



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DENISE DO AMARAL GOMES NASCIMENTO

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-BORRELIA SPP. EM  
HUMANOS, CÃES E EQUINOS DE ASSENTAMENTO  
RURAL DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL**

DENISE DO AMARAL GOMES NASCIMENTO

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-BORRELIA SPP. EM  
HUMANOS, CÃES E EQUINOS DE ASSENTAMENTO  
RURAL DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N244p Nascimento, Denise do Amaral Gomes.

Prevalência de anticorpos *anti-Borrelia* spp. em humanos, cães e equinos de assentamento rural da região norte do Paraná, Brasil / Denise do Amaral Gomes Nascimento. - Londrina, 2012.  
50f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012.

Inclui bibliografia.

1. *Borrelia burgdorferi* - Teses. 2. Doenças transmitidas por carrapato - Teses. 3. Doenças transmissíveis - Teses. 4. Carrapato - Teses. 5. Zoonoses - Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 616.993

DENISE DO AMARAL GOMES NASCIMENTO

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-BORRELIA SPP. EM  
HUMANOS, CÃES E EQUINOS DE ASSENTAMENTO RURAL DA  
REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de pós-  
graduação em Ciência Animal da Universidade  
Estadual de Londrina

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto  
UEL – Londrina – PR.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire  
UEL – Londrina – PR.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Dib Gonçalves  
UNIPAR – Umuarama – PR.

Londrina, 25 de maio de 2012.

*Dedico este trabalho à memória de meu pai José Gomes Nascimento que sempre incentivou e investiu em meu aprendizado e educação, apoiou a realização dos meus sonhos e que deixou saudades no coração de todos que o conheciam*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado a oportunidade de estudar e saúde para realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Odilon Vidotto que sempre me incentivou a pesquisa, pela orientação e confiança.

As Profs. Maria Luísa Vieira e Daniela Dib Gonçalves pela confiança no meu trabalho.

Aos amigos e tutores Rafael Vieira e Marcela Gasparini pela amizade, pelos ensinamentos, exemplo, profissionalismo, paciência e suporte durante todo o trabalho. Espelhei-me principalmente em vocês durante todo o tempo que passei no laboratório de protozoologia.

A amiga Thállitha Vieira pela ajuda e paciência na realização deste trabalho, também pelo companheirismo e pelas risadas altas que contagiavam o ambiente de trabalho.

As colegas Kátia Tamekuni e Roberta dos Santos Toledo pelo auxílio e suporte na realização deste trabalho

Aos técnicos Elizabete Marana, Aldair Matos e Beatriz Nino pela amizade e colaboração durante todo processo.

Aos amigos Jonatas Campos de Almeida, Gislaine Ferreira, Buda, Farma e Rafaela Buosi pelo auxílio, pelas risadas, conversas e pelos inúmeros cafezinhos nos fins de tarde.

Aos colegas de pós-graduação e estagiários do laboratório de protozoologia pela colaboração e amizade no tempo que passamos juntos.

À amiga Fernanda Evers pelos conselhos, conversas por sua hospitalidade e amizade que levarei por toda vida.

Aos meus queridos amigos de longa data Maria Carla Perozim Preti, Luisa Mioni, Thaís Aoki, Shock, Juliana Lopez, Janaína Caldeira, Bruno Manarelli, Pedro Guilherme Nogueira, Rodrigo Silva, Fábio Pomini, Turcão e aos demais integrantes do grupo "Tomeli", que estiveram sempre presentes nos momentos mais importantes desde que cheguei em Londrina. Vocês são a família que escolhi ter e os tenho com muito carinho.

Aos meus irmãos Roberta, Flávio, Fernanda, Rogério e a minha mãe Anita pela compreensão nos meus momentos de ausência, amizade e pelo carinho durante todo processo.

Aos meus sobrinhos lindos Heloísa, Pedro, Laís e Dudu por me fazerem sorrir com pequenos gestos e por serem sempre carinhosos.

Aos meus amigos de Itu pela amizade de sempre mesmo a longas distâncias e mesmo com a minha ausência em várias ocasiões importantes.

A todos os professores de graduação e pós-graduação que contribuíram muito para o meu aprendizado e pela profissional que sou hoje em dia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*"O que fizemos apenas por nós mesmos morre conosco; o que fizemos pelos outros e pelo mundo permanece e é imortal".*

(Albert Pike)

NASCIMENTO, Denise do Amaral Gomes. **Prevalência de anticorpos anti-*Borrelia* spp em humanos, cães e equinos de assentamento rural da região norte do Paraná, Brasil.** 2012. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina. 2012.

## RESUMO

A doença de Lyme é uma infecção causada por bactérias do gênero *Borrelia* pertencentes ao complexo denominado *Borrelia burgdorferi sensu lato* que possui 18 genoespécies descritas até o momento. É transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* e *Amblyomma* podendo infectar humanos, cães e equinos sendo considerada uma zoonose. Cerca de 90% dos humanos infectados apresentam sintomas como eritema migratório cutâneo, artrite, sinais neurológicos, cutâneos e cardíacos enquanto os cães e equinos raramente apresentam sinais clínicos. No Brasil, o agente etiológico ainda não foi isolado e a enfermidade possui características diferentes das encontradas no hemisfério norte, deste modo acredita-se que uma espécie diferente seja responsável pela doença no país. Devido às dificuldades do diagnóstico clínico e exame direto é importante utilizar as provas sorológicas para auxiliar na conclusão dos casos, sendo realizadas principalmente as técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) ou reação de imunofluorescência indireta (IFI) para triagem, e a confirmação realizada pelo método de Western Blot (WB). Deste modo, os objetivos deste trabalho foram determinar a soroprevalência de anticorpos contra *Borrelia* spp. em humanos, cães e equinos de assentamento rural utilizando IFI e WB e verificar as possíveis variáveis associadas ao risco de infecção. Além disso, foram realizadas coleta e identificação dos carrapatos encontrados nos cães e equinos e aplicado questionário epidemiológico aos indivíduos e proprietários dos animais avaliados. Foram coletadas um total de 87 amostras de sangue de humanos, 83 de cães e 18 de equinos. O ponto de corte padronizado na IFI foi de >128 para humanos e >64 para cães e equinos. As prevalências encontradas em humanos, cães e equinos foram de 6,9%, 26,5% e 38,9% respectivamente. No total foram coletados 101 carrapatos: em equinos 34 *Amblyomma cajennense*; em cães 21 *A. ovale*, um *A. cajennense* e 45 *Rhipicephalus sanguineus*. Não foram encontradas variáveis estatisticamente significativas. Com bases nos resultados obtidos é possível concluir que *Borrelia burgdorferi sensu lato* está circulando na região avaliada e infectando humanos, cães e equinos. Médicos e veterinários devem estar atentos para incluir esta doença entre o diagnóstico diferencial das doenças transmitidas por carrapato.

**Palavras-chave:** Imunofluorescência indireta. Doença de Lyme. Sorologia. Carrapatos. Fatores de risco.

NASCIMENTO, Denise do Amaral Gomes. **Serosurvey of antibodies anti-*Borrelia* spp. in humans, dogs and horses from rural settlement of northern Paraná State - Brazil.** 2012. 50 p. Dissertation (Master Degree in Animal Science). Universidade Estadual de Londrina. 2012.

## ABSTRACT

Lyme disease is an infection caused by bacteria belonging to *Borrelia* genus that has a complex called *Borrelia burgdorferi* sensu lato and hitherto there are 18 genospecies described. It is transmitted by ticks belonging to *Ixodes* and *Amblyomma* genus and can affect humans, dogs and horses being considered a zoonosis. About 90% of humans show symptoms such as erythema migrans, arthritis, and neurological, heart and skin problems whereas dogs and horses are rarely symptomatic. In Brazil the causative agent has not been isolated and many aspects of the disease seem to differ from those in the northern hemisphere, thus it is believed that there is a different species in our country. Due to difficulties of clinical diagnosis and direct detection it is important to use serological tests to support diagnosis, ELISA or IFA as screening test and Western blot for confirmation. Thus the aim of this study was to determine the prevalence in humans, dogs and horses from rural area and evaluate possible risk factors. In addition, an epidemiological questionnaire was applied to all individuals and owners of sampled animals and, the ticks from dogs and horses were collected and indentified. A total of 87 blood samples were collected from humans, 83 from dogs and 18 from horses. The cutoff point was standardizing in  $>128$  for humans and  $>64$  for dogs and horses. The prevalence found in humans, dogs and horses were 6.9%, 26.5% and 38.9%, respectively. A total of 101 ticks were collected and 34 identified as *Amblyomma cajennense* were found parasitizing horses and 45 *Rhipicephalus sanguineus*, 21 *A. ovale*, one *A. cajennense* were collected from dogs. No risk factors were found in this study. Based on these results it's possible to conclude that *Borrelia burgdorferi* sensu lato is circulating in this region and infecting humans, dogs and horses. Physicians and veterinarians should be alert to include this disease among the tick borne diseases differential diagnosis.

