

**CULTIVO DE *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae):
CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTIVO E TÉCNICAS DE COLORAÇÃO.**

ANGELA DE OLIVEIRA

Março de 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TITULO

**CULTIVO DE *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae):
CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTIVO E TÉCNICAS DE COLORAÇÃO.**

ANGELA DE OLIVEIRA

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

Dr. ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau
de *Philosophiae Doctor* em
Ciências Veterinárias, área de
concentração em Sanidade
Animal

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
Março de 2002

TÍTULO DA TESE

**CULTIVO DE *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii* (Spirochaetales: Spirochaetaceae):
CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE
CULTIVO E TÉCNICAS DE COLORAÇÃO.**

AUTOR

ANGELA DE OLIVEIRA

APROVADA EM 21/03/2002

Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca _____

Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari _____

Prof. Dr. Francisco Benedito Rangel Filho _____

Prof. Dr. Carlos Luiz Massard _____

Prof. Dr. Tetsuo Inada _____

Dedicatória

A minha inesquecível mãe Luiza (*in memoriam*), pelo amor maternal, quando em vida

Ao meu pai Alzido e irmãos, que , com carinho e compreensão tornaram possível a

realização deste trabalho.

“O temor do Senhor é o princípio da
Ciência... Adquire a sabedoria, adquiere
a inteligência e não te esqueças nem te
apartes das palavras da minha boca”
(Provérbios 1:7 e 4:5)

AGRADECIMENTOS

A pesquisa científica exige a cooperação de grande número de pessoas; o trabalho de equipe é, sem dúvida, uma necessidade; sem ele nada poderia ser feito. Assim sucedeu com o presente trabalho, motivo pelo qual agradeço a todos que colaboraram para a realização do mesmo.

Ao meu orientador Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, pela valiosa orientação, pela oportunidade, pelo apoio e incentivo com os quais sempre pude contar.

Dr. Natalino Hajimi Yoshinari pela colaboração, pelo estímulo e pela gentileza em doar as culturas, bem como pelo treinamento em seu Laboratório, itens indispensáveis para a realização deste trabalho, bem como a equipe de estagiários e bolsista do Laboratório de Doença de Lyme, Faculdade de Medicina da USP, em especial a Virginia Bonoldi, pelo apoio indispensável, na cessão de culturas puras das duas espécies de *Borrelia*.

A Marcia Mayumi Ishikawa, pela amizade e apoio nos momentos mais críticos durante a realização do experimento.

A Catia Marques da Costa, pela amizade, incentivo, companheirismo, pelo apoio nas horas mais difíceis desta jornada.

Aos colegas de Departamento Sieberth do Nascimento Brito e Carlos Mazur, pelo apoio logístico referentes à informática.

Aos estagiários Wanderson Clay Porcino Silva, Erika Izaac de Ornelas e Jaime da Sila Pena, pelo apoio.

Aos funcionários Luiz Carlos, Marildo, Luiz Jorge e Gilberto pelo auxílio no preparo de meios e atenção dispensada durante a realização do trabalho.

Aos Colegas Ernst Gerson Cohn, Ronald Bastos Freire, Getúlio Almeida de Mendonça, Paulo Roberto de Araújo, Carlos Alberto da Rocha Rosa e Cleber Oliveira Soares e Maria das Graças Nascimento pelas sugestões, pelo apoio e estímulo.

Aos Professores e Técnicos Administrativos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, pela contribuição na realização do presente trabalho.

A toda a minha família por acreditar em mim durante todo o tempo.

BIOGRAFIA

ÂNGELA DE OLIVEIRA, filha de Alzido de Oliveira e Luiza Abadia de Bello Oliveira, nascida em 21 setembro de 1953, natural de Belo Horizonte, Minas Gerais. O curso primário foi concluído em 1964, na Escola do Instituto de Zootecnia e frequentou os cursos ginasial e científico no Colégio Fernando Costa, até 1971, todos localizados na no *campus* da UFRRJ.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária da UFRRJ em 1972 e graduou-se em 1975. Foi bolsista do CNPq de 1973 a 1978, na área de Anatomia, DBA, UFRRJ..

Foi contratada como professor Colaborador, em 1^o de abril de 1978, para lecionar Bacteriologia e Microbiologia, na Área de Microbiologia do Departamento de Biologia Vegetal. Obteve o grau de Especialização em Ensino de Medicina Veterinária, promovido pelo NATTE (Núcleo de Apoio, Treinamento e Tecnologia Educacional) UFRRJ, concluído em 1980 com a apresentação de uma monografia cujo título foi: Problemas de cultivo de bactérias anaeróbias.

Em março de 1983 iniciou o curso de Mestrado e defendeu tese com o seguinte título: Intoxicação experimental de suínos com citrinina: perfil eletroforético das proteínas séricas e conjugação “in vitro”: citrinina – albumina sérica, defendida em março de 1989. para conclusão do curso de Mestrado em Patologia Clínica, UFRRJ.

Desde 1996 é professor responsável pela disciplina Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ. Professor responsável pelo laboratório de Bacteriologia e realização de exames bacteriológicos atendendo a Universidade e a Comunidade em que a mesma esta situada.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Sistemática e Morfologia de <i>Borrelia</i> spp	4
2.2. Mecanismo de transmissão de <i>Borrelia burgdorferi lato sensu</i>	10
2.3. Borreliose de Lyme em animais domésticos	13
2.4. Borreliose de Lyme em animais silvestres e aves.	18
2.5. Borreliose de Lyme em Seres Humanos	19
2.6. Isolamento e cultivo em artrópodes	21
2.7. Cultivos de <i>Borrelia</i> spp em diferentes meios	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Amostras de <i>Borrelia</i> .	39
3.2. Meios de cultura utilizados	39
3.3. Preparo dos Meios utilizados.	42
3.3.1. Meio BSK (Barbour - Stoenner - Kelly).	42
3.3.2. Meio BSK-K5 Kanamicina-5-fluorouracil.	44
3.3.3. Meio (TSY) Trypticase Soy Yeast Broth.	44
3.3.4. Meio de CTB - Trypticase Cysteine Broth (BBL).	44
3.3.5. Meio PMR.	45
3.3.6. Meio de BHI (Brain Heart Infusion).	45
3.3.7. Caldo Brucella.	45
3.3.8. Meio de Dubos (Dubos broth base).	46
3.3.9. Meio de Noguchi.	46
3.3.10. Meio de Middlebrook 7 H 9 broth	46

3. 3. 11. Caldo tioglicolato (thioglycollate broth).	47
3. 3. 12. Meio NNN (Neal, Novy e Nicolle).	47
3. 4. COLORAÇÕES.	48
3. 4. 1. Coloração com cristal violeta e fucsina básica.	48
3. 4. 2. Coloração com safranina.	48
3. 4. 3. Coloração com verde brilhante.	48
3. 4. 4. Coloração de Giemsa.	49
3. 4. 5. Coloração de May-Grünwald.	49
3. 5. Contagem de células nos diferentes meios.	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Meios de Cultivo de <i>B. burgdorferi</i> e <i>B. garinii</i> .	51
4.2. Conservação de <i>B. burgdorferi</i> em Geladeira	54
4.3. Cultivo de <i>B. burgdorferi</i> e <i>B. garinii</i> com variação de pH	55
4.4 Cultivo de <i>B. burgdorferi</i> em meio sólido.	56
4.4.1. Agar em placa.	56
4.4.2. Cultivo em agar inclinado	58
4. 5 Coloração de <i>B. burgdorferi</i> e <i>B. garinii</i>	58
4. 6 Formas císticas de <i>B. burgdorferi</i> e <i>B. garinii</i>	60
4. 7 Dinâmica de crescimento em meios líquidos	61
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – A. Erlenmeyer contendo meio de cultivo, B – Estufa bacteriológica com diferentes meios para cultivo de *Borrelia* sp, C e D – Diferentes meios de cultivo 64
- Figura 2 – Enovelado de *Borrelia burgdorferi* Cepa G 39/40 Coloração pelo método de Giemsa e microscopia ótica, 400X e 1000X 65
- Figura 3 Diferentes colorações das células de *Borrelia burgdorferi* G39/40, cultivadas em meio BSK com soro de Coelho. A - Microscopia de contraste de fase, coloração de Giemsa 250X; B- Campo escuro, 400 X; C e D, Giemsa e 400X; E e F. Coloração com Fucsina 1000X e 400X. 66
- Figura 4 *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, cultivada em meio BSK com soro de coelho. A. Coloração com Fucsina 1000 X.B.Sem coloração 67
- Figura 5 . Curva de crescimento em dias de *Borrelia burgdorferi* nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR. 68
- Figura 6 . Curva de crescimento em dias de *Borrelia burgdorferi* nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI. 69
- Figura 7. Curva de crescimento em semanas de *Borrelia burgdorferi* nos

meios BSK adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.	70
Figura 8. Curva de crescimento em semanas de <i>Borrelia burgdorferi</i> nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI.	71
Figura 9 Curva de crescimento em dias de <i>Borrelia garinii</i> nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.	72
Figura 10 Curva de crescimento em dias de <i>Borrelia garinii</i> nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI.	73
Figura 11 Curva de crescimento em semanas de <i>Borrelia garinii</i> nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.	74
Figura 12 Curva de crescimento em semanas de <i>Borrelia garinii</i> nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI.	75

ÍNDICE DO APÊNDICE

Apêndice 1. Composição dos meios CMRL e BSK para cultivo de <i>Borrelia</i> spp.	102
Apêndice 2. Diferentes meios de cultura, datas do preparo dos meios, repique e leitura final, relacionados ao crescimento de <i>B. burgdorferi</i> amostra G39/40	104
Apêndice 3. Diferentes meios de cultura, datas do preparo dos meios, repique e leitura final, relacionados ao crescimento de <i>B. garinii</i> amostra 1B29	114

RESUMO

No presente trabalho, foram utilizados 57 meios para cultivo de *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner 1984, e 26 meios para cultivo de *B. garinii* Baranton, Postic & Saint Girons 1992. Nestes meios foram adicionadas diferentes substâncias, soros sanguíneos de diferentes espécies animais e vários pHs: 6,4; 6,5; 6,8; 7,0 e 7,5. Observou-se que as duas amostras tiveram um bom crescimento na maioria dos meios testados. Foi estudada a cinética de crescimento de *B. burgdorferi* e *B. garinii*, pelo período de 3 meses, utilizando os seguintes meios: 1) BSK adicionado de soro de coelho; 2) BSK adicionado de soro de suíno; 3) BSK adicionado de soro de suíno e 5 fluorouracil; 4) PMR; 5) CTB; 6) DUBOS; 7) Caldo Brucella e 8) BHI. Todos os meios foram preparados assepticamente e mantidos em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL. Para cada meio de cultivo, o inóculo foi padronizado para conter no início, 10^2 espiroquetas para cada 0,1 mL de cultivo. O monitoramento do crescimento foi feito contando-se o total de espiroquetas em 0,1 mL do meio entre lâmina de microscopia com dimensões de 26 x 76 mm e lamínula com dimensões de 10 x 30 mm, tendo sido utilizado microscópio de campo escuro e aumento de 250X e 400X. A contagem foi realizada pelo período de 14 semanas, tendo sido diária nos primeiros 12 dias e semanal a partir desta data. Houve crescimento de *B. burgdorferi* e *B. garinii*, em todos meios testados, com melhor performance para BSK adicionado de soro de coelho, BSK

adicionado de soro de suino + 5 fluorouracil e meio CTB. Observou-se crescimento de *B. burgdorferi* a partir da 4^a semana atingindo o platô de crescimento entre a 8^a e 12^a semanas, quando ocorreu a exaustão do meio de cultivo. Para *B. garinii*, observou-se um ligeiro aumento do crescimento a partir da 6^a semana, atingindo um platô de crescimento entre a 9^a e 12^a semanas, e seguido da diminuição do mesmo. A *B. burgdorferi* após ser cultivada em meio de BSK, foi mantida viável em tubo nunc, adicionado de Glicerol a 80%, pelo período de 12 meses a temperatura de 0 °C. Foi realizada, com sucesso, a coloração das duas amostras de *Borrelia*, utilizando os corantes cristal violeta, safranina, fucsina e verde brilhante.

SUMMARY

In the present study, it was used 57 media for cultivation of *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner 1984, and 26 media for cultivation of *Borrelia garinii* Baranton, Postic & Saint Girons 1992. In these media it was added different substances, blood serum from different animal species and pH variation of 6.4; 6.5; 6.8, 7.0 and 7.5. It was observed a good growth of the two isolates on most of the tested media. It was studied the dynamic of growth of *B. burgdorferi* and *B. garinii* for a period of three months, by utilizing the following media: 1) rabbit serum BSK; 2) swine serum BSK; 3) swine serum BSK + 5-fluorouracil; 4) PMR; 5) CTB; 6) DUBOS; 7) Brucella broth and 8) BHI. All media were prepared aseptically and they were maintained in culture tubes with capacity for 10 mL. For each culture medium, the inoculum was standardized to contain 10^2 spirochete initially for each 0.1 mL of culture. The monitorization of growth was done by counting the total number of spirochetes in 0.1 mL of medium, utilizing a 26 X 76 mm slide with a 10 x 30 mm cover slip, in a dark field microscope with

magnification of 250X or 400X. On the first 12 days counting was done at each 24 hours and after that, once per week, for a period of 14 weeks. There was growth of *B. burgdorferi* and *B. garinii*, in all tested medium, with the best performance for BSK with rabbit serum, BSK swine serum + 5 fluorouracil and CTB medium. Growth of *B. burgdorferi* was observed starting by the 4th week, reaching maximum growth by the 8th week and 12th week, depleting the culture medium after this time. For *B. garinii*, it was observed a slight increase in growth at the 6th week, and a maximum growth between the 9th and 12th weeks, and after that, there was reduction of growth. The *B. burgdorferi* after being cultured in BSK medium, was maintained viable in cryogenic vials with addition of 80% glycerol, for the period of 12 months at 0 °C. The staining of two isolates of *Borrelia* was done, with success, by using crystal violet, safranin, fucsin and brilliant green.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner, 1984, é cosmopolita e endêmica em muitas regiões. *Borrelia garinii* Baranton, Postic & Saint Girons, 1992, tem sua distribuição geográfica mais restrita, incluindo Europa e Ásia. Ambas são consideradas agentes etiológicos da borreliose de Lyme e responsáveis por doença crônica em humanos e animais com potencial envolvimento dos sistemas dermatológico, locomotor, circulatório e nervoso central (BENNETT, 1995; SILVA & FIKRIG, 1997).

As espécies patogênicas do gênero *Borrelia*, em sua maioria, são parasitas sangüíneos dos animais e do homem (FELSENFELD, 1965; BARBOUR & HAYES, 1986) embora exerçam relação simbiótica com os carrapatos, especialmente argasídeos (HOOGSTGRAAL, 1979). Animais silvestres são reservatórios naturais, sendo os roedores hospedeiros biológicos (BARBOUR & HAYES, 1986; BURGESS *et al.*, 1996).

Animais domésticos como caninos, felinos, bovinos e eqüinos são importantes por serem susceptíveis à infecção. Estes animais são reservatórios e, nesta condição, desempenham o papel de sentinela para o monitoramento da dispersão do agente em novas áreas geográficas (LISSMAN *et al.*, 1984; PARKER & WHITE, 1992).

A multiplicação de *Borrelia recurrentis* “in vitro” foi relatada por NOGUCHI (1928) que utilizou rim de coelho e fluido ascítico. Vários meios bacteriológicos padrões, e suas combinações, tem sido avaliados para se conseguir crescimento e massa suficiente de células para estudos sorológicos (DODGE, 1973). O sucesso no cultivo de algumas espécies do gênero *Borrelia* tem propiciado oportunidade para estudo morfológico das células e/ou de suas colônias, bem como da estrutura antigênica (KELLY, 1971; STOENNER *et al.*, 1982; BARBOUR, 1984).

As diferentes espécies de *Borrelia* coram-se pelos corantes derivados da anilina e do Romanovski, crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais seletivos ou não e podem ser visualizadas através de microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou ainda em cortes histológicos, quando impregnados por corantes à base de prata (BARBOUR & HAYES, 1986; QUINN *et al.*, 1994).

Os meios atualmente utilizados para o cultivo de *Borrelia* são altamente enriquecidos e de elevado custo; como o período de incubação desta espiroqueta é longo torna-se fácil o crescimento de microrganismos contaminantes, impedindo o seu desenvolvimento

Os objetivos deste trabalho foram testar diferentes meios modificados e de baixo custo para cultivo de *B. burgdorferi* e *B. garinii* bem como estudar a dinâmica do crescimento em meios selecionados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. Sistemática e Morfologia de *Borrelia* spp.

A primeira observação de espiroqueta foi reportada por Leeuwenhoek em 1681 em material oriundo da mucosa bucal e intestinal do homem. Em 1834 Ehrenberg descreveu a *Spirochaeta plicatilis*, de vida livre. No entanto, a importância deste grupo deveu-se à descoberta de Obermeier, em 1868, publicada em 1873, quando ele verificou, na Rússia, a presença de espiroquetas no sangue de indivíduos com febre recorrente (PESSÔA, 1963; PAVLOVSKY, 1965).

Este grupo de microrganismos teve classificação incerta por um longo período ficando ora no grupo das algas, ora no das bactérias e ora no dos protozoários. Por sua conformação helicoidal foi classificada, inicialmente, como alga *Cyanophyceae* e depois como bactéria do gênero *Paraspirillum* (PESSÔA, 1963). As borrelias, contudo, por um longo tempo permaneceram dentro do

antigo Filo *Protozoa*, Classe *Spirochetes*, gênero *Borrelia* (BRUMPT, 1927). Entretanto, a partir de 1948, os bacteriologistas sistematas colocaram-nas como um grupo especial entre as bactérias (PESSÔA, 1963; KRIEG & HOLT, 1984). A espécie tipo é a *Borrelia anserina* Sakharoff, 1891. As borrelias patogênicas, na sua maioria, são parasitas sangüíneos de animais e do homem (FELSENFELD, 1965; BARBOUR & HAYES, 1986), embora exerçam uma relação simbiótica com os carrapatos, especialmente argasídeos (HOOGSTRAAL, 1979).

Como membro da Ordem *Spirochaetales*, Família *Spirochaetaceae*, estas bactérias se distinguem, morfológicamente, dos demais gêneros da família por serem maiores, possuírem 2 ou mais flagelos periplásmicos e menor número de espiras (PFISTER *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 1994). Entretanto, dentro de uma única espécie, pode ocorrer pleomorfismo de acordo com a cepa (BENNETT, 1995).

O gênero *Borrelia* Swellengrebel, 1907, foi denominado em homenagem a A. Borrel. As diferentes espécies de *Borrelia* possuem formato helicoidal com 3 a 10 espiras e medem de 0,2 a 0,5 μm por 3 a 30 μm . O protoplasma é cilíndrico e envolto pela membrana celular da qual partem de 15 a 20 flagelos periplásmicos; estes flagelos são denominados *filamentos axiais*, *endoflagelos* ou

fibrilas periplásmicas. Possuem, externamente, outra membrana contendo diversas proteínas de superfície e não possuem túbulos citoplasmáticos (KRIEG & HOLT, 1984; BARBOUR & HAYES, 1986).. Segundo CANALE-PAROLA (1978) as espiroquetas possuem três tipos de movimentos em meio de cultura líquido: a) locomoção, b) rotação no eixo longitudinal e c) movimentos flexíveis. As espiroquetas podem, ainda, realizar motilidade translacional em meios de cultura contendo agar a 1% onde elas deslizam e se arrastam lentamente. GUERREIRO *et al.* (1984) referiram-se ao movimento tipo “saca-rolha”, observado nos microrganismos pertencentes ao gênero *Borrelia*.

Segundo KLAVITER & JOHNSON (1979) a parede celular de *B. hermsii* contém ácido murâmico e ornitina detectáveis em todas as células.. Estudo comparativo através da microscopia eletrônica, entre *B. hermsii* e *B. hispanica*, conduzidos pelos mesmos autores, revelou diferença no número de flagelos entre as duas espécies e que este parâmetro constitui-se em uma ferramenta potencialmente útil para a taxonomia de *Borrelia*.

BRORSON & BRORSON (1997) relataram a transformação da forma cística de *B. burgdorferi* para a forma normal de espiroquetas móveis, o que ocorreu após a inoculação de *Borrelia* em meios de cultura sem soro. Segundo os autores estas formas apareceram após uma semana de incubação. Observaram, ainda, que estes cistos, quando transferidos para o mesmo meio

contendo soro, desenvolviam formas de espiroquetas regulares, móveis no período de 6 semanas.

Segundo BARBOUR (1988) as células de *B. burgdorferi* contém dois tipos extra-cromossomiais de DNA: um plasmídio circular e um plasmídio linear. O último tipo de DNA extra-cromossomial era covalentemente fechado . Segundo o autor o número de plasmídios diminui durante subculturas no laboratório. SCHWAN *et al.* (1988), observaram mudanças na infectividade e uma redução no número de plasmídios detectáveis quando utilizavam cultura contínua BSK II. Além disso, observaram mudanças nas proteínas e lipopolissacarídeos das espiroquetas.

Esferoplastos de *Borrelia* foram obtidos pela aplicação de lisozima e EDTA no meio de cultivo; a observação microscópica, no final do processo, revelou células esféricas e semitranslúcidas. Ainda, segundo BRUCK *et al.* (1995) o sucesso na conversão da fase de espiroquetas para esferoplastos foi influenciada pela variação do pH. PREAC- MURSIC *et al.* (1996) relataram sobre a presença de esferoplastos variantes de *B. burgdorferi* em pacientes submetidos a antibioticoterapia.

