

## NOTA DE PESQUISA

**OCORRÊNCIA DE *Borrelia* spp. EM CULTURA DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**JANIA DE REZENDE<sup>1</sup>; RAUL H. KESSLER<sup>2</sup>; CLEBER O. SOARES<sup>2</sup>; ODAIR P. MARTINS<sup>3</sup>

**ABSTRACT:-** REZENDE, J. DE; KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MARTINS, O.P. [Occurrence of *Borrelia* spp. in culture of embryonic cells of the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the state of the Mato Grosso do Sul, Brazil]. Ocorrência de *Borrelia* spp. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p.50-52, 2008. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica RJ 23890-000, Brasil. E-mail: jan\_rezende@yahoo.com.br

The aim of the present work was to report the occurrence of *Borrelia* spp. in embryonic cell cultures from naturally infected *Boophilus microplus*. Seven days after the beginning of a primary culture of embryonic cells of *B. microplus* at 31°C was noted that the cells start suffering degeneration. Under examination at phase contrast microscope, the presence of prolonged microorganisms with great mobility was detected. Microscopic slides of the culture supernatant, hemolymph and egg mass, were stained by May Grünwald-Giemsa, allowing the visualization of the spirochetes. The morphologic examination of the microorganism and its visualization in *B. microplus*, suggest to be *Borrelia* spp.

**KEY WORDS:** *Borrelia* spp., Tick, cell culture, hemolymph.

**RESUMO**

O presente trabalho teve como objetivo reportar a ocorrência de *Borrelia* spp. em culturas de células embrionárias de *Boophilus microplus* infectados naturalmente. Sete dias após o início de uma nova cultura primária de células embrionárias do carrapato *B. microplus*, incubadas a 31°C, notou-se que as células começaram a degenerar. Ao exame em microscópio de contraste de fase detectou-se a presença de microrganismos alongado e com grande mobilidade. Lâminas de microscópio confeccionadas com amostras do sobrenadante da cultura, hemolinfa e massa de ovos, coradas pelo May Grünwald-

Giemsa, permitiram a visualização de espiroquetas. O exame morfológico do microrganismo e sua visualização em *B. microplus* sugere ser *Borrelia* spp.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Borrelia* spp, carrapato, cultivo celular, hemolinfa.

*Borrelia* spp Swellengrebel, 1907 são bactérias do grupo das espiroquetas, agentes etiológico da doença de Lyme, transmitidas para humanos, animais domésticos e silvestres, por artrópodes hematófagos. A primeira observação de espiroquetas no sangue de ruminantes foi registrada por Arnold Theiler em 1902, na África do Sul, denominado *B. theileri* Laveran (1903). É transmitida por carrapatos ixodídeos, principalmente *B. microplus* (SMITH; ROGERS, 1998). Outras duas espécies de *Borrelia* que infecta ruminante são *B. coriacea* que causa o aborto epizootico bovino, e têm como vetor *Ornithodoros coriaceus* e a *B. burgdorferi* responsável pela borreliose de Lyme, que também acomete o homem, seus vetores são *Ixodes* spp. e *Amblyomma americanum* Soares et al. (2000).

<sup>1</sup> Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica RJ 23890-000, Brasil. Bolsista do (CNPq). E-mail: jan\_rezende@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte (CNPGC), BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, Campo Grande, MS 79002-970.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Felinto Miller, s/n, Cidade Universitária, Campo Grande, MS 79070-900.

Poucas espécies de *Borrelia* têm sido cultivadas *in vitro* em meio líquido, porém baixos níveis de crescimento são obtidos (KRIEG et al., 1984).

O Estado de Mato Grosso do Sul (MS), com um rebanho estimado de 25 milhões de cabeças, tem na bovinocultura, uma das principais atividades econômicas. Ademais, não é conhecida a importância epidemiológica da infecção por *Borrelia* spp. em bovinos no nosso meio. O objetivo deste trabalho foi reportar a ocorrência de *Borrelia* spp. em culturas de células embrionárias de *B. microplus* infectadas naturalmente.