**Key-words:** Indirect immunofluorescence assay. Lyme disease. Serology. Ticks. Risk factors.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Frequência de anticorpos anti- *B. burgdorferi* B31 (IFI - IgG) de acordo com o título, nas espécies humana, canina e equina provenientes de assentamento rural, Alvorada do Sul, 2006-2007 .....39
- Tabela 2** – Prevalência de anticorpos anti- *Borrelia* spp. de acordo com cada variável estudada, em humanos e cães de assentamento rural do município de Alvorada do Sul Paraná, Brasil, 2006-2007 .....40
- Tabela 3** – Quantidade e espécies de carrapatos identificados em cães e equinos de assentamento rural de Alvorada do Sul, Paraná, Brasil, 2006-2007 .....40

## SUMÁRIO

<b>1 DOENÇA DE LYME</b> .....	12
1.1 HISTÓRICO .....	12
1.2 HUMANOS .....	15
1.3 CÃES E EQUINOS.....	16
1.4 BRASIL.....	17
1.5 CONCLUSÕES .....	19
1.6 REFERÊNCIAS.....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 GERAL .....	26
2.2 ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	27
3.1 INTRODUÇÃO .....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.2.1 Área de Estudo .....	29
3.2.2 Amostras.....	30
3.2.3 Imunofluorescência Indireta (IFI) .....	30
3.2.4 Western Blot (WB) .....	31
3.2.5 Ficha Epidemiológica.....	31
3.2.6 Análise Estatística.....	31
3.3 RESULTADOS .....	32
3.4 DISCUSSÃO .....	33
3.5 REFERENCIAS .....	35
3.6 TABELAS .....	39
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	41
<b>ANEXOS</b> .....	42
ANEXO 1.....	43
ANEXO 2.....	44

<b>APÊNDICES</b> .....	45
APÊNDICE 1 .....	46
APÊNDICE 2 .....	47
APÊNDICE 3 .....	48
APÊNDICE 4 .....	49
APÊNDICE 5 .....	50

# 1 DOENÇA DE LYME

## 1.1 HISTÓRICO

Em 1883 foi descrito na Europa o primeiro caso de uma doença crônica de pele que posteriormente foi denominada acrodermatite crônica atrófica (BUCHWALD, 1883; HERXHEIMER e HARTMANN, 1902) e alguns anos depois foi relatada uma lesão de pele que se expandia lentamente, a qual recebeu o nome de eritema migratório (EM) (AFZELIUS, 1910). Um médico dermatologista após relatar um caso de EM estava ciente da relação entre doença de pele e picada de carrapato (LIPSCHÜTZ, 1923). Uma descrição de meningo-radiculoneurite também foi vinculada a picada de carrapato e em 1930 foi primeiramente considerada a relação entre EM, sinais neurológicos e picada de carrapatos (GARIN e BUJADOUX, 1922; HELLERSTRÖM 1930).

No entanto a primeira descrição da doença foi caracterizada por uma epidemia de artrite oligoarticular em crianças nas comunidades de Lyme, Old Lyme e East Haddam nos Estados Unidos, e posteriormente alguns pacientes desenvolveram anormalidades cardíacas e neurológicas. A enfermidade multi-sistêmica e transmitida por carrapatos da espécie *Ixodes scapularis* foi então denominada doença de Lyme (DL), porém o agente etiológico não havia sido identificado (STEERE ET AL, 1977).

Em 1982, ao pesquisar o agente da febre maculosa em *I. scapularis*, Burgdorfer encontrou inesperadamente espiroquetas de comprimento longo e forma irregular nas glândulas salivares do carrapato. Estas bactérias foram cultivadas em meio modificado de Kelly (BSKII) e o organismo foi relacionado à Doença de Lyme por reagir com soro de pacientes doentes através de imunofluorescência indireta (BURGDORFER et al., 1982; BARBOUR, 1984). O agente causador da doença foi então denominado *Borrelia burgdorferi* e inserido no gênero *Borrelia* após estudos relacionados ao DNA, morfologia e fisiologia (BARBOUR, 1988).

O gênero *Borrelia* é constituído por bactérias Gram-negativas, microaerófilas, móveis, pertencentes à família Spirochaetaceae da ordem Spirochaetales. Todas as espécies descritas possuem formato helicoidal que pode variar de 3 a 10 espiras, medem de 4 a 30  $\mu\text{m}$ , possuem flagelos e se reproduzem por fissão binária transversal (BARBOUR e HAYES, 1986; AUSTIN, 1993).

A doença de Lyme é uma enfermidade infecciosa, sistêmica e cosmopolita que acomete diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem (BENNET, 1995). É uma enfermidade transmitida por carrapatos e causada por bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), composta por 18 genoespécies taxonomicamente conhecidas. *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garini* e *B. afzelli* são consideradas de maior patogenicidade para o homem e também para as diferentes espécies de animais domésticos, já as demais genoespécies deste complexo, como *B. japonica*, *B. turdi*, *B. tanukii*, *B. andersonii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. sínica*, *B. spielmanii*, *B. yangtze*, *B. californiensis*, *B. americana*, *B. carolinensis*, *B. bavariensis* e *B. kurtenbachii* são consideradas de menor patogenicidade (STANEK e REITER, 2011).

A transmissão das borrelíias no vetor artrópode pode ocorrer de forma transovariana e/ou transestadial variando de acordo com a espécie de carrapato envolvida e isolado do agente etiológico, no entanto a via transestadial ocorre com maior frequência (RANDOLPH et al., 1996; GRAY, 1998). As bactérias são transmitidas pela saliva, que tem importância fundamental no sítio de inoculação ao minimizar as reações imunológicas do hospedeiro contra o agente inoculado (BURGDORFER et al., 1982; DE SILVA et al., 1999).

Nos carrapatos, o estágio evolutivo de maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão desta espiroqueta são as ninfas. Entretanto, todos os ínstares possuem habilidade para transmiti-las (BURGDORFER et al., 1989), sendo necessário um período superior a 48 horas após a fixação para que ocorra a transmissão da bactéria para o hospedeiro (BENACH et al., 1987). Devido ao fato dos carrapatos transmitirem outros agentes além da *B. burgdorferi*, co-infecções podem ocorrer com *Babesia*, *Bartonella*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* (KRAUSE et al., 1996; NADELMAN et al., 1997; ADELSON et al., 2004).

Os principais reservatórios de *Borrelia* são os roedores (DONAHUE et al., 1987) os quais não apresentam sinais clínicos relevantes. No entanto, o papel que as aves assumem na ecologia da doença vem ganhando reconhecimento, pois são capazes de disseminar a longas distâncias larvas e ninfas de carrapatos infectados (HUMAIR et al, 1998).

O diagnóstico da infecção pode ser realizado pelo cultivo do agente etiológico em meio BSK a partir de amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano,

lesão de pele e líquido sinovial, porém o isolamento de *B. burgdorferi* por meio destes métodos é pouco frequente. Além disso, os médicos podem encontrar dificuldades em reconhecer o eritema migratório nos humanos por não estarem familiarizados com a doença ou mesmo pelas lesões se apresentarem pequenas ou atípicas (BERGER et al, 1992). Outros métodos utilizados incluem imunohistoquímica, imunofluorescência indireta, teste da reação imunoenzimática (ELISA), western blot e reação em cadeia pela polimerase (PCR) (SOARES et al., 2000).

Os testes sorológicos mais usados são a imunofluorescência indireta (IFI) e o ELISA. A técnica de Western Blot (WB) é atualmente recomendada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA) para confirmação dos resultados positivos por ser mais sensível e específico do que ELISA ou IFI além de fornecer informação mais detalhada a respeito dos padrões de resposta imune aos diferentes antígenos de *B. burgdorferi* (BINGNAN et al, 1992).

A IFI foi o primeiro teste usado para diagnóstico da doença de Lyme e já foram detectados valores de sensibilidade de 66,4% e 53% enquanto a especificidade já foi calculada em 84%. Para o ELISA, a sensibilidade chega a 67% e 96,6% enquanto já foi relatada especificidade de 92% (WILKINSON, 1984; CUTLER e WRIGHT, 1989). Estudos envolvendo WB apresentaram sensibilidades de 78% e 95,6% e especificidades de 96% e 90,3% (ZOLLER et al., 1991)

Não há padronização da prova de IFI entre laboratórios, pois diferentes metodologias e pontos de corte são usados entre eles, sendo que este último pode variar de 64 a 256 (BARBOUR, 1988). Esta variação depende, em parte, do critério aceito para a intensidade de fluorescência, de diversas tecnologias para preparar os antígenos, executar os testes e definir os respectivos limiares de positividade (BARBOUR, 1988; COLLARES-PEREIRA, 2000). Resultados falso-positivos podem ocorrer em pacientes com sífilis e febre recorrente e em menor grau pode haver reações cruzadas com doenças autoimunes (BARBOUR, 1988).

A prevenção da doença de Lyme em humanos e animais domésticos é dependente da redução do risco à picadas de carrapato tanto em nível ambiental como individual. As medidas de proteção incluem evitar áreas infestadas por carrapatos, usar vestuário de proteção, repelentes e acaricidas, checar por carrapatos no corpo. Após picada de carrapato deve-se removê-lo com uma pinça o mais próximo da pele possível, retirando o carrapato para fora sutilmente (HENGGE

et al., 2003). Deve-se manter o gramado aparado próximo aos locais de criação dos animais domésticos e/ou silvestres e áreas de circulação do homem, além de impedir a presença de roedores hospedeiros intermediários (ALVIM et al., 2005).

## 1.2 HUMANOS

Nos Estados Unidos e na Europa os agentes e os vetores da doença já estão bem caracterizados, enquanto no Brasil ainda não houve relatos relacionados ao isolamento e identificação da espécie responsável pela doença (YOSHINARI et al., 2010).

*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, e *B. afzelii* são considerados agentes etiológicos da doença de Lyme em seres humanos na Europa enquanto nos Estados Unidos apenas *B. burgdorferi sensu stricto* tem sido descrita como patogênica. As cepas são transmitidas por diferentes espécies de carrapatos do gênero *Ixodes* (VAN DAM et al, 1993) sendo que na Eurásia os principais vetores são *I. ricinus* e *I. persulcatus* e na América do Norte o *I. pacificus* e *I. scapularis* (NADELMAN e WORMSER, 1998).

