

UFRRJ
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**CULTIVO E OBTENÇÃO DE CISTOS DE *Borrelia burgdorferi* E
B. garinii (Spirochaetales: Spirochaetaceae) EM DIFERENTES
MEIOS E SOLUÇÕES**

CÁTIA MARQUES DA COSTA

2003



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

**CULTIVO E OBTENÇÃO DE CISTOS DE *Borrelia burgdorferi* E
B. garinii (Spirochaetales: Spirochaetaceae) EM DIFERENTES
MEIOS E SOLUÇÕES**

CÁTIA MARQUES DA COSTA

Sob orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação da professora
Ângela de Oliveira

Dissertação submetida como requisito
Parcial para obtenção do grau de
Magister Scientie em Medicina
Veterinária , área de concentração
Em Medicina Veterinária Preventiva

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA-
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA**

CÁTIA MARQUES DA COSTA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Magister Scientie, em medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

APROVADA EM 25/ 02/ 2003

Adivaldo Henrique da Fonseca, PhD UFRRJ

Roberto de Souza Salles, PhD UFF

Angela de Oliveira, PhD UFRRJ

"Toda vitória tem mais sabor quando
há mais luta para conseguir;
Alvo à frente, disputa e dor
Ganha quem resistir."

Sérgio Leoto

*A DEUS, de forma muito especial e sincera, pois
sem Ele nada poderia ter sido feito. Por dar-me força e
coragem para prosseguir, instruir-me no caminho a seguir.
Por ter sido foi o mais presente de todos os amigos.
À minha mãe, que me ensinou a não desistir
Ao meu pai, que me ensinou a seguir em frente.
Aos meus irmãos Ricardo e Helio, por serem pessoas tão especiais.*

"Tudo quanto te vier à mão para fazer,
faze-o conforme as tuas forças."
Eclesiastes 9: 10

"E tudo quanto fizerdes,
fazei-o de todo o coração..."
Colossenses 3: 23

Quando achar que para ser feliz e alcançar
seus objetivos tem que ir para outro lugar,
pense na árvore imponente.

Ela cresce e prospera usando simplesmente
o que tem disponível à sua volta.

...a riqueza e a satisfação não vêm de se conseguir
mais, e sim do uso pleno daquilo que se tem
ao alcance.

BIOGRAFIA

Cátia Marques da Costa, filha de Léa Marques da Costa e Eurides Joaquim da Costa, é natural do município de São Gonçalo, no estado do Rio de Janeiro, onde nasceu ao 7º. dia do mês de maio de 1971. Durante o ensino fundamental estudou no Educandário Sete de Setembro e no Educandário Cecília Meirelles, instituição na qual concluiu o ensino médio.

O interesse por doenças, pelo envolvimento dos animais no processo de transmissão de patógenos e principalmente pelas medidas de prevenção a esses tipos de doenças, a levou a optar pelo Curso de Medicina Veterinária. Em 1991 passou a fazer parte do quadro de alunos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas e instituições e em 1997 obteve o título de Médica Veterinária.

Foi bolsista de Apoio Técnico do Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento tecnológico de setembro de 1999 a março de 2000 em projeto envolvendo *Borrelia* spp, animais domésticos e silvestres. No ano de 2000 foi aprovada para o cargo de Professora Substituta de Bacteriologia Veterinária e Microbiologia Geral do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro exercendo essa função até o 2º semestre de 2001. Nesse mesmo ano ingressou no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária desta mesma Instituição apresentando sua dissertação em fevereiro de 2003. Em dezembro de 2002 foi aprovada para o Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal, para ingresso em março de 2003.

ÍNDICE

1	Introdução	1
2	Revisão de literatura	3
2.1	Contextualização: Borreliose de Lyme no Brasil	3
2.2	Características gerais do gênero <i>Borrelia</i>	5
2.2.1	Proteínas de superfície	5
2.2.2	Morfologia, estrutura e motilidade	6
2.2.2	Formação e cistos de <i>B. burgdorferi</i> lato sensu	6
2.3	Cultivo de <i>Borrelia</i> spp	6
2.3.1	Fatores ambientais e físicos importantes no cultivo de <i>Borrelia</i> spp	7
2.3.1.1	Aeração	7
2.3.1.2	Temperatura	7
2.3.1.3	Concentração de íons hidrogênio	9
2.3.2	Fatores nutricionais	9
3	Materiais e métodos	13
3.1	Amostras utilizadas	13
3.2	Manutenção dos cultivos	13
3.3	Meios de cultura utilizados	13
3.4	Colorações	13
3.5	Experimento com <i>B. garinii</i>	14
3.5.1	Cultivo em diferentes meios	14
3.5.2	Cultivo em BSK	14
3.6	Experimento com <i>B. burgdorferi</i>	15
3.6.1	Cultivo em Diferentes meios	15
3.6.2	Permanência em solução fisiológica	15
3.6.2.1	Soro de coelho	15
3.6.2.2	Solução de N-acetil glucosamina	16
3.7	Controle da amostra	16
3.8	Observação dos cultivos	16
4	Resultados	17
4.1	Resultados obtidos com <i>B. garinii</i>	17
4.1.2	Cultivo em BSK	19
4.2	Resultados obtidos com <i>B. burgdorferi</i>	19
4.2.1	Cultivo em diferentes meios	19
4.2.2	Permanência em solução fisiológica	19
5	Discussão	22
6	Conclusões	33
7	Referências	34
8	Apêndice	40

Índice de Tabelas

Tabela 1	Resultado dos cultivos de <i>Borrelia garinii</i> em diferentes meios e concentrações de ágar, extrato de levedura e pH, na temperatura de 34 °C.	18
Tabela 2:	Presença de cistos de <i>Borrelia burgdorferi</i> em diferentes meios sem adição de soro ou adicionando-se soros de coelho ou de equino.	20
Tabela 3:	Cultivo de <i>Borrelia burgdorferi</i> em diferentes meios sem adição de soro ou adicionando-se soros de coelho ou de equino.	21
Tabela 4:	Observação da morfologia de <i>B. burgdorferi</i> mantidas em soro fisiológico, soro fisiológico adicionado de soro de coelho e soro fisiológico adicionado de NAG.	23
Tabela 5:	Tempo de Sobrevivência de <i>Borrelia burgdorferi</i> mantidas em soro fisiológico, soro fisiológico adicionado de soro de coelho ou soro fisiológico adicionado de NAG.	24
Tabela 6:	Motilidade de <i>Borrelia burgdorferi</i> mantida em soluções de soro fisiológico puro ou acrescidas de soro de coelho ou NAG.	24

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** – *Borrelia garinii* em meio de cultura BSK. **A, B:** Coloração com safranina 2% (1000x). **C, D:** Coloração com verde brilhante (1000x). **E, F:** Coloração com cristal violeta (400x). 25
- Fig. 2** - *Borrelia burgdorferi* em meio de cultura BSK. **A, B, C, D, E, F:** Estruturas esféricas de diferentes tamanhos, em diferentes localizações nas espiroquetas (→). Coloração nigrosina (1000x). 26
- Fig. 3** - *Borrelia burgdorferi sensu lato* em meio de cultura BSK. **A, B,** Aglomerados de espiroquetas típicas. Corpos esféricos em diferentes localizações nas espiroquetas (→). Coloração nigrosina (1000x). 27

COSTA, Cátia Marques. **Cultivo e obtenção de cistos de *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em diferentes meios e soluções.** Seropédica : UFRRJ, 2003. 40p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva).

RESUMO

No presente estudo duas genoespécies de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. burgdorferi* e *B. garinii* foram utilizadas para observação de alterações morfológicas, quando cultivadas em diferentes meios de cultura e soluções. Inicialmente foram cultivadas em meio de cultura BSK e incubadas a 34°C por 7 dias e posteriormente por 4 dias. *B. garinii* foi repicada nos meios Brain Heart Infusion (BHI), caldo Brucella, Dubos e Barbour-Stoenner-Kelly. Os meios variaram em sua composição pela adição de ágar e extrato de levedura. *B. burgdorferi* foi repicada nos meios BHI, caldo Brucella, Dubos e BSK sem soro ou com soro de coelho ou equino. Utilizou-se também solução fisiológica pura ou acrescida de soro de coelho e n-acetil glucosamina. Através de microscopia de campo escuro acompanhou-se o desenvolvimento das culturas por período que variou conforme a etapa do experimento realizado. Colorações foram realizadas para obtenção de material fotográfico. As culturas apresentaram cistos com diferentes tamanhos, isolados ou em grupos, com parte espiralada de tamanho variável e espiroquetas típicas. Em solução fisiológica, células típicas e também com diferentes aspectos foram observadas e sobreviveram por intervalo de tempo variável.

Palavras chave: Borreliose, espiroquetose, meios de cultivo.

SUMMARY

In the present study two genoespecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. burgdorferi* and *B. garinii* were used for observation of morphologic alterations, when cultivated in different culture medium and solutions. Firstly were cultivated in BSK medium and incubated to 34°C by 7 days and after for 4 days. *B. garinii* was cultivated in the means Brain Heart Infusion (BHI), broth Brucella, Dubos and Barbour-Stoenner-Kelly. The medium varied in composition for the agar addition and yeast extract. *B. burgdorferi* was cultivated in the BHI medium, Brucella broth, Dubos and BSK without serum or with rabbit serum or equine. It was also used physiologic solution pure or added of rabbit serum and n-acetyl glucosamine. By darkfield microscopy the development of the cultures was accompanied by period that varied according to the stage of the accomplished experiment. Colorations were accomplished for obtaining of photographic material. The cultures presented cysts with different sizes, isolated or in groups, with spiraled part of variable size and typical spirochetes. In physiologic solution, typical cells and also with different aspects they were observed and they survived for interval of variable time.

