spp.** 2007. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Spirochetes of the genus *Borrelia* attack animals and humans all over the world, causing different types of diseases. The unique species of *Borrelia* known and identified in Brazil which infects bovines and equines is *B. theileri*, transmitted by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Several studies were made to identify another spirochete that circulates in the country and infects both animals and humans, providing clinical symptoms regarding Lyme disease (LD). The objectives of this work were to determine the frequency of serum-positive animals for *Borrelia burgdorferi* stricto sensu in equines of the Marajó Island and the municipality of Castanhal, State of Pará; to characterize morphometrically and genotypically isolates of *B. theileri* from equine and to analyze genotypically spirochetes the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, and human, by analysis of partial sequence of the gene 16S rRNA, *fla* and *rpoB*. Serum from 105 equines from the Marajó Island and 103 from Castanhal municipality were collected and analyzed by indirect ELISA test. Fifteen equines (7.2% of the total) were serum-positive, being 10 from the Marajó Island (9.5%) and five from the Castanhal municipality (4.9%). For the morphometric and genotypic characterization was collected serum of equine from the Rio de Janeiro State. Tick isolate was obtained from supernatant of a cell culture of ticks from the Mato Grosso do Sul State. Human isolate was obtained from blood sample of a woman, from the Seropédica municipality, RJ, with LD-simile. The PCR was carried through using primers for the gene 16S rRNA, *fla* and *rpoB*. The products of amplification were cloned and sequenced. The analysis of the sequences of the isolated of equine for the genes 16S rRNA and *fla* of 99% (609/611) and 98% (222/226) of identity with sequences of *B. theileri*, respectively, in set with morphometric analysis (17.2 ± 3.6µm of length; 10 ± 2 espiras) revealed to be the microorganism in question, *B. theileri*. For the gene *rpoB* it was observed 92%(250/270) of identity with sequences of *B. hermsii*. The analysis of the sequences of the tick isolated revealed an identification of 100% (177/177) for the gene 16S rRNA with sequences of *B. burgdorferi* deposited in "GeneBank", 100% of identity (23/23) for the gene *fla* with *B. theileri* and 92% of identity (250/270) for the gene *rpoB* with sequence of *B. hermsii*. The analysis of the sequences of the human isolated revealed an identification of 99% (886/889) for the gene 16S rRNA with *B. burgdorferi* sequences. The presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in equines from both places is an indicative of the presence of *Borrelia* sp., and, despite the lower frequency of infected animals, attention is needed for the possible occurrence of human borreliosis in those areas, considering the importance of this emergent zoonosis. This is the first genotypic characterization of a Brazilian isolate of *B. theileri*, as well as the first report of species of *Borrelia* different of *B. theileri* attack *R. (Boophilus) microplus* and confirmation of the presence of the genus *Borrelia* causing LD-simile in Brazil.

Key words: Spirochaetae, PCR, imunoassay

LISTA DE TABELAS

CONTEÚDO	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em eqüinos (n=208) da Ilha do Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, determinada por ELISA indireto.....	21
Tabela 2. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em eqüinos (n=208) da Ilha do Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, quanto à raça determinada por ELISA indireto.....	22
Tabela 3. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em eqüinos (n=208) da Ilha do Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, quanto ao sexo determinada por ELISA indireto.....	22
Tabela 4. Frequência sorológica de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> em eqüinos (n=208) da Ilha do Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, quanto à faixa etária determinada por ELISA indireto.....	23
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Iniciadores para amplificação parcial dos genes 16S <i>rRNA</i> , <i>fla</i> e <i>rpoB</i> dos isolados de eqüino, carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e humano.....	33

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

CONTEÚDO	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
Figura 1. Representação esquemática da classificação de espiroquetídeos, distribuídos em sistemática.....	3
Quadro 1. Complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato: espécies, vetores, hospedeiros e distribuição.....	7
CAPÍTULO I	
Figura 1. Mapa do Estado do Pará.....	18
CAPÍTULO II	
Figura 1. Espiroqueta em sangue periférico de equino.....	30
Figura 2. Microrganismo em cultura de célula de carrapato, mantida em meio Leboivitz.....	31
Figura 3. Microrganismo em sangue de humano com borreliose de Lyme- <i>simile</i>	32
Figura 4. Plasmídeo pGEM®-T Easy utilizados para a clonagem dos fragmentos de DNA dos genes 16S <i>rRNA</i> , <i>fla</i> e <i>rpoB</i> de isolado de equino, carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e humano.....	34
Figura 5. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene 16S <i>rRNA</i> de <i>Borrelia</i> spp.....	37
Figura 6. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene 16S <i>rRNA</i> de <i>Borrelia</i> spp isolado de humano.....	38
Figura 7. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene <i>fla</i> de <i>Borrelia</i> spp.....	38
Figura 8. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene <i>rpoB</i> de <i>Borrelia</i> spp.....	39
Figura 9. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene 16S <i>rRNA</i> do isolado de equino.....	40
Figura 10. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene 16S <i>rRNA</i> do isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	40
Figura 11. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene 16S <i>rRNA</i> do isolado de humano.	41
Figura 12. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene <i>fla</i> do isolado de equino.	41
Figura 13. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene <i>fla</i> do isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	42

Figura 14. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene <i>rpoB</i> do isolado de equino.....	42
Figura 15. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene <i>rpoB</i> do isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	43
Figura 16 Análise do produto das minipreps para os genes 16S <i>rRNA</i> , <i>fla</i> e <i>rpoB</i>	44
Figura 17. Análise do produto da miniprep.....	44
Figura 18. Análise do produto da amplificação de miniprep pela PCR.	45

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Páginas
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Classificação.....	3
2.2 Transmissão.....	3
2.3 Borreliose em Animais e Humanos.....	4
2.4 Borreliose de Lyme- Histórico, Epidemiologia e Distribuição.....	5
2.5 Borreliose de Lyme- Aspectos Clínicos.....	9
2.5.1 Cães.....	9
2.5.2 Bovinos.....	9
2.5.3 Eqüinos.....	9
2.6 Borreliose de Lyme <i>simile</i> - Brasil.....	10
2.7 Diagnóstico.....	11
2.7.1 Sorologia.....	12
2.7.2 Genética Molecular.....	12
CAPÍTULO I Sorologia para <i>Borrelia burgdorferi</i> em eqüinos da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 Animais estudados.....	18
2.2 Obtenção do antígeno.....	18
2.3 Obtenção do controle positivo.....	19
2.4 Obtenção dos controles negativos.....	19
2.5 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto.....	19
2.6 Análise estatística.....	20

3 RESULTADOS.....	21
4 DISCUSSÃO.....	24
CAPÍTULO II- Caracterização morfológica e genotípica de isolado brasileiro de <i>Borrelia theileri</i> (Laveran, 1903) e registro de <i>Borrelia</i> sp. em isolados de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e humano.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1 Material Biológico.....	30
2.1.1 Amostra proveniente de equino.....	30
2.1.2 Amostra proveniente de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	31
2.1.3 Amostra proveniente de humano.....	31
2.2 Seleção do gene.....	32
2.3 Extração e quantificação do DNA.....	32
2.4 Controles positivos.....	32
2.5 Reação de PCR	33
2.6 Análise dos produtos de amplificação.....	33
2.7 Clonagem dos fragmentos	34
2.8 PCR de colônia	34
2.9 Reação de minipreparação de plasmídeos (Miniprep).....	35
2.10 PCR de Miniprep.....	35
2.11 Sequenciamento.....	36
2.12 Análise das Seqüências (<i>in silico</i>) e Alinhamento.....	36
3 RESULTADOS	37
3.1 Análise morfológica e morfológica do isolado de equino.....	37
3.2 Extração e quantificação do DNA.....	37
3.3 Reação de PCR.....	37
3.4 Clonagem dos fragmentos	39
3.5 PCR de colônia	39
3.6 Reação de minipreparação de plasmídeos (Miniprep).....	43
3.7 PCR de Miniprep.....	45
3.8 Análise das Seqüências (<i>in silico</i>) e Alinhamento.....	45
4 DISCUSSÃO.....	46
5 CONCLUSÕES.....	48

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	61
Anexo A- Mapa para o acompanhamento imunoenzimático ELISA.....	62
Anexo B- Questionário.....	63
Anexo C- Alinhamento gene 16S <i>rRNA</i> isolado de equino	64
Anexo D- Alinhamento gene <i>fla</i> isolado de equino.....	66
Anexo E- Alinhamento gene <i>rpoB</i> isolado de equino.....	67
Anexo F- Alinhamento gene 16S <i>rRNA</i> isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	68
Anexo G- Alinhamento gene <i>fla</i> isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	69
Anexo H- Alinhamento gene <i>rpoB</i> isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	70
Anexo I- Alinhamento gene 16S <i>rRNA</i> isolado de humano	71
Anexo J- Alinhamento gene 16S <i>rRNA</i> isolado de carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> com isolado de humano.....	73

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Borrelia* compreende espiroquetas transmissíveis principalmente por vetores artrópodes. Esses organismos podem ser divididos filogeneticamente em três grandes grupos. Um grupo é constituído das espécies de *Borrelia* relacionadas à borreliose de Lyme, transmitidas pelo carrapato ixodídeo, *Ixodes* spp. Os outros dois grupos consistem principalmente de espécies relacionadas à febre recorrente (FR), transmitidas por carrapatos argasídeos *Ornithodoros* sp. e o piolho *Pediculus humanus*. Sendo que um grupo encontram-se as espécies que ocorrem no velho mundo e no outro as espécies relacionadas à FR do novo mundo além dos agentes das espiroquetoses animais.

Borrelia burgdorferi é o agente etiológico da borreliose de Lyme na América do Norte, Europa e Ásia. Inquéritos sorológicos nos EUA para essa espécie em equinos, demonstraram até 60% de animais positivos em áreas endêmicas, alguns animais apresentavam dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, sugerindo importantes implicações para a indústria equina no futuro. Trabalhos desenvolvidos na Europa consideram controversa a associação entre sorologia positiva e sinais clínicos para equinos, porém isso não descarta a importância desses animais em levantamentos soroepidemiológicos para observação do agente na região.

Outra espiroqueta que infecta equinos é *Borrelia theileri*, esta tem como principal vetor o carrapato *Boophilus microplus* = (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Borrelia theileri* forma um ramo monofilético junto de *Borrelia myamotoi* e *Borrelia lonestari*, inseridas em um grupo maior das espécies relacionadas a FR. Essas três espécies são transmitidas por carrapatos ixodídeos, o que pode caracterizar que elas e as outras espécies relacionadas a FR, envolvem um ancestral comum, porém só *B. theileri*, *B. myamotoi* e *B. lonestari* se adaptaram a carrapatos ixodídeos.

O carrapato *R. (Boophilus) microplus* é um dos vetores de *B. theileri* no mundo, e até o momento esse é o único espiroquetídeo identificado nessa espécie de carrapato. A associação patógeno-vetor é tão bem estabelecida que o diagnóstico é corriqueiramente realizado a partir do xenodiagnóstico.

No Brasil, vários estudos têm sido feitos a fim de se identificar outro espiroquetídeo que circula em nosso meio e infecta animais e humanos, levando a quadro clínico semelhante à borreliose de Lyme. A primeira publicação alertando a comunidade médica para a possibilidade da ocorrência de borreliose de Lyme nesse território, foi em 1989. Posteriormente vários registros de borreliose de Lyme *simile* foram feitos pelo país, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Amazonas.

Em artigo de revisão FONSECA et al. (2005) destacaram a importância da borreliose Lyme *simile* para a dermatologia no Brasil, reforçando a importância do isolamento do agente etiológico, que até hoje não foi possível. Ainda não se obteve também, sucesso na amplificação de partes de genes utilizando iniciadores para o gênero *Borrelia*. Os vetores ainda não foram estabelecidos, porém um estudo com carrapatos de pequenos mamíferos do Estado de São Paulo, sugeriu *Ixodes* sp. como um potencial vetor para o agente da borreliose de Lyme-*simile*, sendo responsável pela manutenção da espiroqueta no ambiente silvestre e o “carrapato do cavalo” *Amblyomma cajennense* responsável pela transmissão ao homem.

Além disso, o agente etiológico da borreliose de Lyme-*simile* no Brasil não é cultivável em meio BSK, os soros de pacientes tem baixa reatividade em testes imunoenzimáticos frente à cepa americana G39/40 de *B. burgdorferi* sensu stricto e existe alta frequência de recorrência. Diante desse quadro, MANTOVANI et al. (2007) sugerem que espiroquetas visualizadas em sangue de pacientes com sintomatologia para borreliose de

Lyme-*simile* não estão correlacionadas ao gênero *Borrelia* e atuam conjuntamente com outros microrganismos (*Chlamydia* e *Mycoplasma*) levando a uma mimetização do quadro clínico.

O objetivo do presente trabalho foi observar a presença de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi* sensu stricto em eqüinos da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará e analisar genotipicamente isolados de espiroquetas, obtidos de eqüino, carrapato *R. (Boophilus) microplus* e de humano como borreliose de Lyme-*simile*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação

Os membros da ordem Spirochaetales são bactérias finas, espiraladas que exibem movimentos rotatórios tipo “saca-rolha”. Variam em tamanho de 3 a 500µm consistindo de uma membrana externa e um cilindro protoplasmático (SMIBERT, 1974). Os filamentos axiais ou flagelos são equivalentes aos de outras bactérias, porém não são localizados na superfície da célula, mas no espaço periplasmático entre a membrana externa e o cilindro protoplasmático.

As famílias Leptospiraceae e Spirochaetaceae compreendem as espiroquetas de importância médica e veterinária: *Leptospira*, representante da primeira família e *Serpulina*, *Treponema*, e *Borrelia* representantes da segunda (**Figura 1**) (BAKER-ZANDER; LUKEHART, 1984; QUINN et al., 2002).

A diferenciação entre as espiroquetas do gênero *Borrelia* e os demais gêneros desta família pode ser realizada pela morfometria, uma vez que estas são as maiores delas, e através de microscopia eletrônica, pela visualização dos flagelos (BARBOUR; HAYES, 1986). As borrelíias possuem maior número de flagelos periplasmáticos (15-20) e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994); embora dentro de uma mesma espécie possa existir pleomorfismo de acordo com a cepa (BENNETT, 1995). Podem ser diferenciadas pelo baixo conteúdo de guanina e citosina no seu DNA, além de características ecológicas e bioquímicas (BARBOUR; HAYES, 1986). São bactérias Gram negativas; microaerófilas e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993). Crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais e podem ser visualizadas à microscopia de campo escuro, contraste de fase e em tecidos por impregnações à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 2002).

Domínio: Eubactéria

Filo: Spirochaetes

Ordem: Spirochaetales

Família: Leptospiraceae } *Leptospira*

Spirochaetaceae } *Serpulina/Brachyspira*
 } *Treponema*
 } *Borrelia*

Figura 1. Representação da classificação sistemática de espiroquetídeos. Adaptado de Kelly et al. 1984 e Woese et al, 1990.

2.2 Transmissão

Os membros do gênero *Borrelia* têm como principais vetores os carrapatos, mas também podem ser transmitidos por piolhos (HOOGSTRAAL, 1979). Os carrapatos responsáveis pela transmissão das borrelíias pertencem à família Argasidae, também

conhecidos como carrapatos moles. Entre esses existem diversas espécies do gênero *Ornithodoros* e *Argas* que transmitem espiroquetas aos homens e animais. E também carrapatos da família Ixodidae, chamados de carrapatos duros, dos quais os gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* se destacam como vetores (SOARES et al., 2000).

Borrelia recurrentis transmitida por *Pediculus humanus* é encontrada em grande quantidade na hemolinfa. A transmissão ocorre quando o indivíduo esmaga o piolho, liberando hemolinfa infectada, que entra em contato com a área picada ou ferida (BURGDORFER et al., 1989).

Nos carrapatos argasídeos a principal forma de transmissão de *Borrelia* spp. dos instares adultos, é através do líquido coxal, ocorrendo raramente transmissão por via salivar (BURGDORFER et al., 1989).

Alguns autores sugeriram a hipótese da inoculação de espiroquetas por carrapatos ixodídeos ser feita junto com saliva contaminada por refluxo intestinal (BUGDORFER et al., 1989), enquanto outros descartavam essa possibilidade, já que não observavam células sanguíneas na saliva de carrapatos infectados por *Borrelia* (RIBEIRO et al., 1987). Foi descoberto então que as borrelíias começavam a se multiplicar no intestino do carrapato logo após a fixação desse no hospedeiro vertebrado (36h pós-fixação). Após esse período migravam para hemocele disseminando-se pelos órgãos, chegando à glândula salivar onde eram inoculadas durante o período de osmorregulação (36-48h pós-fixação) (BENACH et al., 1987; RIBEIRO et al., 1987). A diminuição do número de espiroquetas após o completo ingurgitamento dos carrapatos (96h pós-fixação), reforçou a forte evidência da rota salivar (DE SILVA; FIKRIG, 1995), além da saliva do carrapato ser capaz de inibir a imunidade celular do hospedeiro facilitando o estabelecimento de *Borrelia* no sítio da picada (RIBEIRO et al., 1987), onde permanecem por uma ou mais semanas (GERN et al., 1996). A proteína de superfície de membrana, OspC (Outer Surface Protein C), também tem importância no mecanismo de transmissão de *Borrelia* spp. Gilmore Jr et al. (2000) observaram *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) na glândula salivar de 40% dos carrapatos alimentados em camundongos não imunizados contra OspC, enquanto apenas 7,4% dos carrapatos alimentados em camundongos imunizados tinham a espiroqueta. Também observaram através de anticorpos fluorescentes, a presença de OspC em borrelíias encontradas no intestino de carrapatos alimentados em camundongos não imunizados, em contra partida não observaram a presença de OspC nas espiroquetas de carrapatos alimentados em camundongos imunizados.

A transmissão de *B. burgdorferi* sensu lato (sl) também pode ocorrer através de transfusão sanguínea ou transplante de tecido, como relatado por Dorward et al. (1991) ao visualizar esse espiroquetídeo na urina, sangue, fragmentos de bexiga, baço, fígado e cérebro de roedores experimentalmente infectados e em urina e sangue de humanos e cães que apresentavam manifestações clínicas compatíveis com borreliose de Lyme. Espiroquetas foram visualizadas em leite bovino, com isso a transmissão via oral também é considerada possível, porém rara (LEVY; DREESEN, 1992), assim como a transmissão congênita em cães (GUSTAFSON et al., 1993) e bovinos (BURGESS, 1988).

2.3 Borreliose em Humanos e Animais

A febre recorrente epidêmica é a borreliose humana causada por *Borrelia recurrentis* que tem como vetor o piolho *P. humanus* e a febre recorrente endêmica é causada por borrelíias relacionadas *B. recurrentis* transmitidas por carrapatos do gênero *Ornithodoros* (BARBOUR; HAYES, 1986; MARTI RAS et al., 1996). Espiroquetas do grupo da febre recorrente, também já foram associadas a aborto em éguas, nos EUA (WALKER et al., 2002).

Em bovinos a espiroqueta *Borrelia coriaca* causa a enfermidade conhecida como aborto epizootico bovino, que também pode ocorrer em cervídeos, transmitida por *Ornithodoros coriaceus* (SOARES et al., 2000). Nas aves, as borrelíias determinam uma

doença denominada espiroquetose aviária, causada pela *Borrelia anserina* transmitida pelos carrapatos do gênero *Argas* (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903).

Borrelia theileri (LAVERAN, 1903) é um espiroquetideo comum de bovinos e eqüinos em países tropicais e também pode ser encontrado parasitando ovinos e cervídeos (SMITH; ROGERS, 1998). O diagnóstico geralmente é feito por visualização dos espécimes no sangue, em esfregaços corados com Giemsa ou *in vivo*, através de microscopia de campo escuro (MATTON; VAN MELCKEBEKE, 1990). Por isso, a maioria dos autores que identificaram espiroquetas do gênero *Borrelia* em bovinos consideraram-na como sendo *B. theileri*, já que diferenciação bioquímica entre as diferentes espécies de borrelíias e identificação sorológica são difíceis devido à variação antigênica (HADANI et al., 1985). Assim é necessária cautela ao fechar diagnóstico em regiões onde coexistam *B. theileri*, *B. coriaca* e *B. burgdorferi* sl, uma vez que todas espécies infectam bovinos (ROGERS et al., 1999).

Torna-se necessário para definição da espécie levar-se em conta o carrapato vetor, os hospedeiros, a infectividade em animais de laboratório, além das características morfológicas (MARTINS et al., 1996) e genotípicas das espiroquetas (GUPTA; GRIFFITHS, 2002).

Existem relatos incriminando o carrapato *Boophilus microplus* = (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) (Canestrini, 1888) como vetor de *B. theileri*, na Austrália e África do Sul (CALLOW, 1967), no Brasil (MARTINS et al., 1996) e México (VIVAS et al., 1996). Outras espécies de carrapatos também já foram descritas como vetores de *B. theileri*, como *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*, *Rhipicephalus evertsi*, *Ixodes ricinus* e *Haemaphysalis cinnabarina punctata* (VIVAS et al., 1996). Smith et al. (1978) observaram o tropismo dessa espiroqueta pelos hemócitos, ovário e gânglio central de *R. (Boophilus) microplus* e sugeriram a glândula salivar como o primeiro órgão invadido pela espiroqueta, logo após o início do repasto sanguíneo, porém aparentemente nenhum tipo de prejuízo ao carrapato foi observado, evidenciando um relacionamento benigno entre *B. theileri* e o seu vetor (MARTINS et al., 1996).