O sintoma mais importante da doença em humanos é um eritema migratório cutâneo que se manifesta na fase aguda da doença ao redor do local da picada do carrapato após sete a 10 dias. O eritema expande de tamanho após dias ou semanas, provavelmente pela disseminação centrífuga das bactérias através da pele (NADELMAN et al, 1996). Pode ocorrer disseminação hematogênica em áreas do sistema nervoso, articulações, coração e outras regiões da pele gerando sintomas como múltiplos eritemas, defeitos atrioventriculares, miopericardite, artrite, paralisia facial, meningite e meningoradiculoneurite (OSCHMANN et al., 1998). Na América do Norte o sintoma mais comum da infecção tardia é a artrite e na Europa a acrodermatite crônica atrofiante (ACA). Essas características divergem devido ao fato de diferentes espécies serem responsáveis pela doença clínica nesses continentes (NADELMAN e WORMSER, 1998).

Os diagnósticos diferenciais da doença de Lyme na fase aguda e sem lesão de pele incluem gripe, meningite asséptica por enterovírus, hepatite não icterica ou mononucleose infecciosa e quando a lesão de pele está presente mas não é característica pode ser confundida com reação a picada de inseto, eritema nodoso, erisipela, úlcera tularêmica e hepatite B. Quando há envolvimento das

articulações a doença pode ser confundida com artrite séptica, infecção gonocócica disseminada ou artrite reumatoide juvenil pauciarticular. Casos da doença com sinais neurológicos podem ser diagnosticados equivocadamente como sarcoidose, esclerose múltipla, neurosífilis, meningite tuberculosa ou fúngica, múltiplo mieloma e linfoma (BARBOUR, 1988). Devido ao fato dos carrapatos transmitirem outros agentes além da *B. burgdorferi* podem ocorrer co-infecções com *Babesia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* (KRAUSE et al., 1996; NADELMAN et al., 1997; ADELSON et al., 2004).

Embora a maioria dos casos se resolva espontaneamente sem tratamento, os antibióticos podem acelerar a resolução e impedir a progressão da doença. O tratamento usualmente é realizado durante 14 dias e pacientes com EM e linfocitoma são tratados com amoxicilina, azitromicina, doxiciclina, cefuroxima-axetil ou fenoximetilpenicilina e excepcionalmente, com eritromicina. Quando há envolvimento do sistema nervoso e miocardite grave o tratamento envolve ceftriaxona ou penicilina G por 2-3 semanas e apenas excepcionalmente por via oral com doxiciclina ou amoxicilina. A ceftriaxona, penicilina G, doxiciclina ou amoxicilina são utilizados para a terapia de ACA e da artrite (NADELMAN e WORMSER, 1998; MASSAROTI et al, 1992).

Atualmente a borreliose de Lyme é descrita como a doença transmitida por artrópode mais comumente encontrada nos Estados Unidos e Europa, representando cerca de dezenas de milhares de novos casos anualmente em ambas as regiões (O'CONNELL et al., 1998; ORLOSKI et al., 2000).

### 1.3 CÃES E EQUINOS

A doença nos cães é na maioria das vezes assintomática (LITTMAN et al., 2006), porém quando estes apresentam sinais clínicos pode haver comprometimento das articulações principalmente a carpiana e tarsiana além de febre, letargia, inapetência e dor articular, podendo ocorrer também envolvimento dos rins e do coração (DAMBACH et al., 1997; LEVY e DURAY, 1988).

A primeira descrição de borreliose de Lyme em cães foi feita por Lissman et al. (1984), em um animal da raça Doberman de três anos de idade, que apresentava artrite carpiana severa, febre (40,2°C) e claudicação. Este caso ocorreu em 1983 em Nova Iorque, Estados Unidos, e a partir deste relato deu-se maior importância à borreliose canina e de outros animais. Em áreas endêmicas a

porcentagem de cães acometidos pode variar de 70% a 90% tanto em animais saudáveis quanto clinicamente doentes (LITTMAN et al., 2006).

No tratamento dos cães são recomendados derivados da tetraciclina ou amoxicilina, sendo mais frequentemente usada a doxiciclina 10/mg/kg via oral a cada 24 horas durante 1 mês devido à possibilidade de co-infecções (STRAUBINGER et al., 1998).

Em equinos, na maioria dos casos, a doença é assintomática e apenas 5% a 10% dos animais irão apresentar sinais clínicos que incluem mal-estar, febre baixa, rigidez, inchaço das articulações, laminite e em alguns casos envolvimento ocular com uveíte, problemas cardíacos e encefalite (MAGNARELLI et al, 2000; BURGESS et al, 1986; BROWING et al, 1993;

BURGESS e MATTISON, 1987). Estudo realizado em Connecticut nos Estados Unidos, que é uma região endêmica para doença de Lyme, detectou 84% de equinos soropositivos através do teste ELISA (MAGNARELLI e FIKRIG, 2005).

O tratamento pode ser realizado com doxiciclina, ceftiofur ou tetraciclina por via oral durante 28 dias, sendo a tetraciclina mais eficiente na eliminação da infecção persistente (CHANG et al., 2005).

#### 1.4 BRASIL

No Brasil já foram descritas tentativas de isolamento de *B. burgdorferi* (s.l.), porém o agente etiológico ainda não foi identificado e conseqüentemente não há conhecimento da real situação da epidemiologia desta espiroqueta no país (MANTOVANI et al, 2007; YOSHINARI et al, 2010).

A doença neste país difere em muitas características daquelas encontradas na América do Norte e Europa, sendo que a bactéria não apresenta crescimento em meios adequados para borrelias e ocorrem falhas na PCR ao se utilizar *primers* de flagelos e proteínas de membrana externa (Osp). Além disso, apesar do desenvolvimento do clássico eritema migratório em humanos, muitos pacientes apresentam recorrência de sintomas mesmo após o tratamento com antibióticos, o que não ocorre no hemisfério norte (YOSHINARI et al., 2010). Deste modo, várias nomenclaturas foram sugeridas a fim de diferenciar a doença no Brasil como DL-símile, Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (SIRLS), Doença de

Lyme-símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) (YOSHINARI et al, 2010).

Os vetores da borreliose de Lyme no Brasil ainda não estão bem estabelecidos (ABEL et al., 2000), mas em áreas onde houve casos da doença foram encontrados carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Ixodes loricatus* (BARROS-BATTESTI et al., 1995).

O primeiro relato desta enfermidade no Brasil foi feito por Yoshinari et al. (1992), em dois irmãos da cidade de Cotia-SP que apresentaram sorologia positiva para *B. burgdorferi* e quadro de eritema migratório após picada de carrapato. Nesta mesma região foi realizado um estudo em humanos onde se constatou 7,5% de soropositividade no ELISA para *B. burgdorferi* (YOSHINARI, 2001).

Em 2001, no Mato Grosso do Sul, foram encontrados 16 pacientes sororeagentes para *B. burgdorferi* dos quais 25% não relataram picadas de carrapatos, mas conviviam com cães que já sofreram de infestações de carrapatos (SALGADO, 2006). Ao estudar a epidemiologia da doença em crianças Naka et al. (2008) encontraram 27% de soropositivos no estado do Mato Grosso do Sul utilizando o teste de ELISA.

Um estudo realizado em São Paulo com veterinários, biólogos e tratadores de animais silvestres constatou 6,4% de positividade pelo ELISA indireto, sendo relacionada à exposição prévia a carrapatos e também ao tempo de trabalho com os animais (CORRADI et al., 2006). Ao estudar um caso de moradora de área rural que apresentou sintomatologia e relato de contato prévio com carrapatos, Fugimoto et al. (2005) confirmaram a soropositividade pelos testes de ELISA e Western blot.

Em cães provenientes da região metropolitana do Rio de Janeiro verificou-se 15,58% de positividade, enquanto em áreas rurais do estado foram detectados 48,25% de animais positivos pelo teste de ELISA (ALVES et al., 2004; O'DWYER et al., 2004). No estado de São Paulo, cidade de Cotia, os cães foram analisados pelo ELISA indireto e Western blot e foram encontrados 9,7% de sororeagentes, sendo maior a prevalência em animais que tiveram contato prévio com carrapatos (JOPPERT et al., 2001).

Ao estudar a prevalência em equinos no estado do Pará, Galo et al. (2009) verificaram 26,7% de soropositivos utilizando o teste ELISA, enquanto no Rio

de Janeiro foi encontrado 28,4% de animais soropositivos utilizando o mesmo método (MADUREIRA et al., 2007).

No estado do Paraná foi verificada sorologia positiva para IgM em dois moradores de área rural da cidade de Jataizinho, utilizando IFI e Western blot. Neste mesmo estudo foram encontradas como variáveis de risco a presença de carrapatos fixados ao corpo e visualização de carrapatos dentro do domicílio (GONÇALVES, 2010).

## 1.5 CONCLUSÕES

Desde o primeiro relato da doença no Brasil em 1992 (YOSHINARI et al., 1992), alguns estudos foram realizados a fim de melhor compreender a situação da Doença de Lyme no país, no entanto, o agente causador desta enfermidade ainda não foi isolado e pouco se sabe sobre a epidemiologia da doença no Brasil.

O fato é que a doença já está bem caracterizada na América do Norte e Europa e em muitos aspectos diverge das características encontradas no Brasil, deste modo acredita-se que a infecção seja causada por outra espécie de *Borrelia* e transmitida principalmente pelo carrapato *Amblyomma cajennense*.

Levantamentos epidemiológicos realizados nos EUA na última década mostram um aumento expressivo da infecção por seres humanos por *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Borrelia*. No Brasil são poucos os estudos sobre a situação da doença em humanos e em animais e, no estado do Paraná, as pesquisas a respeito das borrelioses são escassas.

A sorologia realizada em animais domésticos contribui para o mapeamento das áreas de risco para a doença de Lyme no homem (YOSHINARI et al, 1997) tornando importante a pesquisa principalmente em áreas onde a rotina diária dos humanos inclui relação estreita com os animais.