Key Words: Borreliosis, espiroquetosis, culture medium

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Borrelia* (Swellengrebel, 1907) possui entre seus integrantes espiroquetas patogênicas para os animais e para os seres humanos. A espécie tipo é a *Borrelia anserina* Sakharoff 1891, que é específica de aves. A transmissão de *Borrelia* spp para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de carrapatos contaminados. Como os vetores são cosmopolitas, os casos com etiologia por esse agente são relatados em praticamente todos os continentes. A despeito deste fato a comercialização de animais ou a migração que faz parte da ecologia de diversas aves, propicia a dispersão dos vetores que podem estar contaminados.

A análise do DNA e do rRNA de diferentes amostras de *B. burgdorferi* permitiu a conclusão de que essa espécie pode ser dividida em 3 genospecies: *B. burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigertwalt & Brenner, 1984; *B. garinii* Baraton, Postic, Saint Giron, Boerlin, Piffaretti, 1992; e *B. afzelii* Canica, Nato, Dumerla, Mazie, Baraton, Postic, 1994 (BARATON *et al.* 1992; SOARES *et al.* 2000). Entre os grupos há diferença geográfica: *B. burgdorferi* foi descrita nos Estados Unidos da América e Europa, *B. garinii*, na Europa e *B. afzelii*, na Europa e Japão.

Apesar de relatos de isolamento de *Borrelia* spp em diferentes órgãos e tecidos, esse procedimento tem sido pouco produtivo na rotina de diagnóstico, pois o período de incubação pode levar de 6 a 8 semanas. Ademais, a necessidade de um meio de cultura rico facilita a contaminação. Equipamentos de custo elevado como fluxo laminar, membranas filtrantes com reduzida porosidade, microscópio de campo escuro ou contraste de fase, são alguns dos equipamentos necessários e, praticamente indispensáveis ao desenvolvimento das pesquisas. Mesmo com as dificuldades existentes, o estudo *in vitro* das características de *B. burgdorferi lato sensu* tem sido realizado utilizando-se amostras já isoladas e mantidas em laboratório através de repiques sucessivos e criopreservação.

Desta forma, torna-se necessário, o desenvolvimento de modos alternativos para o estudo desse microrganismo; e desde que existe a possibilidade de um espiroquetídeo muito semelhante estar presente em nosso País, os resultados obtidos com as amostras mantidas em laboratório poderão ser úteis em estudos futuros.

Seguindo essa linha de pensamento, desenvolveu-se o presente trabalho que teve como objetivos verificar alterações de morfologia de duas genoespécies de *Borrelia burgdorferi lato sensu* quando submetidas a diferentes meios de cultivo e soluções.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Contextualização: Borreliose de Lyme no Brasil

Em nosso País têm sido observado um espiroquetídeo no sangue de animais e humanos que apresentam sintomas compatíveis com a doença ou borreliose de Lyme. Até o presente momento não foi possível o cultivo e isolamento de tal microrganismo; entretanto, os resultados das pesquisas realizadas mostram a existência de um patógeno que está relacionado com carrapatos e que é capaz de estimular o sistema imune do hospedeiro a produzir anticorpos (BARROS 2000; ISHIKAWA, 2000; SALLES, 2002).

BARROS-BATTESTI (1998) ao pesquisar aspectos provavelmente envolvidos na transmissão da borreliose na região de Itapevi, São Paulo, coletou roedores silvestres, marsupiais e carrapatos. Sangue, partes do rim, bexiga e baço dos mamíferos e macerado dos órgãos de carrapatos foram colocados em meio BSK com antibiótico. Espiroquetas foram observadas no meio BSK cultivado com sangue dos mamíferos capturados e nos cultivos com carrapatos.

ABEL (1999) detectou em meio de cultura BSK espiroquetas semelhantes a *B. burgdorferi*. O material semeado foi oriundo de marsupiais, carrapatos e roedores capturados na Reserva Florestal de Morro Grande, Município de Cotia, São Paulo. Nessa mesma localidade diagnosticou-se também casos humanos com clínica e sorologia compatíveis com Borreliose de Lyme. O isolamento do agente, entretanto, não foi realizado porém, através do método PCR, excluiu-se a possibilidade de serem *Leptospira* spp as espiroquetas presentes no material cultivado. Exames sorológicos têm demonstrado resultados positivos para *B. burgdorferi* em diferentes espécies, constituindo-se no procedimento mais eficaz para o diagnóstico laboratorial, devendo , entretanto, ser associado à clínica e epidemiologia.

Mesmo estando naturalmente infectados é possível não se encontrar espiroquetas no sangue ou urina de marsupiais, que são reservatórios desses microrganismos na natureza. Esse fato entretanto, pode ser mudado após administração de droga imunossupressora como a Ciclofosfamida (BARBOZA *et al.*, 1998).

Devido à dificuldade de detecção das espiroquetas no sangue e por consequência de material para ser cultivado, cujo resultado pode ser demorado e negativo, testes

sorológicos, têm apresentado resultados que corroboram a hipótese da presença de *Borrelia* sp. patogênica em nosso meio.

Pacientes com sorologia positiva e acometimento cutâneo relataram algum tipo de permanência em áreas suburbanas ou rurais, em proximidade a animais de pequeno e grande porte, no estado do Rio de Janeiro (FLORIÃO 1994). No município de Cotia, estado de São Paulo, BARROS (1995) identificou 13 casos humanos de doença de Lyme através de sorologia. Dentre as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes, as manifestações cutâneas foram as mais freqüentes e comuns a todos os paciente, independente de relato de contato anterior com carrapato. Estudos realizados por BARROS (2000) permitiram concluir que no Brasil ocorre um tipo de síndrome causada por espiroquetídeos com características clínicas, epidemiológicas diferentes das que ocorrem na Europa e América do Norte. Manifestações cutâneas são as mais freqüentes e com apresentação variada: outras manifestações como as articulares, neurológicas e cardíacas também podem ocorrer.

Por serem os carrapatos ectoparasitas de animais e os vetores de *Borrelia* sp. os exames sorológicos das diferentes espécies, principalmente das que vivem em proximidade com o homem assumem importância no sentido de avaliar riscos para a população humana, visto ser essa doença uma zoonose.

Através de estudo sorológico SOARES (1998) encontrou 30 cães, dentre 150, com sorologia positiva para *B. burgdorferi* no município de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, e adjacências, comprovando a hipótese de ocorrência de *Borrelia* sp.

ISHIKAWA (1996; 2000) encontrou bovinos em condições naturais que apresentaram títulos positivos para borreliose, parasitados por carrapatos, mesmo que em pouca quantidade e sem manifestação clínica. Os bovinos foram oriundos de diferentes regiões do estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo, sendo alguns nativos dessas áreas e outros importados

Na região de Cotia, uma área em que casos de borreliose de Lyme já haviam sido detectados em humanos, também foram encontrados cães soropositivos alguns dos quais com histórico de contato prévio com carrapatos (JOPPERT, 1995).

Interessante conclusão a dos estudos desenvolvidos por BONOLDI (2001) confirmando a semelhança antigênica existente entre o agente etiológico da doença de Lyme-símile no Brasil com *B. burgdorferi* G 39/40. Em vista desses fatos tornam-se

necessários os estudos envolvendo *B. burgdorferi sensu lato*, pois poderão servir como modelo o estudo do espiroquetídeo presente em nosso País.

2.2. Características gerais do gênero *Borrelia*

Espiroquetas do gênero *Borrelia* são microrganismos helicoidas que medem de 0,18 a 0,25µm por 4 a 30µm, possuem de 7 a 30 flagelos periplásmicos localizados ao final de cada célula e 3 a 10 espirais; possuem protoplasma cilíndrico, envolvido por uma membrana externa, que é constituída de uma camada de peptidoglicano. As células são Gram negativas, mas o ideal é que sejam visualizadas em microscopia de contraste de fase ou campo escuro. A temperatura ótima de crescimento é de 34°C a 37°C. São catalase positivas, utilizam a glicose como fonte de carbono e energia produzindo ácido láctico (JOHNSON *et al.*, 1984). São patógenos de seres humanos, de outros mamíferos e aves e são transmitidos por artrópodes hematófagos e essa característica é considerada importante na identificação do gênero (BARBOUR e HAYES, 1986; HOLT *et al.*, 1994). *B. burgdorferi* possui, ainda, atividade colagenolítica capaz de hidrolizar gelatina e colágeno ajudando na disseminação através da pele e do endotélio (GRAB *et al.*, 1996).

A atividade hemolítica foi demonstrada por WILLIAMS & AUSTIN (1992), através de cultivo de *B. burgdorferi* em meio BSK em placas. A redução da cisteína presente no meio propiciou a ativação de hemolisinas e a observação de áreas de β-hemólise cuja intensidade mostrou-se variável, em função da origem do sangue utilizado que foram de cavalo, ovelha, coelho ou bovino.

2.2.1 Proteínas de superfície da *Borrelia* spp

Os membros do gênero *Borrelia* possuem diferentes tipos de proteínas cujas funções necessitam estudos aprofundados. As mais estudadas, e por isso mais conhecidas, são duas maiores proteínas de superfície externa denominadas OspA e OspB cujo peso molecular varia dependendo da amostra testada (BARBOUR & HAYES, 1986). As proteínas OspC, OspE, Rev e Erp talvez desempenhem funções na infectividade da espiroqueta e sua sobrevivência em diversos hospedeiros (OBONYO *et al.*, 2002).

2.2.2. Morfologia, estrutura e motilidade

Flagelos, endoflagelos ou flagelos periplásmicos são estruturas inseridas no espaço periplásmico e cuja rotação origina a movimentação das espiroquetas. Estão presentes em quantidades que variam conforme a espécie e permitem que mesmo em meios com alta viscosidade a capacidade de deslocamento seja mantida (LI *et al.*, 2000). O movimento de rotação é gerado a partir do fluxo de prótons no interior da célula. Mesmo na ausência de fonte de energia o movimento celular é mantido, porém movido pela força motriz de prótons gerada por ionóforos (BROOKS *et al.*, 2001). O flagelo une-se ao corpo celular através de estrutura complexa composta por 4 componentes: filamento, gancho, “neck” e um disco basal (BARBOUR, 1986).