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

Até hoje, existe apenas um artigo científico caracterizando *B. theileri* genotipicamente. Os autores analisaram os genes 16S *rRNA* (subunidade menor do RNA ribossomal) e *fla* (flagelina) de espiroquetas que infectavam naturalmente *R. (Boophilus) microplus* provenientes do México, e concluíram que *B. theileri*, *Borrelia miyamotoi* (FUKUNAGA et al., 1995) e *Borrelia lonestari* (BARBOUR et al., 1996) formam um grupo monofilético, relacionado ao grupo das espiroquetas que causam a febre recorrente (RICH et al., 2001).

O complexo *B. burgdorferi* sl é composto por espiroquetas capazes de induzir infecção em animais domésticos, silvestres e humanos determinando a enfermidade conhecida como borreliose de Lyme.

2.4 Borreliose de Lyme - Histórico, Epidemiologia e Distribuição

Borreliose de Lyme, também conhecida como espiroquetose ou doença de Lyme é a mais importante das borrelioses por ser uma doença de caráter sistêmico e por se tratar de uma zoonose, que tem como vetores carrapatos da família Ixodidae.

Os primeiros indícios da borreliose de Lyme foram reportados na Europa, por Buchwald em 1883 que descreveu uma atrofia de pele em humanos de caráter idiopático, sendo mais tarde denominado de Acrodermatite Atrófica Crônica, por Herxheimer e Hartman. Em 1902, Afzelius demonstrou esta lesão associada à picada de *Ixodes ricinus*, referindo-a como eritema migratório. Garin e Bujadoux, em 1922, observaram meningoradiculite e

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

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

Desde a primeira descrição, outras espécies de *Borrelia* têm sido relatadas nos EUA (MARCONI et al., 1995; POSTIC et al., 1998), Europa (BARANTON et al., 1992; CANICA et al., 1993; LE FLECHE et al., 1997; WANG et al., 1997) e Ásia (KAWABATA et al., 1993; FUKUNAGA et al., 1996a; MASUZAWA et al., 2001), obtidas de humanos com manifestações clínicas da borreliose de Lyme (SITUM et al., 2000), animais (LIN et al., 2001) ou de carrapatos do gênero *Ixodes* (JENKINS et al., 2001).

Indivíduos sorologicamente positivos para *B. burgdorferi* sl são encontrados na América Central (WINWARD; SMITH, 1989), América do Sul (PALÁCIOS et al., 1999; FONSECA et al., 2005), África (ZAHAF et al., 1994), e Oceania (WILLIS; BARRY, 1991) às vezes associados a manifestações clínicas compatíveis com a borreliose de Lyme.

Até hoje foram descritas 11 espécies pertencentes ao complexo *B. burgdorferi* sl (**Quadro 1**), são elas: *B. burgdorferi* ss (JOHNSON, 1984), *B. garinii* (BARANTON et al., 1992), *B. afzelii* (CANICA et al., 1993), *Borrelia japonica* (KAWABATA et al., 1993), *Borrelia andersoni* (MARCONI et al., 1995), *Borrelia lusitanae* (LE FLECHE et al., 1997), *Borrelia valaisiana* (WANG et al., 1997), *Borrelia bissettii* (POSTIC et al., 1998), *Borrelia turdi* (FUKUNAGA et al., 1996a), *Borrelia tanukii* (FUKUNAGA et al., 1996a) e *Borrelia sinica* (MASUZAWA et al., 2001).

Quadro 1. Complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato: espécies, vetores, hospedeiros e distribuição.

Agentes etiológicos	Vetores	Hospedeiros	Distribuição
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Animais Silvestres, Domésticos e Homem,	América do Norte e Europa
<i>B. garinii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Europa e Ásia
<i>B. afzelii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Europa e Ásia
<i>B. japonica</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Ásia
<i>B. andersoni</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	América do Norte
<i>B. lusitaniae</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Europa
<i>B. valaisiana</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Europa e Ásia
<i>B. bissettii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	América do Norte
<i>B. turdii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Asia
<i>B. tanukii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Idem	Asia

Adaptado de Soares et al. (2000) e Fonseca et al. (2005).

As comunidades médica e científica pesquisaram muito uma explicação para os casos de borreliose de Lyme nos EUA com sorologia e cultivo negativos para *B. burgdorferi* ss. Pacientes picados por carrapato *Amblyomma americanum* sofriam de uma doença cutânea (Rash illness) associada ao carrapato, causada por um agente etiológico desconhecido (SCHULZE et al., 1984). A amplificação de um fragmento de 434pb do gene 16S *rRNA* dessas espiroquetas não cultiváveis encontradas no carrapato *A. americanum* revelou que não se tratava de *B. theileri* e associaram-na a borreliose de Lyme-like ou borreliose de Lyme-simile (ARMSTRONG et al., 1996). Evidências sugeriam que pessoas picadas por *A. americanum* que desenvolviam essa lesão (indistinguível do eritema migratório característico da borreliose de Lyme) estariam infectadas por *B. lonestari*. Schwan et al. (1996) identificaram uma enzima imunodominante chamada de GlpQ (Glicerolfosfodiester fodfodiesterase), em espiroqueta relacionada à febre recorrente e demonstraram que o soro de humanos infectados pelas espiroquetas do grupo da febre recorrente reagiam por immunoblotting com antígeno recombinante dessa enzima, enquanto pacientes com borreliose de Lyme, não. Baseado nisso e no fato de *B. lonestari* estar mais relacionada filogeneticamente às espiroquetas que causam febre recorrente, os autores procuraram o gene *glpQ* em carrapatos positivos para *B. lonestari*. Com isso a descoberta do gene *glpQ* em *B. lonestari* fortificou a noção de que essa espiroqueta está mais relacionada aos agentes da febre recorrente do que dos agentes da borreliose de Lyme (BACON et al., 2004). Análises filogenéticas baseadas em seqüências dos genes 16S *rRNA* e *fla* formam um grupo irmão entre *B. lonestari*, *B. miyamotoi* e *B. theileri* (RICH et al., 2001). Outra espiroqueta associada a borreliose de Lyme-simile é *Borrelia barbouri*, porém essa foi considerada idêntica *B. lonestari* por Rich et al. 2001.

A manutenção de *B. burgdorferi* sl em uma determinada região depende da presença de hospedeiros reservatórios adequados e de hospedeiros de manutenção de carrapatos (QUINN et al., 2002).

Os hospedeiros reservatórios são os pequenos roedores, como camundongos, ratos, coelhos silvestres e porcos-espinhos (QUINN et al., 2002). O camundongo da pata branca (white-footed mouse), *Peromyscus leucopus* é incriminado como o principal reservatório para manutenção de *B. burgdorferi* ss nos EUA (BURGESS et al., 1986). As aves migratórias também são consideradas reservatórios por atuarem na manutenção e transmissão de *B. burgdorferi* sl (STAFFORD III et al., 1995), bem como carrearem carrapatos infectados auxiliando na dispersão de *Borrelia* spp. (TELFORD III et al., 1989; DURDEN et al., 2001).

Os grandes mamíferos, como cervídeos e animais domésticos são considerados os hospedeiros de manutenção da população de carrapatos (QUINN et al., 2002). O veado da cauda branca (White-tailed deer), *Odocoileus virginianus* é considerado o principal hospedeiro de carrapatos adultos *Ixodes* spp (LEVY; DREESEN, 1992). Os animais silvestres caracterizam-se como reservatórios naturais, não apresentando sintomatologia clínica (ANDERSON, 1988), enquanto os animais domésticos são conhecidos como importantes reservatórios de *Borrelia* sp. no ambiente domiciliar, favorecendo, assim, ao carrapato veicular o patógeno até o homem e outros animais (MATHER et al., 1994).

Os carrapatos do gênero *Ixodes* completam o ciclo de uma geração em dois anos. As larvas eclodem no final da primavera e se alimentam principalmente de sangue de pequenos roedores silvestres. Estas então se desprendem do hospedeiro e na primavera seguinte fazem a muda para o estágio de ninfa, que podem se alimentar em animais silvestres, domésticos e homem. As ninfas caem ao solo e no final do verão mudam para o estágio adulto. O ínstar adulto de *Ixodes* spp. se alimenta preferencialmente de grandes mamíferos, incluindo homens. No início do inverno é possível encontrar carrapatos adultos nas pastagens, e na primavera as fêmeas fazem postura de 2000 a 4000 ovos (APPEL, 1990).

No mundo os principais vetores de *B. burgdorferi* sl são: *I. scapularis* (sin. *I. dammini*) e *I. pacificus* nos EUA, *I. ricinus* na Europa e Ásia, *Ixodes persulcatus* na Ásia, com *Ixodes ovatus*, *Ixodes turdus* e *Ixodes tanuki* no Japão e *Ixodes ovatus* na China e Nepal (MASUZAWA, 2004).

A infecção do carrapato por *B. burgdorferi* sl pode ocorrer no estágio de larva, ninfa ou adulto. A transmissão transovariana ocorre, mas não é eficiente para a manutenção de *B. burgdorferi* sl nas populações de carrapatos (SCHOELER; LANE, 1993). Burgdorfer et al. (1988) citam que a transmissão transovariana ocorre em 100% dos carrapatos, porém apenas 1% destes são capazes de transmitir a bactéria para o hospedeiro vertebrado. Isso ocorre pelo fato de não ser transmitido número suficiente de espiroquetas para induzir a infecção no hospedeiro primário (pequenos roedores) (APPEL, 1990). Hoogstraal (1979) afirmou que os espiroquetídeos vivem em simbiose com seus vetores. Estudos realizados com fêmeas de *I. pacificus* revelaram que *B. burgdorferi* não afeta o sucesso de alimentação e reprodutividade desse carrapato (SCHOELER; LANE, 1993). Porém outros autores observaram que maciça infecção de teleógenas por *Borrelia* sp. poderia levá-las à infertilidade, havendo danos na formação e deposição da cutícula do ovo (BURGDORFER et al., 1989).

A transmissão de *B. burgdorferi* sl para o hospedeiro vertebrado ocorre através do estágio de ninfa ou adulto (LEVY; DREESEN, 1992). As espiroquetas que estão no intestino do carrapato são estimuladas pela ingestão de sangue no início do repasto, ocorrendo então sua migração para glândula salivar e posterior inoculação na pele do hospedeiro (STRAUBINGER, 2000). Estas se multiplicam no sítio da picada e em algumas semanas migram para outros tecidos, invadindo as articulações levando a processos inflamatórios, com deposição de complexos imunes (GREENE, 1990). A produção de fatores inflamatórios e anti-inflamatórios podem ser a razão da intermitência das artrites (YANG et al., 1994).

2.5 Borreliose de Lyme - Aspecto Clínico

2.5.1 Cães

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

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

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

2.5.2 Bovinos

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

Burgess (1988) isolou *B. burgdorferi* da urina e colostro de bovinos de uma região do Estado de Wisconsin, onde não existe *I. dammini*, sugerindo a infecção oral e através de dípteros hematófagos. Espiroquetas também foram isoladas do fluido sinovial de animais com manqueira e aumento articular. Nesse mesmo estudo, ainda foi isolado *B. burgdorferi* do sangue de um bezerro recém nascido comprovando a transmissão transplacentária. A presença de espiroquetas no sangue de vacas que sofreram aborto sugere que a infecção por esse espiroquetídeo cause problemas reprodutivos.

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

2.5.3 Eqüinos

Os eqüinos foram caracterizados como reservatórios para *B. burgdorferi* por Marcellis et al. (1987), ao observarem que a infecção por essa espiroqueta nesses animais levava a quadro clínico. Posteriormente foi destacada a possibilidade desse espiroquetídeo ter entrado nos EUA através de eqüinos infectados vindos da Europa e alertou-se para o risco de introdução em áreas livres através desses animais (COHEN et al., 1988).

Animais sorologicamente positivos para *B. burgdorferi* em áreas endêmicas para borreliose de Lyme, nos EUA, apresentavam hipersensibilidade da pele, com perda de pêlo e descamação nas áreas onde previamente havia carrapato fixado (MAGNARELLI et al., 1988). Inquéritos sorológicos para *B. burgdorferi* demonstraram até 60% de animais positivos em áreas endêmicas, alguns animais apresentavam dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, sugerindo importantes implicações para a indústria equina no futuro (COHEN et al., 1988). Perda de peso, claudicação esporádica, febre, aumento articular, enrijecimento muscular, panuveíte e sinais neurológicos como depressão, mudança de comportamento, disfagia, balanço de cabeça e encefalite foram outros sintomas já descritos (BURGESS et al., 1986; COHEN; COHEN, 1990; PARKER; WHITE, 1992).

A borreliose de Lyme em equinos só está bem definida nos EUA, apresentando positividade de 10 a 75% em áreas endêmicas (COHEN et al., 1988; PARKER; WHITE, 1992). Bosler et al. (1988) analisaram por sorologia cavalos clinicamente sadios e cavalos com clínica para borreliose de Lyme e alertaram para a possibilidade de animais assintomáticos, soropositivos, não tratados, apresentarem manifestações clínicas posteriormente. Trabalhos desenvolvidos na Europa consideram controversa a associação entre sorologia positiva e sinais clínicos para equinos, também não conseguindo associar esses dois quadros à PCR positivo (CARTER et al., 1994; EGENVALL et al., 2001; MULLER et al., 2002; SCHÖNERT et al., 2002).

2.6 Borreliose de Lyme *simile* - Brasil

No Brasil, a primeira publicação alertando a comunidade médica para a possibilidade da ocorrência de borreliose de Lyme nesse território, foi em 1989. Em 1990 foi formada uma equipe multidisciplinar envolvendo médicos de diferentes especialidades e veterinários a fim de encontrar indivíduos positivos e estudar o perfil da borreliose de Lyme no Brasil. Com isso criou-se na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo um laboratório e ambulatório voltados ao atendimento de casos suspeitos da doença e posteriormente esse serviço foi credenciado como Centro de Referência para Borreliose de Lyme (YOSHINARI et al., 1995).

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

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

Vários registros de borreliose de Lyme *simile* foram feitos por todo o país, Rio de Janeiro (AZULAY et al., 1991; BRIGGS et al., 1993), São Paulo (YOSHINARI et al., 1993a; 1993b), Mato Grosso do Sul (COSTA et al., 1996) e Amazonas (TALHARI et al., 1992). Yoshinari et al. (2003) publicaram um estudo feito em Cotia, estado de São Paulo, onde dois irmãos apresentavam histórico de contato com carrapato e sintomatologia compatível com borreliose de Lyme. Foi observada presença de anticorpos homólogos contra *B. burgdorferi* ss e *Babesia bovis* em ambos irmãos. Em Manaus, estado do Amazonas, foi visualizado *Borrelia* sp. pela primeira vez, nesta região, em um corte histológico corado pela técnica de Warthin Starry em paciente com diagnóstico clínico de eritema crônico migratório (MELO et al., 2003).

Em 2005, Fonseca et al. publicam um artigo de revisão destacando a importância da borreliose Lyme *simile* para a dermatologia no Brasil, reforçando a importância do isolamento do agente etiológico, que até hoje não foi possível.

Existem diferenças entre a enfermidade que ocorre no Brasil e a que ocorre nos EUA. Algumas delas são a impossibilidade de cultivo da espiroqueta em meio BSK, a baixa reatividade de soros de pacientes em testes imunoenzimáticos frente à cepa americana G39/40 de *B. burgdorferi* ss, a alta frequência de recorrência, além de evidências de manifestações clínico-laboratoriais de origem alérgica e auto-imune (YOSHINARI; MANTOVANI, 2006). Como isso, atualmente a enfermidade que ocorre no Brasil de origem infecciosa relacionada a espiroquetas, que determina manifestações clínicas parecidas com a borreliose de Lyme, é denominada de Síndrome Infecto-Reacional Lyme *simile* (SIRLS) (YOSHINARI; MANTOVANI, 2006).

Os vetores ainda não estão estabelecidos, porém um estudo com carrapatos de pequenos mamíferos do estado de São Paulo, sugeriu o *Ixodes* spp. como um potencial vetor para o agente da borreliose de Lyme-*simile*, sendo responsável pela manutenção da espiroqueta no ambiente silvestre e *Amblyomma cajennense* responsável pela transmissão ao homem (ABEL et al., 2000).

Os animais domésticos são conhecidos como importantes reservatórios de *Borrelia* sp. no ambiente domiciliar, favorecendo a veiculação do patógeno pelo carrapato até o homem e outros animais (MATHER et al., 1994); contudo faz-se necessário a realização de mais estudos fisiográficos envolvendo esses animais, além de animais silvestres, carrapatos e cultivo com a finalidade de esclarecer a situação da enfermidade no Brasil.

2.7 Diagnóstico

A variedade de genoespécies e sorotipos existentes de *B. burgdorferi* sl levam a diferentes manifestações clínicas da borreliose de Lyme no mundo (VAN DAM et al., 1993; HERCOGOVA et al., 2001). Em humanos, nos EUA a enfermidade se caracteriza principalmente por problemas articulares (BURGDORFERI et al., 1982) e pelo eritema migratório crônico (STEERE et al., 1983), relacionado à *B. burgdorferi* ss. Na Europa ocorrem principalmente manifestações cutâneas tardias, conhecidas como acrodermatite crônica atrofiante, correlacionada com *B. afzelii* e sintomas extracutâneos devido à disseminação do agente, como neuroborreliose e bloqueio átrio-ventricular relacionados a *B. garinii* (VAN DAM et al., 1993; HERCOGOVA et al., 2001). Em animais as manifestações clínicas são as mais diversas entre as espécies domésticas, sendo difícil o diagnóstico (QUINN et al., 2002). Para um diagnóstico definitivo é necessário associar vários fatores, destacando-se a sintomatologia clínica, a epidemiologia e a sorologia positiva (DICKINSON; BATTLE, 2000).

O cultivo e isolamento de *Borrelia* spp. é um método muito utilizado em estudos científicos. Para isso, o espiroquetídeo é mantido em meio Barbour-Stoener-Kelly (BSK), em condições microaerófilas à 33°C, por aproximadamente 5 dias. Porém dependendo da cepa pode-se levar semanas a meses. A cultura pode ser realizada através de saliva, hemolinfa ou tecido de carrapatos, além de soro, fluidos corporais e tecidos de homens e animais (ANDERSON, 1989; EWING et al., 1994; LANE et al., 1994; DICKINSON; BATTLE, 2000). Porém, esse método tem limitações, podendo apresentar baixa sensibilidade com amostras provenientes de cães e equinos, devido à baixa espiroquetemia nessas espécies (COHEN, 1996; DICKINSON; BATTLE, 2000) além do fato de algumas espécies do complexo *B. burgdorferi* sl serem de difícil cultivo (SMITH; ROGERS, 1998; OLIVEIRA et al., 2004).

A visualização de *Borrelia* pode ser feita através da técnica de impregnação de tecidos pela prata (QUIN et al., 2002). É possível também a observação de borrelíias em esfregaços de

sangue fixados em metanol e corados com Giemsa (MADUREIRA et al., 2004), ao contrário do que ocorre com outras espiroquetas patogênicas (*Treponema* e *Leptospira*) que tem pouca ou nenhuma afinidade por este corante (KELLY, 1984). Porém, a sensibilidade dessa técnica é baixa quando comparada à observação direta em microscopia de campo escuro ou contraste de fase (MATTON; MALCKEBEKE, 1990).

2.7.1 Sorologia

O ensaio imunoenzimático ELISA indireto tem sido o método de diagnóstico mais empregado e reconhecido para diagnosticar a borreliose. A sensibilidade e especificidade do teste podem ser comprometidos por fatores como demora na soroconversão, três a oito semanas em eqüinos, e por reações cruzadas com outras espécies de *Borrelia* e gêneros afins (COHEN, 1996). Por isso, os ensaios devem ser estabelecidos para cada laboratório com os padrões de controle adequados, título mínimo e linha de corte (*cut-off*) seguros.

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

Reações cruzadas entre *Borrelia* spp. e *Leptospira* spp. também têm sido relatadas em animais embora não significativas (WELLS et al., 1993; JOPPERT, 1995). No Brasil não foram observadas reações cruzadas entre esses dois gêneros de espiroquetas segundo levantamentos soroepidemiológicos realizados em bovinos (ISHIKAWA, 2000), cães (SOARES et al., 1999) e eqüinos (SALLES et al., 2002), com auxílio do teste ELISA indireto utilizando antígeno sonicado de célula total.

