

## Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro<sup>1</sup>

Alessandra de Lacerda Alves<sup>2</sup>, Renata Cunha Madureira<sup>3</sup>, Rosângela Antunes da Silva<sup>4</sup>, Fabíola do Nascimento Corrêa<sup>5\*</sup> e Rita C.C. Machado Botteon<sup>5</sup>

**ABSTRACT.**- Alves A.L., Madureira R.C., Silva R.A., Corrêa FN. & Botteon R.C.C.M. 2004. [Frequency of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs from the metropolitan region of Rio de Janeiro.] Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24 (4):203-206. Depto Medicina e Cirurgia Veterinária, Inst. Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ 23851-970, Brazil. E-mail: fabiolanc@ig.com.br

Lyme disease is a worldwide zoonosis caused by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetae) and transmitted through ticks (Ixodidae). Many species of domestic and wild animals are affected. The dog is an important reservoir in the domiciliary environment. The disease affects the joints and causes alterations in other organs. Blood serum samples from 143 dogs, living in the counties of Seropédica, Itaguaí and Rio de Janeiro, were analyzed with the indirect ELISA test, to search for antibodies against *Borrelia burgdorferi* *latu sensu*. Average positive results were 48.25%, 41.9% in Seropédica, 4.9% in Itaguaí and 1.4% in Rio de Janeiro. The titres varied from 1:400 to 1:6400. The prevalence was lower ( $p < 0.05$ ) in dogs up to one year of age than in older dogs, with significant difference. Between males and females was no statistical difference with positives titres. The result of this survey should draw attention to the occurrence of *Borrelia* sp in the area studied, considering the importance of Lyme disease as an emerging zoonosis.

INDEX TERMS: *Borrelia burgdorferi*, Spirochaetae, dogs, enzyme immunoassay, serology.

**RESUMO.**- Borreliose de Lyme é uma zoonose cosmopolita causada pelo espiroquetídeo *Borrelia burgdorferi* e tem como vetores carrapatos ixodídeos. Esta espiroqueta acomete diversas espécies de animais domésticos e silvestres, sendo o cão um importante reservatório no ambiente domiciliar. O quadro clínico da doença envolve as articulações, além de causar alterações em vários sistemas do organismo. Foram analisados 143 soros de cães provenientes dos municípios de Seropédica, Itaguaí e do

Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, quanto à ocorrência de anticorpos contra *B. burgdorferi* *latu sensu*, através de teste de ELISA indireto. Foram encontrados 48,25% de animais soropositivos, sendo 41,9% em Seropédica, 4,9% em Itaguaí e 1,4% no Rio de Janeiro. Os títulos variaram de 1:400 a 1:6400. Cães com menos de um ano apresentaram menor índice de títulos positivos, sendo a diferença significativa. Entre machos e fêmeas, não houve diferença significativa entre os títulos positivos. O resultado encontrado deve servir como alerta para ocorrência de *Borrelia* sp nas regiões estudadas, considerando a importância da borreliose de Lyme como zoonose emergente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Borrelia burgdorferi*, Spirochaetae, cães, ensaio imunoenzimático, sorologia.

### INTRODUÇÃO

Borreliose de Lyme é uma zoonose cosmopolita causada pelo espiroquetídeo *Borrelia burgdorferi* e tem como vetores carrapatos ixodídeos. No Brasil, essa enfermidade foi descrita em seres humanos (Azulay et al. 1991, Yoshinari et al. 1993a,b, Yoshinari et al. 1997), sendo denominada de borreliose de Lyme-like por Yoshinari et al. (2000). Em animais, estudos sorológicos foram realizados em bovinos (Ishikawa 1996, 2000), cães (Soares et al.

<sup>1</sup> Recebido em 28 de maio de 2004.

Aceito para publicação em 8 de julho de 2004.

<sup>2</sup> Discente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

<sup>3</sup> Discente de Doutorado em Ciências Veterinárias da UFRRJ. E-mail: renatacm@ufrj.br

<sup>4</sup> Discente do Curso de Medicina Veterinária da UFRRJ. Bolsista de Iniciação Científica da FAPERJ. E-mail: rhoas@ig.com.br

<sup>5</sup> Discente do Curso de Medicina Veterinária da UFRRJ. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq. \*Autor para correspondência. E-mail: fabiolanc@ig.com.br

<sup>6</sup> Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Inst. Veterinária, UFRRJ, 23851-970 Seropédica, RJ.

1999, Joppert et al. 2001), e equinos (Salles et al. 2002, Madureira 2004) onde foram observadas reações positivas para esse agente.