Cultura primária de células embrionária do carrapato *B. microplus*, segundo metodologia Yunker (1987), eram mantidas no laboratório de hemoparasitologia da Embrapa Gado de Corte – MS, provenientes de uma colônia de *B. microplus*, livre de hemoparasitos. Com sete dias de cultivo, as células embrionárias apresentaram-se degeneração celular. Ao exame em microscópio de contraste de fase detectou-se a presença de microrganismos alongados e com grande mobilidade. A cultura de células era mantida em meio Leibovitz's (L-15) com glutamina, suplementado com 10% de caldo triptose fosfato, 20% de soro fetal bovino, 0,1% fração V de albumina bovina e antibiótico gentamicina 50.000ug/ml, e pH 6,8, incubada em estufa tipo BOD, a 31°C. O meio de

cultura extraído semanalmente do cultivo, foi centrifugado a 572g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma gota do sedimento transferida, para uma lâmina de microscópio, cobrindo-se com lamínula. O material foi examinado a fresco em microscópio óptico de contraste de fase com objetiva de 100X e ocular de 10X. Uma gota foi distribuída sobre lâmina, fixada com álcool metílico, e corada com May-Grünwald/Giemsa, sendo observada com objetiva 100X de imersão e ocular de 10x. Teleóginas caídas dos bezerras estábulados (três animais de raça holandesa), após a conclusão do ciclo parasitário foram, inicialmente, lavadas com água. Na capela de fluxo laminar vertical as teleóginas foram superficialmente esterilizadas segundo metodologia de Yunker (1987). Após, colocadas em placas de Petri e incubadas em estufa a 28 °C e 80% de umidade relativa. Procederam-se os exames de hemolinfa e da massa ovígera de um grupo de 30 teleóginas. Gotas de hemolinfa, de cada teleóquina, foram colhidas diariamente no período de um a 12 dias pós-repleção. Grupos de cinco ovos foram macerados, sendo removidas as cascas. As lâminas foram fixadas com álcool metílico e corado com May-Grünwald/Giemsa. Dos animais doadores de carrapato, realizou-se esfregaço de sangue, fixando com metanol e corado com May-Grünwald/Giemsa.