Muitos estudos têm sido realizados com antígenos recombinantes específicos para *B. burgdorferi*, como proteínas de superfície OspA (Outer Surface Protein A)(31kDa), OspB (Outer Surface Protein B) (34kDa), OspC (23kDa), OspE (Outer Surface Protein E) (19kDa) e OspF (Outer Surface Protein F) (29kDa), lipoproteína VlsE (surface-exposed lipoprotein), fragmento central da flagelina p41-G (13kDa) entre outras proteínas, p22, p35, p37 e p39, a fim de aumentar a especificidade de imunoenaios para espécies como cães, eqüinos, bovinos e humanos (GREENE et al., 1988; MAGNARELLI et al., 1997; 2000; 2004; MAGNARELLI; FIKRIG, 2005). Embora Grodzicki e Steere (1988) não tenham observado diferença significativa entre ELISA recombinante flagelar com ELISA de antígeno de célula total, os antígenos recombinantes são considerados mais específicos. Porém esses estes têm suas limitações; OspC está relacionado à respostas iniciais da infecção por *B. burgdorferi*, OspF à resposta tardia e os OspA, OspB e OspE parecem não ser freqüentes em soros de cães, eqüinos e humanos (MAGNARELLI et al., 1996; 1997). Assim, o ELISA com antígeno de extrato de célula total foi considerado o método mais prático para a varredura inicial de um grande número de soros e conseqüentemente para levantamentos soroepidemiológicos (MAGNARELLI et al., 2004).

Ensaio como o *western blotting* têm sido empregados para confirmação do resultado, após triagem realizada com o método ELISA, pois demonstram maior sensibilidade e especificidade que este (GRODZICKI; STEERE, 1988). Para isso, é fundamental estabelecer a qualidade e a quantidade das bandas reativas, de acordo com o antígeno utilizado e região estudada (SOARES et al., 2000).

2.7.2 Genética molecular

Numerosas tentativas foram feitas no passado para se agrupar e classificar organismos procariotos baseado em semelhanças como características morfológicas, bioquímicas e

fisiológicas. A maior mudança nessa consideração ocorreu com o reconhecimento que seqüências lineares de macromoléculas em diferentes espécies, continham uma enorme reserva de caracteres qualitativos e quantitativos derivados diretamente de um ancestral comum. Baseado no alinhamento de seqüências de genes homólogos, o número e a natureza da mudança de seqüências poderia ser determinado entre diferentes espécies. Isto formou a base para deduzir a relação genealógica entre espécies baseado em seqüências moleculares (GUPTA et al., 2002).

A diversidade de espécies de *Borrelia* atrai muitos estudos científicos na que se diz respeito à evolução microbiológica. Estudos filogenéticos dessas espécies foram requeridos para identificar organismos patogênicos e melhor conhecer a adaptação aos vetores artrópodes e reservatórios vertebrados (WEISBURG et al., 1991; FUKUNAGA et al., 1996b). Com isso vários genes têm sido usados como marcadores filogenéticos, como 16S rRNA (ESCUADERO et al., 2000; RICH et al., 2001), *fla* (FUKUNAGA; KOREKI, 1995; FUKUNAGA et al., 1996b; RICH et al.; 2001) e *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase)(ALEKSHUN et al., 1997; LEE et al., 2000; RENESTO, 2000).

O genoma de *B. burgdorferi* é um dos mais complexos, conhecidos em procariotos, com um cromossomo linear de 910.725pb em comprimento, 21 elementos extracromossomais, incluindo 12 plasmídeos lineares e 9 circulares, totalizando outros 610.694pb (PORCELLA; SCHWAN, 2001). O grupo rDNA (DNA ribossomal) de cepas de *B. burgdorferi* sl está localizado no centro do cromossomo linear e seu arranjo é seguido pela ordem: *rrs-rrlA-rrfA-rrlB-rrfB* (16S-23S-5S-23S-5S) (RANKA et al., 2004). Os RNAs ribossomais são os marcadores filogenéticos mais investigados, especialmente os 16S rRNA, assim como esses têm sido usados com sucesso para diferenciar domínios, subclasses, grupos e espécie de bactérias (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994).

Outros marcadores têm sido utilizados com sucesso, como o gene *fla* e *rpoB*. O gene *fla* tem aproximadamente 1kb e sua localização no cromossomo é conservada entre as espécies de *Borrelia*. É um gene único que codifica para a proteína flagelina (41kDa) (FUKUNAGA et al., 1996b), principal constituinte flagelar peculiar às espiroquetas, que está localizado no flagelo periplasmático abaixo da membrana externa (SITUM et al., 2000). Por o gene *fla* ser altamente conservado, sua diversidade é valiosa para distinguir as espécies de *Borrelia* (PICKEN, 1992; FUKUNAGA et al., 1996b).

O gene *rpoB* codifica para a subunidade β de RNA polimerase, que está relacionada à resistência a rifampicina (BOOR et al., 1995). Seu tamanho ultrapassa 3kb e codifica para uma proteína de 129,8 kDa (ALEKSHUN et al., 1997). O desenho de oligonucleotídeos iniciadores correspondentes à regiões altamente conservadas desse gene conseguiram diferenciar espécies, assim como análises dos genes 16S rRNA e *fla*, com isso o gene *rpoB* foi considerado um marcador muito útil na diferenciação de espécies de *Borrelia* (LEE et al., 2000).

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é a base para uma série de outras técnicas como, RFLP-PCR (RANKA et al., 2004), Nested PCR (SCHÖNERT, 2002), PCR em tempo real (PIESMAN et al., 2001) e Multiplex-PCR (COUTNEY et al., 2004) entre outras, que têm sido muito utilizadas para identificação de *Borrelia* spp. em animais, humanos e carrapatos (WALLICH et al., 1992). Por isso é considerada o ensaio mais preciso, pois garante resultado específico por meio da amplificação do DNA do agente (LIENBLING et al., 1993), e somada a análises fenotípicas e características biológicas são capazes de caracterizar espécies (FUKUNAGA et al., 1995).

CAPÍTULO I

SOROLOGIA PARA *Borrelia burgdorferi* EM EQÜINOS DA ILHA DE MARAJÓ E MUNICÍPIO DE CASTANHAL, ESTADO DO PARÁ

RESUMO

MADUREIRA, Renata Cunha. **Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em eqüinos da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará.** 2007. 10p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

O complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato é responsável por causar a enfermidade conhecida como borreliose de Lyme no hemisfério norte. Esses espiroquetídeos infectam animais silvestres, domésticos e humanos, sendo transmitidos por carrapatos do gênero *Ixodes*. Em áreas endêmicas para borreliose de Lyme nos EUA foi relatado eqüinos apresentando dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, enquanto na Europa não foi observada associação entre sorologia positiva e sinais clínicos nesses animais. No Brasil, diversos estudos têm sido realizados em animais e humanos a fim de se esclarecer a epidemiologia dessa enfermidade no país. O objetivo do presente trabalho foi observar a presença de anticorpos homólogos da classe IgG contra *Borrelia burgdorferi* sensu stricto em eqüinos da Ilha de Marajó e município de Castanhal, estado do Pará; determinar a freqüência de animais soropositivos e avaliar se existe diferença estatística entre as freqüências dos animais soropositivos da ilha e do continente. Procedeu-se a coleta de 208 soros de eqüino, onde 105 amostras foram provenientes da Ilha de Marajó e 103 amostras foram provenientes do município de Castanhal, as quais foram analisadas pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto. Registrou-se por meio de um questionário dados como raça, sexo, idade e presença ou ausência de carrapatos. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através dos testes não paramétricos Qui-quadrado e Fisher, com nível de significância de 95%. Observou-se 15 animais reagentes positivos (7,2%) ao ELISA indireto, sendo 10 animais provenientes da Ilha de Marajó (9,5%) e cinco animais de Castanhal (4,9%). Não foi observada diferença significativa entre a soropositividade da ilha e do continente. O mesmo foi observado para os parâmetros sexo, raça e idade. A presença de anticorpos homólogos contra *Borrelia burgdorferi* em eqüinos na ilha de Marajó e Castanhal é indicativo da presença de *Borrelia* sp. e, apesar da baixa freqüência de animais soropositivos é necessário atenção para ocorrência de borreliose humana nas regiões estudadas, considerando a importância dessa enfermidade como zoonose emergente.

Palavras chaves: *Borrelia* sp., Spirochaetae, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

MADUREIRA, Renata Cunha. **Serology of *Borrelia burgdorferi* in equines of the Marajó Island and Castanhal municipality, State of Pará.** 2007. 10p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The complex *Borrelia burgdorferi lato sensu* is responsible for causing the disease known as Lyme borreliosis in the northern hemisphere. These spirochetes infects wild and domesticated animals, as well as humans, being carried out by ticks of the genus *Ixodes*. In Lyme borreliosis affected areas in EUA, it has been reported equines showing dermatitis in their members, polyarthritis and transitory edemas of limbs; meanwhile, in Europe, it was not observed any relation among positive serology and clinical symptoms. In Brazil, several studies were been conducted in humans and animals aiming to clarify the epidemiology of such a disease. The objectives of this work were to check out the presence of homologue antibodies of the IgG class against *Borrelia burgdorferi stricto sensu* in equines of the Marajó Island and the municipality of Castanhal, State of Pará; to determine the frequency of serum-positive animals; and to evaluate the statistical differences among the frequencies of serum-positive animals from the island and the continent . Serum from 208 equines were collected, being 105 from the Marajó Island and 103 from Castanhal municipality, and analyzed by indirect ELISA test. Race, sex, age of the animals and the presence or absence of ticks at sample collection site were registered. Results were evaluated by the non-parametric tests of Chi-Square and Fisher indirect, at 95% significance level. Fifteen equines (7,2% of the total) were serum-positive, being 10 from the Marajó Island (9,5%) and five (4,9) from the Castanhal municipality (4,9%). There was no significant difference ($p>0,05$) for the serum-positive data between both places, as well as for sex, race or age of the animals. On the other hand, the presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in equines from both places is an indicative of the presence of *Borrelia* sp., and, despite the lower frequency of infected animals, attention is needed for the possible occurrence of human borreliosis in those areas, considering the importance of this emergent zoonosis.

Key-words: *Borrelia* sp., Spirochaetaceae, immunoassay.

1 INTRODUÇÃO

O complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) é responsável por causar a enfermidade conhecida como borreliose de Lyme nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Ásia. Esses espiroquetídeos são transmitidos por carrapatos do gênero *Ixodes* aos animais silvestres, caracterizados como reservatórios naturais (ANDERSON, 1988) e aos animais domésticos, conhecidos como importantes reservatórios de *Borrelia* spp. no ambiente domiciliar, favorecendo ao carrapato veicular o patógeno até o homem e outros animais (MATHER et al., 1994). Inquéritos sorológicos nos EUA para *B. burgdorferi* em eqüinos, demonstraram até 60% de animais positivos em áreas endêmicas, alguns animais apresentavam dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, sugerindo importantes implicações para a indústria eqüina no futuro (COHEN et al., 1988). Trabalhos desenvolvidos na Europa consideram controversa a associação entre sorologia positiva e sinais clínicos para eqüinos (CARTER et al., 1994; EGENVALL et al., 2001; MULLER et al., 2002; SCHÖNERT et al., 2002), porém isso não descarta a importância desses animais em levantamentos soroepidemiológicos para observação do agente na região.

No Brasil, a primeira publicação alertando a comunidade médica para a possibilidade da ocorrência de borreliose de Lyme nesse território, foi em 1989 (YOSHINARI et al., 1995). Posteriormente vários registros de borreliose de Lyme *simile* foram feitos por todo o país, Rio de Janeiro (AZULAY et al., 1991; BRIGGS et al., 1993), São Paulo (YOSHINARI et al., 1993; 2003), Mato Grosso do Sul (COSTA et al., 1996) e Amazonas (TALHARI et al., 1992; MELO et al., 2003). Além de inquéritos sorológicos em eqüinos (SALLES et al., 2002; MADUREIRA et al., no prelo; GALO et al., no prelo), bovinos (ISHIKAWA, 1996; 2000), búfalos (CORRÊA, 2007) e cães (SOARES et al., 1998; ALVES et al., 2004).

Em artigo de revisão FONSECA et al. (2005) destacaram a importância da borreliose Lyme *simile* para a dermatologia no Brasil, reforçando a importância do isolamento do agente etiológico, que até hoje não foi possível. Também os vetores ainda não foram estabelecidos, porém um estudo com carrapatos de pequenos mamíferos do estado de São Paulo, sugeriu o *Ixodes* spp. como um potencial vetor para o agente da borreliose de Lyme-*simile*, sendo responsável pela manutenção da espiroqueta no ambiente silvestre e o “carrapato do cavalo” *Amblyomma cajennense* responsável pela transmissão ao homem (ABEL et al., 2000).

Outra espiroqueta que infecta eqüinos é *Borrelia theileri*, esta tem como principal vetor o carrapato *Boophilus microplus* (= *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) (CALLOW, 1967). ROGERS et al. (1999) alertaram para a probabilidade de comprometimento de estudos soroepidemiológicos devido a reações cruzadas entre *B. burgdorferi* sl e *B. theileri* em regiões onde os agentes coexistem. Porém no mesmo estudo avaliaram a especificidade do teste ELISA com soro bovino não observando reação cruzada.

A Ilha de Marajó é a maior ilha flúvio-marinha do mundo apresentando características fisiográficas peculiares (MARQUES et al., 2001). No lado oriental da ilha onde predomina terras baixas e campos naturais, ocorreram cruzamentos entre várias raças de eqüinos resultando na raça Marajoara, endêmica dessa região, adaptada ao meio e ao trabalho no campo (MARQUES et al., 2001).

O objetivo do presente trabalho foi observar a presença de anticorpos homólogos da classe IgG contra *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss) em eqüinos da Ilha de Marajó e Castanhal, Estado do Pará, determinar a frequência de animais soropositivos e avaliar se existe diferença estatística entre as frequências dos animais soropositivos da ilha e do continente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais estudados

Procedeu-se a coleta de 208 soros de equinos da Ilha de Marajó (n=105) e do município de Castanhal (-01° 17' 38" S; 47° 55' 35" W) (n=103), Estado do Pará (**Figura 1**).



Figura 1. Mapa do Estado do Pará.

Na Ilha de Marajó coletou-se 52 amostras do município de Soure (-00° 43' 00" S; 48° 31' 24" W) e 53 amostras do município Cachoeira do Arari (-01° 00' 41" S; 48° 57' 48" W). As amostras de soro foram colhidas por conveniência de equinos jovens e adultos, aparentemente saudáveis, de diferentes raças, entre os meses de novembro e dezembro de 2004. Coletou-se assepticamente o sangue destes animais, através da venopunção jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante e, os soros obtidos foram alíquotados em tubos tipo 'ependorf' e armazenados à -20°C até o momento da análise sorológica. Foi utilizado o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto padronizado por Salles et al. (2002) (**Anexo A**).

Por meio de um questionário (**Anexo B**) foram registrados dados como raça, sexo e idade dos animais, onde foram agrupados em 3 faixa-etárias distintas, sendo elas: animais até 36 meses; maiores de 36 meses a 84 meses e maiores de 84 meses de idade. Observou-se também, por ocasião da coleta, presença ou ausência de carrapatos.

2.2 Obtenção do antígeno

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

Na obtenção do antígeno 1,0mL de cultura de *B. burgdorferi stricto sensu* cepa G39/40 de origem americana, foi acrescido a 500ml do meio BSK, mantendo-o em estufa a 33°C por uma semana. Centrifugou-se o meio (12.000xg/20 min. a 4 °C); o sedimento foi ressuspenso em tampão salino fosfatado (PBS) 0,001M MgCl₂.6H₂O pH 7,4 e submetido ao

tratamento anterior por duas vezes. O "pellet" formado foi lavado com PBS e finalmente suspenso na mesma solução ao volume de 6,0mL. A suspensão foi submetida à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, model 300, Dynatech) por três minutos, com intervalos de 15 segundos; posteriormente filtrada a 0,45µm e alíquotada, obtendo-se assim, o extrato total de antígeno para uso nos procedimentos de ensaios imunológicos, o qual foi armazenado entre 20 a 70°C negativos até o momento de uso conforme sugeriu Grodzicki e Steere (1988).

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

2.3 Obtenção do controle positivo

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

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

2.4 Obtenção dos controles negativos

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

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

2.5 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto

As 208 amostras coletadas na Marajó de Ilha e no município de Castanhal foram analisadas através do ELISA indireto padronizado por SALLES et al. (2002).

Realizou-se o ensaio para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi* sl, utilizando o antígeno de *B. burgdorferi* ss cepa G39/40 diluído a 20 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6, sensibilizando-se microplacas de poliestireno com 96 orifícios (M-4043, Sigma Chemical), incubadas em câmara úmida a 4 °C "overnight".

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

Os doze soros controles negativos bem como os soros controle positivo e testes foram diluídos em duplicata a 1:800 em PBS T 20; esta etapa do ensaio foi incubada e lavada como a anterior. Adicionou-se às placas conjugado IgG de coelho anti IgG equina ligado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical) na diluição de 1:1000 em PBS T 20. A incubação e lavagem seguiram a fase anterior.

As placas foram forradas com a solução reveladora composta pelo substrato para-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) (Sigma Chemical) diluído em tampão glicina pH 10,5 na concentração de 1mg/mL. Estas permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e momento de leitura em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Microplate

Reader model 550, Bio-Rad Laboratories), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200µL de solução por orifício. A linha de corte do ensaio foi estabelecida pela fórmula: $\bar{x} + SD \cdot t_{v+1}(1/n)$ (FREY et al, 1998).

2.6 Análise estatística

Foram utilizados os testes não paramétricos Qui-quadrado e Fisher, por meio do programa computacional INSTAT, para observação de possíveis diferenças significativas entre as frequências encontradas nos grupos de animais de diferentes raças, sexos e idades, assim como entre as frequências das regiões analisadas. Adotou-se o nível de significância de 95% de confiança.

3 RESULTADOS

A análise soropidemiológica das 208 amostras de soros revelou que 15 (7,2%) animais foram reagentes positivos ao ELISA indireto, com anticorpos da classe IgG anti *B. burgdorferi*, enquanto 193 (92,8%) amostras foram negativas. Na Ilha de Marajó 10 (9,5%) animais apresentaram-se positivos, enquanto que em Castanhal cinco (4,8%) animais foram reagentes ao ELISA indireto. Não houve diferença significativa ($P= 0,2839$) de positividade encontrada entre a ilha e o continente (**Tabela 1**).

Tabela 1. Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos (n=208) da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, determinada por ELISA indireto.

	Frequência				Total (n=208)
	Ilha de Marajó (n=105)		Castanhal (n=103)		
	relativa	absoluta	relativa	absoluta	
Positivo	9,5% (10/105)	4,8% (10/208)	4,8% (5/103)	2,4% (5/208)	7,2% (15/208)
Negativo	90,5% (95/105)	45,7% (95/208)	95,1% (98/103)	47,1% (98/208)	92,8% (193/208)

Os dados obtidos a partir do questionário revelaram a presença de 90 animais da raça Marajoara, 91 Mangalarga Marchador e 27 de outras raças, sendo 1 da raça Árabe, 2 da Quarto de milha, 3 mestiços, 9 burros e 12 Purucas. Desses animais, 118 animais eram machos e 90 eram fêmeas. Todos os animais estavam infestados por carrapatos da espécie *Anocentor nitens*.

A análise segundo as diferentes raças revelou que: 10% dos animais da raça Marajoara, 3,3% dos Mangalarga e 11,1% dos animais de outras raças eram soropositivos para anticorpos da classe IgG contra *B. burgdorferi* (**Tabela 2**). A análise estatística não revelou diferença significativa ($P= 0,1953$) entre as frequências de animais positivos nas diferentes raças.

Tabela 2. Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos (n=208) da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, quanto à raça determinada por ELISA indireto.

	Raças (n=208)					
	Marajoara		Mangalarga Marchador		Outras Raças	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivo	10%	4,3%	3,3%	1,4%	11,1%	1,4%
	(9/90)	(9/208)	(3/91)	(3/208)	(3/27)	(3/208)
Negativo	90%	38,9%	96,7%	42,3%	88,9%	11,5%
	(81/90)	(81/208)	(88/91)	(88/208)	(24/27)	(24/208)
Total	100%	43,2%	100%	43,7%	100%	12,9%
	(90/90)	(90/208)	(91/91)	(91/208)	(27/27)	(27/208)

A análise segundo o sexo revelou que 6,8% dos machos e 7,8% das fêmeas eram positivos (**Tabela 3**) não apresentando diferença significativa (P= 0,7931).

Tabela 3. Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos (n=208) da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, quanto ao sexo determinada por ELISA indireto.

	Sexo (n=208)			
	Macho		Fêmea	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivos	6,8%	3,8%	7,8%	3,4%
	(8/118)	(8/208)	(7/90)	(7/208)
Negativos	93,2%	52,9%	92,2%	39,9%
	(110/118)	(110/208)	(83/90)	(83/208)
Total	100%	56,7%	100%	43,3%
	118/118	(118/208)	(90/90)	(90/208)

A análise segundo a faixa etária, dividida em três grupos revelou frequência relativa de: 6,1% de animais positivos com idade de até 36 meses, 5,7% dos animais positivos entre >36 a 84 meses e 9,7% dos animais entre >84 meses positivos (**Tabela 4**). A análise estatística não revelou diferença significativa entre as diferentes idades (P=0,5935).

Tabela 4. Frequência sorológica de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* em equinos (n=208) da Ilha de Marajó e município de Castanhal, Estado do Pará, quanto à faixa etária determinada pelo ELISA indireto.

