

Ocorrência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro

Occurrence of homologs antibodies against *Borrelia burgdorferi* in equines of properties from the municipalities of Três Rios and Vassouras, of Rio de Janeiro state

Renata Cunha Madureira,* Fabíola do Nascimento Corrêa,* Nathalie Costa da Cunha,* Daniel da Silva Guedes Junior,* Aivaldo Henrique da Fonseca**

Resumo

Borrelia burgdorferi é uma espiroqueta transmitida por carrapatos, de ampla distribuição geográfica, que acomete o homem e animais domésticos, tendo os animais silvestres como reservatórios. O presente estudo teve como objetivo relatar a ocorrência de eqüinos soropositivos para *B. burgdorferi*, por meio de inquérito soroepidemiológico utilizando o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto. Procedeu-se a análise sorológica de 747 soros de eqüinos, onde 431 pertenciam ao município de Três Rios e 316 ao de Vassouras, ambos do estado do Rio de Janeiro. Um total de 212 (28,4%) animais foram positivos ao ensaio. O resultado observado foi similar aos descritos para animais no Brasil e Estados Unidos da América, tendo sido verificado que os animais apresentaram anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi stricto sensu*, corroborando com a ocorrência de *Borrelia* sp. em eqüinos no estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: soroepidemiologia, borreliose de Lyme, ELISA indireto.

Abstract

Lyme Borreliosis is a widely distributed spirochetosis hosted by wild animals, which transmitted to domestic animals as well as man by ticks. The present study aims to observe the occurrence level of positive tested equines to *Borrelia burgdorferi*, on two municipalities of Rio de Janeiro State, Brazil, by seroepidemiologic inquiry using the indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. A serologic analysis was performed on 747 equines serum specimens, which 431 were from Três Rios and 316 were from Vassouras municipality. For this test, 212 (28.4%) animals were positive. The results observed were similar to those described for animals in Brazil and United States of America, confirming that the animals of the studied municipalities showed anti *Borrelia burgdorferi* homologs antibodies.

Keywords: seroepidemiology, Lyme borreliosis, enzyme immunoassay.

Introdução

Borreliose é uma enfermidade produzida por hemoparasitos do gênero *Borrelia* e acomete diversas espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem (Hoogstraal, 1979). Ocorre em todos os continentes de acordo com a espécie, pode determinar patologias severas levando inclusive ao óbito (Steere, 1989). A transmissão de *Borrelia* spp. ocorre através da picada de carrapatos ou piolhos, os quais inoculam saliva infectada nos hospedeiros vertebrados contaminando-os, e pode ocorrer também transmissão de forma passiva através do líquido coxal (Burgdorfer et al., 1989).

Borreliose de Lyme é uma espiroquetose de caráter sistêmico e tem como agentes descritos *Borrelia burgdorferi lato sensu*

ocorrendo nos Estados Unidos da América do Norte, Europa e Ásia. Esses agentes e suas variantes antigênicas são responsáveis pelos vários espectros de apresentação clínica da borreliose de Lyme (Silva e Fikrig, 1997). Na América do Sul, Austrália e África o agente etiológico da borreliose de Lyme ainda não foi isolado (Yoshinari et al., 1997; 2003). Considerando as diferenças etiológicas, aspectos clínicos e laboratoriais, quando comparado com a borreliose de Lyme norte-americana ou européia, a infecção no Brasil deve ser referida como borreliose de Lyme *símile* (Yoshinari et al., 2003), sendo os primeiros casos diagnosticados em 1992, no município de Itapevi, SP (Barros, 2000; Yoshinari et al., 1992). *Borrelia burgdorferi lato sensu* é transmitido pela picada de carrapatos ixodídeos ou por contato direto entre roedores

* Doutorandos do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Rodovia Br 465, Km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000 – E-mail renatacm@ufrj.br.

** Prof. Titular, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária – UFRRJ, E-mail aivaldo@ufrj.br.

(Burgess et al., 1986). Nos carrapatos este agente é transmitido transovariana e tansstadialmente (Burgdorfer et al., 1989).