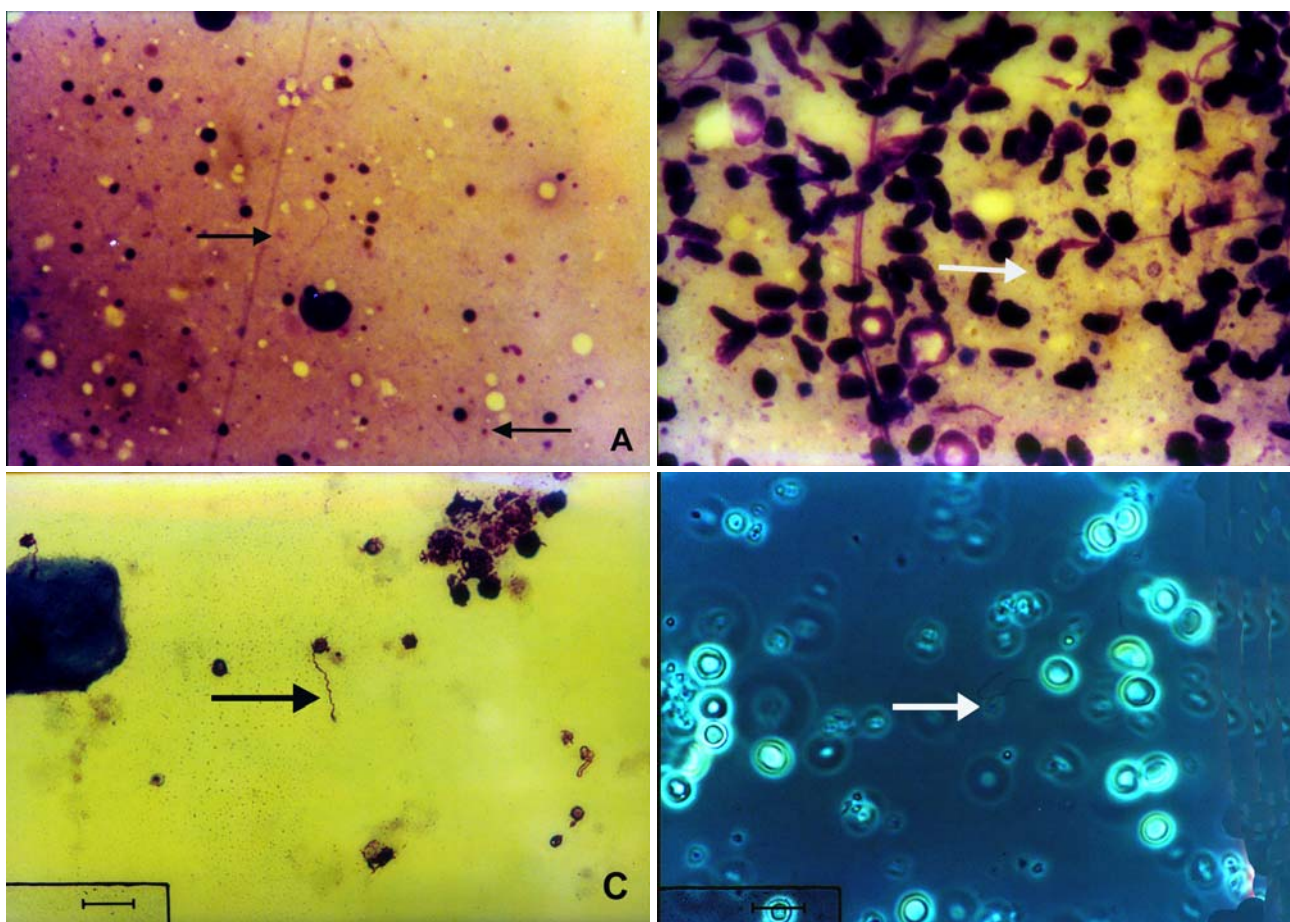


Figura 1. *Borrelia* spp. (A) em hemolinfa de *B. microplus*, (B) em ovos macerado de *B. microplus*, (C) em sobrenadante da cultura de células *B. microplus* GIEMSA (100x). (D) em sobrenadante de cultura de células– Lâmina a fresco, (100x).

O exame de hemolinfa resultou positivo para a espiroqueta *Borrelia* spp. em seis teleóginas no 10º dia pós-repleção (Figura 1A). O exame dos ovos das teleóginas foi positivo do primeiro ao sexto dia após postura (Figura 1B). Nas preparações do sobrenadante do meio de cultura das células embrionárias de *B. microplus*, tanto nas preparações coradas e a fresco, foram encontradas espiroquetas (Figura 1C e 1D). Não identificou-se espiroqueta nos esfregaços de sangue dos bezerras doadores dos carrapatos. As culturas de células embrionárias de *B. microplus* foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido, visualizando degeneração celular.

Somente na observação em contraste de fase, a espiroqueta mostrou-se alongada com muita mobilidade, embora sem espiras. Contudo o grupo das *Borrelia* spp. são mais pleomórficos do que *Leptospira* spp. e *Treponema* spp. (SMITH; ROGERS, 1998). Estas bactérias distinguem-se morfológicamente dos demais gêneros da família Spirochaetaceae por serem maiores, possuírem maior número de flagelos periplasmáticos e menor número de espiras (QUINN et al., 1994). Até o presente, não há registros de encontro de *Borrelia* spp. em cultivo de células de carrapatos infectado naturalmente. Ademais nenhum relato deste gênero no Estado de MS.

