
ESTUDO SOROLÓGICO COMPARATIVO DA BORRELIOSSE DE LYME, BRUCELOSE E LEPTOSPIROSE EM BOVINOS*

Marcia Mayumi Ishikawa,¹ Adivaldo Henrique da Fonseca,² Cleber Oliveira Soares¹ e Natalino Hajime Yoshinari³

RESUMO

Estudou-se a frequência de soros positivos de bovinos para borreliose de Lyme, brucelose e leptospirose, utilizando-se ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* lato sensu, soroaaglutinação rápida para *Brucella abortus* e microaaglutinação para *Leptospira interrogans*. Foram analisadas 376 amostras provenientes de animais de diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro, 100 amostras do município de Bananal (São Paulo) e 37 amostras procedentes do município de Alegre (Espírito Santo). Não houve relação entre os resultados positivos para *B. burgdorferi* pelo teste ELISA, resultados positivos para *L. interrogans* pelo teste de soroaaglutinação microscópica e resultados positivos para *B. abortus* pelo teste de soroaaglutinação rápida. A maior percentagem de animais soropositivos para *B. burgdorferi* foi observada no grupo proveniente do município de Alegre (Espírito Santo), onde também foram identificados casos humanos com suspeita clínica e sorologia positiva (ELISA e Western blotting). A percentagem de soropositivos caracteriza as regiões estudadas como suspeita para presença do agente da borreliose de Lyme.

UNITERMOS: Bovinos. Borreliose. Brucelose. Leptospirose.

* Parte da Tese de Mestrado da primeira autora, apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

1 Aluna do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ

2 Prof. Titular de Doenças Parasitárias - Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária. UFRRJ e bolsista do CNPq.

3 Prof. Associado da FMUSP e bolsista do CNPq

Endereço para correspondência: Cx. Postal 74548 CEP 23851-970 Seropédica RJ. e-mail adivaldo@ufrj.br

Recebido para publicação em 18/03/99. Revisto em 12/11/99. Aceito em 27/12/99.

Vol. 28 (2): 195-201. jul-dez. 1999

INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme é uma espiroquetose causada pela *Borrelia burgdorferi lato sensu* e transmitida por carrapatos ixodídeos, principalmente do gênero *Ixodes* (3,4,10). A doença foi inicialmente descrita nos Estados Unidos e posteriormente na Europa, Ásia, Austrália e América do Sul.

As características clínicas são variáveis de acordo com a região geográfica (7), e a borreliose de Lyme *lato sensu* constitui-se em zoonose emergente que acomete animais domésticos, silvestres e o homem. Nos bovinos foram relatados sintomas de claudicação, edema de membros, perda de peso crônica, hipofagia, febre transitória, dificuldade de levantar-se e aborto (11). Elevados títulos de anticorpos contra *B. burgdorferi* têm sido descritos em animais assintomáticos (5,13). A cultura e a visualização de borrelias em microscopia ótica constituem procedimentos pouco produtivos no diagnóstico da borreliose de Lyme, e os testes sorológicos tornam-se fundamentais para confirmação diagnóstica (12, 13).

Dentre os agentes etiológicos que acometem frequentemente os bovinos, e com potencial para produzir falsos resultados sorológicos, destacam-se *Brucella abortus* e *Leptospira interrogans* com suas variantes sorológicas. Muitos sintomas da brucelose, leptospirose e borreliose bovina se confundem, dificultando o diagnóstico clínico, sendo necessário o auxílio de ensaios sorológicos. O presente trabalho teve como objetivo a pesquisa comparativa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi lato sensu*, anti-*Brucella abortus* e antivariantes sorológicas de *Leptospira interrogans* em bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 376 amostras de soro sanguíneo de bovinos, dos municípios de Itaguaí, Paracambi, Barra do Pirai, Pirai (Estado do Rio de Janeiro), 100 amostras do município de Bananal (Estado de São Paulo) e 37 amostras provenientes do município de Alegre (Estado do Espírito Santo). Todos os animais eram adultos e com aptidão para produção de leite. Os locais foram escolhidos devido à ocorrência de casos clínicos em seres humanos no Estado de São Paulo (14) e Estado do Rio de Janeiro (1 e 8), à ocorrência de altas infestações por carrapatos e em especial, no município de Alegre, pela ocorrência de casos sugestivos de borreliose de Lyme em bovinos e casos clínicos compatíveis à borreliose de Lyme com comprovação sorológica em pacientes humanos (ELISA e Western blotting) (14).

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular utilizando-se agulhas descartáveis 18G, tubos de vidro (10 ml) estéreis e seringas descartáveis (20 ml). Após a colheita, as amostras foram centrifugadas para obtenção de soro, que foi estocado a -20°C em tubo tipo Eppendorf até a realização dos ensaios sorológicos.

O teste ELISA indireto utilizado foi baseado na técnica padronizada por Ishikawa et al. (9) quando se utilizou antígeno sonicado total de *B. burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana na diluição de 15µg/ml em tampão carbonato pH 9,6, soros controles positivos, negativos e soros testes diluídos a 1:400, e conjugado (soro de coelho anti-IgG de bovino, marcado com fosfatase alcalina - SIGMA Chemical) na diluição de 1:1.000.