A borreliose de Lyme acomete roedores silvestres, cervídeos, bovinos, eqüinos, cães, gatos e seres humanos, constituindo-se em zoonose emergente. Esta é uma enfermidade de difícil diagnóstico e o ensaio imunoenzimático (ELISA) representa uma ferramenta importante para o estudo epidemiológico (Magnarelli et al., 1995). No Brasil, estudos soropidemiológicos da borreliose de Lyme foram realizados em humanos (Yoshinari et al., 1993), em cães (Soares et al. 1999), em bovinos (Fonseca et al., 1996), e em eqüinos (Salles et al., 2002). A soroprevalência em todos esses estudos apresentaram valores próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte. A doença clínica em eqüinos é de difícil diagnóstico por ser confundida com problemas articulares comuns nesses animais, embora a maioria dos animais soropositivos permaneçam assintomáticos (Carter, et al., 1994; Manion et al., 2001). A borreliose de Lyme em eqüinos só está bem definida nos EUA, onde foram observados em áreas endêmicas animais com dermatite nos membros, edema transitório das patas e poliartrites, sugerindo importantes implicações para a indústria eqüina (Cohen et al., 1988).

Outro espiroquetídeo comum em eqüinos de regiões tropicais e subtropicais é *Borrelia theileri*, tendo sua transmissão relacionada com carrapatos dos gêneros *Boophilus* e *Rhipicephalus* (Smith, 1998). No Brasil, apenas a espécie de carrapato *B. microplus* foi caracterizada como vetor potencial para este agente (Martins et al., 1996).

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

O presente trabalho teve como objetivo relatar a ocorrência de animais soropositivos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, no estado do Rio de Janeiro para *Borrelia burgdorferi* por inquérito soropidemiológico utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto.

Material e métodos

Coletaram-se 747 amostras de soros de eqüinos, procedentes dos municípios de Três Rios e Vassouras do estado do Rio de Janeiro. As amostras de soro foram colhidas assepticamente, através de venopunção jugular, de animais jovens e adultos, aparentemente sadios, de diferentes raças, entre os meses de março a junho de 2003.

No município de Três Rios foram visitadas duas propriedades com um total de 431 soros coletados. Tais propriedades tinham como principal atividade a criação de eqüinos, com 100% de animais da raça Mangalarga. Estes viviam em piquetes em contato constante com carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*. No município

de Vassouras, teve-se acesso a 13 propriedades distintas, algumas delas com criação bovina, totalizando 316 soros coletados, dos quais 212 pertenciam a animais da raça Mangalarga, 46 animais pertencentes a outras raças (Puro-Sangue Inglês (19), Pônei (18), Brasileiro de Hipismo (7) e Campolina (1) e 58 animais mestiços. Na maioria das propriedades os eqüinos viviam soltos nos pastos durante o dia e estabulados à noite, também em constante contato com carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. nitens*, além da espécie *Boophilus microplus*. Os soros foram alíquotados em tubos tipo "ependorf" e armazenados à -20°C até o momento da análise sorológica.

Foi utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto padronizado por Salles et al. (2002) com modificações. O antígeno utilizado para realização do ELISA indireto foi o extrato total sonicado da cepa G39/40 de *B. burgdorferi stricto sensu* gentilmente cedida pelo Dr. Natalino Hajime Yoshinari do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia/USP e como controles negativos utilizaram-se oito soros de potros Puro-Sangue Inglês, oriundos do Jôquei Clube do Rio de Janeiro, com idades variando de 12 a 24 meses. Estes animais encontravam-se clinicamente sadios e eram mantidos em baias individuais, tendo recebido alimentação balanceada e volumoso, sem histórico de contato com carrapatos.

O teste sorológico foi realizado em microplaca de poliestireno com 96 orifícios (M-4043, Sigma Chemical), a qual foi sensibilizada com antígeno na concentração de 20 mg/mL. Os soros controles negativos, bem como os soros testes foram diluídos a 1:400 e o soro controle positivo foi diluído em série, a partir de 1:400 até 1:51600. Foi utilizado o conjugado IgG de coelho anti-IgG eqüina ligado à fosfatase alcalina (Sigma Chemical) na diluição de 1:1000 e substrato par-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) (Sigma Chemical) diluído em tampão glicina pH 10,5 na concentração de 1mg/mL. A linha de corte do ensaio foi estabelecida pela média aritmética dos valores de densidade óptica dos soros controles negativos mais três vezes o desvio-padrão destes.