As borrelias se reproduzem por fissão binária transversal, são microaerófilas, quimioheterotróficas, ou seja, utilizam substâncias químicas como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono. Em seu

metabolismo utilizam carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa e álcoois graxos como fonte de carbono e energia (CANALE-PAROLA, 1977; JOHNSON 1977). Segundo JOHNSON *et al.* (1984), a taxa de guanina + citosina de DNA, para *B. burgdorferi*, foi 27,3 – 30,0 moles %.

As borrelias conhecidas causam cinco grupos de enfermidades distintas:

1. Febre recorrente humana, ocasionada pelo grupo da *B. recurrentis* Lebert, 1874, *lato sensu*. É uma das enfermidades mais antigas. Há registros de sua ocorrência anterior ao início das civilizações egípcias e até hoje causou incontáveis óbitos (BRUMPT, 1927; PESSÔA, 1963; PAVLOVSKY, 1965; BARBOUR & HAYES, 1986).
2. Borreliose aviária, determinada por uma única espécie, *B. anserina* Sakharoff, 1891; causa processos anemiantes, febre, depressão e altas taxas de morbidade nas aves (BRUMPT, 1927; DIAB & SOLIMAN, 1977; QUINN *et al.*, 1994).
3. Espiroquetose bovina, causada pela *B. theileri* Laveran, 1903, determina anemia em ruminantes e eqüinos, considerada pouco patogênica (KOCH *et al.*, 1990; QUINN *et al.*, 1994).
4. Borreliose de Lyme, causada pelo grupo da *B. burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt, & Brenner, 1984 *lato sensu*, com nove

espécies definidas e uma genoespécie não nomeada (BENNETT, 1995; EUZEBY, 1995; MARCONI, *et al.*, 1995; BARBOUR *et al.*, 1996; LE FLECHE *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1997).

5. Aborto epizoótico bovino, enfermidade que acomete bovinos e cervídeos causada pela *B. coriaceae* Johnson, Burgdorfer, Lane, Barbour, Hayes & Hyde, 1987 (BREITSCHWERDT *ET AL.*, 1994; ZINGG & LEFEBVRE, 1994).

As espécies de *Borrelia* foram nomeadas, principalmente, segundo seu vetor, por serem transmitidas principalmente por carrapatos entretanto, também podem ser transmitidas pelos Anoplura. Para as espécies de *Leptospira*, outro gênero de espiroqueta, existem registros da transmissão de *L. pomona* por *Ornithodoros turicata* (BURGDORFER, 1956; HOOGSTRAAL, 1979). Atualmente a identificação das espécies se dá pela associação dos estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR & HAYES, 1986; MARCONI *et al.*, 1995; BARBOUR *et al.*, 1996; SILVA & FIKRIG, 1997).

2.2. Mecanismo de transmissão de *Borrelia burgdorferi sensu lato*

As borrelias são transmitidas por carrapatos, embora em raros casos ou experimentalmente, sejam transmitidas por tabanídeos, culicídeos e pulgas (MAGNARELLI *et al.*, 1986 e 1987; BUTLER & DENMARK, 1990). Dentre as

espiroquetas, apenas as borrelias são transmitidas por ectoparasitos hematófagos, embora BURGDORFER (1956) tenha comentado sobre a possibilidade dos carrapatos argasídeos transmitirem leptospiras na natureza (BURGDORFER & PICKENS, 1954).

O modo de transmissão das borrelias pode ser transovariano (vertical) e/ou transtadial (horizontal). Nas espécies transmitidas pelos argasídeos ocorre primordialmente a transovariana, o que é bem caracterizado no gênero *Argas* com *B. anserina*, embora haja também transmissão horizontal, principalmente para o *Ornithodoros* com as espécies do grupo da febre recorrente (HOOGSTRAAL, 1979 E 1985; BARBOUR & HAYES, 1986). Contudo, nos argasídeos o modo de transmissão está intrinsecamente relacionado à cepa do carrapato, região fisiográfica, espécie de *Borrelia* e ainda associação com outros patógenos (DIAB & SOLIMAN, 1977; ZAHER *et al.*, 1977; HOOGSTRAAL, 1985).

Entre os ácaros ixodídeos podem ocorrer ambos os modos de transmissão (SMITH *et al.*, 1978; RANDOLPH *et al.*, 1996). O que foi melhor compreendido com os estudos da borreliose de Lyme feitos por OLIVER Jr *et al.* (1993), partindo-se do *I. dammini* (= *I. scapularis*) e demais espécies de *Ixodes* vetores da *B. burgdorferi lato sensu* (BURGDORFER *et al.*, 1985; ANDERSON *et al.*, 1987; MATHER & MATHER, 1990; EWING *et al.*, 1994) e da associação

desta com Babesiose e Ehrlichiose (SPIELMAN *et al.*, 1979 e 1985; PIESMAN *et al.*, 1986; SPACH *et al.*, 1993; ANDERSON *et al.*, 1993; MAGNARELLI *et al.*, 1995).

Nos argasídeos todos os ínstares têm habilidade para transmitir *Borrelia*, enquanto que nos ixodídeos o estágio de ninfa é o de maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão da espiroqueta. Estes processos estão relacionados ao hospedeiro no qual o carrapato realize seu repasto (BENACH *et al.*, 1987; LANE & BURGDORFER, 1987; LANE & MANWEILER, 1988; TELFORD & SPIELMAN, 1989; BOUSEMAN *et al.*, 1990). Na ninfa a transmissão é mais eficiente quando esta encontra-se parcialmente ingurgitada (PIESMAN, 1991; SHIH & SPIELMAN, 1993b; GERN & RAIS, 1996).

O tempo de fixação no hospedeiro é relevante quanto à eficiência na transmissão. Estudos demonstraram que, para os ixodídeos, é necessário um tempo superior a 48 horas para transmissão exclusivamente pela saliva (PIESMAN *ET AL.*, 1987; FALCO & FISH, 1988; FALCO & FISH, 1989; FALCO *et al.*, 1995). Já para os argasídeos o tempo de fixação não é relevante (DODGE, 1973; HOOGSTRAAL, 1985; SMITH *et al.*, 1985) porque nesta família ocorre transmissão tanto via saliva quanto via líquido coxal, exceto na

fase larvar quando o repasto sangüíneo se processa entre 3 e 5 dias (BALASHOV, 1972; HOOGSTRAAL, 1985; SONESHINE, 1991).

Os carrapatos dos gêneros *Argas* e *Ornithodoros* têm potencial para transmitir quase todas as borrelias (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR & HAYES, 1986) enquanto que nos ixodídeos o fenômeno é mais restrito. Dos cinco grupos de borrelioses todas são transmitidas por carrapatos, tendo cada grupo sua(s) espécie(s) de *Borrelia* e os respectivos artrópodes vetores.

A relação *Borrelia* versus carrapato é tão estreita que a espécie pode ser isolada e identificada com o auxílio do xenodiagnóstico (BURGDORFER, 1984; APPEL *et al.*, 1993; GERN *et al.*, 1993). Antígenos salivares do carrapato podem ser inoculados, junto com a espiroqueta, de forma a induzir determinadas expressões antigênicas pela *Borrelia* e, conseqüentemente, resposta imunológica específica pelo hospedeiro. Estes antígenos podem ser utilizados para triagem epidemiológica e relacionando-os à *Borrelia* spp. (BARBOUR *et al.*, 1983; SCHWARTZ *et al.*, 1990; SCHWARTZ *et al.*, 1993; EWING *et al.*, 1994; MAGNARELLI *et al.*, 1995c). No momento da transmissão a saliva do carrapato exerce, ainda, ações farmacológicas como o bloqueio de células fagocitárias e inflamatórias, facilitando a penetração e disseminação do patógeno (RIBEIRO *et al.*, 1987; URIOSTE *et al.*, 1994).

Embora o principal modo de transmissão de *Borrelia* seja por carrapatos pode ocorrer, ainda, pela urina entre roedores, por transfusão sangüínea, por transplante de tecido, por contato e congênita em cães (BURGESS *et al.*, 1986a; HYDE *et al.*, 1989; DORWARD *et al.*, 1991; BURGDORFER, 1993; GUSTAFSON *et al.*, 1993; KARCH *et al.*, 1994).

SCHLESINGER *et al.* (1985), relataram o caso de uma paciente que desenvolveu borreliose de Lyme no primeiro trimestre de gravidez e não recebeu antibioticoterapia. O recém nascido veio a óbito com uma semana de vida; foram achadas espiroquetas na histopatologia do baço, rins, medula óssea e líquido sinovial.

2. 3. Borreliose de Lyme em animais domésticos

Subsequentemente à identificação desta doença em humanos, *B. burgdorferi* foi reconhecida como capaz de infectar animais silvestres. BOSLER *et al.* (1986), demonstraram espiroquetas em urina e sangue, de animais domésticos. No nordeste dos Estados Unidos o agente está amplamente disseminado em roedores e cervídeos (MAGNARELLI *et al.*, 1986) que são reservatórios naturais. Os animais domésticos como caninos, eqüinos e bovinos comportam-se como agentes transportadores de vetores aos domicílios (ANDERSON, 1988). Em contraste com a infecção inaparente nos animais silvestres, este agente pode causar

doença clínica nos animais domésticos (BURGESS *et al.*, 1987; MAGNARELLI *et al.*, 1987).

O primeiro caso de borreliose de Lyme em animais domésticos foi reportado por LISSMAN *et al.* (1984) em um cão na cidade de Nova York, nesta década a incidência da doença cresceu muito. Os gatos também são conhecidos como suscetíveis à borreliose de Lyme, no entanto, poucos casos tem sido relatados (APPEL, 1990).

BURGESS *et al.* (1987) descreveram um caso clínico com altos títulos de anticorpos no soro, leite e líquido sinovial de bovino proveniente de área onde foram registrados casos de infecção por *B. burgdorferi* em humanos e não havia sido registrado a ocorrência de *I. scapularis*. Outros animais assintomáticos, pertencentes ao mesmo rebanho, apresentaram altos títulos de anticorpos, sugerindo infecção por *B. burgdorferi*. O diagnóstico de borreliose de Lyme foi baseado nos altos títulos de anticorpos obtidos pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) no soro e líquido sinovial; lesões histopatológicas de articulações semelhantes aos observados em humanos; ausência de outras bactérias, como *Mycoplasma* sp., e o isolamento de *B. burgdorferi* a partir de fígado e pulmão do animal sintomático.

Em bovinos infectados, foi observado espiroquetas a partir de colostro mas não no leite (BURGESS, 1989). BRAND (1990) relatou altos níveis de anticorpos em bovinos velhos, sugerindo repetidas infecções anuais.

PARKER & WHITE (1992) publicaram uma revisão sobre borreliose de Lyme em bovinos e eqüinos, relatando a dificuldade do diagnóstico clínico e do isolamento de *B. burgdorferi*. Os autores referiram-se à ocorrência de animais assintomáticos com sorologia positiva.

WELLS *et al.* (1993) constataram maior sensibilidade e especificidade do teste ELISA em relação ao teste de Imunofluorescência Indireta (IFI). Estes autores observaram que a soropositividade para *B. burgdorferi* pelo teste ELISA não teve associação com a soropositividade para 6 sorotipos de *Leptospira interrogans*. Observaram, também, altos títulos de anticorpos contra *B. burgdorferi* associados com sintomas de claudicação em vacas leiteiras.

TAKAHASHI *et al.* (1993) incluíram a região sudeste de Hokkaido, Japão, como área endêmica de borreliose de Lyme e onde *B. burgdorferi* foi isolada de *I. ovatus* e *I. persulcatus*. Segundo os autores estes artrópodes são largamente encontrados em Hokkaido e várias outras regiões do Japão. Relataram a percentagem significativamente menor de soropositivos em bovinos com menos de 2 anos de idade em comparação com os animais de mais de 3 anos, sugerindo que melhores condições de pastagem reduzem a oportunidade da infecção por *B.*

burgdorferi. Relataram, ainda, a distribuição sazonal de percentagens de soropositivos e a ocorrência de títulos de anticorpos em bovinos sintomáticos e assintomáticos.

Em Wisconsin, nos Estados Unidos, observaram a alta correlação entre a distribuição geográfica de rebanho bovino leiteiro, soropositivos para *B. burgdorferi*, com a distribuição geográfica do carrapato *I. scapularis* (BENXIU *et al.*, 1994).

JOPPERT (1995) padronizou a sorologia para espécie canina, utilizando o teste ELISA indireto e estudou a soroepidemiologia da borreliose de Lyme em cães na região de Cotia, Estado de São Paulo. Observou que 8,4% dos animais analisados apresentaram anticorpos capazes de reconhecer *B. burgdorferi* cepa G39/40 não havendo predisposição quanto ao sexo ou faixa etária do animal. Detectou, porém, uma maior frequência de soropositivos em animais com história prévia de contato com carrapatos. O autor descreveu que não houve associação entre os resultados positivos para *B. burgdorferi*, pelo teste ELISA, e resultados positivos para *L. interrogans* pelo teste de soroaglutinação rápida.

FONSECA *et al.* (1995b) e FONSECA *et al.* (1996) descreveram altos títulos de anticorpos contra *B. burgdorferi* em bovinos assintomáticos provenientes do Estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Detectaram, também, presença de antígenos circulantes em 6,2% de 129 cães no Estado do Rio de

Janeiro. Em outro estudo relataram a detecção de espiroquetas, através de microscopia de campo escuro e contraste de fase, no sangue periférico de gambás (*Marsupialia: Didelphidæ*) no município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Os autores discutiram a importância epidemiológica desse achado, uma vez que os marsupiais são comuns no Brasil e encontrados, com frequência, em áreas urbanas (FONSECA *et al.*, 1995a).

ISHIKAWA (2000), observou alteração na produção de anticorpos, da classe IgG anti-*B. burgdorferi*, em bovinos, após vacina contra leptospirose e após associação de diferentes estímulos antigênicos. Segundo a autora, não houve interferência na soropositividade dos ensaios imunoenzimáticos para borreliose de Lyme, babesiose e anaplasmose nos bovinos. Estudos sorológicos em bovinos, conduzidos por ISHIKAWA (2000), nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo, demonstraram altos títulos de anticorpos anti-*B. burgdorferi*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *A. marginale*, demonstrando a ocorrência de infecção simultânea por estes agentes na população animal estudada.

2. 4. Borreliose de Lyme em animais silvestres e aves.

OLSÉN *et al.* (1993), estudaram a borreliose de Lyme em aves aquáticas infestadas por carrapatos da espécie *I. uriae*. Eles relataram a presença de

espiroquetas viáveis através do cultivo em meio de BSK (Barbour- Stoenner Kelly)-II incubado a 33 °C.

NAKAO *et al.* (1994) estudaram, no Japão, a espiroqueta da doença de Lyme, observando o ciclo enzoótico de transmissão entre o carrapato *I. persulcatus*, roedores e as aves.

CRAINE *et al.* (1997) verificaram o papel do esquilo cinzento e do faisão na transmissão de *B. burgdorferi sensu lato*. Estes animais são hospedeiros importantes de larvas e ninfas de *I. ricinus* L., o principal vetor da espiroqueta da doença de Lyme.

KUTENBACH *et al.*, (1998) estudaram um foco de borreliose de Lyme em aves de caça no Sul da Inglaterra. Foram analisados carrapatos, roedores e faisões, através da técnica PCR. Nos carrapatos da espécie *Ixodes ricinus*, foram detectadas três genoespécies de *B. burgdorferi sensu lato*, com predominância de *B. garinii* e *B. valaisiana*. Mais de 50% das ninfas ingurgitadas coletadas de faisão estavam infectadas com *B. garinii* ou *B. valaisiana*. Este dado indica que genoespécies diferentes de *B. burgdorferi sensu lato* podem ser mantidas na natureza pela transmissão distinta entre ciclos envolvendo a mesma espécie de carrapato vetor; porém, com as diferentes espécies de hospedeiros vertebrados.

2. 5. Borreliose de Lyme em Seres Humanos

A manifestação clínica da borreliose de Lyme difere de região para região associado às características antigênicas. Na América do Norte há predomínio de manifestações cutâneas e articulares, no Continente Europeu, predominam manifestações neurológicas enquanto que no Continente Asiático as sintomatologias são basicamente cutâneas e neurológicas (EUZEBY, 1995).

Na América do Sul YOSHINARI *et al.* (1989) publicaram o primeiro artigo sobre revisão da borreliose de Lyme, alertando a classe médica sobre a existência desta enfermidade no país. Neste ano uniu-se, na Universidade de São Paulo, uma equipe multidisciplinar voltada para a investigação desta doença infecciosa, sendo criado um laboratório destinado à realização de provas sorológicas e cultura de *B. burgdorferi* em meio BSK. Casos clínicos, com confirmação sorológica, foram identificados no estado de São Paulo embora o isolamento do agente infeccioso não tenha sido possível (BARROS *et al.*, 1993; YOSHINARI *et al.*, 1991 e 1993).

YOSHINARI *et al.* (1995) publicaram um artigo retrospectivo sobre borreliose de Lyme no Brasil, caracterizando-a como uma zoonose emergente de interesse multidisciplinar. Relataram a identificação e estudo de 25 pacientes portadores desta borreliose; traçaram o perfil clínico, sorológico e epidemiológico

e discutiram a participação dos animais domésticos e silvestres no ciclo desta enfermidade em nosso meio.

FILGUEIRA *et al.* (1989) e AZULAY *et al.* (1991), no Rio de Janeiro, e TALHARI *et al.* (1992), em Manaus, igualmente relataram casos de borreliose de Lyme em seres humanos com manifestações cutâneas. STANCHI & BALAGUE (1993) mostraram a presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* em trabalhadores rurais na Argentina com sintomas de artrite. O agente etiológico não foi isolado e os possíveis vetores são desconhecidos . Os autores discutem a necessidade de precauções na interpretação clínica das artrites até que a presença de *B. burgdorferi* seja confirmada pelo cultivo nos meios específicos. CICERONI *et al.* (1994) realizaram estudo soroepidemiológico determinando a baixa prevalência de casos de borreliose de Lyme e Febre Recorrente transmitida por carrapatos em humanos de 3 comunidades da Bolívia. Demonstraram a alta frequência de reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e os agentes etiológicos da Febre Recorrente (*Borrelia parkeri* e *Borrelia turicatae*) sendo este o primeiro relato da presença destas borrelioses na Bolívia, reforçando a existência da *B. burgdorferi* na América do Sul.

BARROS (1995) padronizou a sorologia para detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi*, cepa G39/40, em humanos no Brasil, pelos ensaios imunoenzimáticos ELISA indireto e Western blotting. Descreveu a ocorrência de

sorologia positiva, no Estado de São Paulo, semelhante à encontrada em áreas endêmicas. Identificou e estudou 13 pacientes portadores da borreliose de Lyme através de caracterização epidemiológica, clínica e sorológica. As manifestações variaram na forma de apresentação, predominando o eritema migratório na fase aguda e as máculas eritematosas na fase latente da doença. Em comprometimento articular houve predomínio de poliartralgias de grandes articulações. Nas afecções neurológicas observou-se cefaléia, em fase aguda, e distúrbios sensitivos periféricos em fase latente da doença. Acometimento cardíaco foi detectado em apenas dois desses 13 pacientes.

2. 6. Isolamento e cultivo em artrópodes

BURGDORFER *et al.* (1982) isolaram espiroquetas em carrapatos da espécie *I. dammini* (= *I. scapularis*), posteriormente BENACH *et al.* (1983) isolaram no sangue, JOHNSTON *et al.* (1985) na articulação, PREAC-MURSIC *et al.* (1984) no líquido e STEERE *et al.* (1984) na pele de portadores da doença de Lyme. O agente foi denominado *B. burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt & Brenner, 1984. (em homenagem à Burgdorfer que primeiro descreveu o agente nos vetores).

O crescimento e multiplicação de *Borrelia* no carrapato é afetado por processos fisiológicos durante o ciclo vital do artrópode. Muitas

espiroquetas podem morrer logo após a mudança de estágio do vetor; o carrapato também pode vir a morrer em consequência de patologias causadas por um número excessivo de espiroquetas em seus órgãos (BURGDORFER, 1956; BALASHOV, 1972; SMITH *et al.*, 1978; HOOGSTRAAL, 1985; PIESMAN *et al.*, 1990; SCHWAN, 1996).

A caracterização de amostras de *B. burgdorferi*, isoladas de carrapatos da espécie *I. pacificus* na Califórnia, foi estudada por BISSETT & HILL, (1987). Estes autores pesquisaram 1714 carrapatos adultos sendo que 24 infectados, reagiram com o conjugado anti-soro polivalente para *B. burgdorferi*. O cultivo do microrganismo foi feito em meio de BSK, com e sem rifampicina (50µL). Após a inoculação foram incubados a 35° C por um período de 4 semanas. Os tubos foram examinados e a observação das espiroquetas foi feito através da microscopia de campo escuro.

O primeiro isolamento e cultivo de *B. burgdorferi sensu lato*, em Missouri, foi realizado por OLIVER *et al.* (1998). Os isolamentos foram obtidos a partir de carrapatos das espécies *Ixodes dentatus* ou *Amblyoma americanum* provenientes de coelhos (*Sylvilagus floridanus*) de uma fazenda na cidade de Bollinger, onde um caso humano da doença de Lyme foi relatado. Os carrapatos foram removidos dos coelhos e inoculados em meio de BSK-II contendo 0,023% de L-cisteína, 0,015% de DL-dithiothreitol, 1µg de L-glutamina por mL, 0,15% de

agarose, 50µg de rifampina por mL, 20µg de fosfomicina por mL e 2,5µg de anfotericina B por mL. As culturas foram incubadas em atmosfera com 5% de CO₂ a 33 °C. As espiroquetas foram examinadas pela microscopia de campo escuro após 2 a 6 semanas. Eles realizaram análise dos isolados das espiroquetas através a técnica de imunofluorescência indireta. Os lisados das espiroquetas foram caracterizados através do *sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)* e, finalmente, analisados por PCR.