MOTALEB *et al.* (2000) demonstraram que os flagelos são importantes não só para a motilidade como também para a forma estrutural de *B. burgdorferi*. Essas estruturas são compostas por dois filamentos de proteína: um maior, denominado FlaB e outro menor, designado como FlaA. Usando técnicas de recombinação genética, MOTALEB *et al.*, (2000) conseguiram inativar a FlabB. Assim, originaram células mutantes que apresentaram tempo de geração maior, perda de motilidade, e sem as espirais características. As borrelíias tinham forma de haste (=rod-shape) em cadeia e mantiveram esse padrão em repiques posteriores.

Substâncias como os antibióticos podem ter diferentes efeitos sobre a motilidade das espiroquetas. LUBKE & GARON, (1997) observaram que 100µg/ml de melitina foram suficientes para diminuir rapidamente a motilidade. Testando o efeito de antibióticos sobre a propagação de *B. garinii* LAKOS & NAGY, (1999) registraram que pefloxacina em concentração inferior a 4mg/L ativou a propagação e o metabolismo dessa espiroqueta.

2.3. Cultivo de *Borrelia* spp

O cultivo e isolamento de *Borrelia* spp apresenta dificuldades em face das exigências nutricionais e da multiplicação *in vitro* desses microrganismos. Devido a tais características algumas espécies são qualificadas como incultiváveis impossibilitando as tentativas de sequenciamento genético, desenvolvimento de vacinas e o preparo de antígeno para testes imunológicos. O isolamento em cultura do agente suspeito em doenças infecciosas é o ideal para se concluir o diagnóstico.

Os relatos de sucesso na obtenção e manutenção deste microrganismo em condições de laboratório relacionam-se ao período de infecção (BERGER *et al.* 1992) e ao material escolhido para estudo: sangue (MARASPIN *et al.* 2001), biopsia de eritema migratório (HUDSON *et al.* 1998), soro (WORMSER *et al.* (1998) e ocasionalmente líquido cérebro-espinhal (NOWAKOWSKI *et al.* 2001).

2.3.1. Fatores ambientais e físicos importantes no cultivo de *Borrelia* spp

2.3.1. Aeração

Espécies de *Borrelia* spp que têm sido cultivadas *in vitro* são microaerofílicas (HOLT *et al.*, 1994). Culturas de material proveniente de carrapatos apresentaram melhores resultados quando a incubação em ambiente de microaerofilia foi comparado com a incubação em aerobiose e anaerobiose (DAVINSON *et al.*, 1999).

De acordo com FE (1993), a manutenção dos níveis de O₂ e de CO₂ influenciam a infectividade por prevenir a perda de informação genética ou induzir a expressão de determinantes de virulência. Esse autor observou que *B. burgdorferi* após 20 passagens em ambiente com mistura de gases O₂, CO₂ e N₂. manteve a infectividade; entretanto, cultivos de 15 passagens em meio de cultura e mantidos em ambiente com O₂ e CO₂ perderam a infectividade. OLIVEIRA (2001) cultivou *B. burgdorferi* em microaerofilia conseguida pela utilização de jarra com vela e em anaerobiose através do uso de jarra com envelope de CO₂, obtendo bom resultado nos dois sistemas.

2.3.1.2. Temperatura

Temperaturas assumem importância no cultivo de microrganismos, pois o crescimento bacteriano será maior em faixas de temperatura consideradas ideais. Valores extremos de temperatura são úteis quando o objetivo é a esterilização ou a conservação de espécies microbiológicas. Temperaturas ótimas de crescimento variam de acordo com o microrganismo; de forma geral observa-se bom crescimento microbiano em temperaturas que variam de 30°C a 37°C (BROOKS *et al.* 2001).

No caso de *B. burgdorferi sensu lato* a temperatura ideal de crescimento relatado por HUBÁLEK *et al.*, (1998), varia de acordo com a genospecie. Esses pesquisadores concluíram que, para *B. burgdorferi sensu stricto*, 33°C é a temperatura ideal. *B. garinii* desenvolve-se bem a 37°C e o mesmo ocorre com *B. afzelii* a 35°C. De forma geral, temperaturas entre 28°C e 37°C permitiram o pleno desenvolvimento dessas

espiroquetas. Além de influenciar o crescimento, a temperatura interfere na expressão protéica, como investigado por OBONYO *et al.*, (1999). Através de sistema de cultivo de células de carrapato esses autores observaram maiores níveis de OspA em *B. burgdorferi* cultivada a 31°C. Este sistema em estufas à 34°C e 37°C possibilitou maior produção de OspC quando comparado aos cultivos em BSK. Avaliando infectividade e temperatura OBONYO *et al.*, (2002) verificaram que *B. burgdorferi* sensu stricto cultivada a 31°C apresentou menor nível de OspC, acontecendo o contrário quando as culturas foram incubadas a 37°C. Culturas transferidas de 31°C para 37°C também apresentaram elevados níveis de OspC e apenas os cultivos de 37°C foram capazes de infectar hamsteres.

Sucessivos repiques em meio de cultura diminuem a infectividade de *Borrelia spp.* Levine *et al.* (1990) observaram que após 12 passagens em meio de cultura BSK *B. anserina* foi incapaz de infectar pintos de 1 dia. Pássaros inoculados com a mesma amostra de 22 passagens apresentaram espiroquetemia baixa. Ave alguma foi infectada após 39 passagens em meio de cultura. Hu *et al.* (1996) relataram que após 15 passagens em meio de cultura BSK II (BARBOUR-STENNER-KELLY), uma amostra de *B. garinii* isolada de carrapato e inoculada em camundongos não promoveu manifestação clínica compatível com Doença de Lyme. Quando a mesma amostra foi usada em alimentação artificial para carrapatos *Ixodes ricinus*, reisolada em BSK II e novamente inoculada em camundongos, esses animais apresentaram artrite moderada a severa na articulação tíbio-tarso. Tal fenômeno ocorreu por causa da expressão protéica que diferiu em condições *in vitro* e *in vivo*. Tratamento com antibióticos também interferem na infectividade de *B. burgdorferi* como estudaram BOCKENSTEDT *et al.* (2002), em camundongos. Esses pesquisadores encontraram o referido patógeno em carrapatos alimentados em camundongos artificialmente infectados e posteriormente tratados com doxiciclina ou ceftriaxona, porém a transmissão para outros camundongos não ocorreu. Neste caso observou-se falta de genes em plasmídios correlacionados com infectividade.

2.3.1.3 Concentração de íons hidrogênio

Seres vivos necessitam de certa estabilidade de pH para que seu equilíbrio interno seja mantido. Microambientes com pH 6,0; 7,0 e 8,0 produzem alterações na expressão das proteínas de membrana (CARROL *et al.*, 1999). Várias proteínas de

células cultivadas foram detectadas em abundância em meio com pH 7,0. Em pH 8,0 observou-se diminuição de expressão na maioria das proteínas (RAMAMOORTHY & MEEKER, 2001). Além disso, a regulação de alguns genes é maior em pH 7,0 do que em 8,0 (CARROL *et al.*, (2000).

A capacidade de *B. burgdorferi sensu lato* se manter e multiplicar em ambientes com pH variado foi testada por OLIVEIRA (2002) que observou excelente crescimento de espiroqueta em meios com diferentes pH.

2.3.2 Fatores nutricionais

Meios de cultura têm sido elaborados na tentativa de se obter um produto final em que seja possível cultivar microrganismos tão exigentes como são as espiroquetas do gênero *Borrelia* spp e de custo menos elevado. Até o momento o meio BSK é o que tem permitido tal procedimento, mas seu custo é elevado. Variações nos ingredientes que o constituem levaram a apresentação de 3 formulações. O enriquecimento da formulação desenvolvida por Kelly (KELLY, 1971), nomeada como Meio de Kelly, com CRML 1066, que contém aminoácidos, proteínas e fatores de desenvolvimento originou o Meio de Kelly Fortificado BARBOUR, (1984). O mesmo autor ressaltou a presença de N acetil glucosamina (NAG), que permitiu a obtenção de maior densidade de células. NAG é um aminoaçúcar importante para o desenvolvimento da célula por ser componente da parede celular (FRAISER, 1997). Outras alterações que foram feitas concretizaram a composição do BSK I. A adição de “yeastolate” e de CRML 1066 sem glutamina são os elementos diferenciados do BSK II (BARBOUR, 1984). JOHNSON *et al.*, (1984) acrescentaram kanamicina e 5-fluorouracil ao BSK dando-lhe característica de seletividade. Tomando como base o meio BSK II, POLLACK *et al.* (1993) desenvolveram o BSK H que difere dos antecessores pela presença de gelatina e agarose. Mesmo sendo cultivada em meio considerado próprio, a origem dos ingredientes, como a albumina, interfere na qualidade das células (CALLISTER *et al.*, 1990).

BARBOUR *et al.* (1984) ao cultivar espiroquetas do intestino de carrapatos, observaram que o acréscimo de 100µg de ácido nalidíxico e 200µg de 5-fluorouracil não impediu o crescimento das espiroquetas e suprimiu o desenvolvimento de contaminantes.

Um meio seletivo foi elaborado por JOHNSON *et al.* (1984) que incluía em sua composição kanamicina e 5-fluorouracil que mostrou-se eficiente para o cultivo de materiais contaminados, como carrapatos.

O meio desenvolvido por BAHRMAND *et al.* (1996) com ingredientes comuns ao BSK, permitiu o desenvolvimento de *B. persica* e *B. microti* em superfície sólida e a contagem das células após diluição em solução fisiológica. Dessa forma possibilitou-se a contagem das células e a determinação do tempo de geração que foi de 9:55 e 6:25 horas respectivamente para *B. persica* e *B. microti*.