Resultados e discussão

A análise soropidemiológica das 747 amostras de soros revelou que 21 (28,4%) animais foram reagentes positivos ao ELISA indireto, com anticorpos da classe IgG anti-*B. burgdorferi* dos quais 78,8% apresentaram título de 1:400, 17,0% título de 1:800, 3,3% título de 1:1600 e 0,9% título de 1:3200 e 535 (71,6%) amostras foram negativas (Tabela 1). Os municípios de Três Rios e Vassouras apresentaram respectivamente 13,7% e 14,7% de animais soropositivos.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os valores observados em outros trabalhos de inquéritos sorológicos realizados no Brasil em animais domésticos como bovinos (Ishikawa, 1996), cães (Soares et al., 1999) e eqüinos (Salles et al., 2002). Esse resultado revela percentual semelhante às de áreas endêmicas para borreliose de Lyme nos EUA, onde foi encontrado prevalência de eqüinos soropositivos entre 10 e 60% (Cohen et al., 1988; Bernard et al., 1990).

A estreita associação filogenética entre *B. theileri* e outras espiroquetas do gênero *Borrelia* responsáveis pelas

Tabela 1: Ocorrência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equínos (n=747) de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro, determinada pelo ELISA indireto

Título	Positivos (n)	Frequência		Negativos (n)
		Relativa	Absoluta	
1:400	167	78,8%	22,4%	-
1:800	36	17,0%	4,8%	-
1:1600	7	3,3%	0,9%	-
1:3200	2	0,9%	0,3%	-
Total positivos	212	100% (212/212)	28,4% (212/747)	-
Total negativos	-	-	71,6% (535/747)	535

manifestações clínicas da borreliose de Lyme em todo mundo (Rich et al., 2001) sugerem a possibilidade de reações cruzadas entre esses agentes. Rogers et al. (1999) observaram reação cruzada entre *B. burgdorferi*, *B. coriaceae* e *B. theileri* a partir da técnica de imunofluorescência (IF), ao analisarem soros de bovinos. O mesmo resultado não foi encontrado ao utilizarem o ensaio ELISA indireto com antígenos de extrato de célula total. Porém alertaram para o potencial de falsos positivos principalmente em áreas onde esses agentes coexistem. Ishikawa (2000) levanta esta hipótese, já que encontrou alta prevalência de animais positivos em trabalho feito com bovinos nas mesorregiões Norte Fluminense e Médio Paraíba do estado do Rio de Janeiro, observando respectivamente 69,7% e 75,4% de animais soropositivos para *B. burgdorferi*. Os dados obtidos por este autor sugeriram que as altas porcentagens de animais positivos devem-se ao alto índice de infestação dos animais por carrapatos *B. microplus*. Estudo realizado com equínos mantidos sob diferentes tipos de sistemas de controle de carrapatos, no estado do Rio de Janeiro, mostrou claramente a relação entre produção de anticorpos anti-*B. burgdorferi* e histórico de contato com carrapatos nesses

animais. Dos animais com alta infestação de carrapatos, 42,9% apresentaram-se reagentes ao ELISA indireto, em contraste com 0,9% de soropositivos em animais que viviam sob controle rigoroso de ectoparasitas (Salles et al., 2002). Nesse mesmo estudo, houve a confirmação da positividade dos soros pela formação de bandas no *western blotting*, onde soro dos animais provenientes de áreas com alto índice de infestação por carrapatos apresentaram formação de bandas compatíveis com os resultados observados no teste ELISA. A análise dos resultados permitiu também considerar a existência de similaridade entre a cepa padrão G39/40 de *B. burgdorferi* e o espiroquetídeo de equínos no Brasil.