No Brasil ainda não foi possível isolar e cultivar a bactéria, sendo o método de ELISA utilizado como diagnóstico da doença. Deste modo, a padronização do teste de IFI surge como uma alternativa para triagem de amostras de humanos, cães e equinos.

Estudos sobre a presença da infecção nas diferentes regiões do país e das variáveis associadas ao risco são necessários para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença de Lyme no Brasil.

## 1.6 REFERÊNCIAS

- 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.
- ADELSON ME, RAO RV, TILTON RC, CABETS, K., ESKOW, E., FEIN, L., OCCI, J.L., MORDECHAI, E. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp, *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in northern New Jersey. **J Clin Microbiol.**, v.42, p.2799-2801, 2004.
- AFZELIUS, A. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 28 Oct 1909. **Archives of Dermatology and Syphilis**, v.101, p.404, 1910.
- ALVES, A.L.; MADUREIRA, R.C.; SILVA, R.A.; CORRÊA, F.N. BOTTEON, R.C.C.M. Freqüência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, n.4, p.203-206, 2004
- ALVIM, N. C.; BENTO, M. A. F.; MARTINS, L. A. Borreliose de Lyme: A doença da década. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.4, 2005.
- AUSTIN, F.E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* sh-2-82 in 4% oxygen - 5% carbon dioxide in vitro. **Can. J. Microbiol.**, v 39, p.1103-1110, 1993.
- BARBOUR, A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 57, p.521-525, 1984.
- BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. **Clinical Microbiology Reviews**. v.50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BARBOUR, A.G. Laboratory aspects of Lyme borreliosis. **Clinical microbiology reviews**, v.1, n.4, p.399-414,1988.
- BARROS E BATTESTI DM, ARZUA M, YOSHINARI NH, SCHUMAKER TTS. Ectoparasitas de marsupiais capturados em area de risco para a doença de Lyme, município de Itapevi, São Paulo. **Rev. Patol. Trop**, v.23, n.215, 1995.
- BARROS-BATESTI, D.M. **Estudo de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes a *Borrelia*, no município de Itapevi, Estado de São Paulo**, 1998. 166p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1998.
- BELAICH, S. Lyme disease. **Presse. Med.**, v.14, p. 81-87, 1995.

- 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. **Adv. Parasitol.**, v36, p343-405, 1995.
- BROWNING, A., CARTER, S.D., BARNES, A., MAY, C. AND BENNETT, D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. **Veterinary Record**, v.132, p. 610-611, 1993.
- BERGER, B.W.; JOHNSON, R.C.; KODNER, C.; COLEMAN, L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from Erythema Migrans Lesions and Perilesional Skin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p.359-361, 1992.
- BINGNAN M.A.; CHRISTEN, B.; LEUNG, D.; VIGO-PELFREYT, C. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: Reactivity of Various Significant Antibodies against *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 370-376, 1992.
- BUCHWALD, A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut Atrophie. **Archives of Dermatology and Syphilis**, v.10, p.553-556, 1883.
- BURGDORFER, W.; BABOUR, A.G.; HAYES, S.F.; BENACH, J.L.; GRUNWALDT, E.; DAVIS J.P. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? **Science**, v. 216, p. 1317-1319, 1982.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodes ticks. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 51442-51449, 1989.
- BURGESS, E., GILLETTE, D. AND PICKETT, J.P. Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, p.1340-1342, 1986.
- BURGESS, E.C. AND MATTISON, M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, p.1457-1458, 1987.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.** v.44, p.590- 591, 1995.
- CHANG, YUNG-FU., KU, YU-WE., CHANG, CHAO-FU., CHANG, CHING-DONG., MCDONOUGH, S.P., DIVERS, T., POUGH, M., TORRES, A. Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p.285-294, 2005.
- COLLARES-PEREIRA M, SANTOS SC, VIEIRA ML. Valor diagnóstico da técnica de imunofluorescência indirecta utilizando diferentes preparações antigénicas no imunodiagnóstico da Borreliose de Lyme em Portugal. **Supl.Trab. Soc. Port. Dermatol. Venereol.**,v.58, p.97-105, 2000.

CORRADI, D.A.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D. Anticorpos para *Borrelia burgdorferi* em indivíduos que trabalham com animais silvestres. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p. 966-968. 2006.

CUTLER, S.J., WRIGHT, D.J.M. Comparison of immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assays for diagnosing Lyme disease. **J. clinic. Pathol.**, v.42, p.869-871, 1989.

DAMBACH, D.M., SMITH, C.A., LEWIS, R.M., VAN WINKLE, T.J. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal-lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). **Veterinary Pathology** v.34, p.85-96, 1997.

DE SILVA, A. M.; ZEIDNER, N. S.; ZHANG, Y.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; FRIKG, E. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 30-35, 1999.

DONAHUE, J.G., PIESMAN, J. AND SPIELMAN, A. Reservoir competence of white-footed mice for lyme-disease spirochetes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.36, p.92-96, 1987.

FUGIMOTO, F.; GHANEM, R. C.; MONTEIRO, M.L. R. Pupila tônica bilateral como sequela oftálmica isolada da doença de Lyme: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n. 3, p. 381-4, 2005.

GALO, K.R. **Freqüência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará.** 2006. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará. 48p.

GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R. C., KOBILKA, E. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. **Revista Panam Salud Publica (Panam. J. Public Health)**, v.6, n.3, p.157 - 163, 1999.

GARIN, C. AND BUJADOUX, R. Paralyse par les tiques. **Journal de Médecine de Lyon**, v.71, p.765-767, 1922.

GONÇALVES, D.D. Zoonoses da área rural do município de Jataizinho -Paraná- Brasil, 2010. 102p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2010.

HELLERSTRÖM, S. Erythema chronicum migrans Afzelii. **Acta Dermato-Venereologica (Stockholm)**, v.11, p.315 321, 1930.

HENGGE, U.R., TANNAPFEL, A., TYRING, S.K., ERBAL, R., ARENDT, G., RUZICKA, T. Lyme borreliosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.8, p. 489-500,2003.

HERXHEIMER, K. AND HARTMANN, K. Über Acrodermatitis chronica atrophicans. **Archives of Dermatology and Syphilis**, v.61, p.57-76, 1902.

HUMAIR, P.F., POSTIC, D., WALLICH, R. AND GERN, L. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.287, p.521-538, 1998.

JOPPERT, A.M.; HAGIWARA, M.K.; YOSHINARI, N.H. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia county, São paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v.43, n.5, p. 251-255, 2001.

KRAUSE PJ, TELFORD SR III, SPIELMAN A, SIKAND, V., RYAN,R., CHRISTIANSON, D., BURKE, G., BRASSARD, P., POLLACK, R., PECK, J., PERSING, D.H. Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. **JAMA**, v.275: p.1657-60, 1996..

LEVY, S.A. AND DURAY, P.H. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. **Journal of Veterinary International Medicine**, v.2, p.138-144, 1988.

LIPSCHÜTZ, B. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der 'Erythema chronicum migrans'. **Archives of Dermatology and Syphilis**, v. 143, p.365-374, 1923.

LISSMAN, B.A., BOSLER, E.M., CAMAY, H., ORMISTON, B.G. & BENACH, J.L. Spirochete associated arthritis (Lyme Disease) in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.185, n 2, : p.219-220, 1984.

LITTMAN, M.P.; GOLDSTEIN, R.E.; LABATO, ,M.A.; LAPPIN, M.R.; MOORE, G.E. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Lyme Disease in Dogs: Diagnosis, Treatment, and Prevention. **J Vet Intern Med.**, v.20, p.422-434, 2006.

MADUREIRA, R.C.; CORRÊA, F.N.; CUNHA, D.S.; GUEDES JUNIOR, D.S.; FONSECA, A.H. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras.Ci. Vet.**, v.14, n. 1, p. 43-46, 2007.

MAGNARELLI LA, IJDO JW, VAN ANDEL AE, WU C, PADULA SJ, FIKRIG E. Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi* infections in horses from the Northeastern United States. **J Am Vet Med Assoc.**, v.217, p.1045-1050, 2000.

MAGNARELLI, L.; 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**, v. 79, p. 99-103, 2005.

Massarotti EM, Luger SW, Rahn DW, et al. Treatment of early Lyme disease. **Am J Med.**, v.92, p. 396-403, 1992.

NADELMAN RB, NOWAKOWSKI J, FORSETER G, GOLDBERG, NS., BITTKER,S., COOPER, D., AGUERO-ROSENFELD, M., WORMSER, G.P.. The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. **Am J Med.**, v.100, p.502-508, 1996.

NADELMAN RB, HOROWITZ HW, HSIEH T-C, JOSEPH M.W., AGUERO-ROSENFELD, M.E., SCHWARTZ, I., NOWAKOWSKI, J., VARDE, S., WORMSER, G.P. Simultaneous human ehrlichiosis and Lyme borreliosis. **N Engl J Med.**, ;v.337, p. 27-30, 1997.

NADELMAN, R.B.; WORMSER, G.P. Lyme borreliosis. **The Lancet** , v. 352, p.557-565, 1998.

NAKA, EM, COSTA, IP, ARÃO, CAP, SOARES, CO, YOSHINARY, NH. Pesquisa de Anticorpos Anti-Borrelia e Anti-Babesia em Soro de Crianças com Manifestações Clínicas e Epidemiologia Compatíveis com a Doença de Lyme-Simile no Estado de Mato Grosso do Sul.. **Rev Bras Reumatol**, v.48, n.2, p. 74-85, 2008.

O'CONNELL, S., GRANSTROM, M., GRAY, J.S. AND STANEK, G. Epidemiology of European Lyme borreliosis. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.287, p.229-240, 1998.

O'DWYER, L. H.; SOARES, S. O.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P.; FLAUSINO, W.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi* latu sensu associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, 2004.