RAS *et al.*(1997) trabalharam com uma amostra de *B. burgdorferi* oriunda de casos humanos (sangue, pele, fluido sinovial, líquido céfalo-raquidiano), de carrapatos (*I. ricinus*, *I. scapularis* e *I. pacificus*) e de camundongos de pata branca. Estas amostras cresciam no meio de BSK suplementado de 6% de soro de coelho e 1% de gelatina e foram incubadas na temperatura de 30 °C.

O isolamento de *Borrelia* tem sido realizado a partir de saliva, fragmentos de glândula salivar e intestino, dos carrapatos da espécie *I. scapularis*, *I. s. dammini*, *I. pacificus*, *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. ovatus*, *A. americanum*, *D. variabilis* e outros (MIYAMOTO *et al.* 1992, NAKAO *et al.* 1992, EWING *et al.* 1994, TAKADA *et al.* 1994, TALLEKLINT & JAENSON 1996).

2. 7. Cultivos de *Borrelia* spp em diferentes meios

Um dos primeiros trabalhos realizados para obtenção do crescimento de espiroquetas constou de uma técnica desenvolvida por OAG (1948) baseada na utilização de ovos embrionados. Este autor cultivou, com sucesso, *B. duttoni*, em embrião de pinto, por um período de um mes. Ele observou, ainda, que após repetidas passagens nos embriões mais desenvolvidos ocorria um aumento de motilidade destas espiroquetas.

KELLY (1971) trabalhou com *B. hermsii*, agente etiológico da febre recorrente, e elaborou um meio de cultivo com a seguinte composição: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; NaCl, KCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, glicose, proteose peptona, triptona, piruvato de sódio, citrato de sódio, N-cetilglucosamina, NaHCO_3 (4,5%), albumina bovina, gelatina e soro de coelho a 6%, pH 7,8. A incubação das culturas foi feita a 35 °C. Este meio permitiu o crescimento do microrganismo possibilitando determinar o tempo de geração que foi de 18 horas.

DODGE (1973), isolou *B. recurrentis* utilizando vários meios bacteriológicos padrões adicionados com diferentes suplementos, que foram testados para propiciar o crescimento *in vitro* deste microrganismo. Esta autora utilizou 4 diferentes meios: 1- TSY- Trypticase Soy Yeast Broth : caldo base soja tripticase, extrato de levedura, gelatina, azul de bromotimol, albumina sérica bovina; 2- TSY -G- é o TSY adicionado de 0,4 mL glicose a 10 % em cada tubo

contendo 5 mL deste meio; 3- TSY-S: é o TSY adicionado de 0,4 mL de sucrose a 10% em cada tubo contendo 5 mL deste meio; 4- Meio de CTA- Cysteine Trypticase Agar: adicionado de extrato de levedura a 1 % e glicose a 1%. As seguintes substâncias foram adicionadas nos meios de TSY e CTA: N- acetil glucosamina, piruvato de sódio, NaHCO₃ e soro de coelho. Todos estes 4 meios foram testados e comparados com meio de kelly (KELLY, 1971). Na avaliação dos meios utilizados concluiu-se que : 1- O máximo de crescimento ocorreu no meio de TSY-S; 2- Todos os meios testados foram capazes de propiciar o crescimento do microrganismo e 3- Nenhum crescimento ocorreu quando a albumina era retirada do meio de cultivo.

COWLEY & HILL (1986) cultivaram espiroquetas do ceco de rato em meio com a seguinte fórmula: glicose, celobiose, amido solúvel, sulfato de amônio, resazurina, tioglicolato de sódio, agar-agar, peptona, extrato de levedura, fluido de rúmen e uma solução de sal. A composição da solução de sal era: cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, fosfato dipotássico, fosfato monopotássico, cloreto de sódio e carbonato de sódio. Após a autoclavação do meio os autores adicionaram sangue citratado de bovino, para obter uma concentração final de 10%. Para tornar o meio seletivo eles adicionaram rifampicina e polimixina B. As culturas foram incubadas em anaerobiose por 7 dias a 37 °C. As espiroquetas foram isoladas do lúmen cecal e do tecido epitelial.

RAWLINGS *et al.* (1987) isolaram *Borrelia* de pacientes do Texas (EUA). Estas espiroquetas foram isoladas de sangue, fluido cérebro-espinhal, pele e fluido de joelho . Estes materiais foram inoculados em meio de BSK-II adicionados de 1 mL de L-glutamina a 3% por mL de meio, após 2 semanas o meio foi estocado por um período de 1 mes e incubados a 34° C. As amostras de cada cultura, após 14 a 21 dias, foram examinadas pela microscopia de campo escuro para a observação das espiroquetas. Testes de anticorpos fluorescentes com anticorpos monoclonais de camundongo, confirmam que 7 destes isolados eram de *B. burgdorferi* e que 2 outros pertenciam ao gênero *Borrelia*.

BURGESS *et al.*, (1987) estudaram artrite e uma doença sistêmica em vacas com infecção causada por *B. burgdorferi*. Os animais foram sacrificados e coletados os seguintes materiais: urina, saliva, sangue, leite, pulmão, rim, baço, coração, cérebro e fígado. Estes materiais foram inoculados em meio BSK-II. A espiroqueta foi isolada somente do pulmão e do fígado. Altos títulos de anticorpos contra *B. burgdorferi* foram detectados no soro, leite e fluido sinovial.

SCHWAN *et al.* (1988) observaram mudanças na infectividade e uma redução no número de plasmídios detectáveis quando utilizavam cultura contínua em meio BSK-II. Além disso ocorriam mudanças também nas proteínas e lipopolissacarídeos das espiroquetas, durante este cultivo.

CALLISTER *et al.* (1990) estudaram os efeitos de albumina sérica bovina sobre o meio de BSK para detecção de *B. burgdorferi*. Eles demonstraram que a fração V da albumina sérica bovina, usada no meio de BSK, pode afetar a recuperação quando há um pequeno número de borrelias. Eles utilizaram 6 diferentes lotes de albumina sérica provenientes de três laboratórios (Armour, Sigma e GIBCO). Revelaram que a morfologia de *Borrelia* pode ser afetada por este ingrediente do meio; estas bactérias apresentavam-se menos móveis e tinham uma aparência granulada. Mostraram, ainda, que o crescimento de *B. burgdorferi* em meios com albumina de procedências diversas afetava a qualidade do teste indireto de anticorpo fluorescente.

Não tem sido relatada a atividade hemolítica de *B. burgdorferi* entretanto WILLIAMS & AUSTIN (1992) observaram zonas de β hemólise ao redor das colônias que cresciam em meio de BSK contendo agarose e sangue de equino. O meio foi incubado em jarra de anaerobiose com vela, por um período de 1 a 3 semanas a 34 °C. A hemólise foi mais acentuada no meio com sangue de equino do que no meio com sangue de bovino, ovino ou coelho. Esta hemólise, aumentava após incubação quente-frio, semelhante a atividade fosfolipásica típica, que ocorre com outras bactérias. A presença de *Borrelia* foi verificada pela microscopia de campo escuro.

KUIPER *et al.* (1994) isolaram *B. burgdorferi* a partir da biópsia de espécimens retiradas da pele com aparência saudável e do fluido cérebro-espinhal de pacientes com doença de Lyme. Estes autores utilizaram o meio de Kelly modificado adicionado de rifampicina e fosfomicina (concentração final de 50 mg/L e 100 mg/L, respectivamente) para inibir possíveis contaminantes bacterianos. A incubação foi feita a 33 °C durante 8 semanas. Em experimentos preliminares demonstraram que estas concentrações não inibiam o crescimento do microrganismo em questão. A cultura foi considerada positiva quando apareciam as espiroquetas móveis, observadas através da microscopia de campo escuro, realizada semanalmente.

BAHRMAND *et al.* (1996) descreveram um novo meio sólido para o crescimento de *B. microti* e *B. persica*. Normalmente o cultivo e isolamento de *Borrelia* demora cerca de 21 dias entretanto, neste novo meio, houve redução do tempo de cultivo para 72 horas. Isto permitiu um diagnóstico mais rápido das enfermidades causadas por estas duas bactérias e um tratamento melhor dos pacientes. O meio de cultivo denominado SCM (Solid Culture Medium) era composto de duas frações. A fração I era composta de Neopeptona, HEPES, citrato de sódio, glicose, piruvato de sódio, N-acetilglucosamina, bicarbonato de sódio, extrato de levedura, TC Medium 199, gelatina e soro albumina bovina. Após filtração os autores adicionaram kanamicina (8 µg/mL) e 5-fluorouracil

(230 µg/mL). A fração II consistiu de agarose, soro estéril de coelho e bicarbonato de sódio. As soluções dessas frações (I e II) foram misturadas e distribuídas em placas de Petri. A incubação foi feita em jarra de anaerobiose, numa temperatura de 34 °C. Estes autores obtiveram, ainda, uma curva de crescimento para as duas bactérias.

O cultivo de *B. burgdorferi* sobre o meio sólido pode facilitar o diagnóstico da doença de Lyme. PREAC-MURSIC *et al.* (1991) relataram sobre o cultivo de *B. burgdorferi* em seis meios de cultura sólidos utilizando soro de coelho e albumina sérica bovina, presentes ou não, nos diferentes meios: BSK agar, BHIAM agar, TAROM agar, MEM agar, MKP agar e PMR agar. Para tornar esses meios seletivos eles adicionaram co-trimoxazole, amicacina, fosfomicina e outros antibióticos. Após a incubação em jarras, com vela e na de Gaspak, por um período de 2 a 4 semanas, as colônias de *Borrelia* foram contadas e sua morfologia caracterizada. A cultura sobre o PMR agar resultou numa recuperação mais rápida e na melhor formação das colônias que variaram, em tamanho, de 0,3 a 3,0 mm. No meio MEM agar não houve crescimento deste microrganismo. Um crescimento pobre foi observado sobre os meios de BHIAM agar e de Tarom agar. As colônias foram contadas e a morfologia descrita. Foram examinadas através da microscopia de campo escuro e, logo após, recultivadas sobre PMR agar e em meio MKP.

SAMBRI & CEVENINI (1992) estudaram a incorporação, ou não, de cisteína em meio BSK para o isolamento de *B. burgdorferi* e *B. hermsii*. A quantidade de cisteína que eles acrescentaram foi de 0,185 -5,92 mM no CMRL testado. O crescimento bacteriano máximo ocorreu quando a concentração de cisteína, em CMRL 1066, alcançava 1,48 mM. Esta quantidade representava a concentração standard de cisteína no meio; altas concentrações inibiam o crescimento de *Borrelia*. Esses autores mostraram que a cisteína entrava nas células de *B. burgdorferi* e *B. hermsii* por difusão passiva, detectada através de cisteína radioativa. No meio CMRL sem cisteína o crescimento de *Borrelia* foi detectável, embora reduzido em aproximadamente 80%.

A contaminação bacteriana frequentemente interfere no sucesso da recuperação das espiroquetas da doença de Lyme quando se tem culturas de tecidos provenientes de humanos infectados com *B. burgdorferi*. Foi então que JOBE *et al.* (1993) realizaram estudos para a recuperação de *B. burgdorferi* pela utilização de filtros com poros medindo 0,20 ou 0,45 μm . Com estes filtros foi possível recuperar até mesmo baixas concentrações de cultura da *Borrelia* contaminadas com *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Todas as culturas foram filtradas e incubadas a 32 °C por 2 semanas. Eles concluíram que a filtração é um método de recuperação muito eficiente para culturas contaminadas.

POLLACK *et al.* (1993) procederam a padronização de um meio de cultura para isolar e cultivar espiroquetas da doença de Lyme. Este meio padronizado foi designado de BSK-H e não continha gelatina e nem agarose. Neste meio cultivaram *B. burgdorferi* N 40, *Guelford* e *JD-1*, amostras de *B. hermsii* (*HS-1*) e *B. coriaceæ* - *CO53* (ATCC 43381). Este meio, uma modificação do meio de BSK II, e seus componentes foram utilizados em proporções que diferenciavam das do meio original. Cada isolamento foi desenvolvido a partir de um inóculo de 1 a 5 células.

LEVINE *et al.* (1990) obtiveram, com sucesso, o crescimento de *B. anserina* em meio líquido (BSK) em 39 passagens. Na 12^a passagem a infectividade da *B. anserina* foi perdida. O meio BSK modificado foi preparado com 0,05% de soro de coelho e 0,04% de soro albumina bovina. A microscopia eletrônica não revelou estruturas diferentes entre culturas de organismos infectantes e não infectantes. Mudanças no perfil das proteínas foram encontradas através de eletroforese dos organismos passados em cultura.

WORMSER *et al.* (1998) estudaram a recuperação de *B. burgdorferi* do sangue ou soro de 25% de pacientes com doença de Lyme precoce associada com eritema migratório. O soro foi uma fonte para cultura do material, muito melhor do que o sangue. O meio utilizado foi o BSK sem agentes antimicrobianos.

CUTLER *et al.* (1994) realizaram, com sucesso, o cultivo de *B. recurrentis*, isolada de pacientes com febre recorrente transmitida por piolho, na cidade de Addis Ababa. Os soros destes pacientes foram inoculados em meios de Kelly e BSK-II e incubados a 35 °C. As espiroquetas foram examinadas pela microscopia de campo escuro.

NOHLMANS *et al.* (1995) fizeram análise genotípica e fenotípica de *B. burgdorferi* isolada de pele humana e de carrapatos da espécie *I. ricinus*, coletados de 17 localidades nos Países Baixos. O meio de cultura utilizado foi o BSK-II com adição de neomicina, sulfametoxazol e trimetoprim e, logo após, uma passagem em meio BSK sem antibiótico, foi estocado a -76 °C. Eles ainda realizaram a preparação do DNA, eletroforese da proteína, hibridização do DNA e Western blot.

A utilização de um método que constou da biópsia-punção de orelha de roedores, para detecção e isolamento de *B. burgdorferi* foi idealizado por SINSKY & PIESMAN (1989). Este método mostrou-se extremamente sensível, detectando até 100% de espiroquetas em hamsters infectados no laboratório através da picada de carrapatos e, até 95,8% em hamsters infectados por inoculação intraperitoneal. As culturas foram mantidas e isoladas em meio de BSK adicionado dos seguintes ingredientes: 0,023% de L-cisteína, 0,015% DL-ditioneitol, 1µg de L-glutamina por mL, 0,15% de agarose, 50µg de

rifampicina, 20µg de fosfomicina e 2,5µg de anfotericina B por mL. Todas as culturas foram mantidas a 34 °C e, após 6 semanas, as espiroquetas viáveis foram visualizadas pela microscopia de campo escuro.

A primeira caracterização de *B. burgdorferi sensu lato*, na Bulgária, foi realizada por CHRISTOVA *et al.* (1998) a partir de carrapatos da espécie *I. ricinus* e da biópsia de pele de pacientes com eritema migratório. Estes materiais foram inoculados em meio de BSK-H e incubados a 33 °C. Agentes seletivos foram adicionados, tais como: amicacina (10-20 mg/mL), trimetoprim-sulfametoxazol (25-50 mg/mL) e fosfomicina (50-100 mg/mL). As culturas foram checadas a cada 10 dias para o crescimento de *Borrelia*. Os autores obtiveram 8 amostras de *B. burgdorferi* provenientes de carrapatos e de uma biópsia de pele.

STRAUBINGER *et al.*, (1997) verificaram a persistência de *B. burgdorferi* em cães livres de patógenos, que foram infectados experimentalmente com este microrganismo e, logo após, tratados com altas doses de antibióticos. Para o isolamento de *Borrelia* utilizaram biópsia de pele dos cães antes e depois do tratamento com antibiótico. As amostras foram cultivadas em meio de BSK-II + meio de KR, incubadas a 34 °C por 5 semanas e observadas através de microscopia de campo escuro.

O método de cultivo e isolamento da espiroqueta da doença de Lyme, através da saliva de carrapatos da espécie *I. scapularis* (*I. dammini*) foi descrito por EWING *et al.* (1994). A saliva foi coletada a partir de carrapatos ingurgitados após a indução de salivação com pilocarpina. Foi possível isolar *B burgdorferi* de 8 das 14 amostras de saliva. O isolamento foi feito em meio de BSK com rifampicina (50µg/mL) ou kanamicina (8µg/mL), incubados a 33 °C e examinados periodicamente através da microscopia de contraste de fase para visualização das espiroquetas.

GÜNER (1994) cultivou *B burgdorferi* em um novo meio chamado ESG (antigo BSK-E), num sistema de co-cultura que tinha uma camada alimentadora de tecido tíbio-tarsal derivados de ratos LEW/N (esta articulação foi escolhida porque é o local onde *Borrelia* reside durante a infecção). Este novo meio foi desenvolvido para facilitar o crescimento, além de reter patogenicidade e infectividade de *Borrelia* mesmo após múltiplas passagens no sistema de co-cultura. O cultivo de *B. burgdorferi* “in vitro” em meio BSK resulta em uma baixa de patogenicidade e infectividade após repetidas passagens.

KONISHI *et al.* (1993) desenvolveram um sistema de cultivo “in vitro” com uso de cultura de células SfLEp (cottontail rabbit epithelium) para o crescimento de *B. duttoni* amostra 406 K. Esta *Borrelia*, agente causal da febre

recorrente, não se desenvolveu nos meios comumente utilizados para crescimento das borrelias.

WITTENBRINK *et al.* (1996) realizaram o primeiro cultivo de *B. burgdorferi* a partir do carrapato da espécie *I. ricinus*. Estes autores utilizaram meio BSK-II seletivo (BSK/C adicionado de cotrimoxazole numa concentração final de 500µg/mL e BSK/5 FK adicionado de 5-Fluorouracil e kanamicina na concentração final de 200 e 8µg/mL, respectivamente). O meio não seletivo (BSK-II) foi modificado pela variação das concentrações de albumina sérica bovina. O soro de coelho foi substituído pelo soro de cavalo. A maioria das espiroquetas isoladas (85%) foram detectadas com três semanas de incubação. As espiroquetas isoladas foram identificadas como *B. burgdorferi sensu lato* através do uso de PCR.

STRLE *et al.* (1996) isolaram, em 1994, *B. burgdorferi sensu lato* de 231 pacientes com eritema migratório; as amostras de pele afetada foram colocadas em meios que permitiam o crescimento de *Borrelia*. O cultivo das amostras foi feito em meio de BSK-II modificado pela adição de L- cisteína (1mM), dithiothreitol (1mM), rifampicina (40 µg/mL), e ciprofloxacina (0,4µg/mL). As culturas foram incubadas a 33 °C por um período mínimo de seis semanas. Os microrganismos foram observados através da microscopia de campo

escuro. Estudos sorológicos também foram realizados tais como ELISA, imunofluorescência indireta e Western blot.

HU *et al.* (1995) estudaram a ligação do plasminogênio humano com *B. burgdorferi*; eles utilizaram o plasminogênio marcado L¹²⁵. O plasminogênio liga-se à superfície da *Borrelia* e pode ser convertido para plasmina pelo ativador plasminogênio tipo uroquinase-humana. Segundo estes autores a associação da plasmina do hospedeiro com a proteína de superfície de *Borrelia* explicaria o mecanismo pelo qual *B. burgdorferi* pode digerir a matriz extracelular e depois disseminar-se pelo organismo. Os autores utilizaram as amostras *Borrelia* 297, G 39/40 e a N 40 que foram cultivadas em meio de BSK-II e cresciam numa temperatura de 32 °C; a monitoração das culturas foi feita através da microscopia de campo escuro.

MUNDERLOH *et al.*, (1988) descreveram a formação de colônias de *Borrelia burgdorferi* sobre o meio BSK solidificado pela adição de 1,5 % de agar, NaHCO₃ e com duas vezes a quantidade de gelatina. A concentração alta de agarose foi crítica, porque 1 % dos microrganismos não conseguiram formar colônias. Os autores fizeram diluições das espiroquetas que foram distribuídas sobre o meio e incubado em jarra com vela na temperatura de 34 °C . Após 2 a 4 semanas as placas foram examinadas através de microscopia de varredura. A média do diâmetro da colônia foi de 0,3 a 1,5 mm com um máximo de 1,9 mm

após 5 semanas. Dois tipos de colônias morfológicamente distintas, desenvolviam na camada superficial: uma das colônias era convexa rasa com borda lisa, algumas vezes com o centro elevado, e uma outra era granular e difusa. Formas intermediárias foram também observadas. Corpos esféricos possivelmente representando células degeneradas ou danificadas foram vistas no meio dos feixes de espiroquetas, especialmente no centro das colônias. Segundo o autor, a habilidade de *B. burgdorferi* para crescimento sobre o meio sólido, contitui-se uma opção para análises genéticas.

BRORSON & BRORSON (1998), estudaram as alterações estruturais de *B. burgdorferi* quando expostas ao fluido espinhal. As espiroquetas normais, móveis foram inoculadas dentro de tubos com fluido espinhal e após 1 a 24 horas, elas se convertiam para cistos (formas L- esferoplastos). Quando estas formas foram transferidas para o meio BSK- H, os cistos se convertiam para espiroquetas normais móveis após um período de 9 a 17 dias.

BARANTON & SAINT-GIRONS (1988), estudaram a sobrevivência de *B. burgdorferi*, cultivada por diversos meses em meio BSK II. Neste material foi adicionado de sangue de doadores normais e conservada numa temperatura de 4 °C. Deste material uma alíquota de 40 µL foi inoculada em BSK e examinado em 10 dias após incubação de 30 °C. Todas as culturas permaneciam positivas do 1° ao 25° dias. Estes autores concluíram que a *B. burgdorferi* sobrevive em

amostras de sangue quando estocadas em bancos de sangue, em uma temperatura de +4 °C, podendo ser transmitida por transfusão sanguínea.