Faixa Etária (n=208)						
	Até 36 meses		> 36-84 meses		> 84 meses	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivo	6,1% (4/66)	1,9% (4/208)	5,7% (4/70)	1,9% (4/208)	9,7% (7/72)	3,4% (7/208)
Negativo	93,9% (62/66)	29,8% (62/208)	94,3% (66/70)	31,7% (66/208)	90,3% (65/72)	31,2% (65/208)
Total	100% (66/66)	31,7% (66/208)	100% (70/70)	33,6% (70/208)	100% (72/72)	34,6% (72/208)

4 DISCUSSÃO

O resultado obtido no presente estudo de 7,2% (15/208) de soropositividade, difere dos resultados observados em outros inquéritos sorológicos realizados em equinos no Brasil (GALO et al., no prelo; MADUREIRA et al., no prelo). Galo et al. (no prelo), em estudo realizado com equinos do município de Castanhal-PA observaram 26,7% de animais positivos e Madureira et al. (no prelo) ao avaliarem equinos de propriedades de Três Rios e Vassouras - RJ observaram 28,4%. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que na época da coleta de soros dos animais do presente estudo, estes estavam infestados por carrapatos da espécie *A. nitens*. O carrapato incriminado por transmitir *Borrelia* spp. a humanos e animais domésticos no Brasil é *A. cajennense* (ABEL et al., 2000). Embora esse fato não tenha comprovação científica, justificaria a baixa frequência de animais soropositivos no presente estudo.

Em levantamento sorológico no município do Rio de Janeiro, com equinos mantidos sob diferentes controles de ectoparasitas, foi possível observar animais com alta infestação de carrapatos *A. cajennense* com 42,9% de positividade ao ELISA indireto, em contraste com 17,5% de animais soropositivos que viviam sob manejo regular e 0,9% sob controle rigoroso de ectoparasitas (SALLES et al., 2002) evidenciando a correlação entre presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* e infestação por carrapatos.

A borreliose de Lyme em equinos só está bem definida nos EUA, apresentando positividade de 10 a 75% em áreas endêmicas (COHEN et al., 1988; PARKER; WHITE 1992). Marcus et al. (1985) observaram 24% dos equinos de área endêmica para borreliose de Lyme, nos EUA, soropositivos para *B. burgdorferi*, e apenas 2% de soropositivos em áreas não endêmicas. Nesse trabalho os autores não observaram diferença estatística significativa entre sexo e raças, o que corrobora com os dados obtidos no presente estudo. O mesmo foi relatado por Galo et al. (no prelo) e Madureira et al. (no prelo) onde observaram que presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* é invariável quanto à idade, raça ou sexo do animal.

O diagnóstico sorológico é de grande importância no auxílio clínico e em estudos epidemiológicos, contudo este deve ser interpretado em conjunto com dados clínicos e histórico dos animais, assim como das propriedades. A presença de anticorpos homólogos contra *B. burgdorferi* em equinos na Ilha de Marajó e no município de Castanhal é indicativo da presença de *Borrelia* spp. e apesar da baixa frequência de animais soropositivos é necessário atenção para ocorrência de borreliose humana nas regiões estudadas considerando a importância dessa enfermidade como zoonose emergente.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E GENOTÍPICA DE ISOLADO BRASILEIRO DE *Borrelia theileri* (Laveran, 1903) E REGISTRO DE *Borrelia* sp. EM ISOLADOS DE CARRAPATO E HUMANO

RESUMO

MADUREIRA, Renata Cunha. **Caracterização morfológica e genotípica de isolado brasileiro de *Borrelia theileri* (Laveran, 1903) e registro de *Borrelia* sp. em isolados de carrapato e humano.** 2007. 24p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Espiroquetas do gênero *Borrelia* acometem animais e humanos em todo o mundo determinando diferentes tipos de doenças. A única espécie de *Borrelia* reconhecida e identificada no Brasil que infecta bovinos e eqüinos é *Borrelia theileri*, transmitida por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vários estudos têm sido feitos a fim de se identificar outro espiroquetídeo que circula em nosso meio e infecta animais e humanos, levando a quadro clínico parecido à borreliose de Lyme (BL). O objetivo do presente estudo foi caracterizar morfometricamente *B. theileri* isolado de eqüino e genotipicamente isolados de espiroquetas obtidos de eqüino, carrapato *R. (Boophilus) microplus* e humano, por análise das seqüências parciais dos genes *16S rRNA*, *fla* e *rpoB*. O isolado de eqüino foi obtido do soro de um animal jovem, proveniente do estado do Rio de Janeiro, extremamente debilitado, que apresentava espiroquetas na circulação periférica, visualizadas em esfregaço de sangue corados com Giemsa. O isolado de carrapato foi obtido a partir de sobrenadante de cultura de células de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, proveniente do Estado do Mato Grosso do Sul, que apresentavam espiroquetas visualizadas à microscopia de contraste de fase. O isolado de humano foi obtido do sangue de uma mulher jovem, residente no município de Seropédica-RJ, que apresentava quadro de recorrência para borreliose de Lyme-*simile* e apresentava espiroquetas na circulação periférica, visualizadas em microscopia de contraste de fase. Realizou-se a extração do DNA genômico dos três isolados com o auxílio do Kit comercial Easy-DNATM, os quais foram submetidos a técnica de PCR utilizando iniciadores para a amplificação dos genes *16S rRNA*, *fla* e *rpoB*. Os produtos da amplificação dos isolados de eqüino, carrapato e humano foram clonados em plasmídeo pGEM®-T Easy Vectors e sequenciados. A análise das seqüências do isolado de eqüino em conjunto com a análise morfológica ($17,2 \pm 3,6$ μm de comprimento; 10 ± 2 espiras) revelou ser o microrganismo em questão, *B. theileri*. O sequenciamento do isolado de carrapato revelou 100% de identidade (177/177) para o gene *16S rRNA* com seqüências de *B. burgdorferi* depositadas no “GeneBank” e 92% de identidade (250/270) para o gene *rpoB* com seqüência de *B. hermsii*. O sequenciamento do gene *16S rRNA* de sangue humano com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile*, apresentou identidade de 99% (886/889) com *B. burgdorferi*. Esta é a primeira descrição genotípica de isolado brasileiro de *B. theileri*, assim como o primeiro relato de espécie de *Borrelia* diferente de *B. theileri* infectando *R. (Boophilus) microplus* e confirmação da presença de espiroquetídeo do gênero *Borrelia* causando borreliose de Lyme-*simile* no Brasil.

Palavras chave: borreliose bovina, borreliose de Lyme, análise genotípica

ABSTRACT

MADUREIRA, Renata Cunha. **Morfometric and genotypic characterization of *Borrelia theileri* Brazilian isolated and registers of *Borrelia* sp. isolated from tick and human.** 2007. 24p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Spirochetes of the genus *Borrelia* attack animals and humans all over the world, causing different types of diseases. The unique species of *Borrelia* known and identified in Brazil which infects bovines and equines is *B. theileri*, transmitted by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Several studies were made to identify another spirochete that circulates in the country and infects both animals and humans, providing clinical symptoms regarding Lyme disease (LD). The objective of this work was to characterize morphometrically and genotypically isolates of *B. theileri* from equine and to analyze genotypically spirochetes the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, and human, by analysis of partial sequence of the gene 16S rRNA, *fla* and *rpoB*. The equine isolate was obtained from the serum of a young animal from the Rio de Janeiro State, which was extremely debilitated and presented spirochetes in the peripheral circulation, observed in blood samples stained with Giemsa. Tick isolate was obtained from supernatant of a cell culture of ticks from the Mato Grosso do Sul State, which had spirochetes seen by phase contrast microscopy. Human isolate was obtained from blood sample of a young woman, from the Seropédica municipality, RJ, that presented recurrent symptoms of LD-*simile* and had spirochetes in its peripheral circulation, as seen by phase contrast microscopy. Genomic DNA from all samples were extracted using the commercial Kit Easy-DNATM, submitted to PCR technique using the partial amplification of the gene 16S rRNA, *fla* and *rpoB*. The products of amplification of equine, tick and human isolates were cloned into the plasmid pGEM®-T Easy Vectors and sequenced. The analysis of the sequences of the isolated of equine in set with morphometric analysis (17.2 ± 3.6µm of length; 10 ± 2 espiras) revealed to be the microorganism in question, *B. theileri*. The analysis of the sequences of the tick isolated revealed an identification of 100% (177/177) for the gene 16S rRNA with sequences of *B. burgdorferi* deposited in "GeneBank" and 92% of identity (250/270) for the gene *rpoB* with sequence of *B. hermsii*. The analysis of the sequences of the human isolated revealed an identification of 99% (886/889) for the gene 16S rRNA with *B. burgdorferi* sequences. This is the first genotypic characterization of *Borrelia theileri* Brazilian isolated, as well as the first report of species of *Borrelia* different of *B. theileri* attack *R. (Boophilus) microplus* and confirmation of the presence of the genus *Borrelia* causing LD-*simile* in Brazil.

Key words: borreliose bovine, borreliose of Lyme, molecular characterization

1 INTRODUÇÃO

Espiroquetas do gênero *Borrelia* acometem animais e humanos em todo o mundo determinando diferentes tipos de doenças. A transmissão dessas bactérias ocorre principalmente através de vetores artrópodes, entre esses, o piolho *Pediculus humanus* e carrapatos ixodídeos e argasídeos (SOARES et al., 2000).

As espécies de *Borrelia* podem ser divididas filogeneticamente em três grandes grupos, a partir do gene *fla* (FUKUNAGA et al., 1996) e 16S *rRNA* (RICH et al., 2001). Um grupo é constituído das espécies de *Borrelia* relacionadas à borreliose de Lyme, transmitidas pelo carrapato ixodídeo, *Ixodes* sp.: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss), *Borrelia garinii* e *Borrelia afzelii* entre outras, que juntas são conhecidas como *B. burgdorferi* sensu lato (sl). Os outros dois grupos consistem principalmente de espécies relacionadas à febre recorrente, transmitidas por carrapatos argasídeos *Ornithodoros* sp.. Em um grupo encontram-se as espécies que ocorrem no velho mundo: *Borrelia crocidurae*, *Borrelia duttonii* e *Borrelia hispanica*; e no outro as espécies relacionadas à febre recorrente do novo mundo: *Borrelia turicatae*, *Borrelia parkeri* e *Borrelia hermsii*, além dos agentes das espiroquetoses animais: *Borrelia coriaca* (aborto epizootico bovino) e *Borrelia anserina* (borreliose aviária) (FUKUNAGA et al., 1996).

Borrelia theileri forma um ramo monofilético junto de *Borrelia myamotoi* e *Borrelia lonestari*, inseridas em um grupo maior, relacionados às espécies da febre recorrente (RICH et al., 2001). Essas três espécies são transmitidas por carrapatos ixodídeos, o que pode caracterizar que elas e as outras espécies relacionadas a febre recorrente envolvem um ancestral comum, porém só a *B. theileri*, *B. myamotoi* e *B. lonestari* se adaptaram a carrapatos ixodídeos.

O carrapato *Boophilus microplus* (= *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) (Canestrini, 1888) é um dos vetores de *B. theileri* no mundo, e até o momento esse é o único espiroquetídeo identificado nessa espécie de carrapato (COLLOW, 1967; SMITH et al., 1978; MARTINS et al., 1996). A associação patógeno-vetor é tão bem estabelecida que o diagnóstico é corriqueiramente realizado a partir do xenodiagnóstico (KESSLER et al., 2000; SMITH et al., 1985; MARTINS et al., 1996).

A única espécie de *Borrelia* reconhecida e identificada no Brasil por infectar bovinos e equinos é *B. theileri*, porém a literatura sobre essa espiroqueta é escassa.

Vários estudos têm sido feitos a fim de se identificar outro espiroquetídeo que circula em nosso meio e infecta animais e humanos, levando a quadro clínico semelhante à borreliose de Lyme. Ainda não se teve sucesso na amplificação de partes de genes utilizando iniciadores para o gênero *Borrelia*. Além disso, o agente etiológico da borreliose de Lyme-*simile* no Brasil não é cultivável em meio BSK, os soros de pacientes tem baixa reatividade em testes imunoenzimáticos frente à cepa americana G39/40 de *B. burgdorferi* ss, existe alta frequência de recorrência, além de evidências de manifestações clínico-laboratoriais de origem alérgica e auto-imune (YOSHINARI; MANTOVANI, 2006).

O difícil cultivo de espiroquetas e a baixa sensibilidade da técnica PCR para *Borrelia*, principalmente a partir de amostras de sangue, têm sido descritos (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Por esses motivos e pela dificuldade na identificação da doença e estabelecimento de tratamento, a literatura mundial aponta para a hipótese de que a entidade *Borrelia*, sozinha, é insuficiente para o desenvolvimento da borreliose de Lyme (OWEN, 2006). A doença seria o resultado da infecção por *Borrelia* em interação com outros microrganismos (bactérias, protozoários, vírus e/ou fungos) (OWEN, 2006).

Mantovani et al. (2007) avaliaram a borreliose de Lyme-*simile* no Brasil e sugeriram que espiroquetas visualizadas em sangue de pacientes com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile* não estão correlacionadas ao gênero *Borrelia* e atuam conjuntamente com outros microrganismos (*Chlamydia* e *Mycoplasma*) levando a uma mimetização do quadro clínico.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotipicamente isolados de espiroquetas, obtidos de soro eqüino, cultura de células de carrapato *R. (Boophilus) microplus* e sangue humano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material biológico

2.1.1 Amostra proveniente de eqüino

Amostras de sangue foram coletadas de um eqüino jovem, debilitado, que apresentava espiroquetas na circulação periférica, observadas em esfregaço sangüíneo (**Figura 1**). O animal era pertencente ao Curral de Apreensão da UFRRJ e foi doado à Estação de Parasitologia W. O. Neitz/DPA da UFRRJ para estudos parasitológicos, onde permaneceu sob responsabilidade do Prof. Carlos Luiz Massard.

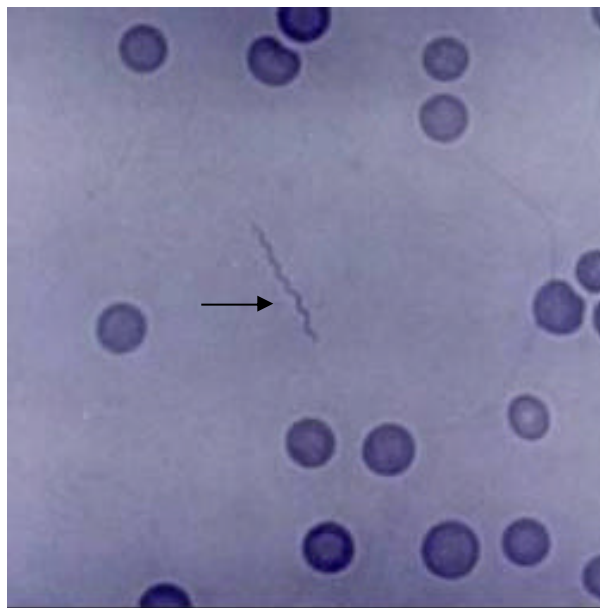


Figura 1. Espiroqueta em sangue periférico de eqüino. Esfregaço de sangue corado com Giemsa, aumento de 1000.

Coletou-se assepticamente o sangue deste animal, através da venopunção jugular em tubos tipo à vacuo sem anticoagulante, e, os soros obtidos foram aliquotados em criotubos com DMSO a 80%, na proporção de 8:2 e armazenados em botijões de nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ. Posteriormente foram transportados em gelo seco para o Laboratório de Biologia Molecular, na área de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Embrapa, no município de Campo Grande-MS, onde permaneceram em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises. Por ocasião da coleta de sangue, confeccionou-se esfregaços de sangue periférico por venopunção de vasos marginais da orelha. Os esfregaços foram fixados em metanol, corados pelo corante de Giemsa e observados por meio de microscópio fotônico com ocular de 10X e sob objetiva de imersão de 100X.

Realizou-se análise morfométrica de 100 formas espiraladas acoplado-se ao microscópio uma ocular micrométrica (Wild-pZo), com aumento de 15X. Foi mensurado a quantidade de espiras e o comprimento total de cada forma parasitária.

2.1.2 Amostra proveniente de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Coletou-se sobrenadante de cultura de células de carrapatos *R. (Boophilus) microplus*, mantidas em meio Leboivitz (Sigma Chemical), no Laboratório de Hemoparasitologia da Embrapa Gado de Corte, que apresentavam espiroquetas visualizadas à microscopia de contraste de fase com ocular de 10X e sob objetiva de 40X (**Figura 2**).

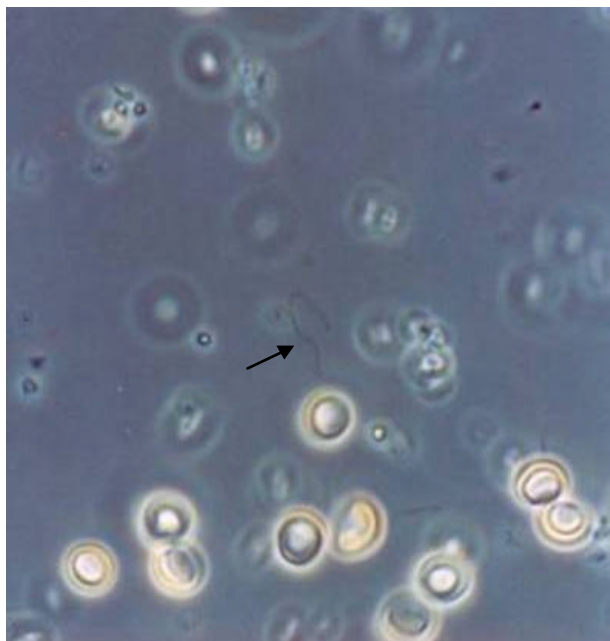


Figura 2. Microrganismo em cultura de célula de carrapato, mantida em meio Leboivitz. Microscopia de contraste de fase, aumento de 400.

A colônia de carrapatos era mantida em bovinos de raça européia, estabulados, livre de patógenos. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Raul Henrique Kessler, pesquisador da referida instituição, e armazenadas em ultrafreezer -80°C até o momento das análises.

2.1.3 Amostra proveniente de humano

Amostras de sangue foram coletadas de uma mulher, jovem, residente no município de Seropédica-RJ, que apresentava quadro de recorrência para Borreliose de Lyme-*simile* diagnosticada pela equipe do Centro de Referência para borreliose de Lyme no Brasil. Foram visualizadas espiroquetas na circulação periférica, observadas em microscopia de contraste de fase com ocular de 10X e sob objetiva de 40X (**Figura 3**).

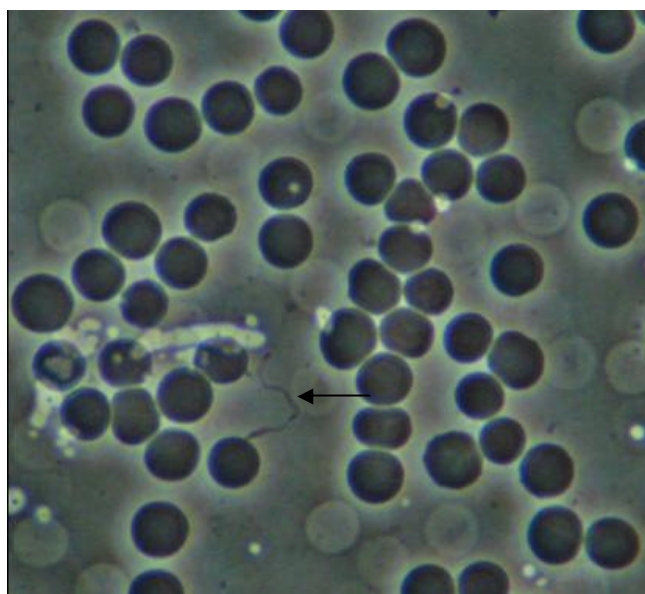


Figura 3. Microrganismo em sangue de humano com borreliose de Lyme-*simile*. Microscopia de contraste de fase, aumento de 400.

Coletou-se assepticamente o sangue da paciente, através da venopunção radial, em tubos tipo ‘vacumtainer’ citratado. Aliquotas de dois mL foram armazenadas em tubos tipo ‘eppendorf’ e mantidas em freezer -20°C no Laboratório de Doenças Parasitárias, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ. Posteriormente foram transportadas em gelo seco para o Laboratório de Biologia Molecular, na área de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Embrapa, no município de Campo Grande-MS, onde permaneceram em freezer a -20°C até o momento das análises.

2.2 Seleção do gene

Realizou-se a escolha do gene 16S *rRNA* (região *Ssu-rDNA*, sub-unidade menor do ribossomo nuclear) (RICH et al., 2001), *fla* (flagelina B) (RICH et al., 2001) e *rpoB* (região β da RNA polimerase) (Lee et al., 2000) baseado em buscas na literatura balizada em estudos de espécies de *Borrelia*, sendo observado que os referidos genes têm importância em estudos filogenéticos por se tratarem de genes altamente conservados.

2.3 Extração e quantificação do DNA

Realizou-se a extração do DNA genômico dos três isolados com o auxílio do Kit comercial Easy-DNATM (Genomic Isolation-Invitrogen). Para os isolados de equino (IE) e carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (IC) foi utilizado o protocolo número 3 do referido kit, destinado à extração de DNA de pequenas quantidades de amostra e para o isolado de humano (IH), utilizou-se o protocolo número 2, destinado à extração rápida de DNA de amostras de sangue. Não foi possível a quantificação do DNA devido à pouca quantidade obtida.

