

Identificação morfológica da espiroqueta *Borrelia* spp. no exame da hemolinfa de *Rhipicephalus microplus***Morphological identification of the spirochete *Borrelia* spp in the examination of the hemolymph of *Rhipicephalus microplus***

Recebimento dos originais: 01/07/2018

Aceitação para publicação: 04/09/2018

Nathália de Assis Queiroz

Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: R. Tamandaré, 6000 - Jardim seminário, Campo Grande - MS, 79117-010

E-mail: nathalia.queiroz2@hotmail.com

Stephanie Harue Massaki

Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: R. Tamandaré, 6000 - Jardim seminário, Campo Grande - MS, 79117-010

E-mail: stephaniecoxim2014@gmail.com

João Victor Manzoni de Oliveira

Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: R. Tamandaré, 6000 - Jardim seminário, Campo Grande - MS, 79117-010

E-mail: joao-manzoni@hotmail.com

Bruno Fernandes Albres

Médico Veterinário pela Universidade Católica Dom Bosco

Instituição: Fazenda Avaí

Endereço: Fazenda Avaí, Nioaque-MS

E-mail: albres_vet@hotmail.com

Carina Elisei

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Endereço: R. Tamandaré, 6000 - Jardim seminário, Campo Grande - MS, 79117-010

E-mail: carinaelisei@yahoo.com.br

Jania de Rezende

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Endereço: R. Onória Martins Pereira, 82; 79011-535, Campo Grande, MS, Brasil

E-mail: rezendejania@gmail.com

RESUMO

As bactérias *Borrelia* spp. são transmitidas para humanos, animais domésticos e silvestres por carrapatos da família Ixodidae. Esta espiroqueta pode acometer a doença, borreliose de Lyme-Símile Brasileira e/ou Síndrome Baggio-Yoshinari. No Brasil, a sua epidemiologia e identificação, necessita ser mais bem investigada, pois o exame parasitológico requer acuracidade. Existem evidências da disseminação deste parasitismo, e conseqüentemente maior atenção da saúde Pública. Objetivou-se neste estudo identificar *Borrelia* spp. na hemolinfa de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Foram coletadas fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* de animais bovinos provenientes da fazenda Avaí, do município de Nioaque, Mato Grosso do Sul. As fêmeas foram lavadas com água, desinfetadas superficialmente com álcool a 70°, após foram secas com gases e transferidas para uma placa de Petri e em seguida incubadas para realização da postura. A seguir do início da postura, de 3 dias, a extração de hemolinfa foi realizada a partir de secção dos primeiros pares de patas com auxílio de uma tesoura oftálmica ou através de perfuração superficial na região dorsal com auxílio de agulha de insulina. Gotas da hemolinfa foram transferidas para uma lamina de vidro, após a secagem das amostras, estas foram fixadas com metanol e coradas com May Grünwald-Giemsa. As laminas coradas foram observadas em microscópio de luz, objetiva de 100x. Por meio do exame de hemolinfa foram encontradas as espiroquetas, infectando naturalmente os carrapatos. O exame morfológico do microrganismo e sua visualização em *R. microplus* sugere ser *Borrelia* spp.

Palavras-chave: Borreliose; Carrapato; Hemolinfa.

Apoio financeiro: CNPq

ABSTRACT

The *Borrelia* spp. bacteria are transmitted to humans, domestic and wild animals by ticks of the Ixodidae family. This spirochete may affect the Brazilian Lyme-simile borreliosis disease and/or Baggioyoshinari syndrome. In Brazil, its epidemiology and identification need to be better investigated, since the parasitological examination requires accuracy. There are evidences of the dissemination of this parasitism and consequently greater attention of public health. The aim of this study was to identify *Borrelia* spp. In the hemolymph of females of the tick rhipicephalus microplus. Engorged females of ticks *R. microplus* of bovine animals from the Avaí farm in the city of Nioaque, Mato Grosso do Sul, were collected. The females were washed with water, disinfected superficially with alcohol at 70 °, after they were dried with gases and transferred to a Petri dish and then incubated to perform the posture. After the onset of the 3-day posture, the extraction of hemolymph was performed from the section of the first pairs of paws with the aid of an ophthalmic scissors or through superficial perforation in the dorsal region with the aid of an insulin needle. hemolymph drops were transferred to a glass blade, after drying the samples, they were fixed with methanol and stained with May Grünwald-Giemsa. The stained slides were observed in light microscope, objective of 100x. By means of hemolymph examination, spirochetes were found, naturally infecting ticks. The morphologic examination of the microorganism and its visualization in *R. microplus* suggests being *Borrelia* spp.

Keywords: Borreliosis; Tick; Hemolymph.

1 INTRODUÇÃO

O isolamento e conseqüentemente a caracterização do agente etiológico responsável pela borreliose de Lyme-*símile* Brasileira, ainda é um grande desafio no Brasil. Ainda não sabemos se pertence ao complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) e/ou subtipos de *B. burgdorferi* sensu stricto (ss) ou ainda se são do grupo de espiroquetas relacionadas a febre recorrente epidêmica. Espiroquetas já foram evidenciadas e detectadas no País, em carrapatos, animais e em humanos (Lopes, et al., 2017, Rezende, et al., 2008, 2016, Gonçalves et al. 2013, Mantovani et al., 2012, , Madureira, 2007). As bactérias *Borrelia* spp. são transmitidas para humanos, animais domésticos e silvestres por carrapatos da família Ixodidae. O Estado de Mato Grosso do Sul (MS), com um rebanho estimado de 21,8 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.