O primeiro relato de borreliose em cães foi descrito em área endêmica para doença de Lyme nos EUA, onde esses animais apresentavam-se com febre e dor nos quatro membros. Os cães são importantes reservatórios de borrelia, podendo ser isoladas espiroquetas de animais clinicamente sadios (Burgess 1986, Merino et al. 2000). Carrapatos do gênero *Ixodes* são os principais vetores do espiroquetideo (Soares et al. 2000), porém a transmissão desse agente também pode ocorrer por *Dermacentor variabilis* ou *Amblyomma americanum* (Mather et al. 1994).

Segundo Coyle (1993), no homem ocorre uma condição inflamatória multissêmica não contagiosa, sendo o sítio da picada do carrapato infectado porta de entrada para o agente etiológico. Os primeiros sintomas podem aparecer dias ou semanas após a exposição do agente e consistem num eritema migratório, linfadenite localizada, glomerulonefrite por deposição de imunocomplexo, mal estar, fadiga, cefaléia, rigidez na nuca, dores musculares e articulares, podendo evoluir para artrites e patologias nervosas e circulatórias mais graves, se a doença não for diagnosticada logo no início.

A doença em animais domésticos manifesta-se por síndrome músculo-esquelética, invariável quanto à idade, raça ou sexo, caracterizada por comprometimento de diversas articulações e quadro de artrite progressiva (Lissman et al. 1984, Levy & Dreesen 1992, Straubinger et al. 1998, Straubinger 2000). Pode ocorrer eritema no local da picada do carrapato (Appel 1990), além de febre, letargia, anorexia e emagrecimento progressivo (Magnarelli et al. 1995). Outros sintomas como meningite, uveíte, glomerulonefrite e cardiopatias têm sido relatadas (Parker & White 1992, Duray 1993, Mackenna et al. 1995).

O diagnóstico da borreliose de Lyme pode ser conclusivo levando em consideração vários fatores, destacando-se a sintomatologia clínica, epidemiologia e sorologia positiva (Steere 1989). O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto tem sido o método de diagnóstico mais empregado e reconhecido para identificar anticorpos anti-*Borrelia* sp com segurança (Gordillo et al. 1999). O conhecimento da soroprevalência de *B. burgdorferi latu sensu* em cães pode constituir-se em importante indicador da dispersão do agente etiológico (Hoskins 1991) em nosso meio.

O objetivo deste trabalho foi verificar a freqüência de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em cães sem sintomas clínicos de borreliose, procedentes da região do "Grande Rio de Janeiro", RJ.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nos anos de 2000 a 2002 foram obtidas 143 amostras de soro de cães, machos e fêmeas de diferentes idades, domiciliados nos municípios de Seropédica (117) e Itaguaí (20), Estado do Rio de Janeiro, e Bonsucesso, Bairro do Município do Rio de Janeiro (6). As amostras avaliadas consistiram de uma amostragem não probabilística, sendo alguns animais sem evidência clínica de enfermidades, outros altamente parasitados por pulgas e/ou carrapatos e enfermos (sintomas de outras doenças). As amostras foram obtidas por punção da veia radial ou safena em seringas de 5 ml e posteriormente transferidas para frascos sem anticoagulante.

O sangue foi centrifugado e os soros obtidos foram acondicionados em frascos tipo *Eppendorf* e mantidos a -20°C até o momento da análise sorológica.

As amostras de soros coletadas foram analisadas através do ELISA indireto para detecção de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi latu sensu*, conforme técnica padronizada por Soares et al. (1999), no laboratório de Doenças Parasitárias do Convênio "Projeto Sanidade Animal Embrapa/UFRRJ".

Foram utilizados oito soros controles negativos de animais provenientes de um canil particular e um soro controle positivo de animal inoculado experimentalmente. A linha de corte (*cut-off*) foi estabelecida com um grau de confiança de 99,99%, segundo a média mais três vezes o desvio padrão dos valores da densidade óptica dos controles negativos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise soro-epidemiológica das 143 amostras de soros revelou que 69 animais foram reagentes positivos (48,25%) ao ELISA indireto com titulações entre 1:400 e 1:6400 (Quadro 1). Foram encontrados 41,9% (60/143) de animais positivos provenientes de Seropédica, 4,9% (7/143) de Itaguaí e 1,4% (2/143) de Bonsucesso.