2.4 Controles positivos

Como controles positivos das reações de PCR utilizou-se a cepa americana de *Borrelia burgdorferi* G39/40 e a cepa européia de *Borrelia garinii* 1B29, mantidas em meio BSK em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, cedidas gentilmente pelo Dr. Natalino Hajime Yoshinari, professor da USP.

2.5 Reação de PCR

Realizou-se replicação *in-vitro* dos genes 16S *rRNA*, *fla* e *rpoB* de *Borrelia* com iniciadores específicos para cada gene, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-‘Polymerase Chain Reaction’). Foi realizada PCR para amplificação do gene 16S *rRNA* (**Tabela 1**) para os isolados IE, IC e IH e dos genes *fla* (**Tabela 1**) e *rpoB* (**Tabela 1**) para os isolados IE e IC.

Tabela 1. Iniciadores para amplificação parcial dos genes 16S *rRNA*, *fla* e *rpoB* dos isolados de equino, carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e humano.

Iniciadores	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')	Posição <i>Borrelia burgdorferi</i> (acesso NC001318)	Temperatura de anelamento	Fragmento esperado (pb)
16SborTF	GAGTCTGCGTCTTATTAGCTA	1291-1312	59°C	850
16SborTR	AACAAGGGTTGCGCTCGTTG	427-446		
flaBorTF	AAGATTAATGCTCAAATTAGGGG	839-861	45°C	350
flaBorTR	GCAGGCTCTTCAGTAGATCTT	557-577		
rpoBBorF	GATGATATTGACCATTTAGG	1353-1373	45°C	370
rpoBBorR	TTCAGGGGTTTCAATAGGAC	1703-1722		

A reação de PCR foi preparada em um volume final de 20µL com 10mM de tris-HCl pH 8,3; 50mM de KCl, 3,0 mM MgCl₂, 0,25mM de cada dNTPs, 5^omoles de cada iniciador, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e 6µL de DNA genômico dos isolados.

Realizou-se uma reação para cada gene/isolado. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf®) programado para uma temperatura de desnaturação das fitas de DNA a 94°C; com um ciclo inicial de 3 min e posteriormente 35 ciclos de 1 min; temperatura de anelamento (de acordo com os iniciadores utilizados) (**Tabela 1**) por 1min; temperatura de extensão da fita de 72°C por 1 min e 30 segundos e um ciclo final a 72°C por 7 min.

2.6 Análise dos produtos de amplificação

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão tris – EDTA – acetato pH 8,0 (TAE), junto com marcador de peso molecular padrão 1Kb plus de 100 a 12000pb (Invitrogen ®) ou 1Kb DNA de 75 a 12216pb (Invitrogen ®), por uma hora a 80V. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (5µg/µL) por 15 minutos e visualizados sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador. Fotografou-se as bandas com auxílio de máquina fotográfica digital interligada ao sistema AlphaDigidoc® (Gel Documentation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

2.7 Clonagem dos fragmentos

Os fragmentos de DNA do gene 16S *rRNA*, *fla* e *rpoB* obtidos através de PCR foram inseridos em plasmídeo pGEM®-T Easy Vectors (Promega) (**Figura 4**) na seguinte proporção: 1 µL de plasmídeo, 3µL do produto de PCR, 1 µL da enzima ligase T4, 5µL do tampão da ligase 2X. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Para cada isolado foi realizada uma reação em separado.

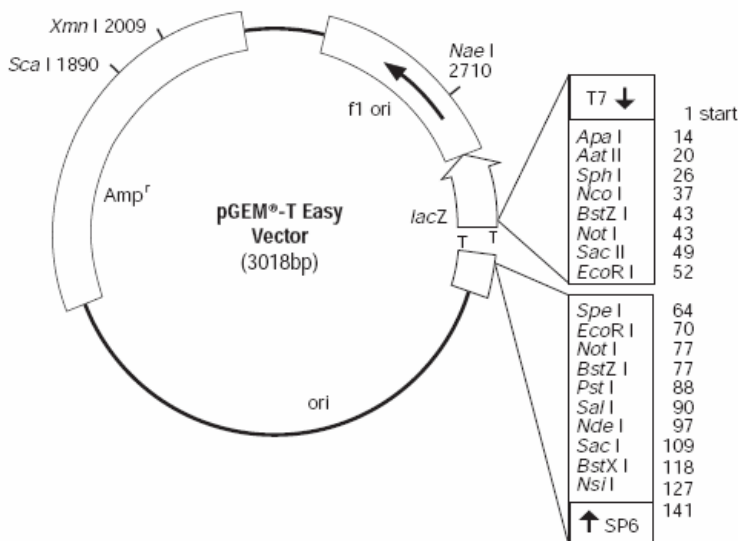


Figura 4. Plasmídeo pGEM®-T Easy utilizados para a clonagem dos fragmentos de DNA dos genes 16S *rRNA*, *fla* e *rpoB* de isolado de equino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e humano.

Os plasmídeos com o inserto (vetor-inserto) de cada gene, para cada isolado (IE, IC, IH) foram utilizados na transformação de células competentes de *E. coli* DH5-a produzidas no Laboratório de Biologia Molecular (Embrapa Gado de Corte).

Adicionou-se 10µL do vetor-inserto às células *E. coli* DH5-a, homogenizou-se levemente, incubando em gelo por 30 minutos. Realizou-se choque térmico de 30 segundos em banho-maria à 42°C e 1 minuto e 30 segundos no gelo. As amostras foram levadas à câmara de fluxo laminar onde adicionou-se 900 µL de meio Luria-Bertani (LB) e posteriormente submetidas à agitação horizontal à 37°C por 1 hora. Os produtos transformados foram semeados em placas de Petri 20 x 24 cm devidamente identificadas, contendo meio LB ágar com 100 µg/mL de ampicilina, com auxílio de uma alça de vidro. As placas foram incubadas por 12 horas à 37°C para o crescimento das colônias bacterianas.

2.8 PCR de colônia

Realizou-se PCR de colônia para identificar os clones bacterianos que continham os insertos de interesse, com os iniciadores para o gene 16S *rRNA* (**Tabela 1**) para a os isolados IE, IC e IH e para os genes *fla* (**Tabela 1**) e *rpoB* (**Tabela 1**) para os isolados IE e IC.

A PCR foi preparada em um volume final de 20µL com 10mM de tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl, 3,0 mM MgCl₂, 0,25mM de cada dNTPs, 5pmoles de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 1 colônia de cada isolado (IE, IC e IH). Foram escolhidas no total 10 colônias aleatoriamente para cada amostra. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf®) programado para uma temperatura de desnaturação das fitas de DNA a 94°C; com um ciclo inicial de 10 min e posteriormente 35 ciclos de 1 min; temperatura de anelamento dos iniciadores (de acordo com iniciadores

utilizados) (**Tabela 1**) por 1min; temperatura de extensão da fita de 72°C por 1 min e 30 segundos e um ciclo final a 72°C por 7 min.

Para a observação da reação, foi realizado eletroforese horizontal de 3µL do produto da PCR, em gel de agarose a 0,8% em TAE sob corrente de 100V. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (5µg/µL) por 15 minutos, as bandas foram visualizadas sob luz UV em transluminador e documentado usando o sistema AlphaDigidoc® (Gel Documentatation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

2.9 Reação de minipreparação de plasmídeos (Miniprep)

Realizou-se a purificação de DNA plasmidial replicado conforme o item 2.7, com auxílio do Kit comercial Wizard® Plus- SV Minipreps (Promega), conforme especificação do fabricante.

As células transformadas (item 2.7), previamente selecionadas pela técnica de PCR de colônia (item 2.8), foram transferidas para tubo do tipo Falcon de 15 mL contendo 2 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina, e incubadas *overnight* à 37°C sob agitação. Foram retirados 2mL das células cultivadas, as quais foram transferidas para tubos de microcentrífuga, devidamente identificados e centrifugados por 1 minuto a 10.000 xg. Descartou-se o sobrenadante por inversão dos tubos e o restante foi retirado com auxílio de pipeta. Ressuspendeu-se o *pellet* adicionando 50µL da solução de suspensão, homogeneizou-se no *vortex* por 1 minuto. Adicionou-se 100 µL de solução de desnaturação de proteína e de DNA bacteriano, homogeneizou-se os tubos invertendo-os por uma vez. Adicionou-se 325 µL da solução de precipitação de proteína e de renaturação de DNA plasmidial, homogeneizou-se os tubos invertendo-os por uma vez. Centrifugou-se os tubos por 2 minutos à 10.000 xg. O sobrenadante com o DNA plasmidial das amostras IE, IC e IH foram transferidos para novos microtubos, contendo coluna de sílica. Centrifugou-se o conjunto por 30 segundo à 10.000xg. Adicionou-se 300 µL da solução de lavagem. Centrifugou-se o conjunto por 30 segundo à 10.000xg e descartou-se o líquido da solução de lavagem. Finalmente adicionou-se 50 µL de solução de eluição, centrifugou-se o conjunto por 30 segundo à 10.000xg e descartou-se as colunas.

Para análise da qualidade do DNA plasmidial obtido, foi realizado eletroforese horizontal de 3µL da solução, em gel de agarose a 1% em TAE sob corrente de 80V. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (5µg/µL) por 15 minutos, as bandas foram visualizadas sob luz UV em transluminador e documentado usando o sistema AlphaDigidoc® (Gel Documentatation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

2.10 PCR de Miniprep

Realizou-se PCR de miniprep para a certificação da extração dos plasmídeos contendo os insertos de interesse, com os iniciadores para o gene 16S *rRNA* (**Tabela 1**) para os isolados IE, IC e IH. E com os iniciadores para os genes *fla* (**Tabela 1**) e *rpoB* (**Tabela 1**) para os isolados IE e IC.

A PCR foi preparada em um volume final de 20µL com 10mM de tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl, 3,0 mM MgCl₂, 0,25mM de cada dNTPs, 5pmoles de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 1µL do produto da miniprep.

As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf®) programado para uma temperatura de desnaturação das fitas de DNA a 94°C; com um ciclo inicial de 3 min e posteriormente 35 ciclos de 1 min; temperatura de anelamento (de acordo com os iniciadores utilizados) (**Tabela 1**); temperatura de extensão da fita de 72°C por 1 min e 30 segundos e um ciclo final a 72°C por 7 min.

Para a observação da reação, foi realizado eletroforese horizontal de 1µL do produto da PCR, em gel de agarose a 0,8% em TAE sob corrente de 80V. O gel foi corado em

solução de brometo de etídio (5µg/µL) por 15 minutos, as bandas foram visualizadas sob luz UV em transluminador e documentado usando o sistema AlphaDigidoc® (Gel Documentatation & Imagem Analysis System – Alpha Innotech Corporation).

2.11 Sequenciamento

As amostras obtidas na miniprep e placas de Petri contendo as colônias dos diferentes isolados foram enviadas para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná – Curitiba, PR, onde foram seqüenciadas, em seqüenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems), pelo método dideoxi (Sanger), segundo as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram seqüenciadas com iniciadores específicos do vetor pGEM-T.

2.12 Análise das Seqüências (*in silico*) e Alinhamento

A qualidade das seqüências foi analisada com auxílio de três pacotes computacionais Phred, Phrap, Cross-match.

As seqüência obtidas para cada gene (16S *rRNA*, *fla* e *rpoB*)/para cada isolado (IE, IC, IH) foram alinhadas pelo programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e obtidos seqüências consenso.

A identidade das seqüências obtidas em relação às seqüências depositadas no banco de dados “GeneBank”, foi obtida com auxílio do pacote computacional BLASTn.

3 RESULTADOS

3.1 Análise morfológica e morfométrica do isolado de eqüino

Ao esfregaço sanguíneo foram observados microrganismos espiralados com comprimento médio de $17,2 \pm 3,6 \mu\text{m}$ e uma média de 10 ± 2 espiras, os quais apresentavam movimento padrão de rotação e contorção.

3.2 Extração e quantificação do DNA

Realizou-se a extração do DNA genômico das amostras obtidas, com o auxílio do Kit comercial Easy-DNATM (Genomic Isolation-Invitrogen). A quantificação do DNA genômico não foi realizada devido a pequena quantidade obtida.

3.3 Reação de PCR

O PCR das amostras IE, IC e IH com iniciadores específicos para o gene 16S *rRNA* de *Borrelia* apresentaram o mesmo perfil de banda que o relatado por Rich, et al. (2001), com aproximadamente 850 pares de base (pb) (**Figura 5 e 6**).

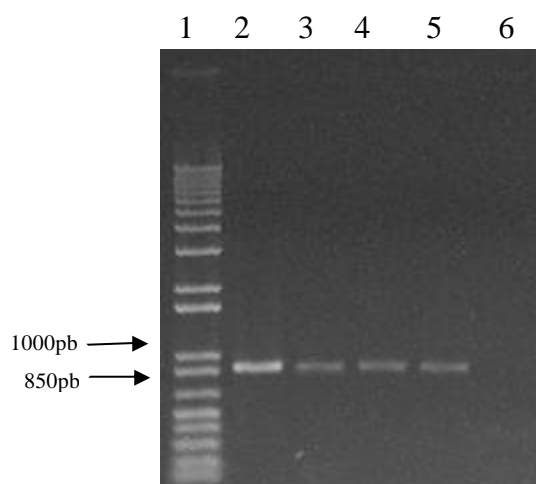


Figura 5. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene 16S *rRNA* de *Borrelia* spp. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2- controle positivo *Borrelia burgdorferi*; 3- controle positivo *Borrelia garinii*; 4- isolado de eqüino; 5- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; 6- controle negativo.

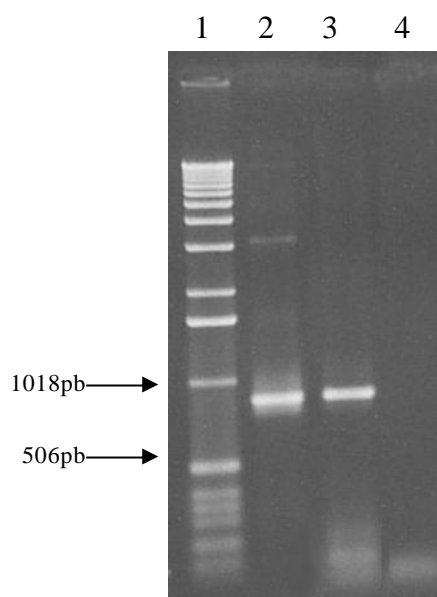


Figura 6. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene 16S *rRNA* de *Borrelia* spp isolado de humano. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb DNA (Invitrogen); 2- controle positivo *Borrelia burgdorferi*; 3- isolado de humano; 4- controle negativo.

O PCR dos isolados IE e IC com iniciadores específicos para o gene *fla* de *Borrelia* apresentaram o mesmo perfil de banda com aproximadamente 350pb que o relatado por Rich, et al. (2001) (**Figura 7**).

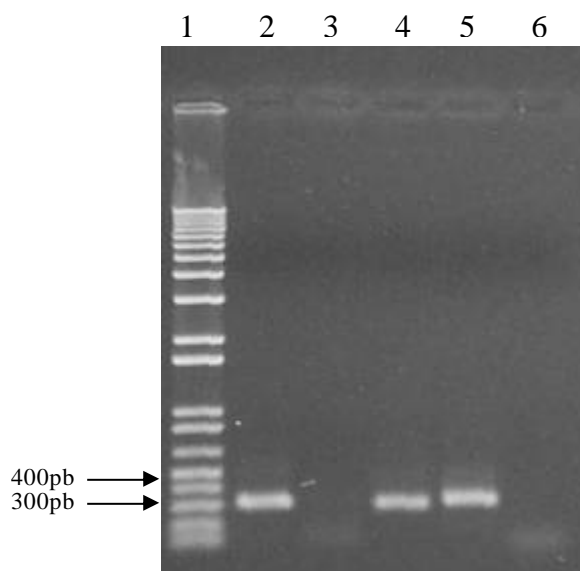


Figura 7. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene *fla* de *Borrelia* spp. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2- controle positivo *Borrelia burgdorferi*; 3- controle positivo *Borrelia garinii*; 4- isolado de equino; 5- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; 6- controle negativo.

O PCR dos isolados IE e IC com iniciadores específicos para o gene *rpoB* de *Borrelia* apresentaram o mesmo perfil de banda com aproximadamente 370 pares de base (pb) que o relatado por Lee, et al. (2000) (**Figura 8**).

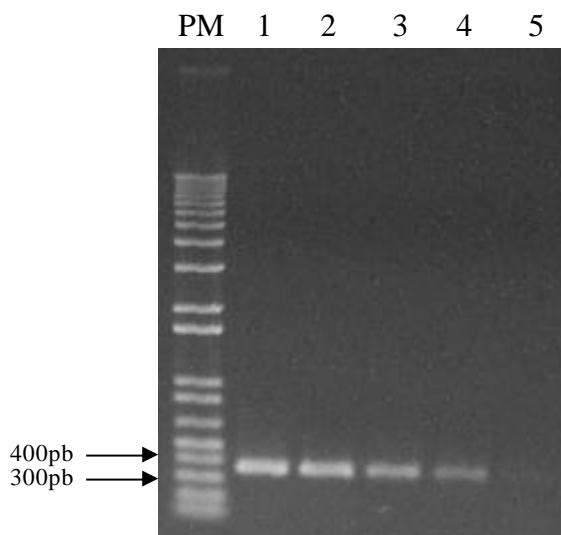


Figura 8. Análise do produto da amplificação pela PCR da sequência parcial do gene *rpoB* de *Borrelia* spp. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2- controle positivo *Borrelia burgdorferi*; 3- controle positivo *Borrelia garinii*; 4- isolado de equino; 5- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; 6- controle negativo.

3.4 Clonagem dos fragmentos

Pela técnica de clonagem para o gene 16S *rRNA* foram obtidas 93, 110 e 210 colônias do ‘produto diluído’ e 240, 281 e 305 colônias do ‘produto concentrado’, para as amostras IE, IC e IH, respectivamente.

Na clonagem do *fla* foram obtidas 13 e 33 do ‘produto diluído’ e 33 e 122 colônias do ‘produto concentrado’, para as amostras IE e IC respectivamente, e para o gene *rpoB* foram obtidas 37 e 11 do ‘produto diluído’ e 94 e 39 colônias do ‘produto concentrado’, para as amostras IE e IC respectivamente.

3.5 PCR de colônia

A técnica de PCR de colônia dos três isolados (IE, IC e IH) com iniciadores para o gene 16S *rRNA* mostrou que das 10 colônias escolhidas, 4 continham o fragmento de interesse para IE (**Figura 9**), 2 para IC (**Figura 10**) e 3 para IH (**Figura 11**).

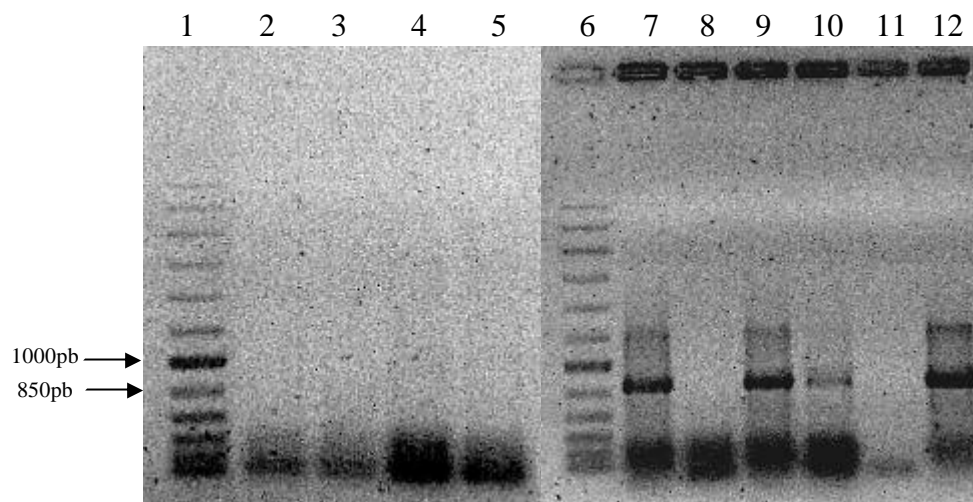


Figura 9. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene 16S *rRNA* do isolado de equino. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1 e 6- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5, 8 e 11- colônias negativas e 7, 9, 10 e 12- colônias positivas.