As diferentes espécies de espiroquetas dentro do gênero *Borrelia* foram classificadas de acordo com a especificidade da relação parasita-vetor-hospedeiro (HOOGSTRAAL, 1985), porém, existem espiroquetas que não são transmitidas por uma única espécie de vetor, assim como, não infectam uma única espécie de hospedeiro. Desta forma, atualmente sua identificação ocorre pela associação entre estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (BARBOUR; HAYES, 1986). Todas as espécies descritas possuem formato helicoidal que pode variar de 3 a 10 espiras, medem de 4 a 30 µm e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993).

Nos carrapatos, *Borrelia* sp. são primeiramente parasitas da superfície celular, capazes de ocasionar invasão intracelular, e a dinâmica do tropismo e sua subsequente invasão no tecido do carrapato varia entre espécies de borrelias (BURGDORFER 1989). A borrelia nos ovários invade a gema do oócito a partir da hemolinfa, antes da formação da casca dos ovos. A transmissão transovariana pode ser muito eficiente, passagens acima de 5 a 9 gerações de carrapatos têm sido documentados em laboratório (BALASHOV 1968). Em *Borrelia theileri* agente da borreliose bovina, ocorre a penetração no intestino após ingestão, e a invasão de órgãos internos é intensiva, em contraste com *B. burgdorferi* que permanece principalmente no lúmen do intestino ao longo da superfície microvilar das células do intestino (BURGDORFER et al., 1989;).

Os hemócitos dos carrapatos são células vacuolizadas, responsáveis por fagocitar bactérias e protozoários, assim como a saliva, servem como células hospedeiras de uma variedade de microrganismos que se desenvolvem em carrapatos. Poucos são os encontros em exames parasitológicos de *Borrelia* spp. em carrapatos. Objetivou-se, com este estudo, identificar *Borrelia* spp. na hemolinfa de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Foram coletadas fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* de animais bovinos provenientes da fazenda Avaí, do município de Nioaque, Mato Grosso do Sul. As fêmeas foram lavadas com água, desinfetadas superficialmente com álcool a 70°, após foram secas com gases e transferidas para uma placa de Petri e em seguida incubadas para realização da postura. A seguir do início da postura, de 3 dias, a extração de hemolinfa foi realizada a partir de secção dos primeiros pares de patas com auxílio de uma tesoura oftálmica ou através de perfuração superficial na região dorsal com auxílio de agulha de insulina. Gotas da hemolinfa foram transferidas para uma lamina de vidro, após a secagem das amostras, estas foram fixadas com metanol e coradas com May Grünwald-Giemsa. As laminas coradas foram observadas em microscópio de luz, objetiva de 100x.

Após observação das lâminas coradas, constatou-se a presença de espiroquetas *Borrelia* spp, infectando naturalmente os carrapatos. O local de estudo, provavelmente mantém o ciclo desta bactéria, pois conforme Quinn, et. al., (2002) a manutenção de *Borrelia burgdorferi* em uma determinada região depende da presença de hospedeiros reservatórios adequados e de hospedeiros de manutenção de carrapatos. A literatura reforça a presença desta espiroqueta em carrapatos, pois borrelias tem o ciclo transovariano em muitas espécies de carrapato. A borrelia nos ovários invade a gema do oócito a partir da hemolinfa, antes da formação da casca dos ovos. Durante o desenvolvimento embrionário, espiroquetas migram da região da gema para o glânglio (BARBOUR; HAYES, 1986). Com os exames da hemolinfa e ovos macerados, corados com Giemsa foi possível a visualização das espiroquetas em *R. microplus* no Brasil (MARTINS, et. al., 1996; REZENDE et al., 2008). Considerando o exame morfológico do microrganismo e sua visualização em *R. microplus* sugere ser *Borrelia* spp e/ou *B. theileri*. Entretanto, a partir deste resultado parcial, propõe-se a caracterização molecular para melhor identificar qual espécie é circulante em nossa região.

REFERÊNCIAS

- AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbon dioxide in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1103-1110, 1993.
- BALASHOV, Y. S. Transovarial transmission of the spirochete *Borrelia sogdiana* in *Ornithodoros papillipes* ticks and its effect on biological properties of the agent. **Parazitologiya**, v. 2, p.198-201,1968.
- BARBOUR, AG, HAYES SF. *Biology of Borrelia species*, v.50, n.38, p. 1-400, 1986.

BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in *Ixodes* ticks. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 51442-51449, 1989.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135-238, 1985.

LOPES, F. A. ; REZENDE, J.; SILVA, D. B. S. ; ALVES, F. C. G. ; OLIVEIRA, ELISEI, C. ; COSTA, I. P. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients in Brazilian central-western region. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, p. 1-5, 2017.

MADUREIRA, R.C, Corrêa FN, Cunha NC, Guedes Junior DS, Fonseca AH. Ocorrência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equínos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro. **Rev Bras Ci Vet.**; v.14, p.43-46, 2007.

MANTOVANI,E.;MARANGONI,R.G.;GAUDITANO.G.;BONOLDI LN,YOSHINARI NH. Amplification of the *flgE* gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**; 54, p.153–7, 2012.

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.

REZENDE J., LOPES, F.A.; ALVES, F.C.G.; BRUNO, A.R.; MORENO, S.E.; COSTA, I.P.; et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **JSM Trop Med Res.**; v. 1.n.1, p.1:1003, 2016.

REZENDE, J., KESSLER, RH., SOARES, CO. and MARTINS, OP. Ocorrência de *Borrelia* spp. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev.Bras. de Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 50-52. 2008

GONÇALVES ,DD, Carreira T, Nunes M., et al. First record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana (Brazil). **Braz J Microbiol**, v.44, p. 883-887, 2013.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. p.292-303.

Figuras. – Espiroqueta *Borrelia* spp., em lâminas de hemócitos- 4 dias de postura das fêmeas de *R. microplus*