HEROLDOVA *et al.* (1998) cultivaram, *B. Burgdorferi* sensu stricto amostra B-31 em meio líquido BSK–H, suplementado com 4,5 % de soro de coelho e com a adição fosfomicina e rifampicina. Na variação da temperatura de 25 °C a 27 °C, o tempo de geração foi entre 8:26 e 12:36 horas. A temperatura ótima de crescimento para *B burgdorferi* foi 33 °C , embora um bom crescimento ocorreu nas temperaturas de 28 °C, 30 °C, 35 °C e 37 °C. A amostra tinha um crescimento lento na temperatura de 25 °C e na de 20 °C nenhum crescimento foi observado.

LIVERIS *et al.*, (1999) realizaram o isolamento de *B. burgdorferi* a partir de 217 culturas oriundas de biópsia de amostras de pele e sangue de pacientes com borreliose de Lyme recente, os quais foram caracterizados geneticamente pelo PCR. As amostras de pele obtidas de pacientes com eritema migratório, foram colocadas em meio de transporte. Os tecidos foram transferidos em 0,5 mL de meio BSK adicionado de soro de coelho e gelatina. Desta suspensão foram colocadas 0,1 mL em 6 mL de meio BSK II com soro de coelho a 6% e gelatina (1,2%) e incubados a 34 °C por um período de 2 a 8 semanas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Amostras de *Borrelia*.

As amostras *B. burgdorferi* (G39/40) e *B. garinii* (1B 29) e o meio de BSK com soro de coelho (meio padrão) foram provenientes do Laboratório de doença de Lyme da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo. As amostras padrões foram conservadas em tubos “nunc” contendo meio BSK com 80% de glicerol estéril, em botijão de nitrogênio líquido.

3. 2. Meios de cultura utilizados

Os seguintes meios foram testados para cultivo de *B. burgdorferi* :

1) BSK padrão (Barbour- Stoenner - Kelly, que são iguais ao Kelly modificado) + soro de coelho; 2) BSK + soro de suíno (proveniente da Suinocultura da UFRJ); 3) BSK + soro de suíno e 5-fluorouracil; 4) BSK + soro de coelho + kanamicina; 5) BSK + soro de suíno + kanamicina 6) BSK + soro de bovino; 7) BSK + sangue de coelho + agar –agar a 5%; 8) BSK + sangue de suíno + agar-agar; 9) BSK + sangue de bovino; 10) BSK + agar -agar 0,1% + kanamicina + soro de coelho; 11) BSK + soro de coelho + kanamicina + rifampicina; 12) BSK + soro de caprino; 13) BSK + soro de coelho + 1,5 % de agar-agar; 14) PMR + soro equino; 15) PMR + soro de coelho ;16) PMR + soro suíno; 17) PMR + soro de suíno + resazurina;18) PMR + soro de suíno+Tween 80; 19) PMR + soro de equino + rifampicina; 20) PMR + soro de equino + kanamicina; 21) PMR + soro

de equino + albumina; 22) CTB (Trypticase Cysteine Broth); 23) CTB + soro de suíno; 24) CTB + soro de coelho; 25) CTB + soro de equino; 26) CTB + kanamicina; 27) Dubos; 28) Caldo Brucella, 29) Caldo Brucella +soro de coelho; 30) Caldo Brucella + soro de suíno; 31) Caldo Brucella + soro de bovino; 32) BHI. (Brain Heart infusion) ou agar; 33) BHI + NAG + 0,1 % agar - agar + 5 Flu; 34) BHI + 0,1% agar -agar + 2,0 mL de 5 Flu; 35) BHI + 0,1% de agar -agar + soro de bovino; 36) BHI + 1,5 % agar -agar + soro de coelho; 37) BHI + 0,1 % de agar -agar + Rifampicina e + kanamicina + soro de coelho; 38) BHI + 5 mL de 5 Flu ; 39) BHI + 1,0 mL de Flu; 40) BHI + NAG + 0,1 % de agar -agar; 41) Agar Columbia + soro de suíno; 42) Agar Columbia + soro de coelho; 43) Agar Columbia + soro de suíno; 44) Agar Columbia + soro de bovino; 45) Caldo Tioglicolato + soro de suíno; 46) Caldo Tioglicolato + 0,1% de agar -agar + soro de equino; 47) Caldo Tioglicolato + 0,1% de agar -agar + soro de suíno; 48) Caldo Tioglicolato + 0,1% de agar -agar + soro de suíno + kanamicina; 49) Meio de Stuart + soro de coelho; 50) Meio de Stuart + soro de equino; 51) Meio de Tarozzi + 0,3% de agar -agar; 52) NNN; 53) Meio de Noguchi, 54); Meio TSY (Trypticase Soy Yeast); 55) Meio de Middlebrook; 56) Caldo Casoy e 57) Leite com Azul de Bromotimol. (Apêndice 2).

Para cultivo de *B. garinii* foram utilizados os meios: 1) BSK padrão + soro de coelho + rifampicina + kanamicina; 2) BSK padrão + soro de coelho +

Kanamicina ; 3) BSK padrão + soro de coelho + rifampicina ; 4) BSK + soro de coelho + 5 mL de 5 fluorouracil; 5) BSK + soro de coelho + 1,5% de agar-agar; 6) BSK Sigma + soro de suíno + Rifampicina + kanamicina; 7) BSK Sigma + soro de suíno + 0,3 mL de 5 fluorouracil + rifampicina + kanamicina; 8) PMR + soro de equino + rifampicina + kanamicina; 9) PMR + soro de equino + rifampicina; 10) PMR + soro de equino; 11) PMR + soro de suíno + rifampicina + kanamicina; 12) PMR + soro de suíno; 13) BHI + rifampicina + kanamicina + 1,0 mL de 5-fluorouracil ; 14) BHI + 0,1 % agar-agar + 1,0 mL de 5-fluorouracil; 15) BHI ; 16) BHI + 1,0 mL de 5-fluorouracil; 17) BHI + soro de suíno + rifampicina + kanamicina + 0,3 % de agar –agar; 18) BHI + 2,5 mL de 5-fluorouracil; 19) Caldo Brucella + soro de suíno ; 20) Caldo Brucella + rifampicina + kanamicina; 21) Caldo Brucella + soro de suíno + rifampicina + kanamicina + 0,3% de agar-agar; 22) Caldo Brucella; 23) CTB; 24) CTB + soro de suíno + rifampicina + kanamicina + 0,3% de agar-agar; 25) Tarozzi + rifampicina; 26) Tarozzi. (Apêndice 3).

Todos os meios foram preparados assépticamente e mantidos em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL ou em placa de Petri com diâmetro de 50x20 mm. Para cada meio de cultivo o inóculo foi padronizado de modo a conter, no início, 10^2 espiroquetas para cada 0,1 mL de cultivo.

3. 3. Preparo dos Meios utilizados.

3. 3. 1. Meio BSK (=Barbour- Stoenner- Kelly).

O Meio BSK foi adquirido no mercado ou preparado segundo descrição original (Apêndice 1). Autoclavou-se, por 15 minutos a 120 °C, 17g de gelatina bovina¹ em 300ml de água bidestilada. Uma solução A foi preparada dissolvendo 5,0g de Neopeptone² 1,0g de Triptone² e 1,0g de Yestiolate² em 300mL de água bidestilada aquecida entre 50 e 70 °C.

A solução B foi preparada acrescentando-se, em 600ml de água bidestilada, 100ml de meio para cultura de células CMRL 1066³; após dissolvido adicionou-se 6,0g de tampão HEPES¹ sódio (N- 2 hydroxyethyl-piperazine-N`-2 -ethane sulfonic acid buffer); 0,7g de citrato de sódio; 5,0g de alfa D⁺ glicose; 0,8g de piruvato de sódio; 0,4g de N-acetilglucosamina; 2,2g de bicarbonato de sódio; 0,3g de cloreto de magnésio seis vezes hidratado; 0,1g de glutamina; 143mL de albumina bovina, fração V¹, a 35% e, por fim, adicionou-se a solução A, previamente preparada. Ajustou-se o pH para 7,55 com NaOH 10M.

Sob fluxo laminar estéril filtrou-se 100ml de soro de coelho⁴ a 37° C em microfiltros de 0,45µm e de 0,20µm.

¹ Sigma

² Difco

³ Connaught Medical Research Laboratories

⁴ Sigma

Filtrou-se a solução B passando por três etapas: papel de filtro comum, microfiltros de 0,45 μ m e de 0,20 μ m, consecutivamente. Misturou-se, em um balão volumétrico de 2,0 litros, a solução A, a solução B, o soro de coelho e a gelatina autoclavada, numa câmara de fluxo laminar. O volume obtido foi transferido para dois frascos de cultura de 500ml, e o restante em alíquotas de 3,0 ml em tubos de cultura com capacidade de 10ml.

O teste de esterilidade do meio (em alíquotas) foi feito em estufa a 33 °C durante 48 horas.

A uma alíquota do meio adicionou-se uma gota de suspensão de espiroquetas, mantendo-as em estufa a 33 °C por uma semana, realizando-se assim o "teste de viabilidade".

Conservou-se o meio BSK a 4 °C para uso em até duas semanas, ou a 70 °C negativos, para uso por tempo indefinido.

3.3.2. Meio BSK-K5 (-Kanamicina–5-fluorouracil).

Meio de BSK-K5, segundo JOHNSON *et al.* (1984) é o meio BSK adicionado de Kanamicina (8 μ g/mL), 5-fluorouracil (230 μ g/mL), soro de coelho ou soro de suíno, ambos a 6%. O pH foi ajustado para 7,5

3.3.3. Meio *Trypticase Soy Yeast Broth* (TSY).

O meio Trypticase Soy Yeast Broth (TSY), DODGE (1973) - Fração A, foi preparado com 7,5g Trypticase Soy Broth base (BBL); 2,5g de Extrato de Levedura (Difco); 4,3g de Gelatina; 6,2mL de uma solução a 0,8% de Azul de Bromotimol; 250mL de água destilada. Este meio foi autoclavado a 120°C durante 15 minutos. Após o resfriamento da mistura acrescentou-se 2,3mL de uma solução de 10g de albumina sérica bovina previamente diluída em 100mL de água destilada. A Fração B foi feita com as seguintes substâncias dissolvidas em 25mL de água destilada: N-acetilglucosamina 0,2g; piruvato de sódio 0,26g; NaHCO₃ 0,54g; essa mistura foi dividida ao meio, uma metade foi adicionada a 11mL de soro de coelho e a outra a 11mL de soro de suíno, em tubos separados, e esterilizadas através de filtro de Seitz. O pH foi ajustado para 7,4.

3. 3. 4. Meio de CTB - Trypticase Cysteine Broth (BBL).

CTB acrescido de 1% de extrato de levedura; 1% de glicose; 20mL de albumina e a Fração B como descrita acima. Neste meio o pH foi: 7,3

3. 3. 5. Meio PMR.

CMRL, 200mL; glicose, 4g; HEPES, 12g; citrato de sódio, 1,4g; piruvato de sódio, 0,8g; N-acetilglucosamina, 0,8g; tioglicolato, 2g; soro de

equino, 20mL e água destilada, 1L. Neste meio o pH variou entre 6,4; 6,5; 6,8; 7,0 e 7,5.

3. 3. 6. Meio de BHI (Difco).

“Infusion calf brains”, 200g; “beef heart infusion”, 250g; “proteose peptone” (Difco), 10g; bacto dextrose, 2g; cloreto de sódio, 5g; fosfato dissódico, 2,5g. O meio foi reidratado em 37g/L de água destilada e o pH ajustado para 6,5; 7,0 e 7,5.

3. 3. 7. Caldo Brucella

Tryptone, 10g; peptamin, 10g; dextrose, 1g; extrato de levedura, 2g; NaCl, 5g. Este meio é autoclavado por 15 minutos a 121⁰C; em seguida, foi adicionado 0,1g de bissulfito; o pH final do meio foi 6,5; 7,0 e 7,5 a 25 ⁰C.

3. 3. 8. Meio de Dubos (Dubos broth base).

Bacto-casitone, 0,5g; Bacto-asparagina, 2,0g; monopotassium phosphate, 1,0g; disodium ammonium citrate, 50mg; magnesium sulfate, 10mg; calcium sulfate, 0,5mg; zinc sulfate, 0,1mg e copper sulfate, 0,1mg. O pH deste meio foi de 6,5; 7,0 e 7,5.

3. 3. 9. Meio de Noguchi.

Salina a 0,9 %, 89 mL; soro de coelho, 10mL; extrato de levedura, 1g; agar-agar, 2g; hemoglobina, 1ml. Meio autoclavado a 121° C por 15 minutos. O pH do meio :7,0.

3. 3. 10. Meio de Middlebrook 7 H 9 broth

Sulfato de amônio, 0,5g; ácido glutâmico, 0,5g; citrato de sódio, 0,1g; piridoxina, 0,001g; biotina, 0,0005g; fosfato disódico, 2,5g; fosfato monopotássico, 0,04g; citrato de ferro e amônio, 0,04g; sulfato de magnésio, 0,05g; cloreto de cálcio, 0,0005g; sulfato de zinco, 0,01g e sulfato de cobre, 0,001g. O pH deste meio variou entre 6,5, 7,0 e 7,5.

3. 3. 11. Caldo tioglicolato (thioglycollate broth).

Bacto yeast extract, 5g; peptona de caseína , 15g; Bacto dextrose, 1g; sodium chloride, 2,5g; L-cysteine, 0,5g e tioglicolato de sódio , 0,5mL. pH= 7,1 + 0,1.

3. 3. 12. Meio NNN (Neal, Novy e Nicolle).

Água destilada, 900mL; agar-agar, 14g; cloreto de sódio, 6g e 15% de sangue de coelho.

3.3.13. Meio de Tarozzi

Caldo glicosado 100 mL; agar 0,6% e pedaços de fígado bovino.

3.3.14. Leite + azul e bromotimol

Leite desnatado e azul de bromotimol.

Alguns meios (Apêndice 1) foram enriquecidos com soro de equino, bovino, suíno, caprino e coelho. Para torná-los seletivo foi utilizado kanamicina (8 µg/mL) e rifampicina (50µg/ mL). Foram adicionados, ainda, em alguns deles, 5 fluorouracil, resazurina, Tween 80 e vitamina B12, bem como pela variação de pH em alguns meios. O Tween 80 (=monooleato de polioxietileno sorbitana), além de estimular o crescimento, torna hidrófila a superfície da bactéria e, deste modo, propicia vegetação dispersa (BIER, 1985).

O tioglicolato de sódio é comumente utilizado como agente redutor; ele combina quimicamente com o oxigênio dissolvido em um meio e torna-o não disponível para os microrganismos. (PELCZAR *et al.*,1997). O tioglicolato é tóxico para quase todas as amostras, embora o grau de toxidez seja influenciado por outros componentes do meio (MOSSEL & BEERENS,1967). WILLIS

(1977) relatou que o tioglicolato é inibidor para o crescimento de alguns clostrídeos e torna-se tóxico, gradualmente, durante a estocagem. A resazurina (7 hydroxy- 3H- phenoxazin- 3- one. 10- oxide C₁₂H₇ NO₄ é um corante indicador de redox, utilizada comumente em cultivo de bactérias anaeróbias. É uma substância solúvel em álcool , ácido acético glacial. É insolúvel em água. Em pH 3,8 é laranja e em pH 6,5 é violeta escuro. (Index Merck, 1983) (Apêndice 1).

3. 4. COLORAÇÕES.

3. 4. 1. Coloração com cristal violeta e fucsina básica.

Foi feito um esfregaço, em lâmina de microscopia, com 10 µL da cultura; este esfregaço foi seco ao ar, fixado no metanol, em partes iguais, por 3 minutos e corado com cristal violeta ou fucsina por 5 minutos; em seguida foi lavado em água destilada.

3. 4. 2. Coloração com safranina.

Uma gota da cultura foi colocada entre lâmina e lamínula e, em seguida, adicionado a mesma quantidade do corante safranina e metanol (em partes iguais) e deixado até secar.

3. 4. 3. Coloração com verde brilhante.

10uL da cultura foram depositados na superfície da lâmina e fixados, durante 3 minutos, com igual quantidade de metanol; em seguida foi corado com verde-brilhante durante 10 minutos e lavado em água destilada

3. 4. 4. Coloração de Giemsa.

Preparo da cultura a ser corada; fixação em metanol por 3 minutos; em seguida foi colorida com o corante de Giemsa a 10% (Merck) por 30 minutos e lavada em água destilada.

3. 4. 5. Coloração de May-Grünwald.

Preparo da cultura; a lâmina foi corada com o corante de May-Grünwald por 3 minutos e lavada em água destilada.

Todas as lâminas coradas foram observadas com objetivas de 16x, 25x e 40x na microscopia de campo escuro e/ou contraste de fase.

3. 5. Contagem de células nos diferentes meios.

Os seguintes meios de cultura foram utilizados para a contagem de das espiroquetas: BSK-coelho, BSK-suíno, BSK-suino+5-fluorouracil, PMR, CTB, Dubos, Caldo *Brucella* e BHI, . Os últimos 7 meios foram adicionados 0,3% de agar-agar e 6% de soro de suíno. Em cada tubo com 3mL de meio foram

inoculados 10 μ L das culturas de *B. burgdorferi* ou *B. garinii*. Para o cultivo de *B. garinii* adicionou-se os antibióticos kanamicina e rifampicina. Todos os tubos foram incubados a 34 °C, e a contagem realizada diariamente.

Para contagem das espiroquetas, 10 μ L da cultura homogenizada, foram depositados sobre lâmina de microscopia e coberto com lamínula de 30x10 mm. A contagem das espiroquetas foi feita com aumento de 250x ou superior, pela microscopia de campo escuro ou contraste de fase. Esta contagem foi feita, diariamente, até o 14^o dia; a partir desta data, a contagem foi realizada 2 vezes por semana, até a 14^a semana. Quando o número de espiroquetas aumentou, inviabilizando a contagem, tornou-se necessário promover diluições seriadas, em salina, para as concentrações 1/10; 1/100 ou 1/1000.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Meios de Cultivo de *B. burgdorferi* e *B. garinii*.

De um total de 57 meios de cultura sólidos ou líquidos, testados e comparados, para manutenção de *B. burgdorferi* e 26 para *B. garinii* (Apêndices 2 e 3), 8 diferentes meios foram eficientes como substratos para crescimento das duas amostras (Figuras 5 a 12; Apêndice 4 e 5).

Poucas espécies de *Borrelia*, tem sido cultivadas *in vitro* e, nestes casos, os meios de cultura incluem ingredientes como soro de coelho, albumina sérica bovina, peptonas, piruvato, citrato de sódio e N – acetilglucosamina.

O meio de BSK foi modificado no presente trabalho pela substituição do soro de coelho por diferentes substratos, incluindo soro de outros animais. Assim como também nos meios PMR, Tioglicolato, Caldo Brucella, Dubos, nos quais adicionou-se soro de suíno e/ou antibióticos.

No presente trabalho, foi observado crescimento exuberante de *B. burgdorferi*, no meio BSK adicionado de soro de coelho, entre a 4ª semana e o 3º meses pós inoculação. Após 100 dias, as espiroquetas apresentavam-se finas, sem espiral e em número reduzido. Nos meio BSK adicionado de soro de suíno,

BSK adicionado de soro de suino + 5 fluorouracil, PMR, CTB, BHI, Caldo Brucella, Dubos, Agar Columbia, Tioglicolato. (Apêndice 2) foi observado crescimento compatível com o observado no meio BSK, adicionado de soro de coelho. Nos demais meios testados (Apêndice 2) foi observado pouco ou nenhum crescimento.

O crescimento de *B. garinii* nos diferentes meios de cultivo, foi exuberante nos meios de BSK, PMR, BHI, Caldo Brucella, CTB. Não havendo nenhum crescimento no meio de Tarozzi (Apêndice 3). No presente trabalho, o crescimento de *B. garinii* foi exuberante no meio de BSK adicionado de soro de coelho, kanamicina e rifampicina a partir da 6ª semana.

Não tem sido relatada a atividade hemolítica de *B. burgdorferi*, mas segundo WILLIAMS & AUSTIN (1992), zonas de β hemólise foram observadas ao redor das colônias que cresciam em meio de BSK sendo mais acentuada com sangue de equino. Na presente pesquisa, não foi observado a presença de hemólise.

DODGE, (1973), isolou *B. recurrentis* utilizando vários meios enriquecidos e referiu-se ao grau elevado de exigência da espécie, quanto ao conteúdo dos meios. Na avaliação dos meios utilizados a autora concluiu que: 1) O máximo de crescimento ocorreu no meio de TSY-S; 2)- Todos os meios foram capazes de suportar o crescimento ativo do microrganismo testado; 3)

Nenhum crescimento ocorreu quando a albumina era retirada do meio. No presente trabalho foi observado crescimento de *B. burgdorferi* nos mesmos meios relacionados por DODGE (1973), e até mesmo nos meios com ausência da albumina.

POLLACK *et al.* (1993), comentaram sobre os componentes proteínicos, tais como a albumina sérica bovina, a origem e qualidade do soro como fatores críticos que afetam a dinâmica do crescimento das espiroquetas. Na standardização do meio de cultura, POLLACK *et al.* (1993), retiraram a gelatina, a agarose e alguns outros ingredientes do BKS II, alterados em sua concentração, mantendo porém, o soro de coelho a 6%. Este produto foi designado BSK H.

Segundo BARBOUR (1986) e WITTENBRINK *et al.*, (1996), a albumina sozinha ou em combinação com soro de coelho fornece os ácidos graxos de cadeia longa que são incorporados dentro dos lipídeos da célula. O efeito do piruvato de sódio sobre o crescimento da *Borrelia in vitro*, estimula a glicólise quando presente em concentrações baixas. CALLISTER *et al.*, (1990), demonstraram que a fração V da albumina sérica bovina, usada no meio de BSK pode afetar a recuperação de borrelias.