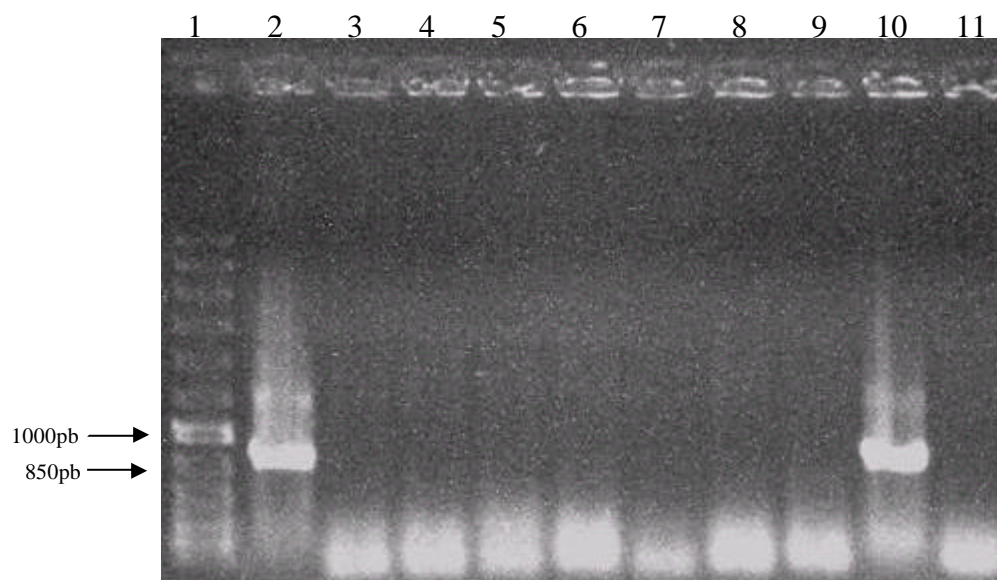


Figura 10. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene 16S *rRNA* do isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11- colônias negativas e 2 e 10- colônias positivas.

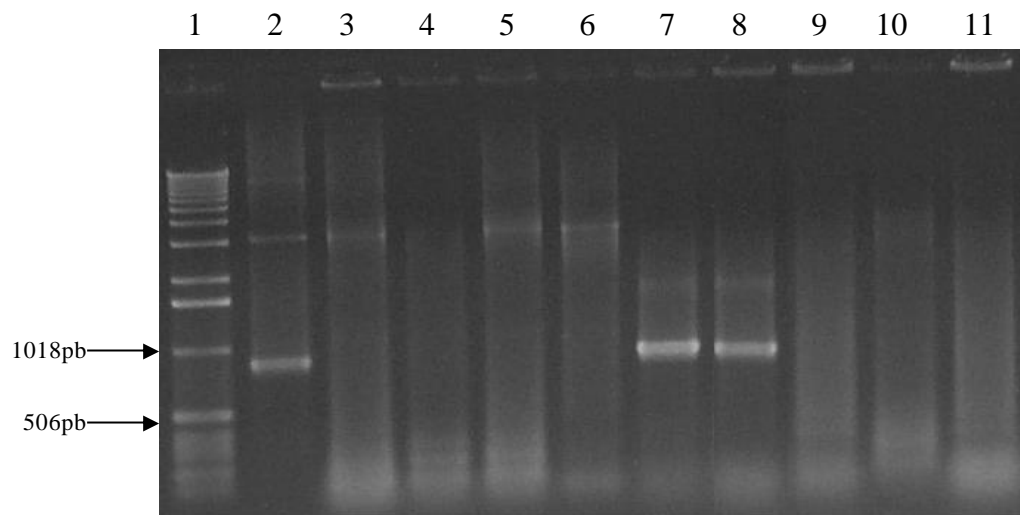


Figura 11. Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene *16S rRNA* do isolado de humano. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb DNA (Invitrogen); 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 11 - colônias negativas e 2, 7 e 8- colônias positivas.

Para gene *fla* a PCR de colônia mostrou que das 10 colônias escolhidas, 10 continham o fragmento de interesse para IE (**Figura 12**) e 7 para IC (**Figura 13**).

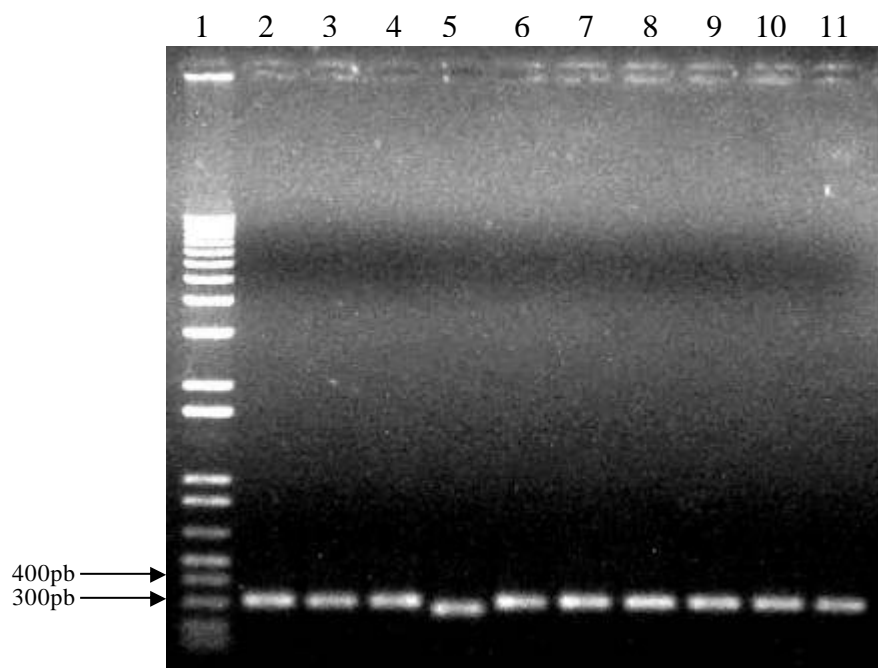


Figura 12: Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene *fla* do isolado de equino. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11- colônias positivas.

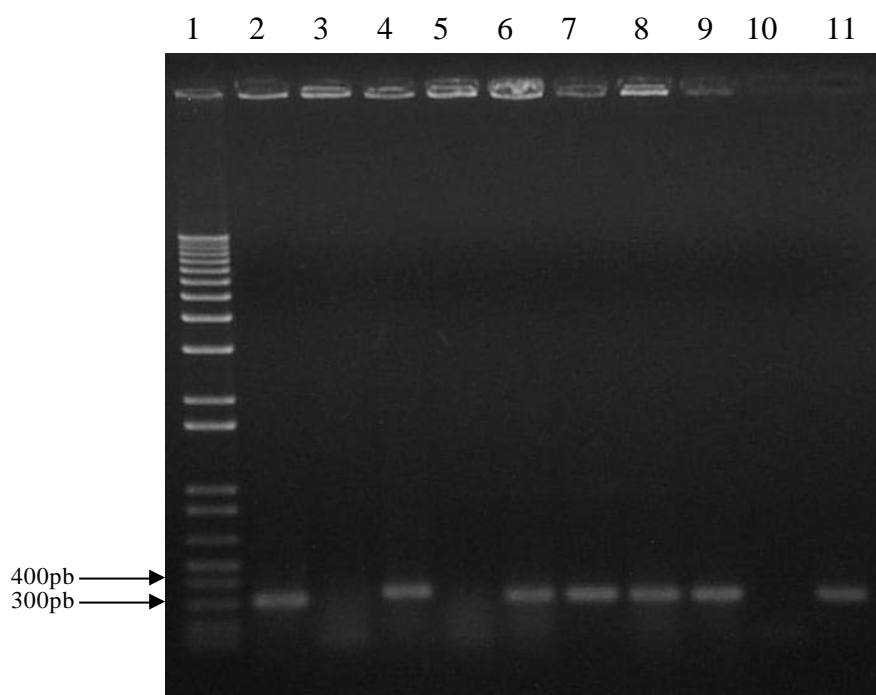


Figura 13: Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene *fla* do isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 3, 5, 10- colônias negativas e 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 11- colônias positivas.

Para gene *rpoB* a PCR de colônia mostrou que das 10 colônias escolhidas, 10 continham o fragmento de interesse para IE (**Figura 14**) e 9 para IC (**Figura 15**).

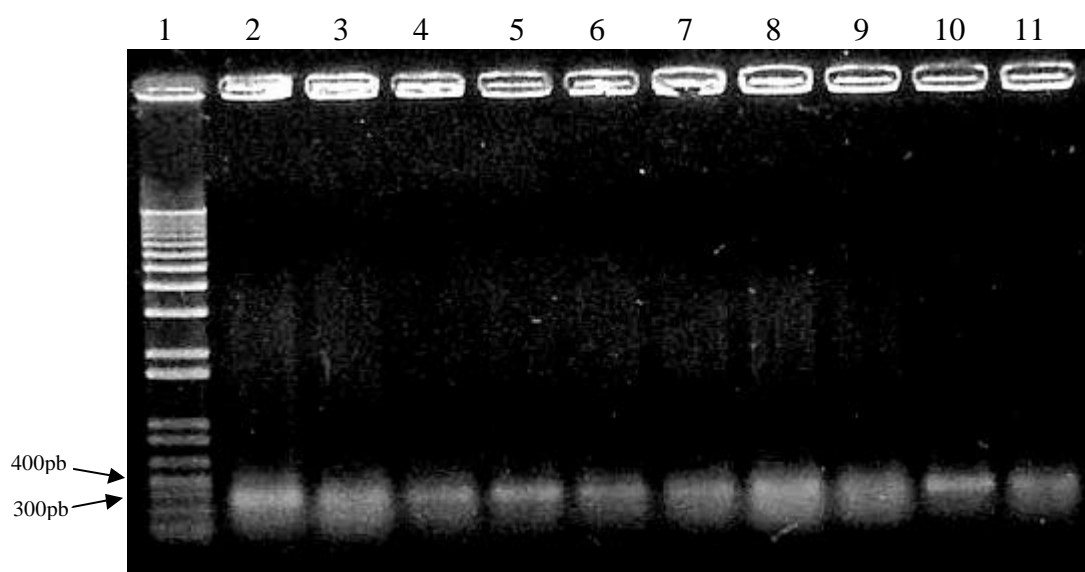


Figura 14: Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene *rpoB* do isolado de equino. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 - colônias positivas.

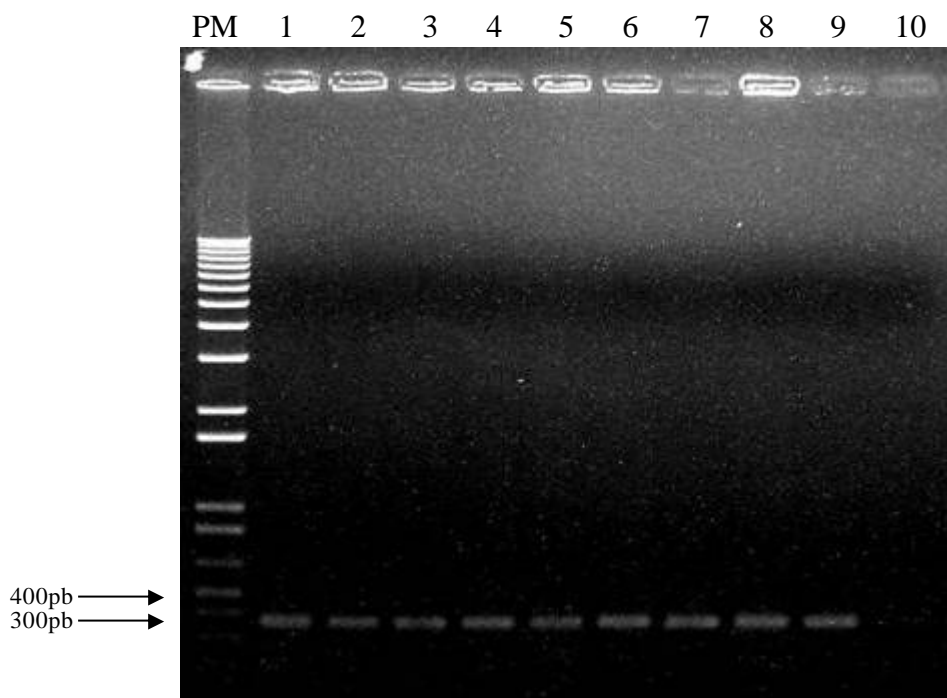


Figura 15: Análise do produto da amplificação pela PCR de colônia da sequência parcial do gene *rpoB* do isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10- colônias positivas; 11- colônia negativa.

3.6 Reação de minipreparação de plasmídeos (Miniprep)

A técnica de Miniprep para obtenção plasmidial dos isolados IE e IC apresentou bandas de tamanho compatível com o esperado (**Figura 16 e 17**).

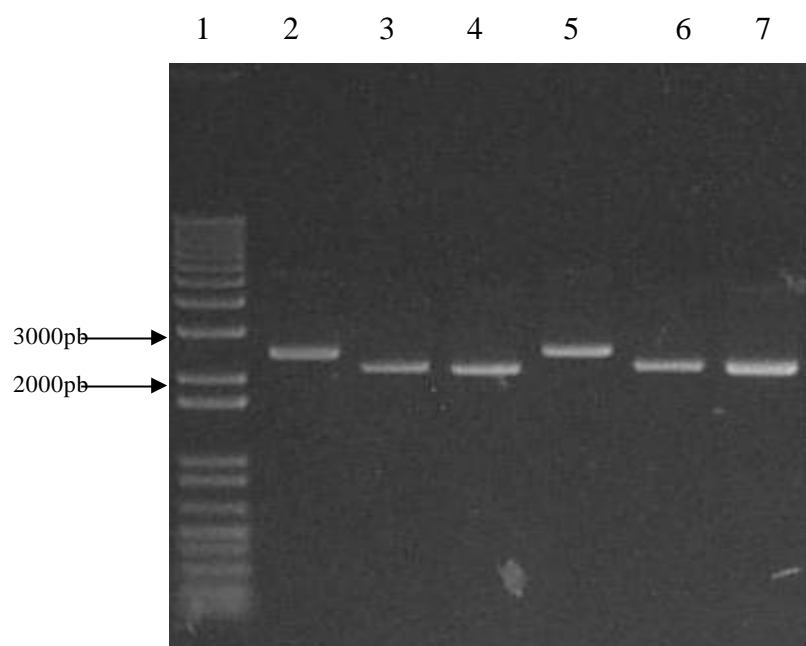


Figura 16. Análise do produto das minipreps para os genes *16S rRNA*, *fla* e *rpoB*. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2- isolado de equino, gene *16S rRNA*; 3- isolado de equino, gene *rpoB*; 4- isolado de equino, gene *fla*. 5- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, gene *16S rRNA*; 6- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, gene *rpoB*; 7- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, gene *fla*.

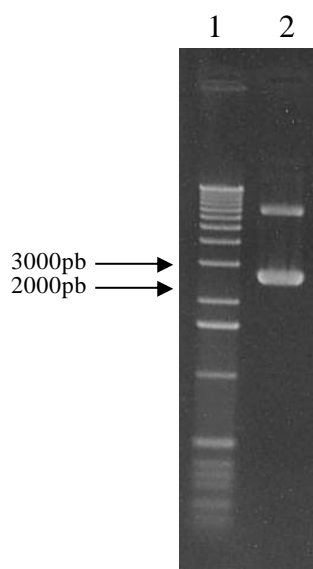


Figura 17. Análise do produto da miniprep. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb DNA (Invitrogen); 2- isolado de humano, gene *16S rRNA*.

3.7 PCR de Miniprep

A técnica de PCR com DNA plasmidial dos isolados (IE e IC) amplificados com iniciadores para o gene 16S *rRNA* apresentou bandas de aproximadamente 850pb, para o gene *fla* de 350pb e para o gene *rpoB* de 370pb, conforme o esperado (**Figura 18**).

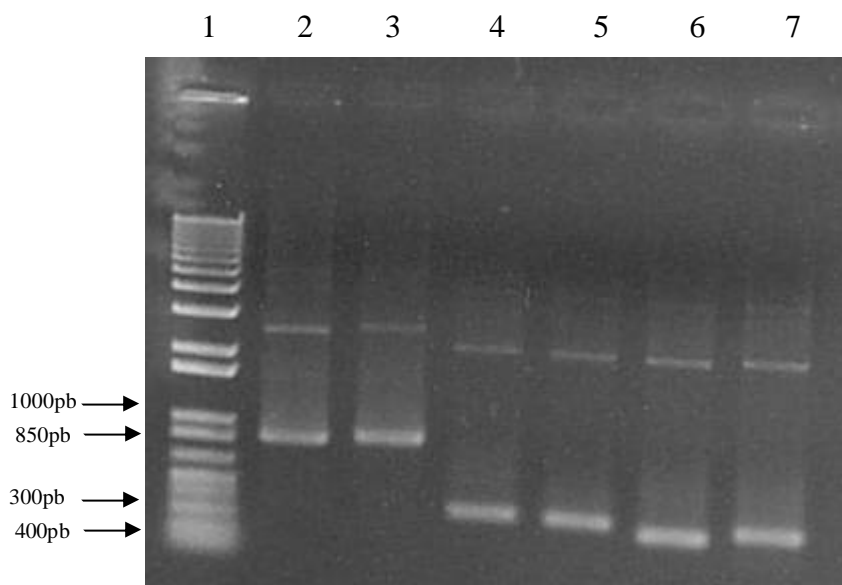


Figura 18. Análise do produto da amplificação de miniprep pela PCR. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídio. 1- Padrão de massa molecular 1Kb Plus (Invitrogen); 2- isolado de equino, gene 16S *rRNA*; 3- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, gene 16S *rRNA*; 4- isolado de equino, gene *rpoB*; 5- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, gene *rpoB*; 6- isolado de equino, gene *fla*; 7- isolado de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, gene *fla*.

3.7 Análise das Sequências (*in silico*) e Alinhamento

Para o isolado de equino foi obtido sequenciamento de 615pb para o gene 16S *rRNA*, 307pb para o gene *fla*. A análise realizada no BLASTn revelou identidade de 99% (609/611) para o gene 16S *rRNA* entre o isolado de equino e a cepa de *B. theileri* depositada no “GeneBank” (acesso U38375) (**Anexo C**) e 98% (222/226) para o gene *fla* em relação a *B. theileri* (acesso U42431), entre outras espécie relacionadas filogeneticamente à febre recorrente (**Anexo D**). Para o gene *rpoB* obteve-se 370pb, sendo observado identidade de 92% (250/270) com a cepa de *B. hermsii* (acesso AF164235), e 90% com *Borrelia turicatae*, também pertencente ao grupo das espécies que causam febre recorrente (**Anexo E**). Para o isolado de carrapato obteve-se sequenciamento de 177pb para o gene 16S *rRNA*, 339pb para o gene *fla* e 370pb para o gene *rpoB*. A análise revelou identidade de 100% (177/177) para o gene 16S *rRNA* com seqüência de *B. burgdorferi* depositada no “GeneBank” (acesso EU025065), entre outras espécies de *Borrelia* do grupo da borreliose de Lyme (**Anexo F**). O gene *fla* apresentou 100% (23/23) de identidade em relação à cepa de *B. theileri* (acesso U42431) (**Anexo G**) e o gene *rpoB*, 92% (250/270) de identidade com a cepa de *B. hermsii* (acesso AF164235), e 90% de identidade com *B. turicatae* (**Anexo H**). Para o isolado de humano, o sequenciamento do gene 16S *rRNA* apresentou 889pb, observando-se identidade de 99% (886/889) com seqüência de *B. burgdorferi* depositada no “GeneBank” (acesso EU025065), entre outras espécies de *Borrelia* do grupo da borreliose de Lyme (**Anexo I**).

O alinhamento entre os sequenciamentos do gene 16S *rRNA* dos isolados de carrapato e humano, através do programa CLUSTALW revelou 100% de identidade (**Anexo J**).

4 DISCUSSÃO

Os valores morfométricos encontrados para o isolado de equino de $17,2 \pm 3,6 \mu\text{m}$ de comprimento e 10 ± 2 espiras, corroboram com as mensurações descritas para espiroquetas da espécie *B. theileri*. Em estudos realizados com bovinos na África do Sul e Austrália foi observado *B. theileri* medindo respectivamente, de 10 a $19\mu\text{m}$ e 6 a $19,5\mu\text{m}$ de comprimento, com número de espiras variando de 3 a 7 (CALLOW, 1967). Smith et al (1978) observaram formas de *B. theileri* medindo $11,65\mu\text{m} \pm 0,56$ em sangue de bovino e comprimento de $17,66\mu\text{m} \pm 0,46$ em tecidos de carrapatos da espécie *R. (Boophilus) microplus*. Em trabalho com sangue bovino, Smith et al. (1985) observaram *B. theileri* com comprimento variando de 8 a $17\mu\text{m}$ e 1 a 8 espiras. Estudo realizado em hemolinfa de *R. (Boophilus) microplus* coletados no município de Guaíba/RS, revelou espiroquetas do gênero *Borrelia* medindo de 10 a $19\mu\text{m}$, sendo sugerido que a espécie em questão era *B. theileri* (MARTINS et al., 1996).

Os dados obtidos na análise morfológica e morfométrica do isolado de equino corroboram com o observado na análise do gene *16S rRNA* e *fla* que apresentaram 99% (609/611) e 98% (222/226) de identidade com as seqüências de *B. theileri* depositadas no “GeneBank”. O fato da maior identidade para o gene *rpoB* do isolado de equino ter sido de 92% (250/270) com *B. hermsii* pode ser explicada pelo fato de não existir ainda depósito de seqüências desse gene para a espécie *B. theileri*.