ORLOSKI, K.A., HAYES, E.B., CAMPBELL, G.L.AND DENNIS, D.T. Surveillance for Lyme disease - United States, 1992-1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.1-11,2000.

OSCHMANN, P., W. DORNDORF, C. HORNIG, C. SCHAFER, H. J. WELLENSIEK, AND K. W. PFLUGHAUPT..Stages and syndromes of neuroborreliosis. **J. Neurol.**, v.245, p.262-272, 1998.

POSTIC D, MERIEN F, PEROLAT P, BARANTON G. Serological techniques - Indirect immunofluorescence. **In Biological Diagnosis Leptospirosis and Lyme Borreliosis, Laboratory Methods**, 2<sup>nd</sup> Edition - Pasteur Institute, Paris, France,2000. 248p.

RANDOLPH, S.E., GERN, L. & NUTTALL, P.A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-Borne pathogen transmission. **Parasitol. Today.**, v.12, n. 12, p.472-479, 1996.

RUSSEL, H., SAMPSON, J.S., SCHMID, G.P., WILKINSON, H.W. & PLIKAYTIS, B. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. **J. Infect. Dis.**, v. 149, p.465-70, 1984.

SALGADO, F.P. **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do centro de controle de zoonoses de Campo Grande estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.** 2006. 54p. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2006.

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.

STANEK, G.; REITER, M. The expanding Lyme Borrelia complex—clinical significance of genomic species?. **Clin Microbiol Infect.**, v.17, p. 487-493, 2011.

STEERE, A.C.; MALAWISTA, S.E.; SNYDMAN, D.R.; SHOPE, R.E.; ANDIMAN, W.A.; ROSS, M.R.; STEELE, F.M. Lyme arthritis an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n.1, p. 7-17 , 1977.

STRAUBINGER RK, STRAUBINGER AF, SUMMERS BA.. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. **Wien Klin Wochenschr**,v.110, p.874-881, 1998.

VAN DAM, A. P.; KUIPER, H.; VOS, K.; WIDJOJOKUSUMO, A.; de JONGH B. M.; SPAANJARD, L.; RANSELAAR, A. C.; KRAMER, M. D.; DANKERT, J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 708-717, 1993.

WILKINSON, H.W. Immunodiagnostic tests for Lyme Disease. **The Yale Journal of Biology and Medicine**,v.57,p. 567-572, 1984.

YOSHINARI NH, BARROS PJJ, CRUZ FCM, OYAFUSO LK, MENDONÇA M, BAGGIO D, YASUDA P, COSSERMELLI W . Clínica e sorologia da doença de Lyme no Brasil. **Rev Bras Reumatol.** , v.32, n.57, 1992.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Sao Paulo**, v.52, n. 2, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H. Doença de *Lyme-simile* no Brasil. **Revista da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, v.26, p.13, 2001.

YOSHINARI, N.H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V.L.N.; MARANGONI, R.G.; GIANCARLA GAUDITANO. Doença de Lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Rev Assoc Med Bras.**, v.56, n.3, p.363-369, 2010.

ZÖLLER, L., BURKARD, S., SCHÄFER, H. Validity of Western Immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.1, p. 174-182, 1991.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Determinar a soroprevalência de anticorpos contra *Borrelia* spp. em cães, equinos e humanos de assentamento rural da região norte do estado do Paraná.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de anticorpos contra *Borrelia* spp por meio das técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Western Blot (WB);
- Identificar as espécies de carrapatos presentes em cães e equídeos da área de estudo;
- Analisar as variáveis associadas ao risco de infecção por *Borrelia* spp. nos animais e seres humanos.

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### "PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS *ANTI-BORRELIA* SPP. EM HUMANOS, CÃES E EQUINOS DE ASSENTAMENTO RURAL DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL".

**RESUMO:** A borreliose de Lyme é uma doença causada por espécies do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.), transmitida por carrapatos, e que pode acometer diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem. No Brasil, o isolamento e a identificação da bactéria responsável pela doença ainda não foi realizada e os dados soroepidemiológicos ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-*Borrelia* spp em humanos, cães e equinos de assentamento rural utilizando as técnicas de sorodiagnóstico de imunofluorescência indireta (IFI) e Western Blot (WB). Aplicou-se um questionário epidemiológico a fim de verificar as variáveis associadas ao risco de exposição ao agente, e os carrapatos presentes em cães e equinos foram coletados e identificados. A soroprevalência em humanos, cães e equinos foi de 6,9%, 26,5% e 38,9%, respectivamente. Em cães foram identificados carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus* (n= 45), *A. ovale* (n=21) e *A. cajennense* (n=1), e em equinos *A. cajennense* (n=34). Sexo, idade e presença de carrapatos, não foram associados à presença de anticorpos para o agente ( $p < 0.05$ ). Com bases nos resultados obtidos pode-se concluir que *Borrelia burgdorferi sensu lato* deve estar circulando nessa região e possivelmente infectando humanos, cães e equinos. Médicos e veterinários devem estar atentos para incluir esta doença entre o diagnóstico diferencial de doenças transmitidas por carrapato.

**Palavras-chave:** Imunofluorescência indireta. Doença de Lyme. Sorologia. Carrapatos. Fatores de risco.

**ABSTRACT:** Lyme borreliosis is a disease caused by species from *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, transmitted by ticks and that can affect several species of domestic and wild animals, besides humans. In Brazil, the bacteria has not been isolated and identified yet and seroepidemiological data are still scarce. Thus the aim of this study was to evaluate the serosurvey of antibodies anti-*Borrelia* spp. in humans, dogs and horses from rural settlement using Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) and Western Blot (WB). In addition, epidemiological questionnaire was applied to determine possible risk factors and ticks from dogs and horses were collected and identified. The seroprevalence in humans, dogs and horses were 6.9%, 26.5% and 38.9%, respectively. The ticks identified in dogs was *Rhipicephalus sanguineus* (n = 45), *A. ovale* (n = 21) and *A. cajennense* (n = 1), and in horses *A. cajennense* (n = 34). Sex, age and presence of ticks, were not associated with the presence of antibodies to the agent ( $P < 0.05$ ). Based on these results we can conclude that the *Borrelia burgdorferi sensu lato* may be circulating in this region and possibly infecting humans, dogs and horses. Physicians and veterinarians should be alert to include this disease among the tick borne diseases differential diagnosis.

**Key-words:** Indirect immunofluorescence assay. Lyme disease. Serology. Ticks. Risk factors.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme é causada por bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato*, pertencentes ao gênero *Borrelia*, Família Spirochaetaceae, Ordem Spirochaetales (BARBOUR e HAYES, 1986). É uma enfermidade transmitida por carrapatos que pode acometer animais domésticos, silvestres e humanos e até o momento são conhecidas 18 genoespécies (STANEK e REITER, 2011).

Na América do Norte a *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.) é o principal agente etiológico enquanto na Europa as espécies patogênicas são *B. afzelli*, *B. garinii* e *B. burgdorferi* s.s. Os carrapatos transmissores da doença na Eurásia são *Ixodes ricinus* e *I. persulcatus* e na América do Norte os vetores são o *I. pacificus* e *I. scapularis* (NADELMAN e WORMSER, 1998). Os principais reservatórios das borrelias são os roedores (DONAHUE et al., 1987), os quais não apresentam sinais clínicos relevantes. As aves também possuem importância epidemiológica por disseminar a longas distâncias larvas e ninfas de carrapatos infectados (HUMAIR et al, 1998).

Os cães podem apresentar sinais clínicos como febre, anorexia e artrite, enquanto nos equinos pode haver febre baixa, laminite, inchaço das articulações e uveíte, no entanto estes animais são raramente sintomáticos (LEVY e MAGNARELLI, 1992; BURGESS et al., 1986). A principal sintomatologia em humanos é o eritema migratório cutâneo e posteriormente podem ocorrer problemas cardíacos, articulares, neurológicos e cutâneos (STEERE et al, 2003).

No Brasil já foram relatadas sorologias positivas em humanos, cães e equinos de diferentes regiões como São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso do Sul e Pará (YOSHINARI, 2001; ALVES et al, 2004; GONÇALVES, 2010; NAKA et al, 2008, GALO, 2006) porém o agente etiológico ainda não foi isolado e caracterizado. Acredita-se que os vetores da doença neste país sejam os carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Ixodes loricatus* (YOSHINARI et al, 2010; BARROS-BATTESTI et al, 1995) no entanto deve-se considerar a capacidade vetorial da espécie *Dermacentor nitens* pois recentemente foi detectado DNA de *B. burgdorferi* s.s. da estirpe B31 em carrapatos coletados de uma população de equinos da região norte do Paraná (GONÇALVES et al, in press).

O diagnóstico da doença pode ser realizado através de detecção direta do antígeno por PCR ou cultura, no entanto estes métodos não são confiáveis

devido à dificuldade em encontrar a espiroqueta nas amostras testadas. Nestes casos faz-se necessário o uso de técnicas sorológicas para dar suporte ao diagnóstico (KLEMPNER et al, 2001). A fim de melhorar a especificidade dos testes sorológicos IFI e ELISA recomenda-se duas etapas de testes, primeiro deve ser realizada triagem dos soros com IFI ou ELISA e os resultados positivos devem ser retestado através de WB (CDC, 1995).

No Brasil a sorodiagnóstico tem grande importância uma vez que o agente etiológico da doença ainda não foi identificado. Neste país a enfermidade apresenta características diferentes daquelas encontradas na América do Norte e Europa, assim sendo inúmeras denominações foram criadas para diferenciar a doença no Brasil como DL-símile, Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (SIRLS), Doença de Lyme-símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) (YOSHINARI et al, 2010).