O sucesso dos diferentes meios para o isolamento e manutenção de espiroquetas causadoras da Borreliose de Lyme nas condições de laboratório é variável. Nesse contexto inclui-se o meio desenvolvido por PHILLIPS *et al.* (1998). Através do meio denominado como MPM realizou-se o cultivo de *B. burgdorferi* de 43, de um total de 47, pacientes com doença de Lyme crônica. Entretanto o mesmo resultado não foi obtido por MARQUES *et al.* (2000). Ao utilizar meio MPM cultivado com amostras de sangue de pacientes com borreliose de Lyme todos os resultados foram negativos. O mesmo material semeado concomitantemente em meio BSK mostrou espiroquetas viáveis a partir do 2º dia de incubação até o 21º dia. TILTON *et al.* (2001) também não foram bem sucedidos ao usarem o meio MPM.

De forma diferente, SPECK *et al.* (2001) conseguiram o isolamento de *B. afzelii* de um cão naturalmente infectado. As espiroquetas encontradas no sangue desenvolveram-se em cultura de células BGM com uma mistura de meios BSK H e MEM (meio mínimo essencial). Em outra combinação dos meios BSK e EMEM (meio mínimo essencial de Eagle), SPECK, *et al.*, (2002) conseguiram cultivar espiroquetas de carrapatos e do sangue de cães; maior taxa de espiroquetas foi observada nessa mistura do que no meio BSK apenas. A inoculação de *B. burgdorferi sensu stricto* e *B. valaisiana* nesses meios acompanhou esse padrão.

MARASPIN *et al.* (2001, 2002) isolaram *B. afzelii* e *B. garinii* em MKP (Kelly Pettenkofer Medium) da pele e sangue de pacientes que apresentaram eritema migratório e *B. afzelli* foi isolada da pele e de um nódulo fibroso de uma mulher com acrodermatite crônica atroficante. Esse meio é citado por WILSKE (2002), juntamente com o BSK, como sendo útil para o cultivo de *Borrelia* spp.

PREAC-MURSIC *et al.* (1991) trabalharam na formulação de meios sólidos que possibilitassem a observação e contagem de colônias. Em suas pesquisas usando os

meios BSK, TAROM, MEM, PMR, BHIAM e MKP verificaram a ausência de padrão de desenvolvimento nesses diferentes meios, além de não ter ocorrido crescimento no meio de MEM. Os vários isolados de *B. burgdorferi* que conseguiram crescer nesses meios apresentaram colônias de dois tipos: um com diâmetro de 0,3 a 3,0mm, de coloração cinza, com superfície lisa ou rugosa, centro convexo e extremidades bem definidas; e outro com colônias cinzas planas com centro negro.

OLIVEIRA (2002) testou 57 diferentes meios para o cultivo de *B. burgdorferi* e 26 para *B. garinii*. Em seu trabalho, variações de soro, de aeração, pH, ágar foram realizadas para se encontrar 8 combinações que permitiram o desenvolvimento, com sucesso das amostras estudadas.

Formação de cistos de *B. burgdorferi* lato sensu

Alterações na morfologia de *B. burgdorferi* foram descritas por BARBOUR & HAYES (1986). Seriam decorrentes da perda de associação da membrana externa com o protoplasma cilíndrico, se a espiroqueta fosse colocada em solução hipotônica.

BRUCK *et al.* (1995) descreveram as etapas de preparação de esferoplastos de *B. burgdorferi*. A microscopia de campo escuro revelou células esféricas semi translúcidas, cuja formação foi influenciada pelo pH. Motilidade e morfologia de *B. burgdorferi* analisadas através de microscopias de campo escuro e eletrônica revelaram células menos espiraladas, mais alongadas, e algumas vezes com grânulos estruturais esféricos em diferentes regiões e motilidade prejudicada (MURSIC *et al.*, 1996).

Cistos de *B. burgdorferi* são estruturas com formato circular e dimensões de 0,5-2,0µm. Possuem pouca atividade metabólica, o que propicia sua longevidade e sobrevivência quando as condições ambientais são desfavoráveis, conforme descreveram BRORSON & BRORSON (1997). BRORSON & BRORSON (1998) descreveram um método rápido de produção de cistos em água destilada a 4°C e de reversibilidade dos mesmos à forma de espiroquetas móveis. GRUNTAR *et al.* (2001), usando esse mesmo método, produziram cistos para inoculação em camundongos concluindo que, *in vivo*, ocorre a transformação para formas espiraladas móveis.

A respeito da sensibilidade dos cistos a drogas medicamentosas sabe-se que a concentração do antibiótico, temperatura e condições de aeração podem permitir a dissolução ou ruptura dos cistos em meio de cultura adicionado de metronidazol (BRORSON & BRORSON, 1999). Em meio com penicilina, ceftriaxona ou doxiciclina

B. burgdoreferi pode apresentar forma espiralada com grânulos aderidos e também cistos (KERSTEN *et al.*, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras Utilizadas

Os experimentos foram realizados com *B. garinii* 1B29 e *B. burgdorferi* G 39/40, ambas oriundas do laboratório de Integração Microrganismo e Artrite da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, gentilmente cedida pelo professor Natalino Hajime Yoshinari. Este laboratório é de referência nacional em pesquisa sobre Borrelioses.

3.2. Manutenção dos Cultivos

Após cultivo em meio de cultura BSK as amostras foram colocadas em refrigeração ou distribuídas em tubos para criopreservação com capacidade para 1mL e com glicerol 80% e mantidas em freezer (-18°C). Para os sucessivos repiques nos meios foram usadas culturas exuberantes mantidas em meio BSK em temperatura de 34°C por 4 dias.

3.3 Meios de Cultura Utilizados

Os meios Brain heart infusion (BHI), Caldo Brucella, Dubos, e BSK serviram como base para variações de soros, pH e ágar

3.4 Colorações

As colorações utilizadas foram: Solução aquosa de safranina a 2% colocada na mesma proporção do cultivo entre lâmina e lamínula. Verde brilhante, sendo 10µL de cultura entre lâmina e lamínula. Cristal violeta, após fixação com metanol durante 5 minutos; decorridos 5 minutos de coloração o excesso de corante foi retirado com água. Nigrosina e 10µL de cultura foram levemente homogeneizados movimentando-se a lâmina de um lado para outro e secados ao ar. As colorações foram utilizadas para obtenção de material fotográfico.

3.5 Procedimento geral com as amostras de *B. burgdorferi* e *B. garinii*

No momento da realização de cada experimento a amostra mantida em freezer foi descongelada e sob fluxo laminar estéril uma alíquota de 100µL foi repicada em

3mL de meio de cultura BSK e incubada em estufa a 34°C por um período de uma semana. Decorrido esse tempo, retirou-se uma alíquota de 10µL para observação microscópica. As espiroquetas foram avaliadas quanto ao tamanho, motilidade e crescimento e deveriam estar com motilidade excelente, serem longas e com crescimento exuberante, ou seja, todos os campos apresentando-se repletos. Dessa cultura, retirou-se uma alíquota de 100µL que foi novamente repicada em 2,0 mL de meio de cultura BSK e incubada a 34°C durante 4 dias para repique nos diferentes meios e soluções. Após retirada de alíquota para realização do experimento, as culturas, mantidas em tubos com capacidade para 10mL, retornaram para a estufa para que o desenvolvimento continuasse. Posteriormente foram transferidas para tubos de criopreservação conforme o item 3.2. Esse procedimento foi comum para a execução dos experimentos com *B. burgdorferi* e *B. garinii*. Assim, as culturas mantinham um número de células constante e com as mesmas características de motilidade e tamanho.

3.6. Experimento com *B. garinii*

3.6.1. Cultivo em diferentes meios

Após realização do procedimento descrito no item 3.5, uma alíquota de 100µL de cultura de *B. garinii* foi repicada nos meios BHI em pH 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; caldo Brucella em pH 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; Dubos 6,2; 6,6;7,0. Alguns desses meios receberam ágar e/ou extrato de levedura. Repicou-se em cada tubo $4,4 \times 10^5/0,1\text{mL}$ de espiroquetas de cultura excelente e incubou-se em estufa a 34°C. Uma alíquota de 10µL foi retirada a intervalos semanais durante 120 dias observação microscópica do crescimento. Macroscopicamente, observou-se as culturas quanto à possibilidade de turvação do meio de cultura, formação de película na superfície ou colônia devido a crescimento de contaminantes. Durante esse período as culturas foram mantidas em estufa a 34°C.

3.6.2. Cultivo em BSK

Para verificação da viabilidade das espiroquetas em diferentes valores de pH, realizou-se o repique de uma cultura de 4 dias de *B.garinii* em meio BSK nos pHs 5,0; 6,0; 7,0 e 7,5. Após 24 horas de incubação procedeu-se à primeira observação microscópica. As culturas permaneceram em estufa para que nova observação fosse realizada após uma semana.

3.7. Experimento com *B. burgdorferi*

Executou-se a etapa de procedimento geral e repicou-se *B. burgdorferi* nos diferentes meios e soluções.

3.7.1. Cultivo de *B. burgdorferi* em diferentes meios

Uma bateria de tubos contendo os meios Brain heart infusion (BHI), caldo Brucella, Dubos e BSK¹(comercial) todos em pH 7,5 foi preparada com o objetivo de acompanhar a morfologia nesses diferentes meios. Cada tubo recebeu 3,0 mL de meio. No momento do uso procedeu-se ao enriquecimento dos meios através de soros de coelho e equino. Em seguida inoculou-se cultura jovem das espiroquetas cultivadas em BSK.