No Brasil são poucos relatos de achados de espiroquetas do gênero *Borrelia* spp. embora seja grande a distribuição geográfica tanto de hospedeiros vertebrados como invertebrados para este gênero. Embora, Martins et al. (1996), observaram *B. theileri* em exames de hemolinfa de uma fêmea de *B. microplus*. Fizeram identificação desta espiroqueta como *B. theileri*, que foi seguida dos achados de alguns autores e levando em consideração o carrapato vetor e as características morfológicas do organismo espiralado. A espiroquetose dos ruminantes é cosmopolita, ocorrendo em todas as regiões onde existem seus potenciais transmissores (VIVAS et al., 1996). A Replicação de *B. theileri* em carrapato *B. microplus* mostra ser maior, do que em sangue de bovinos (SMITH; ROGERS, 1998). *Borrelia theileri* é importante por infectar hospedeiros vertebrado e invertebrado podendo interferir na interpretação de dados experimentais e de diagnóstico sorológico, sendo provavelmente endêmico em populações de uma ou mais espécies de carrapato e seus hospedeiros do mundo todo (SMITH et al., 1978).

Crescimento de *B. burgdorferi* inoculadas em células de linhagem de *Rhipicephalus sanguineus* foi relatado por Kurtti et al. (1993). Ainda, Kurtti et al. (1993), relatam que o cultivo de tecidos de carrapatos pode contribuir para esclarecimento dos mecanismos de aderência celular, migração dentro do hospedeiro, mecanismos de transmissão e a interação da espiroqueta com células do hospedeiro. Ademais, espiroqueta não parece ser altamente específica, embora têm sido observadas diferenças em suas afinidades por células embrionárias de diferentes espécies de carrapatos (KURTTI et al., 1993).

Com base na visualização da espiroqueta no carrapato vetor, sugere-se que o microrganismo encontrado pertence ao gênero *Borrelia*. É necessária uma caracterização morfogenética, para identificação da espécie. Foi possível também observar transmissão transovariana desta espiroqueta. Desta forma, as células embrionárias de *B. microplus* têm potencial para serem utilizadas como substrato para o cultivo de *Borrelia* spp.

**Agradecimentos:-** Ao Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte (CNPGC), ao Ronaldo Luiz da Silva, técnico do Laboratório de Ectoparasitologia da Sanidade Animal (CNPGC) pelo auxílio na manutenção de colônias de carrapato.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KURTTI, T. J. MUNDERLOH, U.G.; KRUEGER, D. E.; JOHNSON, R. C.; SCHWAN, T. G. Adhesion to and invasion of culture tick (Acarina: Ixodidae) cells by *B. burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. *Journal of Medical Entomology*, v. 30, n.3, 1993.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. The espirochetes. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 8 ed. London: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 38-70.
- MARTINS, J. R.; CORREA, B. L.; CERESER, V. H.; SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 26, n. 3. p.447-450, 1996.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, 1994. p.292-303.
- SMITH, R.D.; BRENER, J.; OSORNO, M.; RISTIC, M. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 32, p.182-190, 1978.
- SMITH, R. D.; ROGERS, A.B. *Borrelia theileri*: A review. *Journal of Spirochetel and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.
- SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n. 1, p.1-19, 2000.
- VIVAS, R.I.R.; AGUILAR, F.C.; ALPIZAR, J.L.D.; GALERA, L.A.C.; CALDERÓN, J.J.S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. *Veterinária (México)*, v. 27, n. 2, p. 187-188, 1996.
- YUNKER, C.E. *Arboviruses in arthropod cells in vitro*. Boca Raton: CRC Press, 1987. 35-51p.

Recebido em 9 de janeiro de 2007.

Aceito para publicação em 18 de dezembro de 2007.