WITTENBRINK *et al.*, (1996), indicaram que em mais de 50 amostras de *B. burgdorferi* o crescimento foi bastante rápido com a adição de até 2,5 % de

albumina sérica bovina. Em todas as amostras testadas, segundo os autores, a morfologia celular e a motilidade foram preservadas. Segundo BARBOUR, (1986), a *B. burgdorferi*, é móvel em suspensões, a qual é acentuada quando se adiciona glicose ao meio de cultura.

JOHNSON & ROGERS (1964), mencionam que o 5 Fluorouracil, um análogo de uracil, é ativo para a inibição do crescimento de muitas bactérias e seu uso tem a vantagem de eliminar ou restringir contaminantes.

4.2. Conservação de *B. burgdorferi* em Geladeira

Meio de cultura BSK, contendo *B. burgdorferi* em tubo “nunc” adicionado de glicerol a 80%, foi conservado no congelador de geladeira durante um ano e 6 meses. Após este período procedeu-se o repique em meio de BSK com soro de coelho produzindo um bom crescimento, com as células bastante móveis e espiraladas e em grande número.

4.3. Cultivo de *B. burgdorferi* e *B. garinii* com variação de pH

No meio BSK pH 7,5 com soro de coelho; BSK pH 7,5 com soro de suíno e BSK pH 7,5 com soro de suíno adicionado de 5-fluorouracil, observou-se presença de exuberante crescimento de borrelias entre 4 semanas e 4 meses após o cultivo (Apêndice 2).

No meio de cultivo PMR pH 7,0 observou-se crescimento exuberante no período entre 3 semanas e 5 meses, sendo que no final, as espiroquetas moviam-se lentamente, porém, conservavam a forma espiralada. No meio PMR pH 6,5 observou-se crescimento semelhante por até 6 meses, fato não observado no mesmo meio com pH ajustado para 7,5.

No meio de BHI pH = 7,0 observou-se espiroquetas espiraladas e com movimento por mais de 5 meses. Neste meio em pH 6,5 e 7,5, não houve crescimento.

A utilização de diferentes variações de pH dos meios Caldo tioglicolato adicionado de soro de suino, Caldo Brucella, Meio de Dubos, produziram resultados variáveis (Apendice 2). Segundo BRUCK *et al.* (1995), o sucesso na conversão da fase de espiroquetas em esferoplastos foi influenciada pela variação do pH. Não foi encontrado na literatura, referência bibliográfica relacionada com variação de pH.

4.4 Cultivo de *B. burgdorferi* em meio sólido.

4.4.1. Agar em placa.

Em placas de agar Columbia com sangue de coelho; agar Columbia com sangue de suino; BSK com sangue de bovino; BSK com sangue de suino e BSK com sangue de coelho, após incubação em jarra em ambiente de microaerofilia

(Apêndice 2) observou-se que houve crescimento de *B. burgdorferi* sem no entanto, ter sido observado colônia a olho nú. Nestes meios, o crescimento do microrganismo foi observado através da microscopia de campo escuro, formas espiraladas e com pouca motilidade.

No presente trabalho, foi possível o cultivo de *B. burgdorferi* em meios sólidos, o que foi confirmado pela presença da espiroqueta, visualizada através da microscopia de campo escuro; entretanto, não foi possível determinar a sua morfologia colonial. O trabalho de BARBOUR (1984) sobre *B. burgdorferi* cita que o crescimento foi exuberante, mas o autor não relatou a formação colonial. Entretanto, nos trabalhos de PREAC-MURSIC *et al.*, (1991), ao utilizarem 6 diferentes meios, para o cultivo de *B. burgdorferi*, apenas no meio PMR houve um melhor crescimento da espiroqueta. Neste trabalho, as colônias de borrelias foram examinadas com lente de aumento e, sua morfologia caracterizadas quanto a sua superfície e tamanho. Nestes dois trabalhos houve uma semelhança de dados com a presente pesquisa, no que se refere a visualização das colônias de *B. burgdorferi*.

Segundo BAHRMAND *et al.*, (1996) *B. microti* e *B. persica* tiveram ótimo crescimento no meio SCM, tornando possível a obtenção de colônias isoladas em apenas 72 horas, com um diâmetro entre 0,2 e 0,8 mm. Estes autores utilizaram o meio TC 199, de cultura de tecido. Este meio contém, não somente

aminoácidos do tipo D, mas também do tipo I, que são importantes para a síntese de glicopeptídeos necessários a formação da parede celular da bactéria e conseqüentemente promovendo um rápido crescimento bacteriano. Com relação ao tempo de geração, verificaram que era de 6:25 e 9:55 horas, respectivamente.

BARBOUR (1984) cultivou a amostra B 31 sobre o meio BSK solidificado com uma concentração de 0,8% de agarose. KURTTI *et al.*, (1987), utilizaram uma concentração mais alta de agar igual a 1,3 % em meio BSK e também adicionado de 2 vezes a quantidade de gelatina, e após incubação em ambiente de microaerofilia, observou o desenvolvimento de discretas colônias de borrelia. KELLY (1971); testando outras concentrações de agar, verificou que 0,8% de agar não foi satisfatório e que também havia uma migração extensiva das espiroquetas através o meio. Embora 1,5 % de agarose tenha produzido crescimento satisfatório, houve dificuldade para dissolver a agarose no meio BSK. Este fato foi observado no presente trabalho.

BARBOUR, (1984), observou a tendência da *B. burgdorferi* de ficarem isoladas; porém formando grandes agregados com o crescimento obtido em subpassagens. Segundo o autor, estes agregados foram visualizados não somente através da microscopia, como também macroscopicamente.

Muitos estudos sobre o crescimento de *B. burgdorferi* em meios sólidos foram falhos porque a espécie produz discretas colônias, as quais são observadas com auxílio de lupa .

4.4.2. Cultivo em agar inclinado

Nos meios BHIA inclinado adicionado de soro de suino e BSK agar inclinado, adicionado de soro de coelho, repicados com *B. burgdorferi* incubados por 2 meses, foi possível visualizar exuberante crescimento, as quais encontravam-se espiraladas e com pouca motilidade. No meio de BHIA inclinado adicionado com soro de coelho, não houve crescimento.

4.5. Coloração de *Borrelia burgdorferi* e *B. garinii*

Na coloração com cristal violeta e na com fucsina, as células de *Borrelia* sp apresentaram-se bem coradas, de cor roxa ou vermelha, respectivamente, e a sua forma espiralada sendo preservada, com um número incontável de células.

Na coloração com safranina, o corante ficou ao redor da lamínula e difundiu-se pouco para o centro da lâmina. Com isso as células apresentavam-se descoradas, em fundo pouco corado, em grande número mostrando nitidamente a

sua forma espiralada. Nesta coloração, passados 6 meses, observou-se que as células permaneciam sem alteração, mantendo a forma espiralada.

Na coloração com verde brilhante as células de *Borrelia* apresentavam -se coradas em verde, em um número incontável e também mantida a sua forma espiralada.

Na coloração de May-Grünwald as células de *Borrelia* ficaram coradas em azul escuro, o que facilitou a contagem das células na dinâmica do crescimento, porém a lâmina preparada só durava dois dias.

A membrana externa das espiroquetas, quando comparada com a membrana externa de bactérias Gram negativas, é substancialmente mais suscetível à ruptura pela manipulação física e/ou por agentes químicos (RADOLF *et al.*, 1994). Este fenômeno pode explicar o insucesso de algumas colorações realizadas, em decorrência da ruptura produzida pelos componentes do corante na espiroqueta. Este fato foi constatado no presente trabalho.

4.6 . Formas císticas de *B. burgdorferi*

A presença de formas císticas de *B. burgdorferi* e *B. garinii* observadas no presente trabalho, apresentou maior frequência nos meios de cultivo desfavoráveis, porém ocorrendo também em meios favoráveis como no BSK.

Estas formas císticas foram observadas principalmente durante a contagem de células.

Segundo BRORSON & BRORSON (1997), condições desfavoráveis, representada pela presença de antibióticos, estimulam a criação dessas formas, este estado de baixa atividade é importante para sua sobrevivência em ambiente desfavorável. A eficácia do antibiótico requer um metabolismo ativo da bactéria; portanto, é provável que a forma cística de *B. burgdorferi* constituia uma forma resistente ao tratamento com antibiótico. Este fenômeno, segundo BRORSON & BRORSON (1997) pode explicar as razões da borreliose de Lyme ser de difícil tratamento em alguns pacientes e que as membranas que circundam as formas encistadas as protejam contra stress externo.

No presente experimento as formas encistadas de *B. burgdorferi* apareceram quando se utilizou meios desfavoráveis ao seu crescimento, mas no entanto, ocorreu também no meio de BSK, com e sem antibiótico, após 1 a 2 semanas.

Formas císticas intra e extracelulares tem sido observadas, a partir de biópsia de pacientes, com borreliose de Lyme. BRORSON & BRORSON (1997), verificaram que a ocorrência de formas císticas de *B. burgdorferi* in vitro quando cultivada em meio de cultura comercial sem soro, ocorrendo uma reversão para forma espiralada quando estes cistos foram colocados no mesmo

meio de cultura adicionado de soro. No qual elas apresentavam-se móveis e espiraladas após 6 semanas. Estes cistos foram observados através microscopia eletrônica, revelando a presença de uma fissão transversa no interior dos mesmos. É provável que fenômeno semelhante ocorra in vivo, sob condições desfavoráveis para estes microrganismos. Tais observações podem auxiliar o diagnóstico e tratamento de infecções causadas em seres humanos.

4.7 Dinâmica de crescimento em meios líquidos

Para estudo da dinâmica de crescimento, o número inicial de espiroquetas foi ajustado para 10^2 células por 0,1mL de meio. Nos meios BSK adicionado de soro de coelho, BSK adicionado de soro de suíno, BSK adicionado de soro de suíno + 5 fluorouracil, PMR, CTB, BHI, Caldo Brucella e meio de Dubos (Figura 5 a 8 e Apêndice 2), foram observadas pequenas oscilações nos números de células nos primeiros 14 dias, cuja contagem permaneceu entre 20 e 140 unidades para *B. burgdorferi* e 05 a 120 para *B. garinii* por 0,1 mL de meio (Figuras de 5 a 8 e 9 a 12). A partir da segunda semana observou-se discreto crescimento em todos os meios, com o platô de crescimento da *B. burgdorferi* entre a 8^a e 13^a semana, a partir de quando houve significativo decréscimo na contagem (Figuras de 7 a 8) e para *B. garinii*, observou-se crescimento a partir do

6^a semana atingindo o platô de crescimento entre a 9^a e 12^a semanas, exaurindo o meio de cultivo (Figuras 11 a 12).

Os meios a base de BSK, propiciaram melhores condições para crescimento, tendo atingido o número de $1,2 \times 10^3$ células na 12^a semana.

BAHRMAND *et al.* (1996), descreveram um meio sólido para o crescimento de *B. microti* e *B. persica*. Normalmente o cultivo e isolamento de *Borrelia* demora ao redor de 21 dias. Contudo, no meio proposto por BAHRMAND *et al.*, (1996), houve redução do tempo de cultivo para 72 horas, o que permitiu um diagnóstico mais rápido. HEROLDOVA *et al.* (1998), estudaram o tempo de geração de *B. burgdorferi sensu stricto* em diversas temperaturas e observaram que na variação de temperatura entre 25 °C a 27 °C o tempo de geração foi de 8:26 e 12:36 horas.

Segundo DODGE (1973), o tempo de geração de *B. recurrentis*, em meio de cultura ocorreu num período de 11:03 horas. Esta autora observou que as culturas cresciam melhor em aerobiose do que em anaerobiose. A incorporação de 1,1 % de gelatina auxiliou a diminuir o número de formas degeneradas e a quantidade de gelatina abaixava a velocidade de reprodução destes microrganismos. Todos os meios utilizados pela autora, foram capazes de suportar o crescimento da *Borrelia*. As amostras de *B. recurrentis* tendem a serem finas e extremamente móveis quando são cultivadas em meios líquidos. A

adição de gelatina e sucrose, tornaram os microrganismos espessos com motilidade ligeiramente reduzida. Este fato foi constatado no presente trabalho.

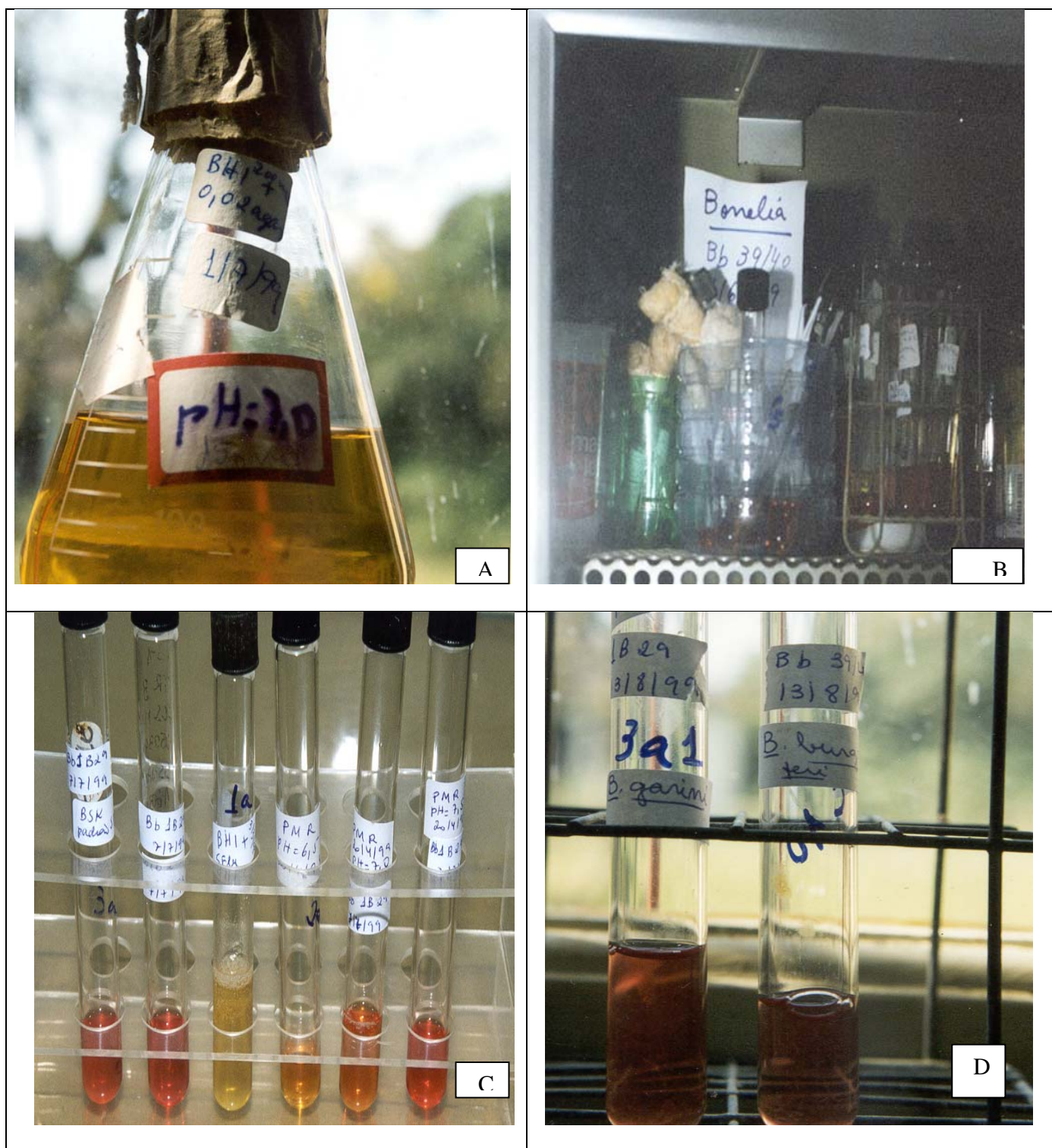


Figura 1 – A. Erlenmeyer contendo meios de cultivo, B – Estufa bacteriológica com diferentes meios para cultivo de *Borrelia* spp, C e D – Diferentes meios de cultivo em tubos de ensaio.

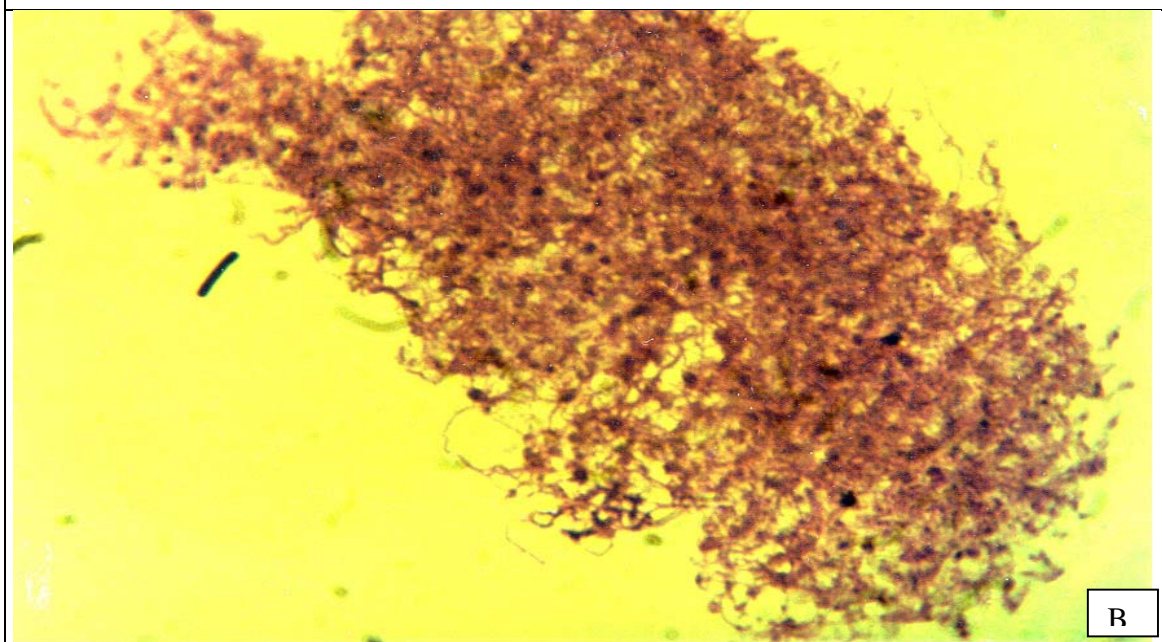
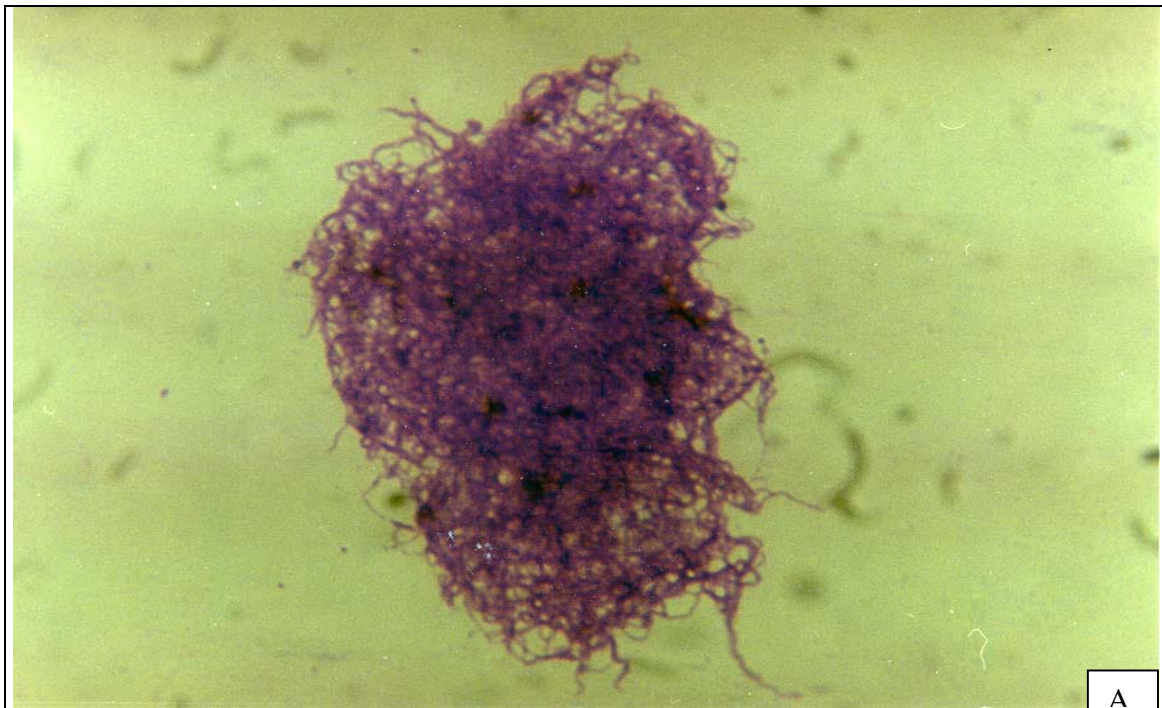


Figura 2 – Enovelado de *Borrelia burgdorferi* Ceba G 39/40 Coloração pelo método de Giemsa e microscopia ótica, A) 400X e B) 1000X.