3.7.2. Manutenção de *B. burgdorferi* em solução fisiológica (SF)

Para avaliar a morfologia e a sobrevivência de *B. burgdorferi* em meio com quantidades mínimas de nutrientes foi utilizada solução fisiológica² 0,9% estéril acrescida ou não de soro de coelho, ou n-acetil glucosamina. A SF foi distribuída em tubos com capacidade para receber um volume 10,0 mL; em cada tubo foi colocado 3,0 mL da solução. Os tubos com S.F. foram mantidos em geladeira até o momento do uso, sem ultrapassar período superior a 24 horas. À SF acrescentou-se soro de coelho, n-acetil glucosamina¹ (NAG).

Realizou-se esse experimento em 3 etapas. À cada etapa 9 tubos com SF, SF+soro de coelho, SF+n-acetil glucosamina recebeu 100µL de cultura de *B. burgdorferi* com 4 dias de incubação à temperatura de 34°C. Antes de serem transferidas para os tubos uma alíquota de 10µL foi retirada para avaliação da qualidade do cultivo. Após inoculação das espiroquetas os tubos foram mantidos em estufa a 34°C. A microscopia foi realizada até 2 dias após não serem encontradas espiroquetas móveis.

3.7.2.1. Soro de coelho

¹ SIGMA

² DARROW

O soro utilizado foi esterilizado em filtros de Milipore com capacidade filtrante de 10 mL passando por membranas 0,45 μm e 0,22 μm respectivamente. O soro foi acrescentado aos meios de cultura e ao soro fisiológico no momento do uso. Utilizou-se em quantidade equivalente a 6% para que a concentração final fosse semelhante à do meio padrão

3.7.2.2 Solução de n-acetil glucosamina (NAG)

Em 100 mL de água destilada estéril adicionou-se 0,04g de n-acetil glucosamina (NAG). Após dissolução, o preparado foi esterilizado em filtro de Seitz com membrana EKS e o filtrado resultante acondicionado em frascos de vidro que foram mantidos em freezer. A solução foi adicionada à SF em quantidade de 600 μL de modo que a concentração final tivesse um valor próximo ao que é usado no meio BSK.

3.8 - Controle da amostra

No momento de repique da amostra de *B. burgdorferi* ou *B. garinii* nos meios ou soluções realizou-se concomitantemente repique em meio de cultura BSK para certificação da viabilidade das células inoculadas.

3.9 – Observação dos cultivos

Uma alíquota de 10 μL foi retirada de cada tubo após agitação, colocada sobre lâmina e coberta com lamínula. Delimitou-se uma área de 1 cm^2 para as observações que foram realizadas em microscópio de campo escuro em aumento de 160 e 400 vezes.

4 – RESULTADOS

Tanto nas observações de *Borrelia garinii* quanto de *B. burgdorferi* foram encontrados os seguintes tipos morfológicos:

- 1) espiroquetas clássicas com tamanho e amplitude das espirais variáveis
- 2) espiroquetas com estruturas esféricas em suas extremidade ou em sua região central
- 3) espiroquetas com estruturas esféricas pequenas, localizadas em diferentes regiões
- 4) cistos

4.1. *Borrelia garinii*

4.1.1. Cultivo em diferentes meios

Cistos e estruturas esféricas com a parte espiralada de tamanho variado foram visualizados em todos os meios de cultivo. Os cistos foram classificados como pequenos, médios e grandes. Em aumento de 400x observou-se que alguns cistos apresentaram em uma das margens ou em margens opostas, uma ou duas estruturas circulares, menores e internas. Cistos com apenas uma estrutura circular assemelhavam-se a um anel. Espiroquetas típicas não foram encontradas. Ao contrário, muitas delas apresentaram-se com aspecto deformado, quase sem espirais e imóveis. O tempo de surgimento dos cistos foi de aproximadamente quatro semanas, sendo individuais no início e posteriormente apresentaram-se aglomerados. Os resultados observados em cada cultura específica estão demonstrados na Tabela 1.

No meio BHI, apenas dois cultivos foram negativos. Em todos os outros observou-se estruturas de formas variadas. Os cistos visualizados foram todos de pequeno tamanho, isolados ou agrupados. Estruturas esféricas com filamento espiralado de tamanhos variados estão referidas na Tabela 1 como alteradas. No meio caldo Brucella, todos os cultivos apresentaram cistos isolados ou em grupos. Em pH 7,0 com extrato de levedura, havia cistos pequenos e maiores, os quais apresentaram estrutura puntiforme em seu interior cuja forma não foi possível de ser definida. Os cistos com esse aspecto possuíam motilidade. Já no meio Dubos, apenas em pH 6,2 e 7,0 com extrato de levedura foram observados cistos, os quais apresentaram estruturas nas margens.

Tabela 1 - Cultivo de *Borrelia garinii* em diferentes meios e concentrações de ágar, extrato de levedura e pH, na temperatura de 34 °C.

Meio	Ágar 0,3%	Extrato de levedura	pH	Leitura
BHI	+	-	6,2	Alteradas
	-	+	6,6	Cistos e alteradas
	-	-	6,6	Cistos e alteradas
	+	-	6,6	Negativo
	-	+	7,0	Cistos
	+	-	7,0	Negativo
	-	-	7,4	Cistos e alteradas
Caldo Brucella	-	-	6,2	Cistos e alteradas
	-	-	6,6	Cistos
	-	+	6,6	Cistos e alteradas
	-	-	7,0	Cistos
	-	+	7,0	Cistos
	-	-	7,4	Cistos
	-	-	6,2	Cistos
Dubos	-	-	6,6	Negativo
	+	-	6,6	Negativo
	-	+	7,0	Cistos
	+	-	7,0	Negativo
	-	-	7,0	Negativo
	-	-	7,4	Cistos

(+) - Acréscimo da substância; (-) - Ausência da substância

4.1.2 Cultivo em BSK

B. garinii cultivada em BSK pH 5,0 manteve-se espiralada, porém imóvel após 24 horas de incubação, sendo raros os cistos encontrados. Motilidade e morfologia não foram afetadas pelo pH 6,0 do meio. Células com vigorosa motilidade foram observadas em BSK pH 7,0. Em pH 6,0 e 7,0 não foram observados cistos ou alguma outra alteração.

Uma cultura repicada em BSK pH 7,5 mantida à temperatura de 4°C apresentou cistos e espiroquetas com estruturas circulares de diferentes tamanhos na extremidade ou no centro.

4.2 -*B. burgdorferi*

4.2.1- Cultivo em diferentes meios

Inicialmente as observações foram diárias e após o 8º dia as observações passaram a ser semanais. Nos meios BHI, Dubos e caldo Brucella, cistos estavam presentes logo nas primeiras observações. A quantidade dessas estruturas foi escassa, uma vez que, percorrida toda a lâmina, apenas um ou dois cistos puderam ser encontrados.

De um total de 36 tubos, 22 apresentaram os cistos. Desses 22, microcolônias ou aglomerados de cistos, foram observadas em cinco tubos. Essas foram observadas nos meios Dubos e Caldo Brucella com soro de coelho ou equino. Dentre os meios sem soro, apenas no meio de Dubos foram observados cistos. Os cistos apresentaram-se em dimensões variadas. Meios sem cistos ou espiroquetas móveis foram classificados como negativos. No meio de Dubos (1 tubo) com soro equino foram encontrados cistos com estruturas móveis em seu interior. Tabela 2.

No meio BSK comercial as mesmas estruturas foram encontradas, além das espiroquetas características. No meio sem soro foram observadas células médias e longas com motilidade excelente e boa além de bem espiraladas. Foram observados cistos a partir da 2ª semana de incubação isolados e posteriormente agrupados. Observou-se cistos após 10 dias de incubação. Em meio BSK acrescido de soro de coelho as espiroquetas tinham motilidade excelente e boa. Em 15 dias de permanência em meio de cultura observou-se estrutura esférica com filamento espiralado curto. No soro equino encontrou-se espiroquetas curtas e longas em excelente motilidade, isoladas e em agrupamentos, grupos de cistos e espiroqueta curta com pequenas estruturas circulares próximas às extremidades (Tabela 3).

Tabela 2: Presença de cistos de *Borrelia burgdorferi* em diferentes meios sem adição de soro ou adicionando-se soros de coelho ou de equino.

Meios	Sem soro	Soro de Coelho	Soro de Equino	Total
BHI	0/3	1/3	2/3	3/9
Caldo Brucela	0/3	3/3	2/3	5/9
Dubos	1/3	2/3	3/3	6/9
BSK Comercial	2/3	3/3	3/3	7/9
Total	3/12	9/12	9/12	21/36

Tabela 3: Cultivo de *Borrelia burgdorferi* em diferentes meios sem adição de soro ou adicionando-se soros de coelho ou de equino.

	Repetições	SEM SORO	SORO COELHO	SORO EQUINO
BHI	1	Negativo	Negativa	Cistos
	2	Negativo	Cistos	Cistos
	3	Negativo	Negativo	Negativo
C.BRUCELLA	1	Negativo	Cistos	Cistos
	2	Negativo	Microcolônias	Negativo
	3	Negativo	Microcolônias	Cistos
DUBOS	1	Cistos	Cistos -	Cistos isolados e agrupados + + + +
	2	Negativo	Microcolônias	Cistos pequenos e médios
	3	Negativo	Negativo	Cistos móveis
BSK COMERCIAL	1	Cistos agrupados e espiroquetas móveis	Cistos agrupados	Aglomerado de cistos e espiroquetas móveis
	2	Espiroquetas móveis	Cistos agrupados e espiroquetas móveis	Cistos agrupados e espiroquetas móveis
	3	Cistos e espiroquetas móveis	Cistos agrupados e espiroquetas móveis	Negativo

4.2.2 Manutenção de *Borrelia* sp em Solução fisiológica

Na tabela 3 estão os resultados dos tamanhos observados nas diferentes soluções. No soro fisiológico (SF) puro ou acrescido de outras substâncias foram encontradas 3 padrões de células. Células curtas, médias e longas foram observadas em 24 tubos de um total de 27 com SF, SF + soro de coelho e SF + n-acetil glucosamina (NAG). Em SF espiroquetas longas com movimentos de flexão. Em SF + soro de coelho observou-se cistos com movimentos circulares e com estrutura interna. Em solução de NAG, cistos grandes e estruturas esféricas com parte móvel de tamanho variável e espiralada foram visualizadas. Um tubo com SF apresentou contaminação por fungos *Penicillium* sp. Nesse ambiente as espiroquetas apresentaram motilidade boa e razoável e permaneceram móveis por mais 5 dias.