Ao realizar sorologia em animais domésticos é possível verificar as prováveis áreas de risco para a doença de Lyme no homem (YOSHINARI et al, 1997). O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de anticorpos anti-*Borrelia* spp. em humanos, cães e equinos, associar variáveis ao risco de infecção e identificar os potenciais vetores da doença em assentamento rural na região norte do Paraná, Brasil.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Área de Estudo

Realizou-se um estudo transversal cujas amostras biológicas foram obtidas em um assentamento rural localizado na região norte do estado do Paraná, em área composta por vários lotes, pertencente ao município de

Alvorada do Sul (22°51'S/51°14'W). Neste local residem 60 famílias que ocupam uma área total de 1068.62 hectares.

A principal atividade realizada é a agricultura familiar os homens vivem próximos aos cães e equinos. Ao redor deste assentamento são encontradas áreas de mata ciliar próxima à margem de córregos onde existe a presença de animais silvestres.

### 3.2.2 Amostras

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UEL (n° 82/2006) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEL (n° 124/07). Todos os participantes do projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram obtidas amostras de sangue de todos os cães, equinos e humanos presentes no momento da coleta de novembro de 2006 a janeiro de 2007. A coleta em humanos foi realizada por uma enfermeira do sistema público de saúde. As amostras foram obtidas usando material estéril e identificadas antes do transporte ao laboratório onde foram centrifugadas, aliquotadas e armazenadas a -20 °C até o uso.

Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Protozoologia veterinária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Foram colhidas amostras de carrapatos dos cães e equinos infestados. Os ectoparasitas foram mantidos em álcool absoluto e a identificação das espécies de carrapatos foram feitas de acordo com Aragão & Fonseca, (1961) e Guimarães et al. (2001).

### 3.2.3 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Os soros de cães, equinos e humanos foram triados para anticorpos contra *B. burgdorferi* do complexo *sensu lato* pela IFI em lâminas com antígeno da estirpe de referência (B31) de *B. burgdorferi sensu stricto*. As lâminas contendo o antígeno foram gentilmente cedidas pelo Grupo de leptospirose e borreliose de Lyme da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL), Portugal.

Para cães e equinos testados na IFI o ponto de corte usado foi 1:64 enquanto para humanos foi usado 1:128 e as diluições dos conjugados de humano, cão e equino foram padronizadas em 750, 200 e 600 vezes respectivamente.

A solução tampão e o protocolo foram realizados de acordo com as descrições de literatura (Russel et al, 1984; Postic et al, 2000; Collares-Pereira et al, 2000). Foram usados anti-IgG de humano, cão e equino conjugados com isotocianato de fluoresceína e produzidos em coelhos (Sigma-Aldrich®).

As amostras positivas na diluição mínima foram testadas até a o título de 256. A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência Leica utilizando a objetiva de 40x.

#### 3.2.4 Western Blot (WB)

Os soros dos humanos reagentes na diluição 1:128 da reação de imunofluorescência foram posteriormente confirmados, por WB, mediante a utilização de "kits" comerciais. Foi utilizado o kit "*Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT IgG*" (Euroimmun®, Alemanha) que utiliza antígenos recombinantes altamente purificados de *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* e *B. garinii*. Este teste detecta os seguintes antígenos: VlsE Ba, Lipid Ba, p83 Ba de *B. afzelii*; VlsE Bb, Lipid Bb, p58, p21, p20, p19 e p18 de *B. burgdorferi* e VlsE Bg, p41 Bg, p39 Bg, OspC Bg de *B. garinii*. As etapas foram realizadas conforme as instruções do fabricante e as amostras consideradas positivas quando apresentavam 2 ou mais bandas reagentes.

#### 3.2.5 Ficha Epidemiológica

Para a obtenção das informações epidemiológicas cada morador respondeu a um questionário que incluía informações tais como: há quanto tempo mora em assentamento, atividade realizada, se visita área de mata ciliar, picada de carrapatos, época do ano que aparecem os carrapatos e proximidade da mata ciliar ao domicílio.

Os moradores também responderam questões a respeito dos cães e equinos como: idade e sexo do animal, se visita área de mata ciliar, presença de carrapatos, época do ano que verifica carrapato no animal, se faz controle de carrapatos e com qual produto e frequência.

#### 3.2.6 Análise Estatística

Para análise das variáveis utilizou-se o teste de significância estatística de Qui-quadrado corrigido de Yates ou teste exato de Fisher. A força de associação foi estimada pelo cálculo de "Odds ratio" (OR) com intervalo de confiança de 95%. Adotou-se o

nível de significância de 5%. Os cálculos foram realizados utilizando-se o pacote estatístico EPI6 (DEAN et al., 1994).

### 3.3 RESULTADOS

No total foram utilizados 87 soros de humanos, 83 de cães e 18 de equinos com soropositividades de 6,9%, 26,5% e 38,9%, respectivamente. Das 87 amostras de soro humano testadas cinco apresentaram títulos de anticorpos de 128 e um foi positivo em 256 (Tabela 1). Não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as variáveis sexo, idade e presença de carrapatos (Tabela 2). Nenhum humano com idade entre 13 e 20 anos foi positivo e em menores de 12 anos, uma amostra (16,7%) apresentou anticorpos contra *B. burgdorferi*.

Todos os soros positivos na IFI foram confirmados pelo WB. Os antígenos p41 (*B.garinii*) e p21 (*B. burgdorferi*) estiveram presentes em todas as reações positivas. Outras proteínas que reagiram no WB foram a p39 (*B.garinii*), p83 (*B.afzelli*), p19 e p58 (*B. burgdorferi*).

Das amostras de cães, 14 foram positivas no título de 64 e, oito animais na diluição de 1:128. Nenhuma amostra testada foi reagente na diluição 1:256. A análise estatística das variáveis não mostrou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao sexo, idade e presença de carrapatos.

Dos 18 equinos testados, dois foram positivos no título de 64, quatro foram reagentes na diluição de 1:128 e uma amostra foi positiva no título de 256 (Tabela 1). Não foi possível realizar análise estatística nestes animais devido ao baixo número testado, no entanto todos os animais positivos apresentaram carrapatos aderidos ao corpo.

No total foram coletados 101 carrapatos sendo 67 obtidos de cães e identificados como *Amblyomma ovale* (21), *A. cajennense* (1) e *Rhipicephalus sanguineus* (45). Nos equinos foram coletados 34 carrapatos sendo todos da espécie *A. cajennense*.

### 3.4 DISCUSSÃO

Devido às limitações existentes na detecção direta de *B. burgdorferi* s.l. as provas sorológicas representam a principal metodologia para apoiar o diagnóstico clínico (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). No presente estudo foram encontradas seis amostras de humanos com sorologia positiva na IFI e todas (6,9%) foram confirmados através do western blot, sendo identificadas proteínas específicas para *B. burgdorferi* s.s. e proteínas nativas de *B. afzelli* e *B. garinii*.

No Brasil, estudos sorológicos envolvendo seres humanos relatam prevalências que podem variar de acordo com a região e população estudada, chegando a 27% em pacientes com suspeita clínica e 3% em pessoas saudáveis (NAKA et al, 2008; YOSHINARI et al, 1997). Na Espanha, Vásques et al. (1997) ao estudarem 98 moradores de uma área rural e 104 cães, detectaram pela IFI 4,80% e 2,10% de positividade respectivamente. Estudo realizado em moradores assintomáticos de área rural em região norte do Paraná relatou 0,96% de positividade para anticorpos de classe IgM através de imunofluorescência indireta e western blot (GONÇALVES, 2010). Neste mesmo estudo foram encontradas como variáveis de risco a presença de carrapatos fixados ao corpo e visualização de carrapatos no domicílio. A menor prevalência neste trabalho pode ser devido ao fato do pico de IgM ocorrer apenas entre a terceira e sexta semana após o eritema crônico migratório, tendendo a cair ou mesmo desaparecer ao longo dos anos, enquanto os anticorpos de classe IgG permanecem altos por vários anos (STEERE et al, 1983).

A detecção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.s. através de ELISA e WB já foi relatada no Brasil, bem como anti-*B. garinii* (YOSHINARI et al, 2003; PIRANA et al, 2000), porém até o momento ainda não foi relatado sorologia positiva contra *B. afzelli* em humanos em nosso país. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para a variável idade assim como Orloski et al (1998). O contato prévio com carrapatos não foi fator de risco para a doença no presente estudo, assim como Lane et al (1992) que verificaram que tanto soronegativos como soropositivos haviam sido igualmente picados por carrapatos.

Os resultados positivos encontrados em 26,5% dos cães também estão dentro dos valores detectados no país que variam entre 9,7% e 15,58% em animais de área urbana a 48,25% dos cães em área rural (JOPPERT et al, 2001;

O'DWYER et al, 2004; ALVES et al, 2004). Nos Estados Unidos a porcentagem de cães soropositivos pode variar de 70% a 90% em regiões endêmicas (LITTMAN et al, 2006). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para a variável idade no presente trabalho. Resultado semelhante foi obtido em cães no Rio de Janeiro onde apesar da maior frequência em animais acima de cinco anos e com contato prévio com carrapato não foi verificada diferença estatística entre as variáveis estudadas (O' DWYER et al, 2004). Os resultados deste presente trabalho estão de acordo com Greene et al. (1988) que encontraram animais positivos na IFI em todas as faixas etárias, com maior prevalência em animais de um a cinco anos. Vale ressaltar que os resultados obtidos em cães devem ser confirmados com western blot (CDC), pois alguns estudos relatam reação cruzada de *Borrelia* com *Treponema* (MAGNARELLI et al, 1985; LINDENMAYER et al, 1990).