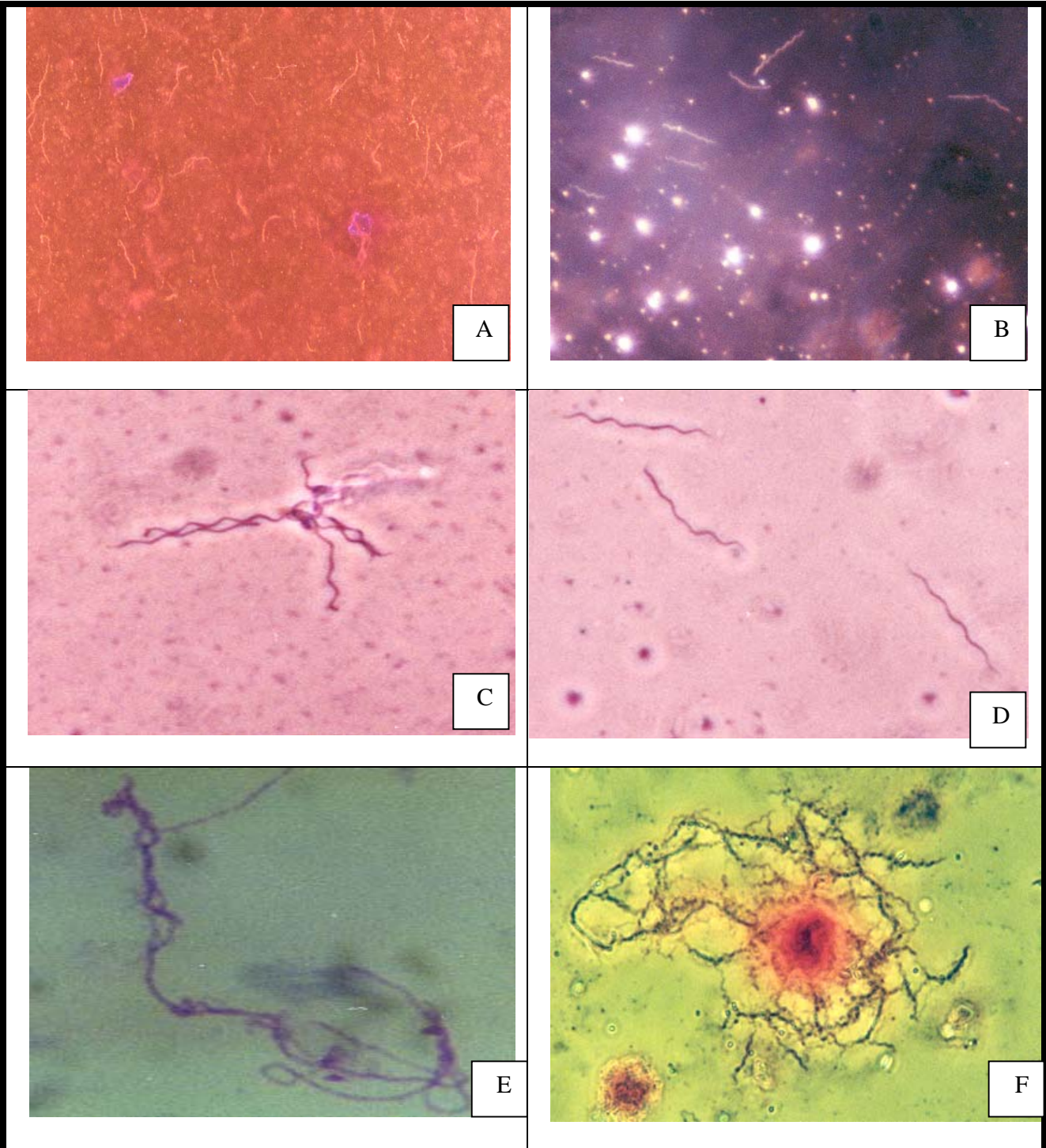


Figura 3 Diferentes colorações das células de *Borrelia burgdorferi* G39/40, cultivadas em meio BSK com soro de Coelho. A - Microscopia de contraste de fase, coloração de Giemsa 250X; B- Campo escuro, 400 X; C e D, Giemsa e 400X; E e F. Coloração com Fucsina 1000X e 400X.

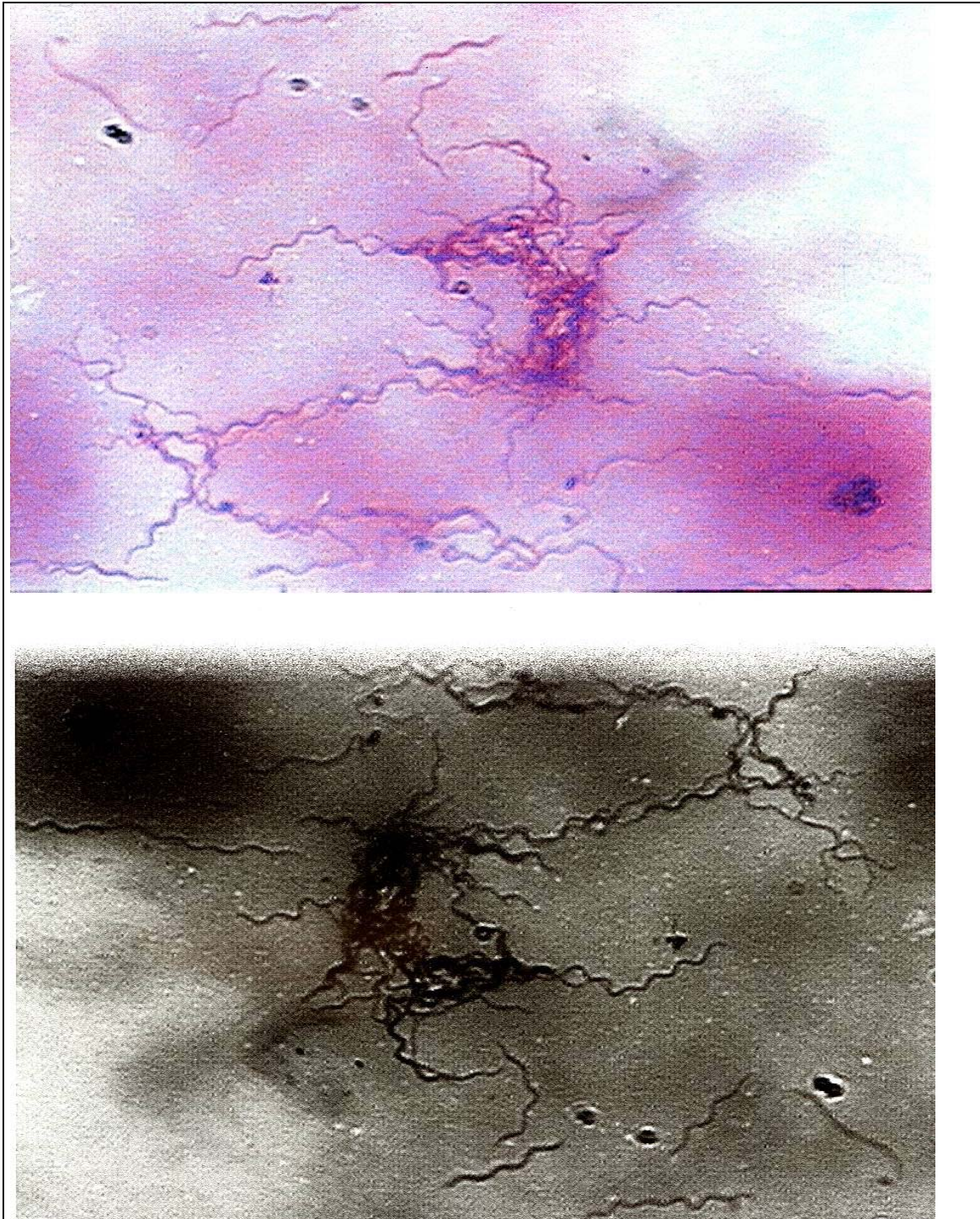


Figura 4 *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, cultivada em meio BSK com soro de coelho.
A. Coloração com Fucsina 1000 X. B. Sem corante.

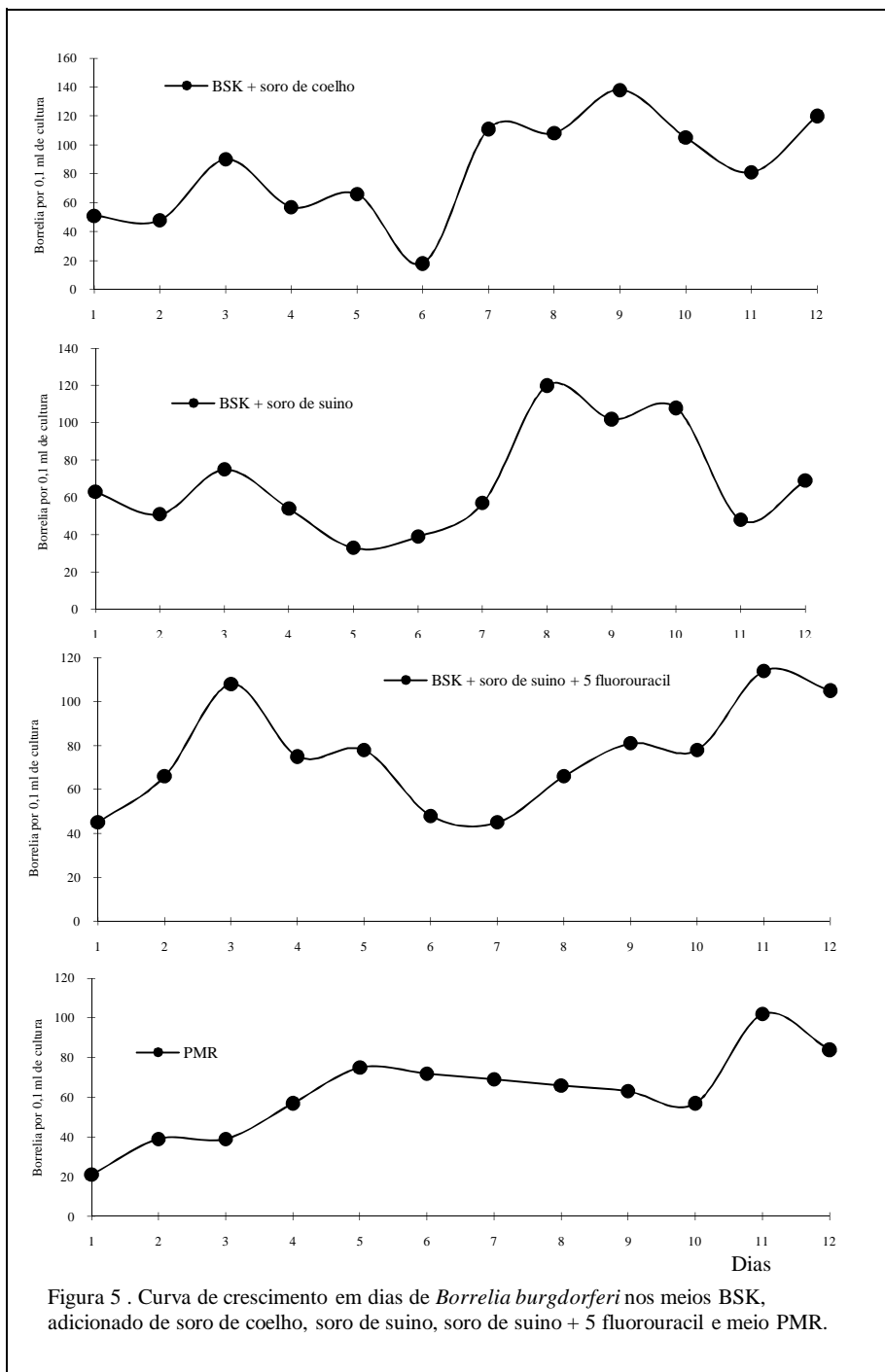


Figura 5 . Curva de crescimento em dias de *Borrelia burgdorferi* nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.

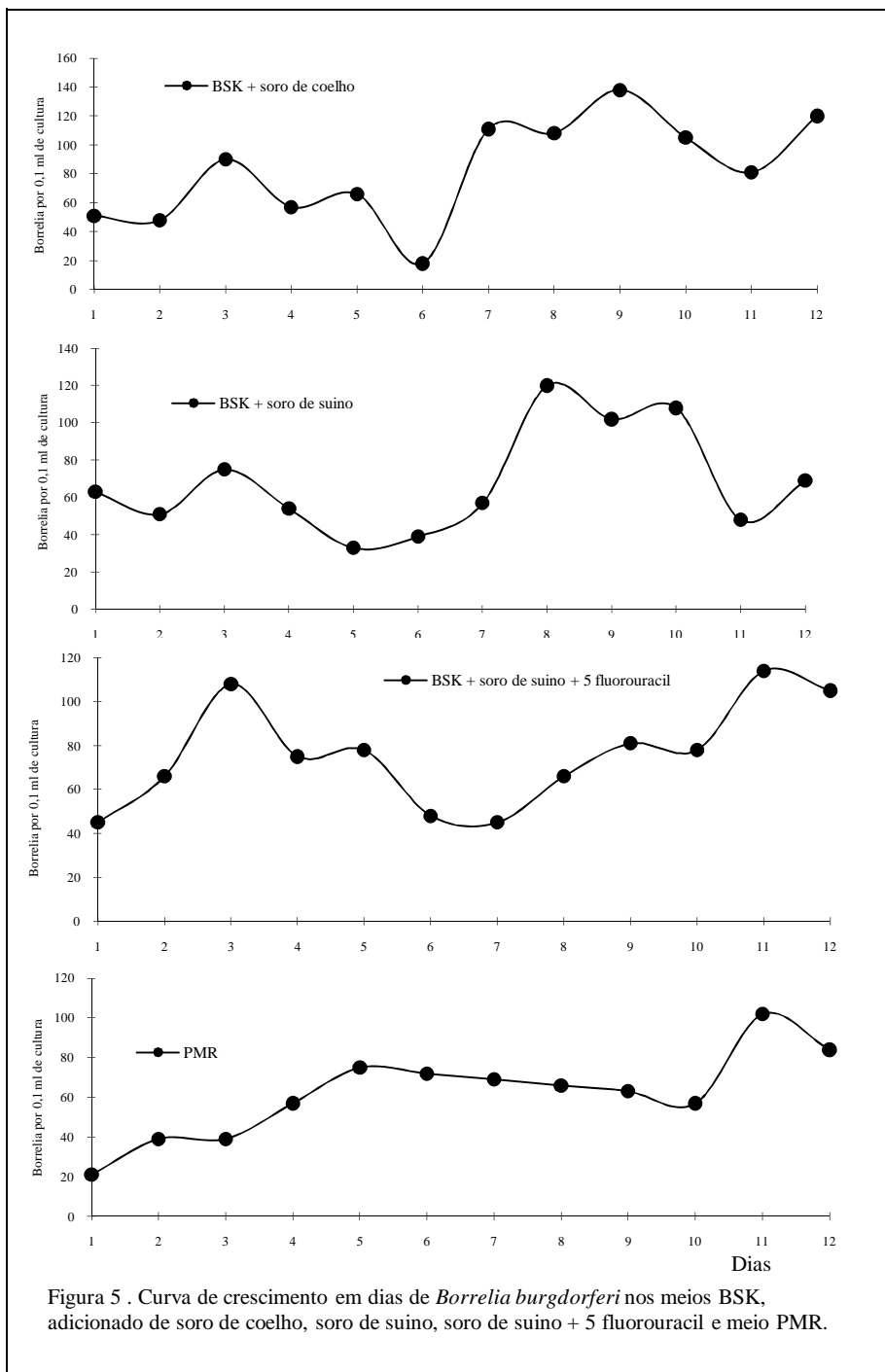


Figura 5 . Curva de crescimento em dias de *Borrelia burgdorferi* nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.

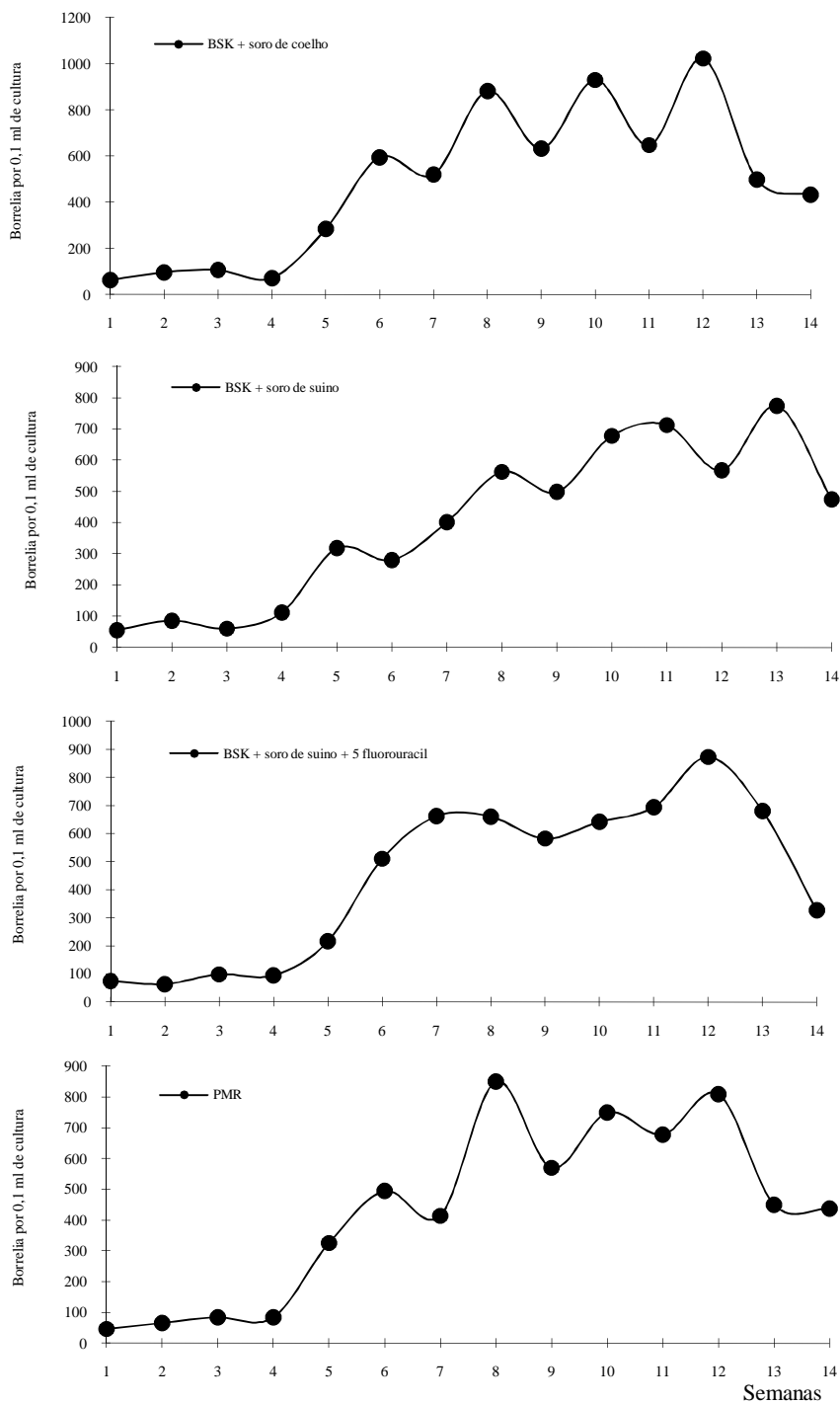


Figura 7. Curva de crescimento em semanas de *Borrelia burgdorferi* nos meios BSK adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.

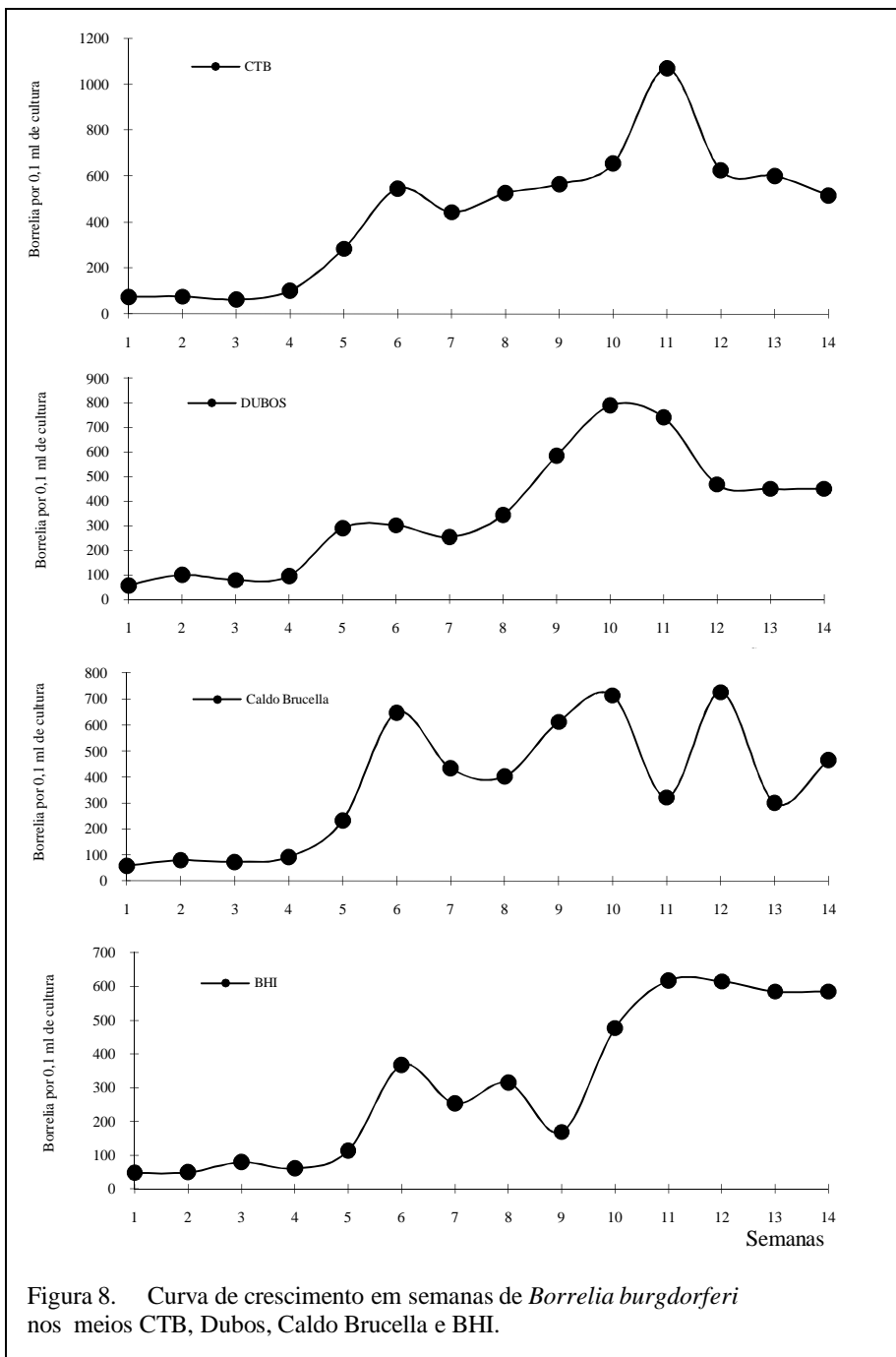


Figura 8. Curva de crescimento em semanas de *Borrelia burgdorferi* nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI.