O tempo de sobrevivência de *B. burgdorferi* em SF, SF+soro de coelho e SF+NAG está registrado na tabela 4. O menor tempo de sobrevivência observado foi de 2 dias em SF com soro de coelho e o período maior foi o de 12 dias observados em solução em SF+NAG. Nas 3 soluções encontraram-se células móveis por até 11 dias. Houve grande variação no tempo de sobrevivência e os maiores períodos foram detectados no soro fisiológico.

O total de tubos com células móveis e a qualidade da motilidade podem ser observados na tabela 5. Em soro fisiológico de um total de nove tubos, oito apresentaram células com motilidade boa e excelente. Os maiores valores de motilidade também foram observados nessa solução. Células com motilidade que variaram de + a ++++ foram encontradas em todas as soluções. Em momentos diferentes foram observadas espiroquetas finas, pouco espiraladas e também células bem características. Diminuição ou aumento de motilidade não seguiram uma seqüência temporal.

Tabela 4: Observação da morfologia de *B. burgdorferi* mantidas em soro fisiológico, soro fisiológico adicionado de soro de coelho e soro fisiológico adicionado de NAG.

Tubo	Tamanho	Soro Fisiológico (dias)	Soro Fisiológico + Soro de Coelho (dias)	Soro Fisiológico + NAG
1	Curta	-	-	3
	Média	-	-	3
	Longa	1	-	3
2	Curta	-	-	2
	Média	1	1	2
	Longa	1	1	2
3	Curta	-	1	1
	Média	-	4	4
	Longa	2	6	5
4	Curta	2	1	4
	Média	8	2	7
	Longa	8	-	4
5	Curta	1	1	5
	Média	3	2	4
	Longa	3	-	1
6	Curta	4	1	4
	Média	3	1	4
	Longa	3	-	1
7	Curta	-	1	-
	Média	5	2	1
	Longa	1	1	-
8	Curta	1	1	-
	Média	7	5	1
	Longa	5	2	-
9	Curta	1	1	-
	Média	4	2	2
	Longa	2	-	-

Tabela 5: Tempo de Sobrevivência de *Borrelia burgdorferi* mantidas em soro fisiológico, soro fisiológico adicionado de soro de coelho ou soro fisiológico adicionado de NAG.

Tubo	Soro Fisiológico (dias)	Soro Fisiológico	Soro Fisiológico
		+ Soro de Coelho (dias)	+ NAG (dias)
1	9	4	5
2	8	2	6
3	6	11	6
4	11	3	12
5	3	3	6
6	11	2	11
7	8	7	6
8	10	7	6
9	8	6	7

Tabela 6: Motilidade de *Borrelia burgdorferi* mantida em soluções de soro fisiológico puro ou acrescidas de soro de coelho ou NAG.

	Motilidade				
	++++	+++	++	+	-
Soro Fisiológico	8	8	7	9	9
Soro Fisiol. + Soro de Coelho	5	6	3	8	9
Soro Fisiol. + NAG	7	6	6	8	9
Total	20	20	16	25	27

++++ = excelente motilidade +++ = boa ++ = razoável + = lenta - = imóvel

5 DISCUSSÃO

5.1 Meios de Cultura

O cultivo de *B. burgdorferi* sensu lato apresenta dificuldades tanto pela quantidade de nutrientes requeridos e que favorecem a contaminação, quanto pela própria longo período de multiplicação *in vitro*. Em nosso estudo não foi observado crescimento de *B. burgdorferi* ou *B. garinii*, na forma típica de espiroqueta nos meios BHI, caldo Brucella ou Dubos em nenhum dos pHs, com ou sem soro ou com extrato de levedura. Em meio BSK sem soro ou com soro de coelho pH 7,5 houve um bom crescimento das células. A utilização de soro equino também permitiu o bom crescimento das espiroquetas que apresentaram motilidade excelente e boa quase não havendo motilidade lenta. A literatura não cita a utilização de soro de equino em BSK entretanto pode ser adicionado ao meio de cultura como um substituto de líquido ascítico humano suportando o desenvolvimento de células desde que o pH esteja entre 7,0 e 8,0 (BARBOUR & HAIES, 1986). OLIVEIRA, 2002 cultivou *B. burgdorferi* e *B. garinii* em meios enriquecidos com diferentes substratos, como os soros de coelho, suíno ou equino, extrato de levedura ou vitamina B12. A autora também variou o pH desses meios em 6,4 até 7,5. Em pH 7,5 com soro de coelho o crescimento foi exuberante. Resultado variável foi observado nos diferentes pHs o mesmo acontecendo nos meios BHI, Dubos e caldo Brucella. BRORSON e BRORSON, (1997) consideraram a ausência de soro de coelho no meio de cultura BSK como uma condição desfavorável ao cultivo de *B. burgdorferi*. FRASER *et al.* (1997) destacaram a importância do soro nos meios de cultura, devido a aparente incapacidade de *B. burgdorferi* promover a síntese de aminoácidos, ácidos graxos, co-fatores de enzimas e nucleotídeos. O soro, entretanto não deve ser considerado o elemento mais importante na composição do meio de cultura, mas sim, um ingrediente que juntamente com outro fornece os nutrientes para o desenvolvimento das borrelíias. Destacamos que em meio BSK comercial sem soro as espiroquetas desenvolveram-se apresentando bom crescimento.

Para *B. garinii* em meio BSK pH 5,0 apenas células imóveis estavam presentes. Em pH 6,0 e 7,0 observou-se células com motilidade boa e excelente. O resultado desse experimento em pH 7,0 confere com os observados por OLIVEIRA, 2002 que cultivou *B. burgdorferi* e *B. garinii* em meios com pH variando entre 6,4 e 7,5. Microrganismos de forma geral são capazes de se desenvolverem em faixas estreitas de

pH. (BROOKS *et al.*, 2001.). A regulação do pH interno é conseguida através de mecanismos de transporte de prótons na membrana citoplasmática que inclui uma bomba de prótons impulsionada por ATP e uma troca de Na^+/H^+ (BROOKS *et al.*, 2001). Como células bem móveis em crescimento, excelente puderam ser encontradas nos pHs 6,0 e 7,0 é possível afirmar que as células conseguiram manter o pH interno.

De acordo com BARBOUR & HAYES, (1986) a composição do meio de cultura influencia o tamanho da célula.

5.2 - Morfologia

Vários autores descreveram alterações na morfologia típica de *B. burgdorferi* observadas em diferentes situações consideradas desfavoráveis como pH (BRUCK *et al.*, 1995), antibióticos (KERSTEN *et al.*, 1995; LUBKE e GARON, 1997), ausência de soro no meio de cultura (ALBAN *et al.*, 2000). Estas estruturas foram citadas na literatura com diferentes nomes. Esferoplastos (BRUCK *et al.*, 1995; MURSIC *et al.*, 1996), cistos (BRORSON e BRORSON, 1997; ALBAN *et al.*, 2000; OLIVEIRA, 2002). BRORSON e BRORSON, (1998) referem-se às estruturas observadas por BRUCK *et al.*, (1995) como sendo as mesmas. MURSIC *et al.*, (1996), relataram a presença de formas atípicas e várias estruturas esféricas em cultivos de *B. burgdorferi* oriunda de pacientes que receberam tratamento antibiótico. As células tinham um tamanho alongado e algumas apresentaram grânulos. Os autores observaram que o número de células imóveis e a formação de cistos aumentaram conforme aumentava o período de incubação. Através do microscopia eletrônica detectou-se *B. burgdorferi* alongada com cistos separados ou ocasionalmente aderidos ao final ou ao meio de espiroquetas normais. Os cistos tinham aspecto interno não definível, mas podiam ser diferenciados em inteiros ou vazios. BRORSON e BRORSON, (1997) descreveram a morfologia de cistos observada à microscopia de campo escuro como sendo estruturas arredondadas, de tamanho variável e que podiam apresentar movimento se algo em seu interior se movesse. Tais observações resultaram do cultivo de 1 mês. *B. burgdorferi* em meio BSK Os autores sugeriram que sejam formas alternativas adotadas em condições desfavoráveis. Segundo BRORSON & BROSON, (1998) os cistos retornam à forma de espiroquetas após serem recolocados em meio BSK. ou segundo. GRUNTAR *et al.*, (2001) provou a reversibilidade de cistos de *B. garinii in vivo* após inoculação em camundongos. OLIVEIRA, (2002) observou cistos nos meios que receberam

antibióticos, que conferiram ao meio condição desfavorável. Sendo *B. burgdorferi*, microrganismo tão exigente, esperávamos encontrar apenas células imóveis, sem espirais características ou cistos. Os resultados foram superiores ao esperados e estão registrados nas tabelas 7, 8 e 9. Análise microscópica de *B. burgdorferi* em meio com antibiótico permitiu a KERSTEN *et al.*, (1995) descreverem alterações na forma desse microrganismo. Os autores observaram agregados ou grânulos imóveis e corpos esféricos livres ou ligados à espiroqueta. após 18 horas de incubação. Grânulos, vesículas ou gemas podiam ser localizados no meio ou ao final das espiroquetas. À microscopia eletrônica revelou-se que essas estruturas foram resultado da pronunciado alongamento e germinação do envelope externo dando origem a vesículas, gemas e corpos esféricos que formaram-se em associação com a borrelia ou foram lançados no meio de cultura. BRUCK *et al.*, 1995 descreveram a presença de células esféricas, semi-translúcidas em agregados nas etapas de preparação de esferoplastos

Cistos foram observados após uma semana de cultivo em meio BSK sem soro por BRORSON & BRORSON, (1997) e após 6 semanas de cultivo não havia mais espiroquetas presentes no meio. Os cistos possuíam baixa atividade metabólica em meio BSK, pois não houve mudança de coloração do meio.