Realizou-se teste de soroprecipitação rápida em placa, com antígeno inativado de *B. abortus* amostra 1119 B em suspensão celular, conforme padrão internacional recomendado pelo Ministério da Agricultura.

Utilizaram-se para avaliação sorológica contra *L. interrogans* 24 variantes sorológicas (*Australlis australis*, *A. bratis lava*, *Autumnalis autumnalis*, *A. butembo*, *Ballum castellanis*, *Batavia batavie*, *Canicola canicola*, *Celledoni whicombi*, *Cynapteri cynapteri*, *Grippatyphosa grippatyphosa*, *Hebdomadis hebdomadis*, *Icterohaemorrhagiae copenhageni*, *I. icterohaemorrhagiae IV*, *Javanica javanica*, *Panama panama*, *Pomona pomona*, *Pyrogenes pyrogenes*, *Sejroe hardjo*, *S. wolfi*, *Shemani shemani*, *Tarassovi tarassovi*, *Andamana andamana*, *Seramanga patoc*, *Djasiman sentat*). Os soros classificados como suspeitos no teste de microaglutinação foram submetidos à prova de titulação através da microtécnica(6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 513 amostras analisadas pelo teste ELISA indireto, 16 (13,12%) apresentaram anticorpos da classe IgG contra *B. burgdorferi lato sensu* com título 1:800, 292 (56,92%) com título de 1:400 e 205 (39,96%) foram negativos. Os resultados obtidos em cada Estado encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Frequências sorológicas para *Borrelia burgdorferi lato sensu* dos bovinos provenientes dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo.

Estado	Animais examinados (n)	Título 1/400	Título 1/800	Negativos
Rio de Janeiro	376	224 (59,6%)	16 (4,2%)	136 (36,2%)
São Paulo	100	36 (36,0%)	0 (0,0%)	64 (64,0%)
Espírito Santo	37	32 (86,5%)	0 (0,0%)	5 (13,5%)

A maior percentagem de animais soropositivos para borreliose de Lyme foi observada no grupo proveniente do município de Alegre, Estado do Espírito Santo. Neste município foram observados animais apresentando sinais clínicos compatíveis à borreliose descrita na literatura(13), ou um com claudicação e outro com aumento de volume da articulação radiocarpiana (Figura 1). Ambos os animais eram provenientes da mesma propriedade e com sorologia positiva no teste ELISA. Na mesma região foram identificados

casos humanos com suspeita clínica e sorologia positiva (ELISA e Western blotting) (14), reforçando a possibilidade de se tratar de uma área de risco para existência da borreliose de Lyme. Os bovinos testados apresentavam infestação por carrapatos da espécie *Boophilus microplus*, *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*. No entanto, não foram obtidos dados específicos para análise da ixodofauna da região.



Figura 1. Articulação radiocarpiana de bezerro com três meses de idade, soropositivo, procedente do município de Alegre (ES), apresentando aumento do volume articular do membro anterior esquerdo.

Analisando os resultados obtidos com a sorologia para borreliose de Lyme e brucelose, observou-se que não houve interferência entre os resultados positivos destas sorologias (Tabela 2). Na amostragem de animais provenientes dos Estados de São Paulo e Espírito Santo não foi obtido nenhum animal soropositivo para brucelose, dificultando sua interpretação. No entanto, no grupo proveniente do Rio de Janeiro obtiveram-se 14 (4,75%) animais soropositivos, sendo que 10 foram positivos em ambos os ensaios e 4 foram negativos para borreliose de Lyme e positivo para brucelose. A alta percentagem de animais soropositivos para borreliose de Lyme e negativos para brucelose sugere que não houve a interferência da soropositividade de brucelose nos resultados soropositivos para borreliose de Lyme (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados comparativos entre animais soropositivos para *Borrelia burgdorferi lato sensu*, *Leptospira interrogans* e *Brucella abortus* provenientes dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo.

Origem Sorologia	Rio de Janeiro			São Paulo			Espírito Santo		
	n	Positivos	%	n	Positivos	%	n	Positivos	%
<i>Borrelia</i> sp	376	240	63,83	100	36	36,00	37	32	86,49
<i>Brucella</i> sp	295	4	1,35	19	0	0,00	29	0	0,00
Bor + Bru	295	10	3,39	19	0	0,00	29	0	0,00
<i>Leptospira</i> sp	62	6*	9,68	20	4**	20,00	37	0	0,00
Bor + Lep	62	42*	67,74	20	1**	5,00	37	10***	27,28

n = número de animais examinados. n₁ = número de animais positivos

* sorotipos (n₁=48): hardjo (45), wolfi (41), australis (5), sentat (3), pyrogenes (2), pomona (2), autumnalis (1) e bratislava (1).

** sorotipos (n₁=5): hardjo (3), wolfi (3), bratislava (1), pyrogenes (1), patoc (1) e sentat (1).

*** Sorotipos (n₁=10): hardjo (10), wolfi (6), hebdomadis (1), pyrogenes (1)

Com relação aos resultados dos ensaios sorológicos para borreliose de Lyme e leptospirose, observou-se que não houve interferência entre os resultados positivos (Tabela 2), como observado por Wells et al. (13).