No presente estudo foram detectados 38,9% de equinos positivos, valor próximo ao encontrado na França onde 33% dos animais provenientes de diferentes regiões metropolitanas foram sororeagentes no teste comercial SNAP 4DX® (MAURIZI et al, 2010). Valores menores foram encontrados em estudos realizados no Pará e Rio de Janeiro onde se detectou positivities de 26,7% e 28,4% respectivamente (GALO et al, 2009; MADUREIRA et al, 2007). Em região endêmica para doença de Lyme nos Estados Unidos foi encontrada uma prevalência de 84% nos equinos testados pelo ELISA (MAGNARELLI et al, 2005).

O ponto de corte da IFI foi padronizado neste trabalho em  $>64$  para cães e equinos e  $>128$  em humanos sendo considerado abaixo do ponto de corte geralmente usado ( $>256$ ) fato que pode ser explicado devido às técnicas de IFI e ELISA apresentarem divergências nos resultados obtidos em diferentes laboratórios mesmo ao se utilizar amostras idênticas (BAKKEN et al, 1992).

Entre as principais razões ressalta-se a existência de diversas tecnologias para preparar os antígenos, executar os testes e definir os respectivos limiares de positividade. Além disso, devem-se usar preferencialmente estirpes locais a fim de aumentar a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico e na ausência desta, deve-se usar habitualmente *B. burgdorferi* s.s. como único antígeno, independentemente da área geográfica da população estudada (COLLARES-PEREIRA et al, 2000). Outro fator relevante a ser considerado é que no Brasil a pesquisa de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* de origem americana ou europeia

revela títulos baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue ou líquido cefalorraquidiano (YOSHINARI et al, 2010).

Em relação aos carrapatos obtidos neste estudo pode-se inferir que o *A. cajennense* é o principal responsável pelos resultados encontrados nos equinos por ter sido a única espécie identificada. Este fato corrobora com pesquisa realizada em região onde foram relatados casos humanos da doença, na qual o *A. cajennense* foi encontrado e acredita-se que seja a principal espécie transmissora da bactéria entre os animais domésticos e o homem (BARROS-BATTESTI et al, 1995). Diferente destes resultados, foi detectado DNA de *B. burgdorferi* em carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* que parasitavam equinos da região norte do Paraná (GONÇALVES et al, in press) Já em relação aos cães, as espécies encontradas foram *A. ovale*, *A. cajennense* e *R. sanguineus* assim como O'Dwyer et al (2004) que detectou as mesmas espécies nos animais de área rural, além de *A. aureolatum*.

Não foi encontrada associação positiva entre histórico de picada de carrapatos e presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* para cães, equinos e humanos, no entanto deve-se considerar que a presença de anticorpos indica exposição prévia ao agente e que o animal infectado pode não estar mais sendo parasitado pelo carrapato responsável pela transmissão.

As prevalências encontradas nas diferentes espécies estudadas indicam ampla distribuição do agente na área do assentamento rural e alerta para possíveis casos da doença, sendo importante a inclusão desta enfermidade nos diagnósticos diferenciais realizados por veterinários e, principalmente por seu caráter zoonótico. Além disso, ressalta-se a suspeita dos carrapatos de diferentes espécies do gênero *Amblyomma* como possíveis transmissores da Doença de Lyme no Brasil, principalmente em áreas rurais.

### 3.5 REFERENCIAS

AGUERO-ROSENFELD, M.E., WANG, G., SCHWARTZ, I., WORMSER, G.P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.3, p. 484-509, 2005.

ALVES, A.L.; MADUREIRA, R.C.; SILVA, R.A.; CORRÊA, F.N. BOTTEON, R.C.C.M. Freqüência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, n.4, p.203-206, . 2004

- BAKKEN LL, CASE KL, CALLISTER SM, BOURDEAU NJ, SCHELL RF. Performing of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. **Journal of the American Medical Association** 268: 891-895 (1992).
- BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. **Clinical Microbiology Reviews**. v.50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BARROS E BATTESTI DM, ARZUA M, YOSHINARI NH, SCHUMAKER TTS. Ectoparasitas de marsupiais capturados em area de risco para a doença de Lyme, município de Itapevi, São Paulo. **Rev. Patol. Trop**, 23, (supl):215, 1995.
- BINGNAN M.A.; CHRISTEN, B.; LEUNG, D.; VIGO-PELFREYT, C. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: Reactivity of Various Significant Antibodies against *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 370-376, 1992.
- 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., GILLETTE, D. AND PICKETT, J.P Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 186,1340-1342, 1986.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 44: 590-591, 1995.
- COLLARES-PEREIRA M, SANTOS SC, & VIEIRA ML. Valor diagnóstico da técnica de imunofluorescência indirecta utilizando diferentes preparações antigénicas no imunodiagnóstico da Borreliose de Lyme em Portugal. **Supl.Trab. Soc. Port. Dermatol. Venereol.** 58: 97-105, 2000.
- DEAN, AG, DEAN, JA, COULOMBIER, D, BRENDDEL, KA, SMITH, DC, BURTON, AH, DOCKER, SULIVAN, K, FAGAN, RF, ARNER, TG. *Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistic program for epidemiology on microcomputers.* Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1994.
- DONAHUE, J.G., PIESMAN, J. AND SPIELMAN, A. Reservoir competence of white-footed mice for lyme-disease spirochetes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 36, 92-96, 1987.
- GALO, K.R. **Freqüência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi* em eqüinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará.** 2006. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará. 48p.
- GONÇALVES, D.D. **Zoonoses da área rural do município de Jataizinho -Paraná- Brasil,** 2010. 102p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2010.
- GONÇALVES, D.D., CARREIRA, T., NUNES, M., BENITEZ, A., LOPES-MORI, F.M.R., VIDOTTO, O., FREITAS, J.C., COLLARES-PEREIRA, M., VIEIRA, M.L. First

record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, (in press).

GREENE, R.T., LEVINE JF, BREITSCHWERDT EB, BERKHOFF HA. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in North Carolina. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.473-476, 1988.

HUMAIR, P.F., POSTIC, D., WALLICH, R. AND GERN, L. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. **Zentralblatt für Bakteriologie** 287, 521-538, 1998.

JOPPERT, A.M.; HAGIWARA, M.K.; YOSHINARI, N.H. *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs from Cotia county, São paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v.43, n.5, p. 251-255, 2001.

KLEMPNER MS, SCHMID CH, HU L,. Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. **Am J Med.**, , 110:217-219, 2001.

LANE, R.S., MANWEILER, S.A., STUBBS, H.A., LENNETTE, E.T., MADIGAN, J.E., LAVOIE, P.E. Risk factors for Lyme Disease in a small rural community in northern California. **Am. J. Epidemiol.**, v.136, n.11, p.1358-1368, 1992.

LEVY SA, MAGNARELLI LA. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. **JAVMA** 1992; 200:344-347.

LINDENMAYER, J., WEBER, M., BRYANT, J., MARQUEZ, E., ONDERDONK, A. Comparison of Indirect Immunofluorescent-Antibody Assay, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Western Immunoblot for the Diagnosis of Lyme Disease in Dogs. **Journal of clinical microbiology**, vol. 28, No. 1, p. 92-96, 1990.

LITTMAN, M.P.; GOLDSTEIN, R.E.; LABATO, ,M.A.; LAPPIN, M.R.; MOORE, G.E. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Lyme Disease in Dogs: Diagnosis, Treatment, and Prevention. **J Vet Intern Med.**, v.20, p.422-434, 2006.

MADUREIRA, R.C.; CORRÊA, F.N.;; CUNHA, D.S.; GUEDES JUNIOR, D.S.; FONSECA, A.H. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras.Ci. Vet.**, v.14, n. 1, p. 43-46, 2007.

MAGNARELLI, L. A., J. F. ANDERSON, A. F. KAUFMANN, L. L. LIEBERMAN, AND G. D. WHITNEY. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 186, p. 955-959, 1985.

MAGNARELLI, L.; 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**, v. 79, p. 99-103, 2005.

MANTOVANI E, COSTA IP, GAUDITANO G, BONOLDI VL, HIGUCHI ML, YOSHINARI NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? **Braz J Med Biol Res.**, 40:443-56, 2007.

- MASSARD, C.A.; MASSARD, C.L.; RESENDE, H.E.B. Carrapatos de cães de áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6., 1981, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte : Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1981. p.201.
- MAURIZI, L; MARIÉ, JL; AOUN, O; COURTIN, C; GORSANI, S; CHAL, D; DAVOUST, B. Seroprevalence survey of equine lyme borreliosis in France and Sub-Saharan Africa. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n.5, p.535- 537, 2010.
- NADELMAN, R.B.; WORMSER, G.P. Lyme borreliosis. **The lancet** , v. 352, p.557-565, 1998.
- NAKA, EM, COSTA, IP, ARÃO, CAP, SOARES, CO, YOSHINARY, NH. Pesquisa de Anticorpos Anti-Borrelia e Anti-Babesia em Soro de Crianças com Manifestações Clínicas e Epidemiologia Compatíveis com a Doença de Lyme-Simile no Estado de Mato Grosso do Sul.**Rev Bras Reumatol**, 48 (2): 74-85, 2008.
- O'DWYER, L. H.; SOARES, S. O.; MASSARD, C. L.; SOUZA, J. C. P.; FLAUSINO, W.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi* latu sensu associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, 2004.
- ORLOSKI, K.A., CAMPBELL, C.A., BECKLEY, J.W., SCHRIEFER, M.E., SPITALNY, K.C., DENNIS, D.T. Emergency of Lyme Disease in Hunterdon County, New Jersey, 1993: A case-control study of risk factors and evaluation of reporting patterns. **Am. J. Epidemiol.**, v.147, n.4, p.391-397, 1993.
- STANEK, G.; REITER, M. The expanding Lyme Borrelia complex—clinical significance of genomic species?. **Clin Microbiol Infect.**, v.17, p. 487-493, 2011.
- STEERE AC, GRODZICKI RL, KORNBLATT AN, et al: The spirochetal etiology of Lyme disease. **New Eng J Med** 308:733-740, 1983.
- STEERE AC, DHAR A, HERNANDEZ J, et al.: Systemic symptoms without erythema migrans as the presenting picture of early Lyme disease. **Am J Med** , 114:58-62, 2003.
- PIRANA, S, YOSHINARI, NH, BONOLDI, V, SILVEIRA, JAM, BENTO, RF. Reatividade sorológica para antígenos de *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelli* e *Borrelia garinii* em portadores de paralisia facial periférica no Brasil. **Rev. bras. Reumatol.**, v.40, n.2, p. 55-60, 2000.
- VÁZQUEZ J. R. Seroprevalencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia conorii* en población humana y canina de la zona básica de salud de San Andrés del Rabanedo (León, España). **Revista Espanhola de Salud Publica**, v.71, p.173-180, 1997.
- YOSHINARY, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Sao Paulo**, v.52, n. 2, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI,, N. H.; ABRAÃO, M. G.; BONOLDI, V. L.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A., et al. Co-existence of antibodies to tickborne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 311-318, 2003.