5.3 Motilidade e soluções

Neste estudo observou-se células com excelente motilidade em solução fisiológica, sem qualquer fonte de nutrientes e por período de tempo variável. Apesar da solução fisiológica ser utilizada para promover diluições seriadas de microrganismos, esperava-se que bactérias tão exigentes para serem cultivadas *in vitro* (HOLT *et al.*, 1994) não sobrevivessem em meio tão pobre.

A motilidade das células é um dos parâmetros analisados para qualificação dos cultivos e vários fatores podem interferir na velocidade dos mesmos. A composição dos meios de cultura interfere neste parâmetro e deve ser levado em consideração no momento da microscopia. Foi dessa maneira que se chegou à formulação do meio BSK-II (POLLACK *et al.*; 1993). Dentre diferentes combinações testadas para o cultivo de *B.*

burgdorferi, escolheu-se a que foi capaz de preservar a motilidade e o bom desenvolvimento das células (POLLACK *et al.*; 1993). De acordo com LI *et al.*, (2000) *B. burgdorferi* mantém sua motilidade ainda que o meio seja viscoso. Substâncias que podem dar esse aspecto ao meio são o ágar e a gelatina. OLIVEIRA, (2002) obteve bom crescimento de *B. burgdorferi* e *B. garinii* em meios com diferentes concentrações de ágar. No presente trabalho não foi adicionada gelatina a nenhum dos meios; nos meios em que havia ágar espiroquetas móveis não foram encontradas e as lâminas examinadas à microscopia demoravam mais tempo para ressecar. As lâminas com espiroquetas das soluções apresentavam-se ressecadas em pouco tempo. Por essa razão optou-se pela microscopia em aumento de 160X, que permitiu a observação do campo antes do ressecamento.

A utilização de quatro cruces (+ + + +) quando espiroquetas são observadas diretamente no sangue é indicativo de células que se apresentam com vigorosa motilidade (LABRUNA *et al.*, 1999). No presente trabalho optou-se pelo uso da mesma simbologia para qualificação da motilidade a partir de observações feitas no meio BSK.

SHI *et al.*, (1998), demonstraram o efeito quimiotático de diversas substâncias sobre *B. burgdorferi*. Valores de pH acima de 8,4 e abaixo de 6,5 tiveram efeito repelente sobre as células que ainda conseguiram apresentar alguma motilidade em faixa de pH variando entre 4,0 e 9,0. Esses autores observaram que a alta concentração de NaCl promoveu o aumento da motilidade, mas essa característica seria dirigida pela força motriz de prótons (1998). Afirmaram esses pesquisadores que a motilidade de *B. burgdorferi* requer alta concentração de NaCl e pH 7,6. Em nosso trabalho observamos células com excelente motilidade em solução com 0,9% de NaCl.

Em seu estudo sobre o movimento de *B. burgdorferi* GOLDESTEIN *et al.*, (1994) propuseram que as variações de movimento apresentado por *B. burgdorferi* ocorreriam em função da interação dos flagelos com o protoplasma cilíndrico e da interação entre os flagelos nas duas extremidades da célula. Os flagelos em extremidades opostas rotacionariam para lados diferentes. O encontro na região central da célula de ondas que se moviam em direção oposta resultaria no movimento de flexão com forma de U. Esse tipo de movimento foi observado no presente trabalho. Na solução fisiológica acrescida de soro de coelho espiroquetas que estavam em linha reta flexionaram-se até formarem um ângulo de 90° e posteriormente mantiveram um ângulo de 145° sempre girando sobre seu próprio eixo. Em soro fisiológico flexionaram-se em forma de V com boa motilidade. Em solução fisiológica com N-acetil glucosamina

(NAG) as células apresentaram movimento de flexão em U, em L (ângulo de 90°), em círculo e em “degrau”.

A adição de melitina ao meio de cultura promove uma diminuição da motilidade num período tempo que varia de acordo com as concentrações de antibióticos (LUBKE e GARON, 1997). Antibióticos também podem ter um efeito de estímulo à motilidade. Estudos realizados por LAKOS e NAGY, (1999) permitiram a conclusão de que pequenas concentrações de pefloxacina no meio de cultura aumentaram a propagação e metabolismo de *B. garinii*. Efeito contrário foi produzido com doxiciclina e ceftriaxona. *B. burgdorferi* mantida em solução aquosa de metronidazole e 0,9% de NaCl apresentou-se imóvel, sem multiplicação após 4 dias em incubação à 30°C (BRORSON & BRORSON, 1999).

NAG é um componente estrutural da célula, entretanto pode ser fonte energética.. *B. burgdorferi* tem a capacidade de metabolizar NAG em frutose-6-fosfato que entra no ciclo glicolítico através de duas enzimas: N-acetilglicosamina-6-fosfato diacetilase e glucosamina-6-fosfato isomerase (FRASER,1997).

Relato de perda de motilidade foi feito por ALBAN *et al.*, (2000) ao cultivar *B. burgdorferi* em meio RPMI sem soro. Nesse experimento as observações microscópicas realizadas até o 8º dia mostraram que apenas no dia de inoculação as células apresentaram-se móveis. No presente estudo células com vigorosa motilidade foram observadas em meio BSK³ comercial sem soro ou acrescido de soro de coelho ou equino e nas 3 diferentes soluções testadas; a ausência de soro em meio BSK não foi impedimento à motilidade das células. Nossos dados diferem dos resultados apresentados por ALBAN *et al.*, (2000), mas estão de acordo com OLIVEIRA, (2002) que cultivou *B. burgdorferi* em BSK comercial sem soro.

³ Sigma

6 CONCLUSÕES

1. Os diferentes meios utilizados propiciaram a observação de variações na morfologia de *B. garinii* e *B. burgdorferi*, bem como a formação de cistos
2. *B. burgdorferi* foi capaz de sobreviver em solução fisiológica pelo período variando de 2 a 11 dias
3. Adição de soro de coelho ou n- acetil glucosamina à solução fisiológica não aumentou o tempo de sobrevivência da *Borrelia burgdorferi*.

7 REFERÊNCIAS

- ABEL, I. S. 1999. 87p **Investigações preliminares sobre espiroquetídeos e seus potenciais vetores procedentes da Reserva Floresta de Morro Grande, Município de Cotia-SP**. São Paulo: Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- ALBAN, P. S.; JOHNSON, P. W.; NELSON, D.P. 2000. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *B. burgdorferi*. **Microbiol.** **146**: 119-127.
- BARATON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIRON, I. 1992. Delineation of *B. burgdorferi* sensu strictu, *B. garinii* sp. nov., and Group VS461 Associated with Lyme Borreliosis. **Internat. J. Systematic Bacteriol.** **42** (3): 378-383.
- BARBOUR, A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale J. Biol. Med.** **57**: 521-525.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. 1986. Biology of *Borrelia* species. **Microbiol. Rev.** **50**(4):381-400
- BARBOZA, W. G. A.; ALMEIDA Jr., D. E.; SILVA, L. A. M.; FONSECA, A. H. 1998. Detecção de *Borrelia* spp em gambás (*Didelphis aurita*) imunossuprimidos com ciclofosfamida. **Rev. Bras. Med. Vet.** **20**(6):241-243.
- BARRMAND, A. R.; NECKOUI, H. ARDEKANI, A. M. 1996. Nuevo medio sólido para el crecimiento de *B. persica* e *B. microti*. **Rev. Cubana Med. Trop.** **48**(1).
- BARROS, P. J. 1995. 82p. **Contribuição ao conhecimento da doença de Lyme no Brasil**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- BARROS, P. J. 2000. **Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e reação em cadeia de polimerase**. Tese: Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 163p.
- BARROS-BATTESTI. **Estudo de carrapto e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à *Borrelia*, no município de Itapevi, estado de São Paulo**. 1998. 116p. Tese (Doutorado)-Dep. Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- BERGER, B. W.; JOHNSON, R. C.; KODNER, C.; COLEMAN, L. 1992. Cultivation of *B. burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. **J. Clin. Microbiol.** **30**(2):359- 361.
- BOCKENSTEDT, L. K.; MAO, J.; HODZIC, E.; BARTHOLD, S. W.; FISH, D. 2002. Detection of attenuated, noninfectious spirochetes in *B. burgdorferi* – infected after antibiotic treatment. **J. Infectious Diseases** **186**: 1430-1437.

BONOLDI, V. L. N. 2001, 108. **Estudo da resposta linfoproliferativa aos antígenos da *B. burgdorferi* nos pacientes com doença de Lyme símile na população brasileira.** Dissertação: Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Fundamentos de Microbiologia. Em: **Microbiologia Médica.** 21ªed. 1-87.

BRORSON & BRORSON, S. H. 1997. *Transformation of cystic forms of B. burgdorferi to normal, mobile Spirochetes* **Infection** **25** (4): 240-246.

BRORSON & BRORSON, S. H. 1998. A rapid method for generation cystic forms of *B. burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. **APMIS** **106**: 1131-1141.

BRORSON e BRORSON, S. H. 1999. An *in vitro* study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *B. burgdorferi* to metronidazol. **APMIS** **107**: 566-576.

BRUCK, D. K.; TALBOT, M. L.; CLUSS, R. G.; BOOTHBY, J. T. 1995. Ultrastructural characterization of the stages of spheroplast preparation of *B. burgdorferi*. **J. Microbiol. Methods.** **23**: 219-228.

CALLISTER, S. M.; CASE, K. L.; AGGER, W. A.; SCHELL, R. F.; JOHNSON, R. C.; ELLINGSON, J. L. E. 1990. Effects of bovine serum albumin on the ability of BSK medium to detect *B. burgdorferi*. **J. Clin. Microbiol.** **28** (2): 363-365.