Em relação ao total de amostras obtidas em cada município, observou-se que em Seropédica ocorreram proporcionalmente mais animais positivos (51,28%). Esse fato pode ser justificado em parte pelo tipo de criação com acesso freqüente à rua, contato com animais errantes e possibilidade de maiores e mais freqüentes infestações por carrapatos. Constatou-se ainda que a maioria dos cães procedentes de Seropédica tem contato com animais de outras espécies, sobretudo equinos e bovinos cria-

**Quadro 1. Freqüência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em cães (n=143) domiciliados nos municípios de Seropédica, Itaguaí e Rio de Janeiro (Bairro de Bonsucesso), determinado pelo ELISA indireto, entre os anos de 2000-2002**

Título	Prevalência	Positivos (n)		Negativos
		Relativa	Absoluta	
1:400	44	63,77%	30,77%	-
1:800	17	24,63%	11,88%	-
1:1600	4	5,80%	2,80%	-
1:3200	2	2,90%	1,40%	-
1:6400	2	2,90%	1,40%	-
Total positivos	69	100,00% (69/69)	48,25% (69/143)	-
Total negativos	-	-	51,75%	74

**Quadro 2. Freqüência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em cães (n=143) domiciliados nos municípios de Seropédica, Itaguaí e Rio de Janeiro (Bairro de Bonsucesso), determinado pelo ELISA indireto, entre 2000 e 2002, em relação à observação de parasitismo por carrapato no momento da coleta de sangue**

	Parasitados	Não Parasitados	Não observado	Total
Positivos	20,28% (29)	23,08% (33)	4,90% (7)	48,25% (69)
Negativos	25,87% (37)	20,28% (29)	5,59% (8)	51,75% (74)
Total	46,15% (66)	43,36% (62)	10,49% (15)	100% (143)

**Quadro 3. Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* quanto ao sexo em cães (n=143), domiciliados nos municípios de Seropédica, Itaguaí e Rio de Janeiro (Bairro de Bonsucesso), determinado pelo ELISA indireto, entre os anos de 2000 a 2002**

	Fêmeas	Machos	Total
Positivos	27,85% (39)	20,71% (29)	49,28% (69)
Negativos	25% (35)	26,42% (37)	52,85% (74)
Total	52,85% (74)	47,14% (66)	100% (140)

**Quadro 4. Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* por faixa etária em cães (n=143), domiciliados nos municípios de Seropédica, Itaguaí e Rio de Janeiro (Bairro de Bonsucesso), determinado pelo ELISA indireto, entre os anos de 2000 e 2002**

	< 1 ano	= 1 ano < 3 anos	= 3 anos < 5 anos	= 5 anos	Não informado	Total
Positivos	1,40% (2)	9,79% (14)	9,09% (13)	12,58% (18)	15,39% (22)	48,25% (69)
Negativos	13,99% (20)	13,99% (20)	7,69% (11)	6,29% (9)	9,79% (14)	51,75% (74)
Total	15,39% (22)	23,78% (34)	16,78% (24)	18,87% (27)	25,18% (36)	100% (143)

dos em terrenos baldios e animais silvestres. Torrence et al. (1990), ao relacionar a prevalência de borreliose canina com o grau de exposição destes animais aos vetores, sugere que cães com acesso à rua estão mais expostos à população de carrapatos pela falta de controle parasitário e têm maiores chances de desenvolver a enfermidade. No presente estudo todos os cães provenientes de Seropédica tinham acesso à rua, diferentemente daqueles provenientes de Bonsucesso e Itaguaí e os títulos confirmam a possibilidade de maior exposição ao agente, contudo sem diferença significativa (Quadro 2).

A frequência de anticorpos (48,25%) encontrada no presente estudo foi superior à observada por Soares et al. (1999), que ao analisarem soros de cães da Baixada Fluminense por meio do ensaio ELISA indireto, encontraram 20% (30/150) dos animais positivos. Joppert et al. (2001), utilizando a mesma técnica, observaram 9,7% (23/237) dos cães provenientes de Cotia, SP reagentes ao ensaio. Ambos os trabalhos não observaram reações cruzadas significativas entre anticorpos de *B. burgdorferi* e variantes sorológicas de *Leptospira* sp. Os dados foram igualmente superiores aos relatados por Torrence et al. (1990) em Virgínia nos EUA; Ulmer et al. (1999) na França, Greene et al. (1988a), na Carolina do Norte, EUA, e Rojo Vazquez (1997) em Leon na Espanha.

O resultado observado no presente estudo corrobora com os encontrados em áreas endêmicas para borreliose de Lyme nos EUA, onde foram relatados sorologias para cães, variando de 40 a 89% de animais soropositivos (Burgess 1986, Cohen et al. 1990, Magnarelli et al. 1985, 1987, 1990, Levy & Magnarelli 1992), assim como por Azuma et al. (1994) que encontraram 76,2% de cães positivos em Hokkaido, Japão.