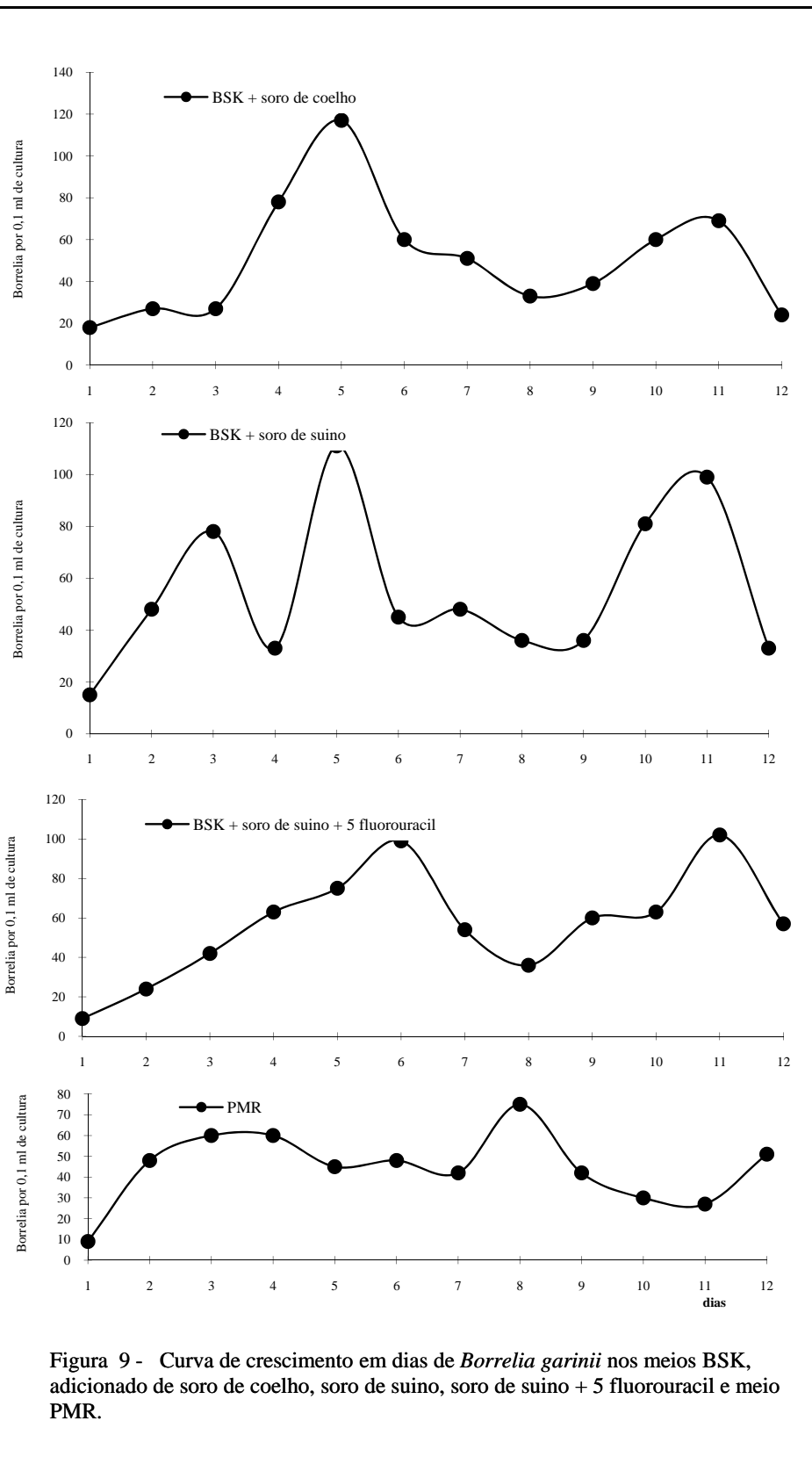


Figura 9 - Curva de crescimento em dias de *Borrelia garinii* nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suino, soro de suino + 5 fluorouracil e meio PMR.

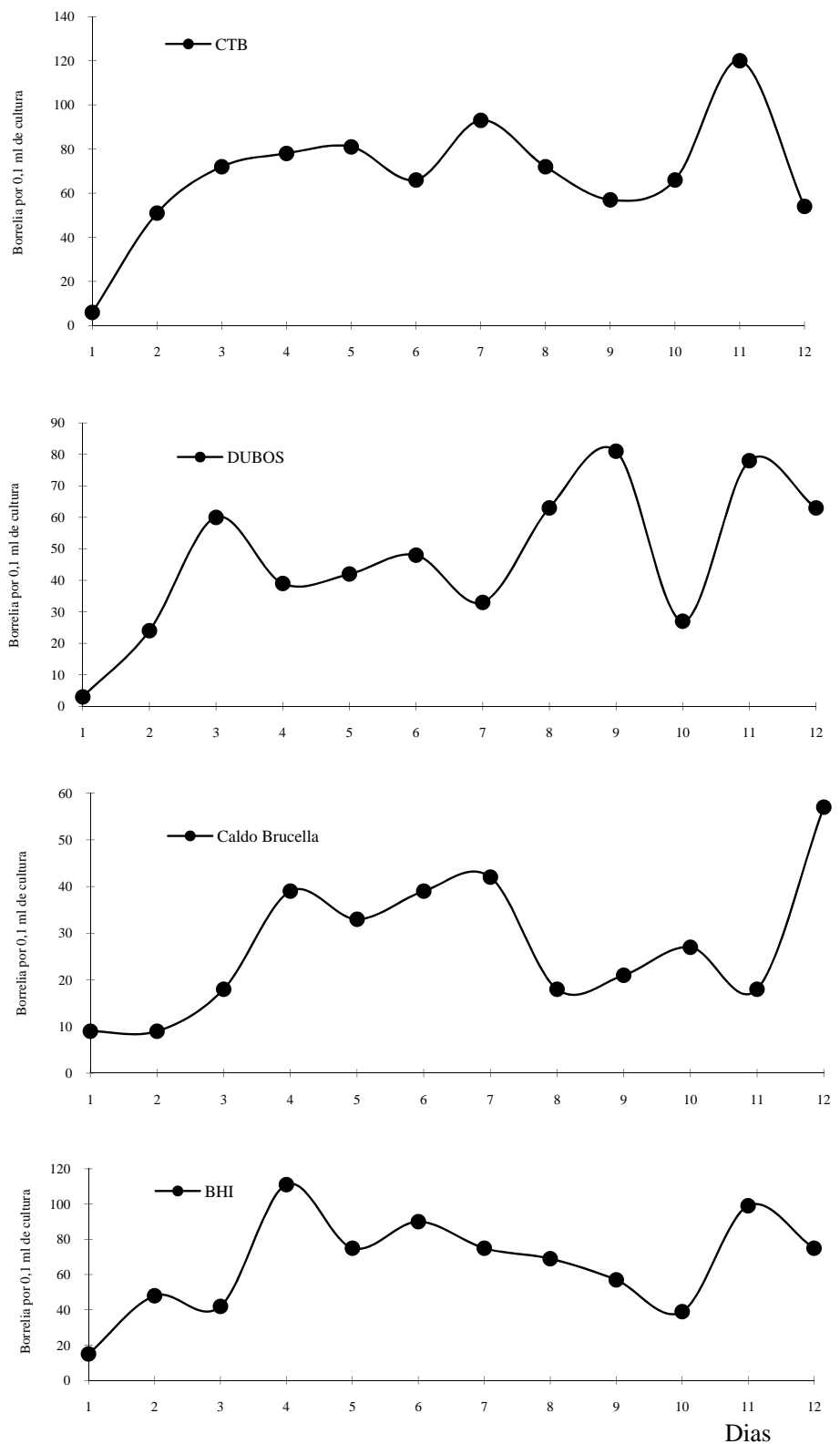


Figura 10 - Curva de crescimento em dias de *Borrelia garinii* nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI.

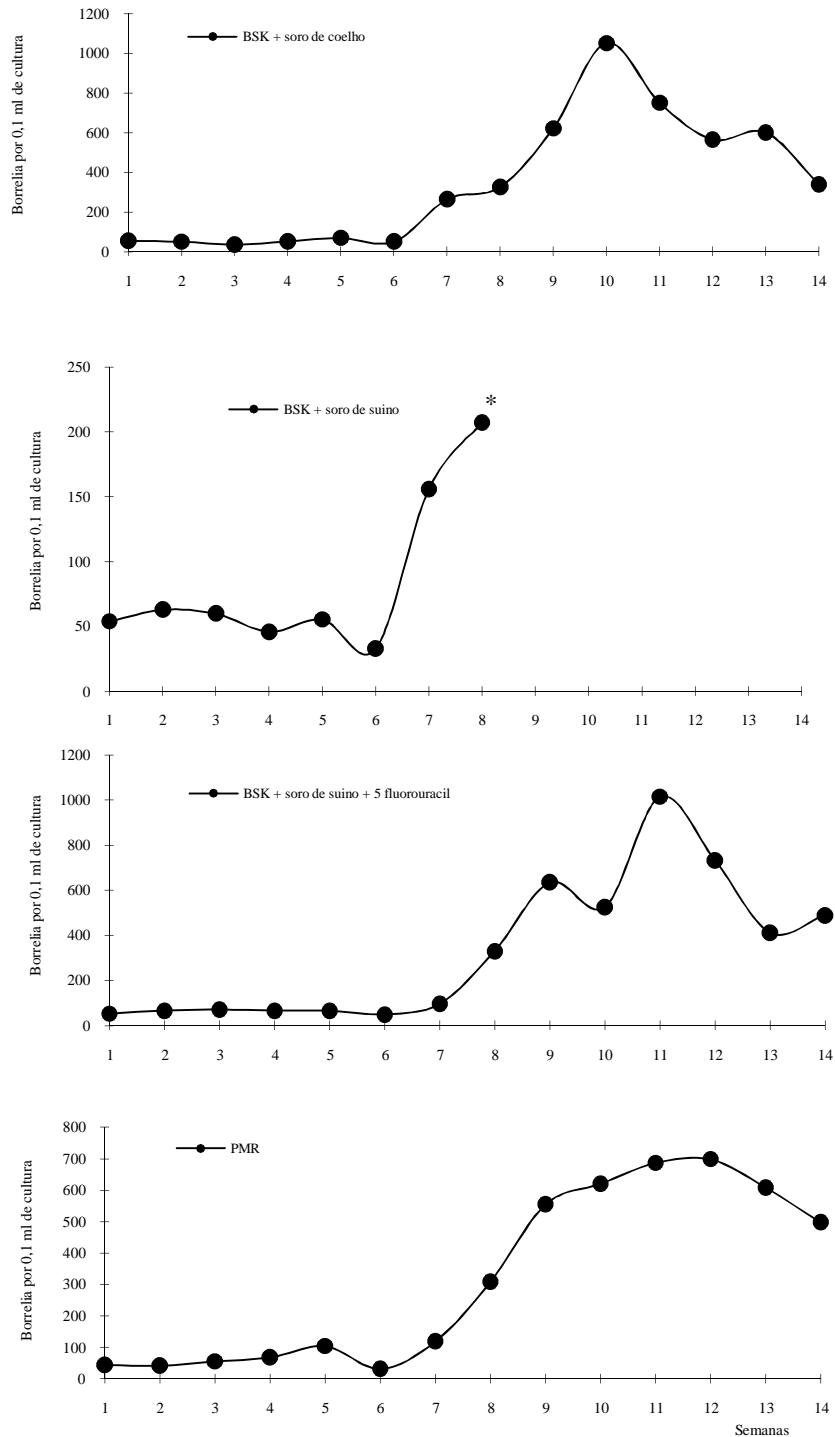


Figura 11 - Curva de crescimento em Semanas de *Borrelia garinii* nos meios BSK, adicionado de soro de coelho, soro de suíno, soro de suíno + 5 fluorouracil e meio PMR. * = contaminação

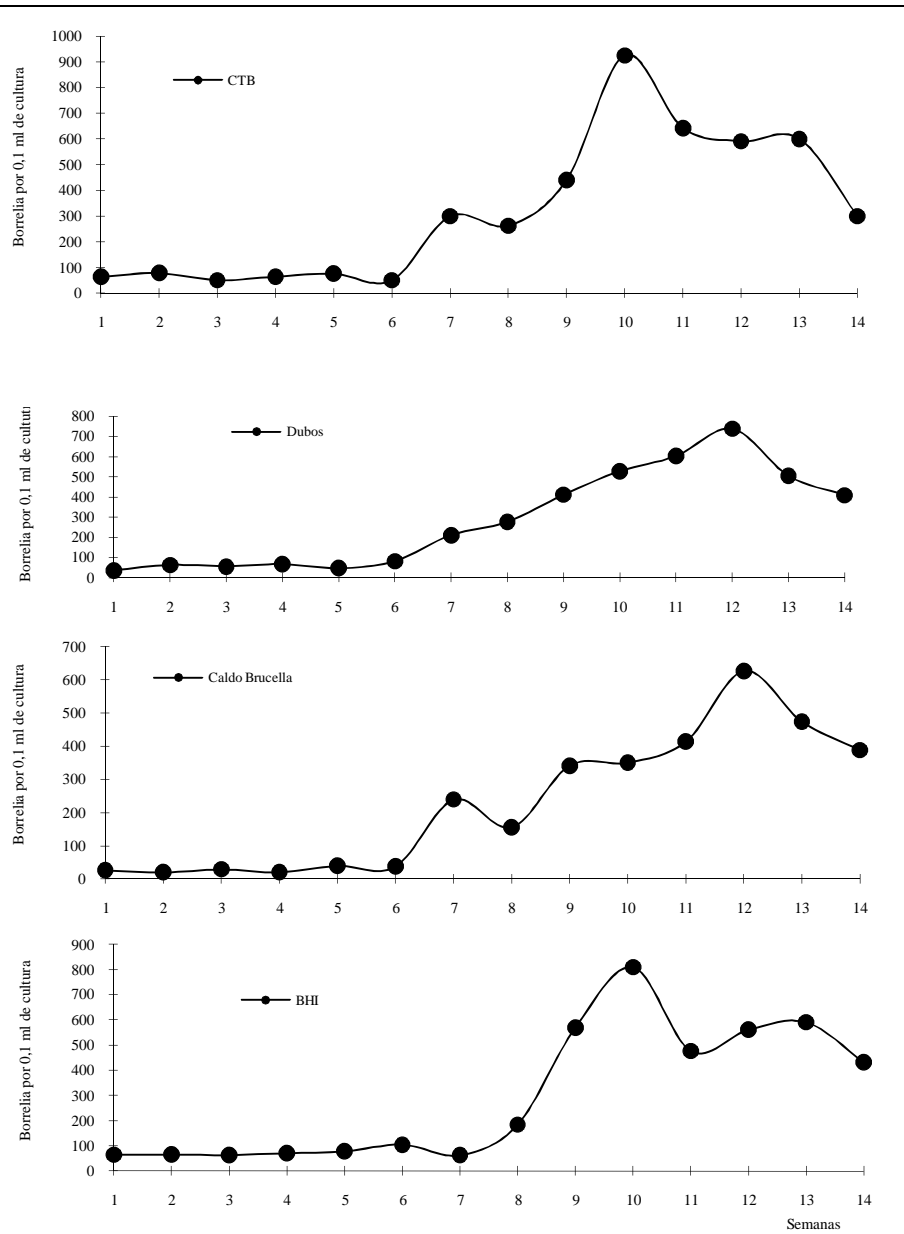


Figura 12 - Curva de crescimento em Semanas de *Borrelia garinii* nos meios CTB, Dubos, Caldo Brucella e BHI.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, as seguintes conclusões foram relacionadas:

As amostras de *B. burgdorferi* e *B. garinii* estudadas, tiveram crescimento exuberante em meio BSK, mesmo com a substituição do soro de coelho, pelo soro de suino, equino, bovino ou caprino,

Outros meios de cultivo menos complexos, foram utilizados com sucesso no estudo da dinâmica de crescimento,

A partir de um inóculo contendo 10^2 células de *B. burgdorferi* em 0,1 mL de cultura, observou-se crescimento a partir do 4^a semana atingindo o platô de crescimento entre a 8^a e 12^a semanas, exaurindo o meio de cultivo a partir desta data,

A partir de um inóculo contendo 10^2 células de *B. garinii* em 0,1 mL de cultura, observou-se crescimento a partir do 6^a semana atingindo o platô de crescimento entre a 9^a e 12^a semanas, exaurindo o meio de cultivo a partir desta data,

B. burgdorferi foi mantida pelo período de 12 meses em tubos nunc com glicerol a 30% em temperatura variando de -4 a 0 °C,

B. burgdorferi foi mantida pelo período de até 6 meses em meio de cultura menos enriquecidos PMR e BHI

A variação de pH nos gradientes entre 6,4, 6,5, 6,8, 7,0, 7,3 e 7,5, não interferiu no crescimento das duas espécies estudadas.

Safranina, cristal violeta, verde brilhante e fucsina, mostraram-se adequadas para coloração de *B. burgdorferi* e *B. garinii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERER, E.; DURAY, P. H. Morfology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. **J. Clin. Microbiol.**, 29 (4): 764-772, 1991.
- ACKERMANN, R.. Spirochäten-aetiologie der erythema-chronicum-migrans krankheit. **Dtsch. Med. Wochenschr**, 109: 92, 1984.
- ANDERSON, B. E.; SIMS, K. G.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E.; PIESMAN, J. F.; HAPP, C. M.; MAUPIN, G. O.; JOHNSON, B. J. *Amblyomma americanum* a potential vector of human ehrlichiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 49 (2): 239-244, 1993.
- ANDERSON, J. F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 539: 190, 1988.
- ANDERSON, J. F.; DURAY, P. H.; MAGNARELLI, L. A. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in white-footed mice and *Ixodes dammini* at Fort McCoy, Wis.. **J. Clin. Microbiol.**, 25 (8): 1495-1497, 1987.

- ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; MAGNARELLI, L. A.; HYDE, F.W.
Involvement of birds in the epidemiology of Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. **Infect. Immun.**, 51: 394-396, 1986.
- APPEL, J.G.. Lyme disease in dogs and cats. **The Compendium**, 12(5): 617, 1990.
- APPEL, M. J. G.; ALLAN, S.; JACOBSON, R. H.; LAUDERDALE, T. L.;
CHANG, Y. F.; SHIN, S. J.; THOMFORD, J. W.; TODHUNTER, R. J.;
SUMMERS, B. A.. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and
persistent infection. **J. Infect. Dis.**, 167: 651-664, 1993.
- AZULAY, R. D.; ABULAFIA, L.; SODRE, C. S.; AZULAY, R. A.; AZULAY, M. M.
Lyme disease in Rio de Janeiro. Brazil. **Int. J. Dermatol.**, 30: 569-571, 1991.
- BAHRMAND, A. R., NEKOUI, H., ARDEKANI, A. M.. Nuevo medio sólido para el
crecimiento de *B. persica* y *B. microti*. **Rev. Cubana Med. Trop.**, 48 (1): 40-44 ,
1996.
- BALASHOV, Y. S.. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of
diseases of man and animals. **Misc. Publicat. Entomol. Soc. Am.**, 8 (5): 159-376,
1972.
- BARANTON, G. : SAINT- GIRON, I.. *Borrelia burgdorferi* survival in human
blood samples. In Lyme disease and Related Disorders. **Ann New York Acad.
Dis.** 539 (1):444-445, 1988.
- BARANTON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIRON, I. Delineation of *Borrelia
burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp. nov.*, and VS461 associated with
Lyme borreliosis. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, 42:378-83, 1992.
- BARBOUR, A. G. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi* , the Lyme disease
agent. **J. Clin. Microbiol.** 26: 475-478, 1988.