No grupo de animais provenientes do Estado do Espírito Santo, todos os positivos para leptospirose foram também positivos para borreliose de Lyme (Tabela 2). No entanto, na amostragem proveniente de São Paulo, apenas um foi positivo em ambas as sorologias e quatro foram positivos para leptospirose e negativos para borreliose de Lyme (Tabela 2).

No grupo proveniente do Rio de Janeiro foi constatado elevada percentagem de animais soropositivos para ambos os testes e baixa percentagem de animais soropositivos para leptospirose e negativos para borreliose de Lyme. Contudo, seis animais do Rio de Janeiro e três de São Paulo apresentaram altos títulos de anticorpos para leptospirose e não reagiram no teste contra antígeno de *B. burgdorferi*, observando-se novamente que não houve interferência dos soropositivos para leptospirose nos resultados sorológicos para borreliose de Lyme (Tabela 2).

As variantes sorológicas que reagiram nos testes para leptospirose estão listados na Tabela 2. Constatou-se que os sorotipos hardjo e wolfi foram os de maior ocorrência nos três Estados estudados. Em estudo sorológico, Wells et al. (13) verificaram que os sorotipos canicola, pomona e hardjo apresentaram maior frequência, não sendo testado o sorotipo wolfi.

A frequência sorológica para *B. burgdorferi* em bovinos obtida neste estudo, os casos humanos diagnosticados no Brasil (1,8e14) e o encontro de espiroquetas em marsupiais (2) sugerem a possibilidade da existência do agente da borreliose de Lyme nas áreas estudadas.

SUMMARY

Comparative serological study of Lyme Borreliosis, Brucellosis and Leptospirosis in cattle

The frequency of positive Lyme Borreliosis bovine sera was studied by means of the Indirect Immunoenzymatic Assay (ELISA), which was used in the detection of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies. Rapid Serum Agglutination and Microscopic Agglutination were utilized for the detection of *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans*, respectively. A total of 376 samples from different municipalities of Rio de Janeiro State, 100 samples from Bananal, São Paulo State and 37 samples from Alegre, Espírito Santo State, were analyzed. There was not relationship among positive results of ELISA for *B. burgdorferi* and positive results of Microscopic Agglutination for *L. interrogans* and positive results of Rapid Serum Agglutination for *B. abortus*. The group located in Espírito Santo presented the highest positive percentage for *B. burgdorferi*, where also suspected clinical human cases with positive serology (ELISA and Western Blotting) were observed. Due to the number of seropositive animals characterized, this studied region is considered suspect for the presence of the agent of Lyme Borreliosis.

KEYWORDS: Bovine. Borreliosis. Brucellosis. Leptospirosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azulay RD, Abulafia L, Sodre CS, Azulay RA, Azulay MM. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol*, 30: 569-571, 1991.
2. Barboza WG, Almeida Junior DE, Marques da Silva LA, Fonseca AH. Detecção de *Borrelia* sp em Gambás (*Didelphis aurita*) imunossuprimidos com ciclofosfamida. *Rev Bras Med Vet* 20:241-243, 1998.
3. Bosler EM, Coleman JL, Benach JL, Massey DA, Hanrahan JP, Burgdorfer W, Barbour AG. Natural distribution of the *Ixodes dammini* spirochaete. *Science*, 220: 321-322, 1983.
4. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF. Lyme Disease: a tick-borne spirochaetosis? *Science*, 216: 1319, 1982.
5. Burgess EC, Gendron-Fitzpatrick A, Wright WO. Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow. *JAVMA*, 191: 1468-1470, 1987.
6. Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 25:976-980, 1973.
7. Dressler F, Ackerman R, Steere AC. Antibody responses to the three genomic of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis. *Infec Dis*, 169: 313-318, 1994.
8. Filgueira AL, Troppe BM, Gontijo Filho PP. Doença de Lyme. *Rio Dermatológico*, 2:4-5, 1989.
9. Ishikawa MM, Fonseca AH, Soares CO, Massard CL, Yoshinari NH. Padronização de Ensaio Imunoenzimático ELISA indireto para Pesquisa de Anticorpos da Classe IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. *Rev Bras Med Vet*, 19:166-168, 1997.
10. Johnson RC, Schimid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov. etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34:496, 1984.
11. Parker JL, White KW. Lyme Borreliosis in cattle and horses: a review. *Cornell Veterinarian*, 82: 253-274, 1992.
12. Schresta M, Grodzicki RL, Steere AC. Diagnosing early Lyme Disease. *Am J Med*, 78: 235-240, 1985.
13. Wells SJ, Trent AM, Robinson RA, Knutson KS, Bey RF. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. *Am J Vet Res*, 54: 398-405, 1993.
14. Yoshinari NH, Barros PJJ, Bonoldi VLN, Ishikawa MM, Battesti DB, Fonseca AH, Schumaker TS. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*, 52: 11-117, 1997.