O isolado de carrapato apresentou 100% de identidade (177/177) para o gene *16S rRNA* com seqüências de *B. burgdorferi* depositadas no “GeneBank”. Para o gene *fla* foi observado identidade de 100% com *B. theileri*, porém de apenas 23 nucleotídeos, e para o gene *rpoB* observou-se identidade de 92% (250/270) com seqüências depositadas de *B. hermsii*. O tamanho de apenas 177pb seqüenciado para o gene *16S rRNA* em conjunto com os resultados obtidos para os genes *fla* e *rpoB* nos permitem apenas caracterizar esse isolado como pertencente ao gênero *Borrelia* e afirmar que este não pertence a espécie *B. theileri*.

O resultado obtido com o sequenciamento do gene *16S rRNA* para o isolado de humano com 99% (886/889) de identidade com *B. burgdorferi*, confirmam a presença de espiroquetídeos do gênero *Borrelia* infectando humanos no Brasil e causando doença. O alinhamento dessa seqüência com a seqüência obtida para o mesmo gene do isolado de carrapato, mostra identidade de 100%, mas esse fato não nos permite dizer que esses isolados pertencem a mesma espécie, devido ao pequeno tamanho da seqüência obtida do isolado de cultura de célula de carrapato. Também faz-se necessário a análise dos genes *fla* e *rpoB* do isolado de humano, afim de esclarecer esse questionamento.

A confirmação de que o isolado de equino pertence a espécie *B. theileri* foi ao encontro das nossas expectativas. Porém o fato da espiroqueta isolada da cultura de células de carrapato *R. (Boophilus) microplus*, não pertencer a essa espécie foi uma surpresa, uma vez que o carrapato *R. (Boophilus) microplus* é o vetor desse espiroquetídeo em várias partes do mundo (COLLOW, 1967; SMITH, 1998). Até o presente momento não existe na literatura outra espécie de borrelia infectando essa espécie de carrapato. Alertamos para o fato dessa espiroqueta ter potencial em causar doença em animais e humanos por sua alta identidade com *B. burgdorferi* para o gene *16S rRNA*. Existem diversos relatos de diferentes manifestações clínicas da doença em humanos, relacionadas a diferentes genoespécies de *B. burgdorferi* sl (VAN DAM et al., 1993; HERCOGOVA et al., 2001). O mesmo ocorre em relação a equinos. Grupos de pesquisa dos EUA que estudam borreliose de Lyme nesses animais correlacionam claramente clinica em animais soropositivos (BURGESS et al., 1986; COHEN; COHEN, 1990; PARKER; WHITE, 1992), o que não ocorre em animais da Europa,

que parecem ser assintomáticos (CARTER et al., 1994; EGENVALL et al., 2001; MULLER et al., 2002; SCHÖNERT et al., 2002).

No artigo publicado por Mantovani et al. (2007), os autores avaliam o histórico da borreliose de Lyme-*simile* no Brasil, e sugerem que espiroquetas visualizadas em sangue de pacientes com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile*, não estão correlacionadas ao gênero *Borrelia*. Os autores ainda associam essa doença a outros microrganismos, como já vem sendo feito da literatura mundial (OWEN, 2006; HOPPA; BACHUR, 2007). A literatura indica o sinergismo entre patógenos para desencadear borreliose de Lyme, inclusive sugerem que a espiroqueta sozinha não seja capaz de induzi-la, porém o gênero *Borrelia* está sempre envolvido. Com isso o sequenciamento do gene 16S *rRNA* de sangue humano com sintomatologia para borreliose de Lyme-*simile*, com identidade de 99% (886/889) com *B. burgdorferi*, corrobora com a literatura mundial, mostrando a presença de bactérias do gênero *Borrelia* envolvidas na doença que ocorre no Brasil, embora ainda seja necessário mais estudos para definição de sua real classificação.

Com isso, esta é a primeira descrição genotípica de isolado brasileiro de *B. theileri*, primeiro relato de espécie de *Borrelia* diferente de *B. theileri* infectando *R. (Boophilus) microplus* e confirmação da presença de espiroquetídeo do gênero *Borrelia* causando borreliose de Lyme-*simile* no Brasil.

5 CONCLUSÕES

1. A frequência de soropositivos corrobora a hipótese da ocorrência de *Borrelia* sp. em equinos na Ilha de Marajó e no município de Castanhal;
2. A espiroqueta isolada de equino pertence à espécie *Borrelia theileri*;
3. Os microrganismos isolados de carrapato e humano pertencem ao gênero *Borrelia*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I. S. **Estudo de *Borrelia* sp. em *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) naturalmente infectados.** 1996. 40p. Trabalho de Monografia- Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ, Rio de Janeiro.
- 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.
- AFZELIUS, A. Verhandlungen der dermatologischen gesellschaft zu Stockolm. Archiv fur dermatologie und syphilis, v. 101, p. 04-406, 1910.
- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; WANG, G.; SCHWARTZ, I.; WORMSER, G. P. Diagnosis of Lyme borreliosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 18, p. 484-509, 2005.
- ALEKSHUN, M.; KASHLEV, M.; SCHWARTZ, I. Molecular cloning and characterization of *Borrelia burgdorferi* *rpoB*. **Gene**, v. 186, p. 227-235, 1997.
- ALVES, A. L.; MADUREIRA, R. C ; SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 203-206, 2004.
- ANDERSON, J. F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 25, n. 8, p. 1495-1497, 1988.
- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A.; LEFEBVRE, R. B.; ANDREADIS, T. G.; MCANINCH, J. B.; PERNG, G. C.; JOHNSON, R. C. Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolates from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 13-20, 1989.
- APPEL, M. J. G. Lyme disease in dogs and cats. **The Compendium**, v. 12, n. 5, p. 617-625, 1990.
- ARMSTRONG, P. M.; RICH, S. M.; SMITH, R. D.; HARTL, D. L.; SPIELMAN, A.; TELFORD III, S. R. A new *Borrelia* infecting lone star ticks. **The Lancet**, v.347, p. 67-68, 1996.
- 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.
- AZULAY, D. A.; 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.
- 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.
- BACON, R. M.; PILGARD, M. A.; JOHNSON, B. J. B.; RAFFEL, S. J.; SCHWAN, T. G. Glycerophosphodiester Phosphodiesterase gene (*glpQ*) of *Borrelia lonestari* identified as a target for differentiating *Borrelia* species associated with hard ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2326-2328, 2004.

- BAKER-ZANDER, S. A.; LUKEHART, S. A. Antigenic cross-reactivity between *Treponema pallidum* and other pathogenic members of the family *Spirochaetaceae*. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 1, p. 116-121, 1984.
- BARANTON, G., POSTIC, D.; SAINT GIROS, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and VS461 associated with Lyme borreliosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 378-83, 1992.
- BARBOUR, A. G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 57, p. 521-525.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.. Biology of *Borrelia* species. **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 an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 403-409, 1996.
- BATTESTI, D. M.; SOARES, C. O.; ZEITUNE, A. D.; YOSHINARI, N. H.; ARZUA, M. Estudo de *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) como reservatório da borreliose de Lyme, através de método sorológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, resumos do 15º, 1997. p. 252.
- BENACH, J. L.; COLEMAN, J. L., SKINNER, R. A.; BOSLER, E. M. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 6, p. 1300-1306, 1987.
- 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. **The 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, p. 577-578, 1994.
- BOOR, K. J.; DUNCAN, M. L. ; PRICE, C. W. Genetic and transcriptional organization of the region encoding the β subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20329-20336, 1995.
- BOSLER, E. M.; COHEN, D. P.; SCHULZE, T. L.; OLSEN, C.; BERNARD, W.; LISSMAN, B. Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 221-233, 1988.
- BRIGGS PL, FRAGA S, FILGUEIRA AL. Doença de Lyme: Apresentação de um caso com demonstração de *Borrelia*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DERMATOLOGIA, resumos do 48º, 1993, Curitiba.
- BUCHAWALD, A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. **Derm Vierteljahresschr**, v. 10, p. 553-554, 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, p. 571-579, 1956.

- BURGDORFER, W.; BARBUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? **Science**, v.216, p. 1317-1319, 1982.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; BENACH, J. L. Development of *Borrelia burgdorferi* in ixodid tick vectors. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 172-179, 1988.
- 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. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 235-243, 1988.
- CALLOW, L.L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. **British Veterinary Journal**, 123: 492-497, 1967.
- CANICA, M. M.; NATA, F.; MERLE, L. D.; MAZIE, J. C.; BARANTON, G.; POSTIC, D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. Nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. **Scandinavian journal of infectious diseases**. v. 25, p. 441-448, 1993.
- CARTER, S. D.; MAY, C.; BARNES, A.; BENNETT, D. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 187-190, 1994.
- COHEN, D.; BOSLER, E. M.; BERNARD, W.; MEIRS II, D.; EISNER, R.; SCHULZE, T. C. Epidemiologic studies of Lyme Disease in horses and their public health significance. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, p. 244-257, 1988.
- COHEN, N. D; COHEN, D. Borreliosis in horses: a comparative review. **The Compendium**, v. 12, n. 10, p. 1449-1458, 1990.
- COHEN, N. D. Borreliosis (Lyme disease) in horses. **Equine veterinary education**, v. 8, n. 4, p. 213-215, 1996.
- CORRÊA, F. N. **Pesquisa de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalus*) do Estado do Pará**. 2007. 45pp.Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Rio de Janeiro.
- COSTA, I. P.; YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; LEON, E. P.; ZEITUNE, A. D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme em Mato Grosso do Sul: relato de três casos clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 253-257, 1996.
- COURTNEY, J. W.; KOSTELNIK, L. M.; ZEIDNER, N. S.; MASSUNG, R. F. Multiplex Real-Time PCR for detection of *Anasplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3164-3168, 2004.
- DE SILVA, A. M.; FIKRIG, E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during feeding. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 4, p. 397-404, 1995.

- 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.
- DURAY, P. H. Histopathology of human borreliosis. In: COYLE P. K. **Lyme disease**. 1993. p. 49-58.
- DURDEN, L. A.; OLIVER, J. H.; KINSEY, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) and spirochetes (Spirochaetaceae: Spirochaetales) recovered from birds on a Georgia Barrier Island. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 231-236, 2001.
- EGENVALL, A.; FRANZÉN, P.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E. O.; VAGSHOLM, I.; WIKSTRÖM, U-B.; ARTURSSON, K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. And demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 49, p. 191-208, 2001.
- ESCUDEIRO, R.; BARRAL, M., P´REZ, A.; VITUTIA, M. M.; GÁRCIA-PÉREZ, A L.; JIMÉNEZ, S.; SELLEK, R. E.; ANDA, P. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 11, p. 4026-4033, 2000.
- 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.
- FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M.M.; MASARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Detection of *Borrelia* sp. In opossum (Marsupialia: Didelphidae) in Brazil. In: **CONGRESS OF WORLD VETERINARY ASSOCIATION**, resumos do 25º, 1995a, Yokohama, Japão. p. 283.
- FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M.M.; MASARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis serology in cattle and dogs in Brazil. In: **CONGRESS OF WORLD VETERINARY ASSOCIATION**, resumos do 25º, 1995b. Yokohama, Japão. p. 283.
- FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASARD, 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.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**. v. 221, p. 35-41, 1998.
- FUKUNAGA M.; KOREKI Y. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, p. 255-258, 1995.
- FUKUNAGA M, TAKAHASHI Y, TSURUTA Y, MATSUSHITA O, RALPH D, MCCLELLAND M, NAKAO M Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan **International journal of systematics bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 804-810, 1995.

- FUKUNAGA, M.; HAMASE, A.; OKADA, K.; NAKAO, M. *Borrelia tanukii* sp. nov. And *Borrelia turdae* sp. Nov. Found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 11, p. 877-881, 1996a.
- FUKUNAGA, M.; OKADA, K.; NAKAO, M.; KONISHI, T.; SATO, Y. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, n. 4, p. 898-905, 1996b.
- GALO, K. R.; MADUREIRA, R. C.; FONSECA, A. H.; BARBOSA NETO, J. D. Frequência de anticorpos homólogos anti -*Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. no prelo.
- GARIN, C. H.; BUJADOUX, C. H. Paralyse par les tiques. **Journal de Médecine Lyon**, v. 71, p. 765-767, 1922.
- GERN, L.; LABET, N.; MORET, J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. **Experimental & Applied Acarology**, v. 20, p. 649-658, 1996.
- GILMORE JR., R. D.; PIESMAN, J. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC- immunized mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 411-414, 2000.
- 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.
- GREENE, R. T. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 167-171, 1990.
- GRODZICKI, R. L.; STEERE, A. C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 4, p. 790-797, 1988.
- GRUND, S.; NATTERMANN, H.; HORSCH, F. Electron-microscopic examination of spirochaetes in dermatitis lesions in cows. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, n. 6, p. 882-890, 1995.
- GUPTA, R.; GRIFFITHS, E. Critical issues in bacterial phylogeny. **Theoretical Population Biology**, v. 61, p. 423-434, 2002.
- 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 género *Borrelia* en bovinos de la provincia de Salta, Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria Argentina**, v.66, n. 5, p. 292-294, 1985
- HERCOGOVA, J.; BRZONOVA, I.; KONKOLOVA, R.; MACHOVCOVA, A. Lyme borreliosis in 2001. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v. 15, n. 2, p. 13, 2001.
- HOOGSTRAAL H. Ticks and spirochetes. **Acta Tropica**, v.36, p. 133-136, 1979.

HOOPA, E. ; BACHUR, R. Lyme disease update. *Current Opinion in Pediatrics*, 19, n. 3, p. 275-280, 2007.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico.** 1996. 51pp. Tese de Mestrado, UFRRJ, Rio de Janeiro.

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

JENKINS, A.; KRISTIANSEN, B-E.; ALLUM, A-G.; AAKRE, R. K.; STRAND, L.; KLEVELAND, E. J.; POL, I.; SCHOULS, L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. In *Ixodes* ticks from Southern Norway. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 10, p. :3666-3671, 2001.

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.

JOPPERT, A. M. **Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo.** 1995. 83pp. Tese de Mestrado, FMVZ-USP, São Paulo.

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, p. 843-848, 1993.

KELLY, R. T. Genus IV. *Borrelia* Swellengrebel 1907, 582^{AL}. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimor e. Williams & Wilkings, 1984. v. 1. pp. 57-62.

KESSLER , R. H.; SOARES, C. O.; REZENDE, J. Ocorrência de *Borrelia theileri*, em cultura de células embrionárias de *Boophilus microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, resumos do 29º, Gramado/RS 2002, p. 80.

KORNBLATT, A. N.; URBAND, P. H.; STEERE, A. C. Arthrits caused by *Borrelia burgdorferi* in dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 186, n. 9, p. 960-964, 1985.

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.

LAVÉLAN, A. Sur la spirillose des bovines. **Cr Academy of Science, Paris**, 136:939-941, 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.

LEE, S. H.; KIM, B-J.; KIM, J-H.; PARK, K-H.; KIM, S. J.; KOOK, Y. H. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2557-2562, 2000.

LEVY, S. A.; DRESEEN, D. W. Lyme borreliosis in dogs. **Canine Practice**, v. 17, n. 2, p. 5-14, 1992.

- LEVY, S. A.; MAGNARELLI, L. A. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.200, n. 3, p. 344-347, 1992.
- 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.
- LIN, T.; OLIVER JR., J. H.; GAO, L.; KOLLARS JR., T. M.; CLARK, K. L. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the southern United States based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2500-2507, 2001.
- LISSMAN, B. A.; BOSLER, E. M.; CAMAY, H.; ORMISTON, B. G.; BENACH, J. L. Spirochete-associated arthritis (Lyme Disease) in a dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 185, n. 2, p. 219-220, 1984.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 19, p. 265-275, 1951.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, 15:155-173, 1994.
- MADUREIRA, R. C.; FONSECA, A. H.; GOLYNSKI, A. A.; FERNANDES, K. R.; MASSARD, C. L. Diagnóstico microscópico de *Borrelia theileri* (Laveran, 1903) em eqüinos no Brasil e o registro de coinfeção com *Babesia equi* (Laveran, 1910). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, resumos do 13º, 2004. Ouro Preto, MG. p. 364.
- MADUREIRA, R. C.; CORRÊA, F. N.; CUNHA, N. C.; GUEDES JUNIOR, D. S.; FONSECA, A. H. Ocorrência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. no prelo.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; KAUFMANN, A. F.; LIEBERMAN, L.L.; WHITNEY, G. D. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 189, p. 955-959, 1985.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; SHAW, E. ; PAST, J. E.; PALKA, F. C. Borreliosis in equids in northeastern United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 3, p. 359-362, 1988.
- MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIKRIG, E. Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 237-240, 1996.
- MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIKRIG, E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 169-173, 1997.
- MAGNARELLI, L. A.; IJDO, J. W.; PADULA, S. J.; FLAVELL, R. A.; FIKRIG, E. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1735-1739, 2000.

- MAGNARELLI, L. A.; BUSMICH, S. L.; SHERMAN, B. A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic test for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p. 667-674, 2004.
- MAGNARELLI, L. A.; FIKRIG, E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in naturally infected horses in the USA by enzyme-linked immunosorbent assay using whole-cell and recombinant antigens. **Research in Veterinary Science**, 79: 99-103, 2005.
- MANTOVANI, E.; COSTA, I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 4, p. 443-456, 2007.
- MARCELIS, L.; MANEFFE DE, P.; CHAIDRON, E.; BIGAIGNON, G.; KAGERUKA, P.; GOUBAU, P. Horse reservoir for *Borrelia burgdorferi*? **The Lancet**, v. 25, p. 977, 1987.
- MARCHOUX, E.; SALIMBENI, A. La spirillose des poules. **Annales de l'Institut Pasteur Lille**, v. 17, p. 569-580, 1903.
- MARCONI, R.T.; LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 2427-2434, 1995.
- MARCUS, L.C.; PATTERSON, M.M.; GILFILLAN R.E.; URBAND P.H.. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses: serologic survey. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2570-2571, 1985.
- MARQUES, J. R. F.; COSTA, M. R.; OHAZE, M. M. Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe. 3º, IAPAR, EMBRAPA-CENARGEN, Londrina, PR, p. 132-137, 2001.
- MARTI RAS, N. M.; LASCOLA, B.; POSTIC, D.; CUTLER, S. J.; RODHAIN, F.; BARANTON, G.; RAOULT, D. Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp.. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 859-865, 1996.
- 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**, v. 26, n. 3, p. 447-450, 1996.
- MASUZAWA (T.), TAKADA (N.), KUDEKEN (M.), FUKUI (T.), YANO (Y.), ISHIGURO (F.), KAWAMURA (Y.), IMAI (Y.) and EZAKI (T.): *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1817-1824, 2001.
- MASUZAWA, T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia. **Japan Journal of Infectious Diseases**, 57: 229-235, 2004.
- MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 205, n. 2, p. 186-188, 1994.
- MATTON, P.; MALCKEBEKE, V. H. Bovine borreliosis: comparison of simple methods for detection of the spirochaete in the blood. **Tropical Animal Health Production**, v. 22, p. 147-152, 1990.

- MCKENNA, P.; CLEMENT, J.; VAN DIJCK, D.; LAUWERYS, M.; CAREY, D.; VAN DEN, B.; BIGAIGNON, G. Canine Lyme disease in Belgium. **The Veterinary Record**, v. 136, p. 224-247, 1995.
- MELO, I. S.; GADELHA, A. R.; FERREIRA, L. C. L. Estudo histopatológico de casos de eritema crônico migratório diagnosticados em Manaus. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 169-177, 2003.
- MULLER, I.; KHANAKAH, G.; KUNDI, M.; STANEK, G. Horses and *Borrelia*: Immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish Riding School in Vienna. **Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 33, p. 80-87, 2002.
- OLIVEIRA, A.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; YOSHINARI, N. H. Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* em diferentes meios de cultivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 61-64, 2004.
- OWEN, D.C. Is Lyme disease always poly microbial? The jigsaw hypothesis. **Medical Hypotheses**, n. 67, p. 860-864, 2006.
- PALÁCIOS, R.; OSORIO, L. E.; GIRALDO, L. E.; TORRES, A. J.; PHILIPP, M. T.; OCHOA, M. T. Positive IgG Western Blot for *Borrelia burgdorferi* in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4; p. 499-503, 1999.
- 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.
- PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **The Lancet**, v.343, p. 1013-1016, 1994.
- PICKEN, R. N. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and north american relapsing fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 99-114, 1992.
- PIESMAN, J.; SCHNEIDER B S.; ZEIDNER, N. S. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in midgut and salivary glands of feeding tick vectors. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 11,p.4145-4148, 2001.
- PORCELLA, S. F.; SCHWAN, T. G. *Borrelia burgdorferi* and *Treponema paladium*: comparisan of funcional genomics, environmental adaptations and phatogenic mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 56, p. 651-656, 2001.
- POSTIC, D.; MARTI RAS, N.; LANE, R. S.; HENDSON, M.; BARANTON, G. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *B. bissetti* sp. Nov. (formerly *Borrelia* group DN127). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3497-3504, 1998.
- QUINN P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Espiroquetas. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ºed. Blackwell Science Publishing Oxford: Art Médica, 2002. p. 179-188.
- RANKA, R.; BORMANE, A.; SALMANE, K.; BOWMANIS, V. Identification of three Clinically relevante *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of 16S-23S ribosomal DNA spacer amplicons. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(4):1444-1449, 2004.
- RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLON, K.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* gene analysis as novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*,

Treponema and *Leptospira*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2200-2203, 2000.