CARROL, J A.; GARON, C. F.; SCHWAN, T. G. 1999. Effects of environmental pH on membrane proteins in *B. burgdorferi*. **Infection Immunity** **67** (7): 3181-3187.

DAVINSON, M. M.; EVANS, R.; LING, C. L.; WISEMAN, A. D.; JOSS, W. L.; HO-YEN, D. O. 1999. Isolation of *B. burgdorferi* from ticks in the Highlands of Scotland. **J. Med. Microbiol.** **48**: 59-65.

FE, A. 1993. Maintenance of infective *B. burgdorferi* SH-2- 82 in 4% oxygen, 5% carbon dioxide *in vitro*. **Can. J. Microbiol.** **39** (12): 1103-1110.

FLORIÃO, R. A. 1994. **Borreliose de Lyme: determinação de manifestações peculiares a BL entre os pacientes que frequentam o HUCFF.** Tese: Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FRASER, C. M.; CASJENS, S.; HUANG, W.M. *et al.* 1997. Genomic sequence of a Lyme spirochaete. *B. burgdorferi*. **Nature.** **390** (11): 580-586.

GRUNTAR, I.; MALOVRH, T.; MURGIA, R.; CINCO, M. 2001. Conversion of *B. garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. **APMIS** **109** 383- 388

GRAB, D.J.; KENNEDY, R.; PHILIPP, M. T. 1996. *B. burgdorferi* possesses a collagenolytic. **FEMS Microbiol. Letters.** **144**: 39-45.

HOLT, J. G.; KRIEG, P. H. A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, A.T. 1994. The spirochetes. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** 9^a.ed. Baltimore p.27-37

HU, C. M.; SIMON, M.; KRAMER, M.D.; GERN, L. 1996. Tick factors and *in vitro* cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *B. garinii* isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. **Infection** **24**(3):251-257.

HUBÁLEK, H.; HALOUZKA, J.; HEROLDOVA, M. 1998. Growth temperature ranges *B.burgdorferi* sensu lato strains. **J. Med. Microbio.** **47**: 929-932.

HUDSON, B. J.; STEWART, M.; LENNOX, V. A.; FUKUNAGA, M.; YABUKI, M.; MACORISON, H.; SMITH, J.K. 1998. Culture positive Lyme borreliosis. **MJA** **168**: 500-502.

ISHIKAWA, M. M. 1996, 51p. **epidemiologia da borreliose de Lyme na região Sudeste do Brasil e Padronização do diagnóstico sorológico.** Tese de Mestrado. Curso ed pós-graduação em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ISHIKAWA, M. M. 2000, 84p. **Pesquisa de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em condições experimentais e de infecções naturais em bovinos.** Tese Doutorado em Med. Vet.- Parasit. Vet.:Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

JOHNSON, R. C.; SCHMID, G.P.; HYDE, F.W.; STEIGERWALT, A.G. BRENNER, D.J. 1984 *B.burgdorferi* sp.: Etiologic Agent of Lyme Disease. **Internat. J. of Systematic Bacteriol.**, **34** (4): 496-497.

JOHNSON, S. E.; KLEI, G. C.; SCHMID, G. P.; BOWEN, G. S.; FEELEY, J. C.; SCHULZE, T. 1984. Lyme disease: a selective medium for isolation of the suspected etiological agent , a spirochete. **J. Clin. Microbiol.** **19** (1): 81-82.

JOPPERT, A. M. **Estudo soro-epidemiológico da infecção por *B. burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo.** 1995. 83p. Dissertação: Mestrado-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

KELLY, R. 1971. Cultivation of *B. hermsii*. **Science** **173**: 443. .

KERSTEN, A.; POITSCHKEK, C.; RAUCH, S.; ABERER, E. 1995. Effects of penicillin, ceftriaxona, and doxycycline on morphology of *B.burgdorferi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** **39** (5): 1127-1133.

LABRUNA, M. B.; RESENDE , J. S.; MARTINS, N. R. S.; JORGE , M. A. 1999. Cryopreservation of an avian spirochete strain in liquid nitrogen. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.****51** (6).

LAKOS, A.; NAGY, G. 2000. Effect of an antibiotic combination on the propagation of *B. burgdorferi* ,causative agent of Lyme disease. **Orv. Hetil** **141** (2) : 106-111.

LEVINE, J. F.; DYSTRA, M. J.; NICHOLSON, W. L.; WALKER, R. L.; MASSEY, G. 1990. Attenuation of *B. anserina* by serial passage in liquid medium. **Research in Veterinary Science**, **48**:64-69.

LI, C.; MOTALEB, A.; SAL, M.; GOLDSTEIN, S. F.; CHARON, N. W. 2000. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** **2** (4): 345-354.

LUBKE, L. L.; GARON, C. F. 1997. The antimicrobial agent melittin exhibits powerful *in vitro* inhibitory effects on the Lyme disease spirochete. **Clin. Infect. Dis.** **25**(suppl 1): S58-S51

MARASPIN, V.; RUZIC-SABLJIC, E.; CIMPERMAN, J.; LOTRIC-FURLAN, S.; JURCA, T.; PICKEN, R. N.; STRLE, F. 2001. Isolation of *B. burgdorferi* sensu lato from blood of patients with erythema migrans. **Infection** **29** (2): 65-70.

MARASPIN, V.; RUZIC-SABLJIC, E.; STRLE, F. 2002. Isolation of *B. burgdorferi* sensu lato from a fibrous nodule in a patient with acrodermatitis chronica atrophicans. **J. Infect. Dis.** **186** (10): 1430-1437.

MARQUES, A.R.; STOCK, F.; GILL, V. 2000. Evaluation of a new culture medium for *B. burgdorferi*. **J. of Clin. Microbiol.** **nov. 38** (11): 4239-4241.

MOTALEB, M. A.; CORUM, L.; BONO, J. L.; ELIAS, A. F.; ROSA, P.; Samuels, D. S. 2000. *B. burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. **PNAS** **97** (20): 10899-10904

NOWAKOWSKI, J.; SCHWARTZ, I.; LIVERIS, D.; WANG, G.; AGUERO-ROSENFELD, M. E.; GIRAO, G.; MCKENNA, D.; NADELMAN, R.B.; CAVALIERI, F.; WORMSER, G.P. 2001. Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. **Clin. Infect. Dis.** **33**:2023-2027.

OBONYO, M. MUNDERLOLOH, U.G.; FINGERLE, V.; WILSKE, b.; KURTTI, T. J. 1999. *B. burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. **J. Clin. Microbiol** **37**(7):2137- 2141.

OBONYO, MARYGORRET.; MUNDERLOH, U. G.; SAM, T.H.; KURTTI, T. J. 2002. Cultivation at 37°C enhances *B. burgdorferi* sensu stricto infectivity for hamsters. **Med. Microbiol. Immunol.** **191**: 33-39.

OLIVEIRA, A.. 2002. **Cultivo de *B. burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em diferentes meios.** Tese de Doutorado. Curso de pós graduação em Ciências Veterinárias: Sanidade Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 114p.

PHILLIPS, S.E.; MATTMAN, L.H.; HULÍNSKA, D.; MOAYAD, H. 1998. A proposal for reliable culture of *B. burgdorferi* from patients with chronic Lyme disease, even from those previously aggressively treated. **Infection** **26**:6364-367.

- POLLACK, R. J.; TELFORD III, S. R.; SPIELMAN, A. 1993. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. **J. Clin. Microbiol.** **31** (5): 1251-1255.
- PREAC-MURSIC, V.; WILSKE, B.; REINHARDT, S. 1991. Culture of *B. burgdorferi* in six solid media. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **10** :1076-1079.
- RAMAMOORTHY, R.; MEEKER, D. S. 2001. *B. burgdorferi* proteins whose expression is similarly affected by culture, temperature and pH. **Infection immunity** **69** (4):2739-2742.
- SALLES, R. S. 2002. 104p. **Borreliose de Lyme em equinos no estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado. Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias - Sanidade Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SOARES, C. O. 1998. 80 p. **Estudo da borreliose canina: sorodiagnóstico, soroepidemiologia e análise interativa com a babesiose canina**. Tese de Mestrado. Curso de pós-graduação em Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SOARES, C. O. 2000.; ISHIKAWA M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H.; 2000. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Vet. Brasileira** **20** (1): 1 19.
- SPECK, S.; REINER, B.; WITTENBRINK, M. M. 2001. Isolation of *B. afzelii* from a dog. **Vet. Rec.** **149**: 19-20.
- SPECK, S.; FAILING, K.; REINER, B.; WITTENBRINK, M. M. 2002. Evaluation of different media and a BGM cell culture assay for isolation of *B. burgdorferi sensu lato* from ticks and dogs. **Vet. Microbiol.** **89** (4): 291-302.
- STEERE, A. C. Lyme disease. 2001. **N. Engl. J. Med.** **345**(2):115-124. July,12.
- TILTON, R.C.; BARDEN, D.; SAND, M. 2001. Culture of *B. burgdorferi*. **J. of Clin. Microbiol.** **39**(7):247.
- WANG, J.; MASUZAWA, T.; YANAGIRA, Y. 1997. Characterization of *B. garini* isolated from Lyme disease patients in Hokaido, Japan, by sequence analysis of OspA and OspB genes. **FEEMS Microbiol Letters** **154** (2): 371-375.
- WILLIAMS, L. R.; AUSTIN, F.E. 1992. Hemolytic- activity of *B. burgdorferi*. **Infection and Immunity.** **60**(8): 3224-3230 Aug
- WILSKE, B. 2002. Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis. **Int. J. Med. Microbiol.** **291**(33): 114-119.
- WORMSER, G. P.; NOWAKOWSKI, J.; NADELMAN, R. B.; BITTKER, S.; COOPER, D.; PAVIA, C. 1998. Improving the yield of blood cultures for patients with early Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.** **36** (1): 296 – 298.