Em seres humanos, existem trabalhos realizados no Brasil relatando a presença de indivíduos com clínica compatível com a borreliose de Lyme e sorologicamente positivos para IgM e IgG contra *B. burgdorferi* (Yoshinari et al., 1993; 2003). Yoshinari et al. (1997) compararam o espiroquetídeo existente em nosso meio com as espécies europeias *B. garinii* e *B. afzelii* e a norte-americana *B. burgdorferi*, sugerindo que a espécie existente no Brasil é distinta das três anteriormente citadas. Em estudo posterior, os autores denominaram a enfermidade observada no Brasil de borreliose de Lyme *simile* (Yoshinari et al., 2000). Assim, é válido ressaltar a importância do diagnóstico sorológico, o qual deve ser interpretado em conjunto com dados epidemiológicos e clínicos.

Conclusões

- 1 Os equínos dos municípios estudados possuem anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi*.
- 2 A ocorrência de soropositivos corrobora o relato da existência de *Borrelia* sp. em equínos no estado do Rio de Janeiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Referências

BARROS P. J. L. *Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e reação em cadeia de polimerase*. 2000. 163 f. Tese (Doutorado)—Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BERNARD, W. V.; COHEN, D.; BOSLER, E.; ZAMOS, D. Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses referred to a mid-Atlantic Veterinary Teaching Hospital. *JAVMA*, v. 196, n. 8, p. 1255-1258, 1990.

BURGESS, E. C.; ADMUNDSON, T. E.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. A.; EDELMAN, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp. With *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* v. 35, n. 2, p. 355-359, 1986.

BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*, in *Ixodes* ticks. *Rev. Infect. Dis.*, v. 11, n. 6, p. S1442-S1449, 1989.

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. *An. New York Acad. Sci.*, v. 539, p. 244-257, 1988.

FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. *Rev. Univ. Rural, Série Ciência da Vida*, v. 18, n. 1/2, p. 85-89, 1996.

HOOGSTRAAL, H. Ticks and spirochetes. *Acta Trop.* v. 36, p. 133-136, 1979.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2001. Capturado em nov. 2003. Online. Disponível na Internet: <http://www.ibge.gov.br>.

- ISHIKAWA, M. M. *Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico*. 1996. 51f. Tese (Mestrado)- Curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.
- ISHIKAWA, M. M. *Perfil da produção de anticorpos anti-Borrelia burgdorferi em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural*. 2000. 80 f. Tese (Doutorado)- Curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C. Analyses of mammalian sera in enzyme-linked immunosorbent assays with different strain of *Borrelia burgdorferi* sensu latu. *J. Wild Dis.*, v. 31, n. 2, p. 159-165, 1995.
- MARTINS, J. R.; CERESÉR, V. H.; CORRÊA, B. L.; SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: Observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Cien. Rural, Santa Maria*, v. 26, n. 3, p. 447-450, 1996.
- RICH, S. M.; ARMSTRONG, P. M.; SMITH, R. D.; TELFORD III, S. R. Lone star tick-infecting Borreliae are most closely related to the agent of bovine Borreliose. *J. Clin. Microbiol.*, 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. *Am. J. Vet. Res.*, 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 Vet.*, v. 127, p. 46-49, 2002.
- SILVA, A. M. & FIRKRING, E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. *Parasitol. Today*, v. 13, n. 7, p. 267-270, 1997.
- SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: A review. *J. Spirochetes and Tick-Borne Dis.*, 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. et al. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 21, n. 3, p. 111-114, 1999.
- STEERE A. C. Lyme disease. *New Engl. J. Med.*, v. 31, p. 586-597, 1989.
- YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; YASSUDA, P.; BAGGIO, D.; STEERE, A. C.; COSSERMELLE, W. Estudo epidemiológico da doença de lyme no Brasil. *Rev. Hosp. Clínicas Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 47, n. 2, p. 71-75, 1992.
- 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. *Rev. Esp. Reumatol.*, v. 20, p. 6, 1993.
- 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. *Rev. Hosp. Clínicas Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 52, n. 2, p. 111-117, 1997.
- YOSHINARI, N. H.; SOARES, C. O. FONSECA, A. H.; SCOFIELD, A.; BATTESTI, D. B.; MADRUGA, C. R. *Serology for Babesia bovis in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases*. ANNAIS DO XXI INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, v. 2, n. 1, 2000. p. 820.
- YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L. N.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, state of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.