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 borreliosis. **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* *latu sensu* em eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v. 127, p. 46-49, 2002.

SCHOELER, G. B.; LANE R. S. Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 80-86, 1993.

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

SCHULZE, T. L.; BOWEN, G. S.; LAKAT, M. F.; PARKIN, W. E.; ALTMAN, R.; ORMISTON, B. G.; SHISLER, J. K. *Amblyomma americanum*: a potential vector of Lyme disease in New Jersey. **Science**, v. 224, p. 601-603, 1984.

SCHWAN, T. G.; SCHRUMPF, M. E.; HINNEBUSCH, B. J., ANDERSON, D. E.; KONKEL, M. E. GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2483-2492, 1996.

SITUM, M.; GRAHOVAC, B. E.; MARKOVIAE, S.; LIPOZENËIAE, J.; POJE, G.; DOBRIAE, I.; MARINOVIAE, B.; BOLANEA-BUMBER, S.; MISIAE-MAJERUS, L. Detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* *sensu lato* by polymerase chain reaction. **Basic Science**, v. 41, n. 1, p. 47-53, 2000.

SMIBERT, R. M. 1974. Order I. Spirochaetales, Buchanan. In: R. E. BUCH ANAN AND N. E. GIBBONS. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8° ed., Baltimore: The William & Wilkins Co., 1917, v. 163, p. 167-195.

SMITH, R.D.; BRENER, J.; OSORNO, M.; RISTIC, M. Pathobiology of *B. theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 32: 182-190, 1978.

SMITH, R.D.; ROGERS, A.B. *Borrelia theileri*: A Review. **Journal of Spirochaetal and Tick-borne Disease**, v. 5, n. 4, p. 63-68, 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.
- STAFFORD III, K. C.; BLADEN, V. C.; MAGNARELLI, L. A. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds (Aves) and white-footed mice in Lyme, CT. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 453-466, 1995.
- 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 espectrum**. *Annals of Internal 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, p. 7, 1977b.
- STEERE, A. C.; GRODZICKI, R. L.; KORNBLATT, A. N. The spirochetal etiology of Lyme disease. **New England Journal Medical**, v. 308, n. 13, p. 733-740, 1983
- STRAUBINGER, R. K. Lyme borreliosis in dogs. In: Recent advances in canine infectious diseases, ed. L.E. Carmichael. **International Veterinary Information Service**, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org>
- TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; FERREIRA, L. C. L. Eritema chronicum migrans, eritema migratório, doença de Lyme ou borreliose de Lyme. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 67, p. 205-209, 1992.
- TELFORD III, SAM R.; SPIELMAN, A. Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme disease spirochete. **Journal of Medicine Entomology**, v. 26, n. 2, p. 118-121, 1989.
- VAN DAM, A. P.; KUIPER, H.; VOS, K; WIDJOJOKUSUMO, A.; JONGH, B. M.; SPANJAARD, L.; RAMSELAAR, A. C. P.; KRAMER, M. D.; DNAKERT, J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme disease. **Clinical Infectious Diseases**, 17:708-717, 1993.
- 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.
- WALKER, R. L.; READ, D. H.; HAYES, D. C.; Nordhausen, R. W. Equine abortion associated with the *Borrelia parkeri*-*B. turicatae* tick-borne relapsing fever spirochete group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1558-1562, 2002.
- WALLICH, R.; HELMES, C.; SCHAIBLE, U. E.; LOBET, Y.; MOTER, S. E.; KRAMER, M. D.; SIMON, M. M. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of *OspA*, *fla*, HSP60, and, HSP70 gene probes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 11, p. 4856-4866, 1992.
- 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.
- WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A; LANE, D. L. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

- 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.
- WILLIS, M. C.; BARRY, R. D. Detecting the cause of Lyme disease in Australia. **The Medical Journal of Australia**, 155: 275, 1991.
- WINWARD, K. E.; SMITH, J. L. Ocular disease in Caribbean patients with serologic evidence of Lyme borreliosis. **Journal Clinical Neuroophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 65-70, 1989.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 87, 4576-4579, 1990.
- YANG, L.; WEIS, J. H.; EICHWALD, E.; KOLBERT, C. P.; PERSING, D. H.; WEIS, J. J. Heritable susceptibility to severe *Borrelia burgdorferi* -induced arthritis is dominant and associated with persistence of large numbers of spirochetes in tissues. **Infection and Immunity**, 62:492-500, 1994.
- 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 Brasil: report of five cases. **Revista Espanhola de Reumatologia**, v. 20, p. 6, 1993b.
- YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; BONOLDI, V. L. N.; 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.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L. N.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.
- YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E. Síndrome infecto-reacional Lyme-símile. **Atualidades-Sociedade Brasileira de Parasitologia**, p. 1-17, 2006.
- ZAHAF, A.; BOUASSIDA, S.; TURKI, H. Lyme disease in Sfax. **Annals of Dermatology and Venereology**, v. 121, n. 2, p. 177-179, 1994.

ANEXOS

Anexo A- Mapa para o acompanhamento imunoenzimático ELISA

Anexo B- Questionário

Anexo C- Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de equino

Anexo D- Alinhamento gene *fla* - isolado de equino

Anexo E- Alinhamento gene *rpoB* - isolado de equino

Anexo F- Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Anexo G- Alinhamento gene *fla* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Anexo H- Alinhamento gene *rpoB* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Anexo I- Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de humano

Anexo J- Alinhamento gene 16S *rRNA* isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com isolado de humano

ANEXO A

UFRRJ CPGCV-PV Renata C. Madureira

Mapa para o acompanhamento imunoenzimático ELISA

Data:

Controle positivo (CP)

Controles negativos (CN)

Obs:

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

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

IDENTIFICAÇÃO

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

MANEJO


Nº total de animais (Equinos)	Presença de carrapatos	Utilização de Carrapaticida	Periodicidade de aplicação

DADOS DAS AMOSTRAS

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

ANEXO C

Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de equino

```
>  gb|U38375.1|BTU38375 Borrelia theileri 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=887

Score = 1094 bits (1212), Expect = 0.0
Identities = 609/611 (99%), Gaps = 0/611 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 5 GAGTCTGCGTCTTATTAGCTAGTTGGTAGGGTATGAGCCTACCAAGGCTATGATAAGTAA 64
      |||
Sbjct 1 GAGTCTGCGTCTTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGAGCCTACCAAGGCTATGATAAGTAA 60

Query 65 CCGGCCTGAGAGGGTGATCGGTCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGA 124
      |||
Sbjct 61 CCGGCCTGAGAGGGTGATCGGTCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGA 120

Query 125 GGCAGCAGCTAAGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACACTGCGTGAAC 184
      |||
Sbjct 121 GGCAGCAGCTAAGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACACTGCGTGAAC 180

Query 185 GAAGAAGGTCGAAAGATTGTAAAGTTCTTTTATAAATGAGGAATAAGCTTTGTAGGAAAT 244
      |||
Sbjct 181 GAAGAAGGTCGAAAGATTGTAAAGTTCTTTTATAAATGAGGAATAAGCTTTGTAGGAAAT 240

Query 245 GACTAAGTGATGACGTTAGTTTATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCG 304
      |||
Sbjct 241 GACTAAGTGATGACGTTAGTTTATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCG 300

Query 305 GTAATACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTCCGGGATCATTGGGCGTAAAGGGTGAGTAGGCGGA 364
      |||
Sbjct 301 GTAATACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTCCGGGATCATTGGGCGTAAAGGGTGAGTAGGCGGA 360

Query 365 TATGTAAGTCTATGTGTAAAATACCACAGCTCAACTGTGGAATATGCTAGAAACTGCAT 424
      |||
Sbjct 361 TATGTAAGTCTATGTGTAAAATACCACAGCTCAACTGTGGAATATGCTAGAAACTGCAT 420

Query 425 GACTAGAGTCTGATAGGGGAAGTTAGAATTCCTGGTGTAAAGGGTGGAAATCTGTTGATATC 484
      |||
Sbjct 421 GACTAGAGTCTGATAGGGGAAGTTAGAATTCCTGGTGTAAAGGGTGGAAATCTGTTGATATC 480

Query 485 AGGAAGAATACCAGAGGCGAAGGCGAACTTCTAGGTCAAGACTGACGCTGAGTCACGAAA 544
      |||
Sbjct 481 AGGAAGAATACCAGAGGCGAAGGCGAACTTCTAGGTCAAGACTGACGCTGAGTCACGAAA 540

Query 545 GCGTAGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCTACGCTGTAAACGATGCACACTT 604
      |||
Sbjct 541 GCGTAGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCTACGCTGTAAACGATGCACACTT 600

Query 605 GGTGTTAATCG 615
      |||
Sbjct 601 GGTGTTAATCG 611
```


> [gb|AY682920.1|](#) Borrelia lonestari isolate MO2002-V1 16S ribosomal RNA
gene,
partial sequence
Length=1233


Score = 1022 bits (553), Expect = 0.0
Identities = 561/565 (99%), Gaps = 0/565 (0%)

> [gb|AY604976.1|](#) Borrelia miyamotoi isolate FR64b 16S ribosomal RNA
gene, partial
sequence
Length=1273

Score = 1011 bits (547), Expect = 0.0
Identities = 559/565 (98%), Gaps = 0/565 (0%)

ANEXO D

Alinhamento gene *fla* - isolado de equino

```
>  gb|U42431.1|BTU42431 Borrelia theileri flagellin gene, partial cds
Length=305


Score = 396 bits (214), Expect = 2e-107
Identities = 222/226 (98%), Gaps = 0/226 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CAGCAACTCTGTTAATTCATCTGTAAGTTGTTCAATTTCAATTTGAATAGAACCTCTGT 60
      |||
Sbjct 226 CAGCAACTCTGTTAATTCATCTGTAAGTTGTTCAATTTCAATTTGAATAGAACCTCTGT 167


Query 61 CTGCATCTGAGTATGTACCATTACCAGATTGAACAGCAAGTTCTTTTCATTCTAACTAATA 120
      |||
Sbjct 166 CTGCATCTGAGTATGTACCATTACCAGATTGGACAGCAAGTTCTTTTCATTCTTACTAATA 107

Query 121 TCTTCTCCACCTCATTCAAATTTCTTCTGTTGTTTGAATAAAAATTTATAGCCTTTGAAG 180
      |||
Sbjct 106 TCTTCTCCACCTCAATCAAATTTCTTCTGTTGTTTGAATAAAAATTTATAGCCTTTGAAG 47

Query 181 TATTTCTAGAAGCTTGAGATAATCCCCTAATTTGAGCATTAAATCTT 226
      |||
Sbjct 46 TATTTCTAGAAGCTTGAGACAATCCCCTAATTTGAGCATTAAATCTT 1

>  gb|AY850064.1 Borrelia lonestari isolate MO2002-V2 flagellin (fla)
gene, complete
cds
Length=987

Score = 359 bits (194), Expect = 3e-96
Identities = 216/227 (95%), Gaps = 0/227 (0%)

>  gb|AY604980.1 Borrelia parkeri isolate RML flagellin (flaB) gene,
partial cds
Length=981

Score = 340 bits (184), Expect = 1e-90
Identities = 213/227 (93%), Gaps = 2/227 (0%)
```


ANEXO F

Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

> [gb|EU025065.1|](#) *Borrelia burgdorferi* isolate MI-1 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence
Length=1362

Score = 320 bits (354), Expect = 1e-84
Identities = 177/177 (100%), Gaps = 0/177 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 GTTTACAGCGTAGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCTACGCTTTCGTGACTC 60
      |||
Sbjct 723 GTTTACAGCGTAGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCTACGCTTTCGTGACTC 664

Query 61 AGCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCCTCCGGTATTCTTTCTGATATCAACAG 120
      |||
Sbjct 663 AGCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCCTCCGGTATTCTTTCTGATATCAACAG 604


Query 121 ATTCCACCCTTACACCAGAAATTCTAACTTCCTCTATCAGACTCTAGACATATAGTT 177
      |||
Sbjct 603 ATTCCACCCTTACACCAGAAATTCTAACTTCCTCTATCAGACTCTAGACATATAGTT 547
```

> [gb|EF488991.1|](#) *Borrelia garinii* strain Nov9906 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1292

Score = 235 bits (127), Expect = 2e-59
Identities = 127/127 (100%), Gaps = 0/127 (0%)

ANEXO G

Anexos G- Alinhamento gene *fla* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

>  [gb|U42431.1|BTU42431](#) Borrelia theileri flagellin gene, partial cds
Length=305

Score = 42.8 bits (46), Expect = 0.63
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query  231  CCCCTAATTTGAGCATTAATCTT  253
      |||
Sbjct  23   CCCCTAATTTGAGCATTAATCTT  1
```

ANEXO H

Alinhamento gene *rpoB* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

> [gb|AF164235.1|AF164235](#) Borrelia hermsii RNA polymerase beta subunit gene, partial cds
Length=329

Score = 388 bits (210), Expect = 5e-105
Identities = 250/270 (92%), Gaps = 0/270 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 GAGAGTCTCCAGGACCCAAAGCATTAAAGACGCCTCTTATGTGTCAATTCAGCCAAAGGA 60
      ||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct 270 GAGAGCCCCCAGGACCCAAAGCATTAAAGACGCCTCTTATGAGTCAATTCAGCTAAAGGA 211

Query 61 TTAAGTGGATCCATAAAATTGTGAAAGCTGGCTAGTTGCAAAAAATTCTTTAACAGCAGAA 120
      ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct 210 TTAAGTGGATCCATAAAATTGTGAAAGCTGACTAGTTGCAAAAAATTCTTTAACAGCAGAA 151

Query 121 ACAATGGGTTTAACTAATCAACTCTTGGGGTTTAAAGACTAAATACCTCTTTATTAGAC 180
      ||||| |||||||||||||| || || ||||| || ||||| ||||| |||||||
Sbjct 150 ACAATAGGTTTAACTTATTAATTCTTGAGGCTTAAGATTAAACACCTCTTTATTAGAC 91

Query 181 ATTCTATCTCTTGCAATTTTCTCTACTCTAGACATTGCTCCCTTATATATATTAGTAAGC 240
      ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||||||
Sbjct 90 ATTCTATCTTTTGCAATTTTCTCTACTCTTGACATTGCACCTTTATATATATTTGTAAGC 31


Query 241 AACTCACCAACAGATCGCACTCTTCTATTT 270
      ||||||| || |||||||
Sbjct 30 AACTCACCAACAGAACGAACTCTTCTATTT 1
```

> [gb|AF164236.1|AF164236](#) Borrelia turicatae RNA polymerase beta subunit gene, partial cds
Length=329

Score = 361 bits (195), Expect = 1e-96
Identities = 245/270 (90%), Gaps = 0/270 (0%)

ANEXO I

Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de humano

>  [gb|EU025065.1](#) Borrelia burgdorferi isolate MI-1 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence
Length=1362

Score = 1582 bits (1754), Expect = 0.0
Identities = 886/889 (99%), Gaps = 2/889 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 TAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC -AACACCTCACAGCACGAGCTGACGAC 59
      |||
Sbjct 1021 TAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACAGCACGAGCTGACGAC 962

Query 60 AACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTATATCCT 119
      |||
Sbjct 961 AACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCCAAACGGGGAATAATTATCTCTAACTATATCCT 902

Query 120 ATATATGTCAAGCCCTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATGCTCCAC 179
      |||
Sbjct 901 ATATATGTCAAGCCCTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAACCACATGCTCCAC 842

Query 180 CGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCC TTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCATACTCCCCAG 239
      |||
Sbjct 841 CGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCC TTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCATACTCCCC -AG 783

Query 240 GCGGCACACTTAACACGTTAGCTTCGGTACTAACTTTTAGTTAACACCAAGTGTGCATCG 299
      |||
Sbjct 782 GCGGCACACTTAACACGTTAGCTTCGGTACTAACTTTTAGTTAACACCAAGTGTGCATCG 723

Query 300 TTTACAGCGTAGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCTACGCTTTCGTGACTCA 359
      |||
Sbjct 722 TTTACAGCGTAGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCTACGCTTTCGTGACTCA 663

Query 360 GCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCCCTCCGGTATTCTTTCTGATATCAACAGA 419
      |||
Sbjct 662 GCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCCCTCCGGTATTCTTTCTGATATCAACAGA 603

Query 420 TTCCACCCTTACACCAGAAATTCTAACTTCTCTATCAGACTCTAGACATATAGTTTCCA 479
      |||
Sbjct 602 TTCCACCCTTACACCAGAAATTCTAACTTCTCTATCAGACTCTAGACATATAGTTTCCA 543

Query 480 ACATAGGTCCACAGTTGAGCTGTGGTATTTTATGCATAGACTTATATATCCGCCTACTCA 539
      |||
Sbjct 542 ACATAGGTCCACAGTTGAGCTGTGGTATTTTATGCATAGACTTATATATCCGCCTACTCA 483

Query 540 CCCTTTACGCCAATAATCCCGAACACGCTCGCCCTTACGTATTACCGGGCTGCTGG 599
      |||
Sbjct 482 CCCTTTACGCCAATAATCCCGAACACGCTCGCCCTTACGTATTACCGGGCTGCTGG 423

Query 600 CACGTAATTAGCCGGGGCTTATTCATAAATTAACGTCATCACTTTGTCATTTCTACAAA 659
      |||
Sbjct 422 CACGTAATTAGCCGGGGCTTATTCATAAATTAACGTCATCACTTTGTCATTTCTACAAA 363

Query 660 GCTTATTTCTCATTATATAAAGAATTTTACAATCTTTCGACCTTCTTCATTACGCAGTG 719
      |||
Sbjct 362 GCTTATTTCTCATTATATAAAGAATTTTACAATCTTTCGACCTTCTTCATTACGCAGTG 303

Query 720 TCGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCTTAGCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 779
      |||
Sbjct 302 TCGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCTTAGCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 243
```

```
Query 780 CTGGACCGTATCTCAGTTCAGTGTGACCGTTCACCTCTCAGGCCGGTTACTTATCATT 839
      |||
Sbjct 242 CTGGACCGTATCTCAGTTCAGTGTGACCGTTCACCTCTCAGGCCGGTTACTTATCATT 183

Query 840 GCCTTGGTAGGCATTTACCCTACCAACTAGCTAATAAGACGCAGACTCA 888
      |||
Sbjct 182 GCCTTGGTAGGCATTTACCCTACCAACTAGCTAATAAGACGCAGACTCA 134
```

```
> emb|X85189.1|BB16S272 B.afzelii 16S rRNA gene (272 strain)
Length=1488
```

```
Score = 1472 bits (797), Expect = 0.0
Identities = 804/808 (99%), Gaps = 1/808 (0%)
```

```
> gb|EF488990.1| Borrelia garinii strain Nov7006 16S ribosomal RNA gene,
partial
sequence
Length=1292
```

```
Score = 1469 bits (795), Expect = 0.0
Identities = 804/808 (99%), Gaps = 1/808 (0%)
```


ANEXO J

Alinhamento gene 16S *rRNA* - isolado de células de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* com isolado de humano

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
IC -----
IH TAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACACCTCACAGCACGAGCTGACGACA 60

IC -----
IH ACCATGCAGCACCTGTATATAGACCCAAACGGGAATAATATCTCTAACTATATACCTA 120

IC -----
IH ATATGTCAAGCCCTGGTAAGGTTCCCTCGCGTATCATCGAATTAAACCACATGCTCCACC 180

IC -----
IH GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCACTCTTGCAGCATACTCCCCCAGG 240

IC -----GT 2
IH CGGCACACTTAACACGTTAGCTTCGGTACTAACTTTTAGTTAACACCAAGTGTGCATCGT 300

IC TTACAGCGTAGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCTACGCTTTCGTGACTCAG 62
IH TTACAGCGTAGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCTACGCTTTCGTGACTCAG 360
*****

IC CGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCCTCCGGTATTCTTTCTGATATCAACAGAT 122
IH CGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCCTCCGGTATTCTTTCTGATATCAACAGAT 420
*****

IC TCCACCCTTACACCAGAAATCTAACTTCCTCTATCAGACTCTAGACATATAGTT----- 177
IH TCCACCCTTACACCAGAAATCTAACTTCCTCTATCAGACTCTAGACATATAGTTTCCAA 480
*****

IC -----
IH CATAGTCCACAGTTGAGCTGTGGTATTTTATGCATAGACTTATATATCCGCCTACTCAC 540

IC -----
IH CCTTTACGCCCAATAATCCCGAACAACGCTCGCCCCTTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC 600

IC -----
IH ACGTAATTAGCCGGGCTTATTCATAAATTAACGTCATCACTTTGTCATTTCTACAAAG 660

IC -----
IH CTTATTTCTCATTATATAAAGAATTTTACAATCTTTGACCTTCTTCATTACGCAGTGT 720

IC -----
IH CGCTCCGTAGGCTTTTCGCCATTGCGGAAGATTCTTAGCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC 780

IC -----
IH TGGACCGTATCTCAGTTCAGTGTGACCGTTACCCCTCTCAGGCCGTTACTTATCATTG 840

IC -----
IH CCTTGGTAGGCATTTACCCTACCAACTAGCTAATAAGACGCAGACTCAA 889
```