Em relação ao sexo, observou-se a maior frequência de títulos positivos entre as fêmeas (Quadro 3), contudo estatística-

mente a diferença entre machos e fêmeas não foi significativa. Três animais não entraram nesta análise porque o preenchimento de suas fichas estava incompleto, não contendo essa informação.

Quanto à idade (Quadro 4), entre os cães mais jovens a frequência de positivos foi baixa e obteve-se os menores títulos. Cerca de 9% dos cães com menos de um ano apresentaram títulos de 1:400. Por outro lado, títulos mais elevados foram registrados em cães com cinco anos ou mais, em semelhança com os dados obtidos por Greene et al. (1988b), utilizando Imunofluorescência Indireta (IFI). Magnarelli et al. (1985) encontraram maior número de casos positivos, na IFI, em cães

com mais de quatro anos. Análise estatística da variável idade revelou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre cães com menos de um ano em relação às outras faixas etárias. Em parte, isto se deve provavelmente ao fato de os animais jovens estarem há menos tempo expostos ao agente, devido a baixos níveis de anticorpos colostrais ou por não terem desenvolvido a imunidade ativa com níveis de anticorpos suficientes para serem detectados no teste ELISA (Merino et al. 2000). No entanto, Joppert et al. (2001) não observaram diferença significativa em relação à faixa etária em cães no Estado de São Paulo.

## CONCLUSÕES

O grande número de animais positivos deve servir como alerta para ocorrência de *Borrelia* sp nas regiões estudadas, sugerindo atenção aos Médicos Veterinários e agentes de saúde pública, considerando a importância da borreliose de Lyme como zoonose emergente.

## REFERÊNCIAS

- Appel M.J.G., Allan S., Jacobson R.H., Lauderdale T.L., Chang Y. F., Shin S.J., Thomford, J. W., Todhunter R.J. & Summers B.A. 1993. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J. Infect. Dis.* 167:651-664.
- Azulay R.D., Abulafia L.A., Sodré C.T., Azulay D.R. & Azulay M. M. 1991. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Dermatol.* 30:569-571.
- Azuma Y.J., R.H., Lauderdale T.L., Chang Y.F., Shin S.J., Thomford, J. W., Todhunter R. J. & Summers B.A. 1994. Canine disease: clinical and serological evolutions in 21 dogs in Japan. *Vet. Rec.*134:369-372.
- Burgess E.C. 1986. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Laboratory Anim. Sci.* 36(3):288-290.
- Coyle P.K. 1993. Lyme Disease. Mosby Year Book, St. Louis, Missouri. 235p.