YOSHINARI, N.H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V.L.N.; MARANGONI, R.G.; GIANCARLA GAUDITANO. Doença de Lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Rev Assoc Med Bras.**, v.56, n.3, p.363-369, 2010.

### 3.6 TABELAS

**Tabela 1** – Frequência de anticorpos anti- *B. burgdorferi* B31 (IFI - IgG) de acordo com o título, nas espécies humana, canina e equina provenientes de assentamento rural, Alvorada do Sul, 2006-2007.

<b>Espécie</b>	<b>População</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Título 64</b>	<b>Título128</b>	<b>Título 256</b>
<b>Canina</b>	83	22 (26,5)	14	8	0
<b>Equina</b>	18	7 (38,9)	2	4	1
<b>Humana</b>	87	6 (6,9)	-	5	1

**Tabela 2** – Prevalência de anticorpos anti- *Borrelia* spp. de acordo com cada variável estudada, em humanos e cães de assentamento rural do município de Alvorada do Sul Paraná, Brasil, 2006-2007.

Espécie	Positivos/Total (%)	p	OR	IC (95%)
Variável				
<b>Canina</b>				
Picada de carrapato				
Sim	19/65 (29,20)	0,225*	2,06	0,53-7,96
Não	3/18 (17,70)			
Idade				
<1	4/23 (17,40)	0,217*	2,15	0,62-7,45
1-5	15/48 (31,30)			
>5	3/12 (25,00)			
Sexo				
Macho	14/62 (22,60)	0,163	0,47	0,16-1,37
Fêmea	08/21 (38,10)			
<b>Humana</b>				
Picada de carrapato				
Sim	04/60 (6,70)	0,608*	0,89	0,15-5,19
Não	02/27 (7,40)			
Idade				
≤12	01/15 (6,70)	0,420*	-	-
13-20	00/20 (0,00)			
21-60	05/41 (12,20)			
≥61	00/11 (0,00)			
Gênero				
Masculino	03/43 (7,00)	0,650*	1,02	0,19-5,38
Feminino	03/44 (6,80)			

p = valor de p; OR = Odds ratio; IC = Intervalo de confiança, \* Teste exato de Fisher.

**Tabela 3** – Quantidade e espécies de carrapatos identificados em cães e equinos de assentamento rural de Alvorada do Sul, Paraná, Brasil, 2006-2007.

Espécie	Canina	Equina	Total
<i>A. cajennense</i>	1	34	35
<i>A. ovale</i>	21	0	21
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	45	0	45
Total	67	34	101

#### 4 CONCLUSÕES

- Os resultados das reações sorológicas indicam presença de *Borrelia* spp. em humanos, cães e equinos da área estudada;
- Os resultados da sorologia dos equinos e cães em Alvorada do Sul reforçam a hipótese destes animais serem utilizados como sentinelas para Doença de Lyme;
- Não foram encontradas variáveis de exposição associadas ao risco de infecção pelo agente causador da Doença de Lyme.

## **ANEXO**

## ANEXO 1



## COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 82/2006

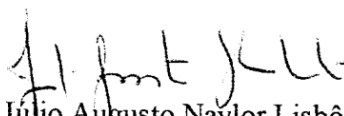
Londrina, 14 de novembro de 2006.

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 14 de novembro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Epidemiologia de patógenos das famílias Rickettsiaceae, Anaplasmataceae e Babesidae em carrapatos da família Ixodidae e avaliação soroepidemiológica em animais no Estado do Paraná**”, registrado no CEEA sob o nº 49/06, projeto de Tese junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do CCA, desenvolvido sob sua responsabilidade e orientação, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



Prof. Dr. Julio Augusto Naylor Lisboa  
Coordenador do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Odilon Vodotto  
Coordenador e Orientador do Projeto  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Centro de Ciências Agrárias

## ANEXO 2



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
 Registro CONEP 268

Parecer Nº 0124/07 CAAE Nº 0065.0.268.000-07 FOLHA DE ROSTO Nº 12999	Londrina, 06 de julho de 2007.
<b>PESQUISADOR: ODILO VIDOTTO</b>	
<p>Ilmo Sr,</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e complementares, avaliou e aprovou as respostas, datada de 02 de julho, ao parecer 124/07 de 10 de maio de 2007 referente ao projeto:</p> <p><b>"EPIDEMIOLOGIA DE PATÓGENOS DAS FAMÍLIAS RICKETTISIACEAE, ANAPLASMATACEAE E BABESIDAE EM CARAPATOS DA FAMÍLIA IXODIDAE E AVALIAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA EM ANIMAIS NO ESTADO DO PARANÁ".</b></p> <p>Segue em anexo o parecer consubstanciado e análise das respostas.</p> <p>Informamos que o Sr. deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, bem como comunicar, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da mesma.</p>	
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b>	
<p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center">   <b>Prof. Dra. Nilza Maria Diniz</b>          Coordenadora          Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL       </p>	

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE 1****PROJETO ASSENTAMENTO**

Laboratório de Protozoologia - DMVP/CCA - UEL

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

Propriedade n°: \_\_\_\_\_ Data: / /

Entrevistado Nome: \_\_\_\_\_

Função: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

- 1 Há quanto tempo mora no assentamento atual? \_\_\_\_\_
- 2 Já morou fora do Assentamento? ( ) sim, ( ) não. Onde? \_\_\_\_\_
- 3 Qual o tipo de trabalho realizado no assentamento? ( ) doméstico, ( ) com lavoura, ( ) com animais ( ) outros: \_\_\_\_\_
- 4 Visita área de mata/mata ciliar? ( ) sim, ( ) não.
- 5 Frequência: ( ) todos os dias, ( ) 1x semana, ( ) 1x mês, ( ) 1x ano
- 6 Presença de carrapato? ( ) sim, ( ) não.
- 7 Época do ano que aparecem:  
( ) primavera ( ) Verão ( ) Outono ( ) Inverno ( ) Ano todo
- 8 Onde pegou carrapato? ( ) Mata ( ) Pasto ( ) Outros  
Presença de bosques/reserva/mata ciliar próximo à residência? ( ) até 100m,  
( ) >100 a 500m.

**APÊNDICE 2****PROJETO ASSENTAMENTO**

Laboratório de Protozoologia - DMVP/CCA - UEL

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

Propriedade n°: \_\_\_\_\_ Data: / /

Entrevistado Nome: \_\_\_\_\_

Função: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

**Questionário individual de Cães**

1. Nome e n° do canino	
2. Idade e sexo do animal	
3. Há quanto tempo o cão mora no local?	
4. O cão tem pelo longo ou curto?	
5. O cão visita área de mata/mata ciliar?	
6. O cão tem o hábito de caçar?	
7. O cão acompanha nas atividades diárias como lida com o gado, lavoura ou pescaria?	
12. Presença de carrapato?	
13. Época que observa os carrapatos nos animais	
14. Controle de carrapatos? Qual produto?	
15. Frequência do controle de carrapatos	

**APÊNDICE 3**  
**Questionário individual de Equinos**

1. Nome e nº do equino	
2. Idade e Sexo do Animal	
3. Há quanto tempo o equino mora no local?	
4. O Equino vai área de mata/mata ciliar?	
12. Presença de Carrapato?	
13. Época em que observa os carrapatos nos animais	
14. Controle de carrapatos? Qual produto?	
15. Frequência do controle de carrapatos	

## APÊNDICE 4

### Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

- Diluir as amostras de soro em PBS (solução fosfato tamponada) nas diluições de 1:64, 1:128, 1:256.
- Adicionar 10-20 ul das diluições em cada poço das lâminas;
- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C;
- Lavar as lâminas uma vez com tampão de lavagem, em cuba de lavagem, durante 5 minutos;
- Deixar as lâminas secarem à temperatura ambiente;
- Diluir o conjugado, na proporção obtida com a prévia titulação do mesmo, em PBS;
- Adicionar 15 ul da diluição do conjugado em todos os poços das lâminas;
- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C, ao abrigo de qualquer fonte de luz;
- Lavar as lâminas uma vez com tampão de lavagem em cuba de lavagem, por 5 minutos. Manter as cubas cobertas com papel alumínio para proteger de qualquer fonte de luz;
- Adicionar de três a quatro gotas de glicerina tamponada sobre cada lâmina, cobrindo-a com lamínula. Manter sobre o abrigo da luz até o momento da leitura;  
Realizar leitura das lâminas em microscópio de imunofluorescência em objetiva de 40X.

**APÊNDICE 5**  
PBS

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> = 1,02g

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (2.H<sub>2</sub>O) = 0,39g

Nacl = 8,5g

pH = 7,2

Faz 1 litro

Autoclavar a 1210C por 15 minutos.