- Cohen N.D. & Cohen D. 1990. Borreliosis in horses: a comparative review. *Compendium* 12(10):1449-1458.
- Duray P.H. 1993. Histopathology of Human Borreliosis, p.49-58. In: Coyle P.K. (ed.) *Lyme Disease*. Mosby Year Book, St. Louis.
- Gordillo G., Torres J., Solorzano F., Cedillo-Rivera R., Taipa-Conyer & Muñoz O. 1999. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. *Archs Med. Res.* 30:64-68.
- Greene R.T., Levine J.F., Breitschwerdt E. B. & Berkhoff H.A. 1988a. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in North Carolina. *Am. J. Vet. Res.* 49(4):473-476.
- Greene R.T., Walker R.L., Nicholson W.L., Heidner H.W., Levine J.F., Burgess E.C., Wyand M., Breitschwerdt E.B. & Berkhoff H.A. 1988b. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimental and naturally exposed dogs. *J. Clinical Microbiol.* 26(4):648-653.
- Hoskins J.D. 1991. Tick-borne zoonoses: Lyme disease, Ehrlichiosis and Rocky Mountain spotted fever. *Small Animal* 6:236-243.
- Ishikawa M. M. 1996. Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na Região Sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária), Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 51p.
- Ishikawa M.M. 2000. Perfil da produção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária), Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 80p.
- Joppert A.M., Hagiwara M.K. & Yoshinari N.H. 2001. Antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. *Revta Inst. Med. Tropical, São Paulo*, 43(5):251-255.
- Levy S. A. & Dreesen D.W. 1992. Lyme borreliosis in dogs. *Canine Practice* 17:5-14.
- Levy S.A. & Magnarelli L.A. 1992. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200(3):344-347.
- Levy S.A. & Magnarelli L.A. 1992. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200(3):344-347.
- Lissman, B.A., Jacobson R.H., Lauderdale T.L., Chang Y.F., Shin S.J., Thomford J. W., Todhunter R.J. & Summers B.A. 1984. Spirochete-associated arthritis (Lyme Disease) in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185(2):219-220.
- Madureira R.C. 2004. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária), Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 46p.
- Magnarelli L.A., Jacobson R.H., Lauderdale T.L., Chang Y.F., Shin S.J., Thomford J.W., Todhunter R.J. & Summers B.A. 1985. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:955-959.
- Magnarelli L.A., Anderson J.F., Schreier A.B. & Ficke C.M. 1987. Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1089-1094.
- Magnarelli L.A., Anderson, J.F. & Schreier A.B. 1990. Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196(7):1064-1068.
- Magnarelli L.A., Anderson J.F. & Johnson R.C. 1995. Analyses of mammalian sera in enzyme-linked immunosorbent assays with different strain of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J. Wild Dis.* 31(2):159-165.
- Mather T.N., Fish D. & Coughlin R.T. 1994. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205(2):186-188.
- Mckenna P. 1995. Canine Lyme disease in Belgium. *Vet. Rec.* 136:224-247.
- Merino F.J., Serrano J.L., Saz J.V., Nebreda T., Gegundez, M. & Beltran M. 2000. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria. *European J. Epidemiol.* 16(2):97-100.
- Parker J.L. & White K.W. 1992. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet.* 82:253-274.
- Rojo V.J. 1997. Soroprevalencia de la infección por *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia* en población humana y canina de la Zona Básica de Salud de San Andrés del Rabanedo (Leon, España). *Revta Española Salud Publica* 71(2):173-180.
- Salles R.S., Fonseca A.H., Scofield A., Madureira R.C. & Yoshinari N.H. 2002. Sorologia para *Borrelia burgdorferi latu sensu* em equinos no estado do Rio de Janeiro. *Hora Vet., Porto Alegre*, 127:46-49.
- Soares C.O., Fonseca A.H., Ishikawa M.M., Manera G.B., Scofield A. & Yoshinari N.H. 1999a. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Revta Bras. Med. Vet.* 21(3):111-114.
- Soares C.O., Scofield A., Manera G.B., Ishikawa M.M., Fonseca A.H. & Yoshinari N.H. 1999b. Ensaio imunoenzimático indireto para detecção de anticorpos homólogos da classe IgG contra *Borrelia burgdorferi latu sensu* em cães. *Revta Bras. Med. Vet.* 21(4): 153-158.
- Soares C.O., Ishikawa M.M., Fonseca A.H. & Yoshinari N.H. 2000. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesq. Vet. Bras.* 20(1):1-19,
- Steere, A. C. 1989. Lyme disease. *Engl. J. Medicine* 31:586-597.
- Straubinger R.K., Straubinger A.F., Summers B.A., Jacobson R.H. & Erb H.N. 1998. Clinical manifestations, pathogenesis and effect of antibiotic treatment of Lyme borreliosis in dogs. *Wiener Klinische Wchschr.* 110:874-81.
- Straubinger R.K. 2000. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. *J. Clinical Microbiol.* 38:2191-2199.
- Torrence M. E., Suzanne R.J., Jay F.L., William L.N. & Kevin D.P. 1990. Serosurvey of shelter dogs in Virginia for antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *Preventive Vet. Med.* 10(1-2):41-46.
- Ulmer P., Fertè H., Mercier A. & Richard S. 1999. Borreliose de Lyme: enquête épidémiologique réalisée dans un chenil du nord-est de la France. *Revue Française Laboratoire* 310:49-56.
- Yoshinari N.H., Oyafuso L.K., Monteiro F.G.V., Barros P.J.L., Cruz F.C.M., Ferreira, L. G. E., Bonasser F., Baggio D. & Cossermelli W. 1993a. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. *Revta Hospital das Clinicas Fac. Med. São Paulo* 48(4):170-174.
- Yoshinari N.H., Steere A.C., Barros P.J.L., Cruz F.M.C., Mendonça M., Oyafuso L.K., Levy L. & Cossermelli W. 1993b. Lyme disease in Brasil: report of five cases. *Revta Española Reumatol.* 20:6.
- 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. 1997. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Revta Hospital das Clinicas Fac. Med. São Paulo* 52(2):111-117.
- Yoshinari N.H., Soares C.O., Fonseca A.H., Scofield A., Battesti D.B. & Madruga C.R. 2000. Serology for *Babesia bovis* in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases. *Annals XXI Int. Congr. Entomology*, vol. 2, no.1, p.820-820.