- BARBOUR, A. G.. Isolation and cultivation of Lyme disease *Spirochetes*. **The Yale J. Biol. Med.**, 57: 521-525, 1984.
- BARBOUR, A. G.; BURGDORFER, W.; GRUNWALDT, E.; STEERE, A. C.. Antibodies of patients with Lyme disease to components of the *Ixodes dammini* spirochete. **J. Clin. Invest.**, 72: 504-515, 1983.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.. Biology of *Borrelia* species. **Microbiol. Rev.**, 50(4): 381-400, 1986.
- BARBOUR, A. G.; MAUPIN, G. O.; TELTOW, G. J.; CARTER, C. J.; PIESMAN, J.. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. **J. Infect. Dis.**, 173: 403-409, 1996.
- BARROS, P. J. L. **Contribuição ao Conhecimento da doença de Lyme no Brasil**. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 83pp., 1995.
- BARROS, P. J. L.; LEVY, L. H.; MONTEIRO, F. G. V.; YOSHINARI, N. H. Doença de Lyme: acometimento cutâneo e tratamento das fases iniciais. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 39: 170, 1993.
- BENACH, J. L.; BOSLER, E. M.; HANRAHAN, J. P.; COLEMAN, J. L.; HABICHT, G. S.; BAST, T. F.; CAMERON, D. J.; ZIEGLER, J. L.; BARBOUR, A. G.; BURGDORFER, W.; EDELMAN, R.; KASLOW, R. A. *Spirochetes* Isolated from the blood of two patients with Lyme disease. **New Engl. J. Med.**, 308 (13): 740 – 742 , 1983.

- BENACH, J. L.; COLEMAN, J. H.; SKINNER, R. A.; BOSLER, E. M.. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: A hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. **J. Infect. Dis.**, 155(6): 1300-1306, 1987.
- BENNETT, C. E.. Ticks and Lyme disease. **Adv. Parasitol.**, 36: 343-405, 1995.
- BENXIU, J.; THOMAS, C. B.; COLLINS, M. T.. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that uses the 41-kd flagellin as the antigen for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, 55 (9): 1213-1219, 1994b.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia** . 24 Ed. Melhoramentos.. 1985.
- BISSET, M. L.; HILL, W. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. **J. Clin. Microb.**, 25 (12): 2296-2301, 1987.
- BOSLER, E. M.; SCHULZE, T. L. The prevalence and significance of *Borrelia burgdorferi* in the urine of feral reservoir animals. **Zbl Bakt Mikrob. Hyg.**, 263: 40-44, 1986.
- BOUSEMAN, J. K.; KITRON, U.; KIRKPATRICK, C. E.; SIEGEL, J.; TODD, K. S.. Status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) in Illinois. **J. Med. Entomol.**, 27(4): 556-560, 1990.
- BRAND, A. **Comparative seroepidemiological studies of Lyme disease cattle in the Southern Heaths and Weser Hills**. Thesis, Tierarztlichen Hochschule Hannover, German Federalm Republic, VIII, 139 pp.; 226 pp. of ref. ,1990.
- BREITSCHWERDT, E. B.; NICHOLSON, W. L.; KIEHL, A. R.; STEERS, C.; MEUTEN, D. J.; LEVINE, J. F.. Natural infections with *Borrelia* spirochetes in two dogs from Florida. **J. Clin. Microbiol.**, 32 (2): 352-357, 1994.

- BRORSON, O. ; BRORSON, S. H. In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile *Spirochetes* by incubation in BSK – H Medium. **Infection**, 26 (3): 144-150, 1998.
- BRORSON, O.; BRORSON, S. H.. Transformation of cystic forms of *B. burgdorferi* to normal, mobile *Spirochetes*.. **Infection** 25 (4): 240 -246, 1997.
- BRUCK, D. K., TALBOT, M. L. , CLUSS, R.. C., BOOTHBY, J. T. Ultrastructural characterization of the stages of spheroplast preparation of *B. burgdorferi*. **J. Microb. Methods.** 23; 219-228, 1995.
- BRUMPT, E.. **Précis de Parasitologie**, Collection de Précis Médicaux Masson & C^{ie} Éditeurs, Paris; p 1452, 1927.
- BURGDORFER, W.. **Discovery of *Borrelia burgdorferi***. In: COYLE, P. K. Lyme disease. Mosby Year Book, Boston. pp 3-7, 1993.
- BURGDORFER, W.. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. **Yale J. Biol. Med.**, 57: 515-520, 1984.
- BURGDORFER, W.. The possible role of ticks as vectors of Leptospirae. I. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. **Exp. Parasitol.**, V:571-579, 1956.
- BURGDORFER, W.; BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F, BENACH, J. L., GRUNWALIT, E., DAVIS J. P. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? **Science**, 216 (19): 1317-1319, 1982.
- BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; GRESBRINK, R. A.; ANDERSON, J. R.. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. **Am. J. Med. Hyg.**, 34(5): 925-930, 1985.

- BURGDORFER, W.; PICKENS, E. G.. A technique employing embryonated chicken eggs for the infection of argasid ticks with *Coxiella burnetii*, *Bacterium tularensis*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and western equine encephalitis virus. **J. Infect. Dis.**, 94: 84-89, 1954.
- BURGESS, E. C. *Borrelia burgdorferi* infection in wisconsin horses and cows. **Ann. NY Acad. Sci.**, 539: 235-43, 1989.
- BURGESS, E. C.; AMUNDSON, T. E.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. A.; EDELMAN, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp with *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 35(2): 355-359, 1986a.
- BURGESS, E. C.; GENDRON- FITZPATRICK, A.; WRIGHT, W. O. Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow. **JAVMA**. 191 (11): 1468-1470. 1987.
- BUTLER, J. F.; DENMARK, H. A. Tick (Acari: Ixodidae) vectors of Lyme disease organisms (*Borrelia burgdorferi*) in Florida. Fla. Dept. Agric. & Consumer serv. Division of Plant Industry. **Entomol. Circular**, 326, 1990.
- CALLISTER, S. M.; CASE, K. L. AGGER, W. A.; SCHELL, R. F.; JOHNSON, S. M.; ELLINGSON, J. L. E. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour- Stoenner- Kelly Medium to detect *Borrelia burgdorferi* **J. Clin. Microbiol.** 28 (2): 363-365, 1990.
- CANALE- PAROLA, E.. Motility and chemotaxis of *Spirochetes*. **Annu Rev. Microbiol.** 32: 69-99. 1978.
- CANALE-PAROLA, E.. Physiology and evolution of *Spirochetes*. **Bacteriol. Rev.** 41: 181-204. 1977.

- CHEN, S.; DUMLER, J. S.; BAKKER, J. S.; WALKER, D. H.. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* Species as the etiologic agent of human disease. **J. Clin. Microbiol.**, 32(3): 589-595, 1994.
- CHRISTOVA, I. ; HOHENGERGER, S.; ZEHETMEIER, C. ; WILSKE, B. First characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from ticks and skin biopsy in Bulgaria. **Med. Microbiol. Immunol.** 186 :171-175., 1998.
- CICERONI, L.; BARTOLONI, A.; GUGLIELMETTI, P.; PARADISI, F.; BARAHONA, H. G.; ROSELLI, M.; CIARROCCHI, S. & CACCIAPUOTI, B. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* in human settlements of the Codillera Province, Bolivia. **J. Trop. Med. Hyg.**, 97: 13-17, 1994.
- COWLEY, H. M. ; HILL, R. H. The isolation of spirochaetes from the rat caecum . **Letters in Applied Microbiology.** 3: 105-107, 1986..
- CRAINE , N. G.; NUTTALL, P. A.; MARRIOTT, A. C.; RANDOLPH, S. E.. Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. **Folia Parasitológica**, : 44 (2) : 155-160. 1997.
- CUTLER, S. J. ; FEKADE, D. ; HUSSEIN, K. ; KNOX, K. A.; MELKA., A.; CANN, K.; EMILIANUS, A. R.; WARRELL, D. A.; WRIGHT, D. J. M. Successful *in vitro* cultivation of *Borrelia recurrentis* . **The Lancet.** 343: 242, 1994.
- CUTLER, S. J.; FEKADE, D.; HUSSEIN, K.; KNOX, K.A.; MELKA, A.; CANN, K.; EMILIANUS, A. R.; WARRELL, D.A.; WRIGHT, D. J. M. Successful *in vitro* cultivation of *Borrelia recurrentis*. **The Lancet** , 343 – 242 1994.

- DIAB, F. M.; SOLIMAN, Z. R. An experimental study of *Borrelia anserina* in four species of *Argas* tick. 1. Spirochete localization and densities. **Z. Parasitenk.**, 53: 201-212, 1977.
- DODGE, R. W. Culture of ethiopian of *Borrelia recurrentis*. **Appl. Microbiol.**, 25(6): 935-939, 1973.
- DORWARD, D. W.; SCHWAN, T. G.; GARON, C. F.. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissue from infected ticks, mice, dogs, and humans. **J. Clin. Microbiol.**, 26(9): 1162-1170, 1991.
- EUZEBY, J.P. Les espèces et les genres bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 1994. **Rev. de Med. Vét.**, 146: 3-22, 1995.
- EWING, C.; SCORPIO, A.; NELSON, D. R.; MATHER, T. N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. **J. Clin. Microbiol.**, 32(3): 755-758, 1994.
- FALCO, C. R.; DANIELS, T. J.; FISH, D.. Increase in abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in an emergent Lyme disease endemic area. **J. Med. Entomol.**, 32(4): 522-526, 1995.
- FALCO, C. R.; FISH, D.. Potential for exposure to tick bites in recreational parks in a Lyme disease endemic area. **Am. J. Public Health**, 79: 12-15, 1989.
- FALCO, C. R.; FISH, D.. Ticks parasitizing humans in a Lyme disease endemic area of southern New York State. **Am. J. Epidemiol.**, 128: 1146-1152, 1988.
- FELSENFELD, O.. *Borrelia*, human relapsing fever, and parasite-vector-host relationships. **Bacteriol. Rev.**, 29 : 46 - 74, 1965.-

- FILGUEIRA, A.L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P.P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, Ano 2 - nº01, 1989.
- FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H.. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Rev. Univ. Rural - Sér. Cienc. da Vida**, 18(1/2): 85-89, 1996.
- FONSECA, A. H.; SOARES, C. O; ISHIKAWA, M. M.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Detection of *Borrelia* sp in opossum (Marsupialia: Didelphidae) in Brazil. **An. XXV Cong. World Vet. Assoc., XX Cong. World Small Animal Vet. Assoc.**, Yokohama, Japão, Setembro, 1995a
- FONSECA, A. H.; SOARES, C. O; ISHIKAWA, M. M.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis sorology in cattle and dogs in Brazil. **An. XXV Cong. World Vet. Assoc., XX Cong. World Small Animal Vet. Assoc.**, Yokohama, Japão, Setembro, 1995b.
- ZAHER, M. A.; SOLIMAN, Z. R.; DIAB, F. M.. An experimental study of *Borrelia anserina* in species of *Argas* ticks. 2. Trasstadial survival and transovarial transmission. **Z. Parasitenk.**, 53: 213-223, 1977.
- GERN, L.; RAIS, O.. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). **J. Med Entomol.**, 33(1): 189-192, 1996.
- GERN, L.; SCHAIBLE, U. E.; SIMON,; M .M. Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses inbred strains of mice. **J. Infect. Dis.** 167:971-975, 1993.
- GUERREIRO, M. G.; OLIVEIRA, S. J.; SARAIVA, D.; NIEST, J. M.; LIEBERKNECHT, F.; POESTER, F. P.; DIAS, J. C. A. ; FERNANDES, J.C

- . T, LANGELOH, A.; BAPTISTA, P. J. H. P. **Bacteriologia Especial**. Ed. Sulina. Porto Alegre R. S. 484-492, 1984.
- GÜNER, E.S. Retention of *B. burgdorferi* pathogenicity and infectivity after multiple passages in a co-cultura system. **Experientia** ,50 :54-59, 1994.
- GUSTAFSON, J. M.; BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; STEINBERG, H.. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, 54(6): 882- 890, 1993.
- HEROLDOVA, M.; NEMEC, M; HUBALEK, Z.. Growth parameters of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* at various temperatures. **Zentralblatt für Bakteriologie – International Journal of Medical Microbiology , Virology, Parasitology and Infectious Diseases**. 288 (4) 451-455,1998.
- HOOGSTRAAL, H. Ticks and spirochetes. **Acta Trop.**, 36:133-136, 1979.
- HOOGSTRAAL, H.. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv. Parasitol.**, 24: 135-238, 1985.
- HU, L. T. ; PERIDES, G. ; NORING, R.; KLEMPNER, M. S. Binding of human plasminogen to *B. burgdorferi*. **Infec. and Imm.** 63(9): 3491-3496, 1995.
- HYDE, F. W.; JOHNSON, R. C.; WHITE, T. J.; SHELBURNE, C. E.. Detectin of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.**, 27(1): 58-61, 1989.
- ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H.. Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. **R. Bras. Med. Vet.**, 19(4): 166-168, 1997.

- JOBE, D. A.; CALLISTER, S. M.; SCHELL, R. F.. Recovery of *Borrelia burgdorferi* by filtration. **J. Clin. Microbiol.**, 31(7): 1896-1898, 1993.
- JOHNSON , R. C.; ROGERS, P., 5- Fluorouracil as a selective agent for growth of *Leptospirae*. **J. Bacteriol.**, **87 (2) 422-426 , 1964.**
- JOHNSON, R. C.; HYDE, F. W.; RUMPEL, C. M.. Taxonomy of the Lyme disease *Spirochetes*. **Yale J. of Biol. Med.** 57: 529-537, 1984.
- JOHNSON, R. C. The *Spirochetes*. **Ann. Vet. Microbiol.** 31: 89-106, 1977.
- JOHNSON, R.C. SCHMID, G.P, HYDE, F.W., STEIGERWALT, A.G. & BRENNER , D.J. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34(4):496- 497, 1984.
- JOHNSON, S. J., KLEIN, G. C., SCHMID, G. P.; BOWEN, S., FEELEY, J. C., SCHULZE, T.. Lyme disease: a selective medium for isolation of the suspected etiological agent, a *Spirochete*. **J. Clin. Mibrob.**, 19(1): 81-82, 1984.
- JOHNSTON, Y.E.; DURAY, P.H. & STEERE, A.C. Lyme arthritis: spirochetes found in synovial microangiopathic lesions. **Amer. J. Pathol.**, 118: 26-34, 1985.
- JOPPERT, A. M. **Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo.** Tese Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 83pp., 1995.
- KARCH, H.; HUPPERTZ, H. I.; BÖHME, M.; SCHMIDT, H.; WIEBECKE, D.; SCHWARZKOFF, A.. Demonstration of *Borrelia Burgdorferi* DNA in urine samples from healthy humans whose sera contain *B. burgdorferi*-specific antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, 32(9): 2312-2314, 1994.
- KELLY, R.. Cultivation of *Borrelia hermsii*. **Science** 173: 443-444, 1971.

- KLAVITER, E. C.; JOHNSON, R. C. Isolation of the outer envelope, chemical, components and ultrastructure of *Borrelia hermsii* grown in vitro. **Acta Tropica**, 36, 123-131, 1979.
- KOCH, H. T.; KAMBEVA, L.; OCAMA, J. G. R.; MUNATSWA, F. C.; FRANSSEN, F. R. J.; UILENBERG, G.; DOLAN, T. T.; NORVAL, R. A. I. Immunization of cattle against *Theileria parva bovis* and their exposure to natural challenge. **Vet. Parasitol.**, 37: 185-196, 1990.
- KONISHI, H; MORSHED, M. G., AKITOMI, H., NAKAZAWA, T. In vitro cultivation of *B. duttoni* on cultures of SFLEp Cells. **Microbiol. Immunol.**, 37 (3) 229-232, 1993.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G.. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, vol. 1: 57-62, 8th. Edition, Williams & Wilkins, London, 1984.
- KUIPER, H.; VAN DAM, A. P.; SPANJAARD, L.; JONGH, B. M.; WIDJOJOKUSUMO, A.; RAMSELAAR, T. C. P.; CAIRO, I.; VOS, K.; DANKERT, J.. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from biopsy specimens taken from healthy-looking skin of patients with Lyme borreliosis. **J. Clin. Microbiol.**, 32(3): 715-720, 1994.
- KURTENBACH, K.; PEACEY, M.; RIJPKEMA, S. G. T.; HOODLESS, A. N.; NUTTAL, P. A.; RANDOLPH, S. E. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by game birds and small rodents in England. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (4): 1169-1174, 1998.
- LANE, R. S.; BURGDORFER, W.. Transovarial and transstadial passage of *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **Am. J. Med. Hyg.**, 37(1): 188-192, 1987.

- LANE, R. S.; MANWEILER, S. A.. *Borrelia coriaceae* in its tick vector, *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae), with emphasis on transstadial and transovarial infection. **J. Med. Entomol.**, 25(3): 172- 177, 1988.
- LE FLECHE, A. L.; POSTIC, D., G; GIRARDET, K.; PETER, O.; BARANTON, G.Characterization of *Borrelia lusitaniae sp nov* by 16 S ribosomal DNA sequence analysis. **Int. J. Syst. Bact.** 47 (4) 921-925, 1997.
- LEBECH, A.-M.; CLEMMENSEN, O.; HANSEN, K.. Comparison of *in vitro* culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. **J. Clin. Microbiol.**, 33(9): 2328-2333, 1995.
- LEVINE, J. F.; DYKSTRA, M. J; NICHOLSON, W. L.; WALKER, G.; MASSEY, G. Attenuation of *Borrelia anserina* by serial passage in liquid medium. **Res. Vet. Sci.** 48- 64-69, 1990.
- LISSMAN, B. A.; BOSLER, E. M.; CAMAY, H.; ORMISTON, B. G; BENACH, J. L.. *Spirochetes* associated arthritis (Lyme disease) in a dog. **JAVMA**, 185 (2): 219-220, 1984.
- LIVERIS, D., VARDE, S., IYER, R., KOENING, S., BITTKER, S., COOPER, D., McKENNA, D., NOWAKOWISKI, J., NALDEMAN, R.B., WORMSER, G.P., SCHWARTZ, I. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 37 (3) :565-569, 1999.
- LOPES, C. W. G.. **Ocorrência de Protófitas em ruminantes e suínos doméstico, ainda não descritos no Brasil.** Tese de Mestrado, U.F.R.R.J., 52P., 1976.

- LORD, R. D.; LORD, V. R.; HUMPHREYS, J. G.; McLEAN, R. G.. Distribution of *Borrelia burgdorferi* in host mice in Pennsylvania. **J. Clin. Microbiol.**, 32(10): 2501-2504, 1994.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; APPERSON, C. S.; FISH, D.; JOHNSON, R. C.; CHAPPELL, W. A. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white tailed Deer from Connecticut, New York state, and North Caroline. **J. Wildl. Dis.**, 22: 178-188, 1986.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.. Analyses of mammalian sera in enzyme-linked immunosorbent assays with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **J. Wild. Dis.**, 31(2): 159-165, 1995c.
- MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; SCHREIER, A. B.; FICKE, C .M. Clinical and serologic studies of canine Borreliosis. **JAVMA**, 191: 1089-1094, 1987.
- MAGNARELLI, L. A.; DENICOLA, A.; STAFFORD III, K. C.; ANDERSON, J. F.. *Borrelia burgdorferi* in an urban environment: white-tailed deer with infected ticks and antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, 33(3): 541-544, 1995d.
- MAGNARELLI, L. A.; DUMLER, J. S.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; FIKRIG, E.. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. **J. Clin. Microbiol.**, 33(11): 3054-3057, 1995 a
- MAGNARELLI, L. A.; STAFFORD, K. C.; MATHER, T. N.; YEH, M. T.; HORN, K. D.; DUMLER, J. S.. Hemocytic *Rickettsia*-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to *Ehrlichia* and detection of DNA of absent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 33(10): 2710-2714, 1995b.

- MARCONI, R. T.; LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 33(4): 2427-2434, 1995.
- MATHER, T. N.; MATHER, M.E.. Intrinsic competence of three Ixodid ticks (Acari) as vectors of the Lyme disease spirochete. **J. Med. Entomol.** 27(4): 646-650, 1990.
- MIYAMOTO, K.; NAKAO, M.; FUJITA, H.; SATO, F..The ixodids ticks on migratory birds in Japan and the isolation of Lyme disease spirochetes from bird-feeding ticks. **Jap. J. Sanit. Zool.**, 44: 315-326, 1993.
- MIYAMOTO, K.; NAKAO, M.; UCHIKAWA, K.; FUJITA, H.. Prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in ixodid ticks of japan, with special reference to a new potential vector, *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 29 (2): 216-220, 1992.
- MOSSEL, D. A. & BEERENS, H. Studies on the inhibitory proprieties of sodium thioglycollate on the germination of wet spores of Clostridia. **J. Hyg. Camb.** 66, 269-272 , 1968.
- MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J.; JOHNSON, R. C. ; AHLSTRAND, G. G. . Colony formation by Lyme disease *Spirochetes*. In Lyme disease and related Disorders. **Annals New York Academy of Sciences.** 539 (1): 404-406, 1988.
- NAKAO, M.; MIYAMOTO, K.; FUKUNAGA, M.. Lyme disease Spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. **J. Infect. Dis.**, 170 (10): 878-882, 1994.

- NAKAO, M.; MIYAMOTO, K.; UCHIKAWA, K.; FUJITA, H.. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 47(4): 505-511, 1992.
- NOGUCHI, H. **The spirochaetes.**452-495. In . JORDAN, E. O. ; FALK, I. S. (ed.) The newer knowledge of Bacteriology. Chicago, 1928.
- NOHLMANS, L. M. K. E.; BOER, R.; BOGAARD, A. E. J. M. ; BOVEN, C. P. A. Genotypic and phenotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from the Netherlands. **J. Clin. Microbiol.** 33(1) 119-125., 1995.
- OAG, R., K., The growth of *Borrelia duttonii* in the developing egg. **Journ. Of Path.** XLIX-339-344, 1948.
- OLIVER Jr., J. H.; OWSLEY, M. R.; HUTCHESON, H. J.; JAMES, A. M.; CHEN, C.; IRBY, W. S.; DOTSON, E. M.; McLAIN, D. K. Conspecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v.30: 54-63, 1993.
- OLIVER, J. H.; KOLLARS, T. M.; CHANDLER, F. W.; JAMES, A M .; MASTERS, E. J.; LANE, R.S.; HUEY, L.O. First isolation and cultivation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from Missouri. **J. Clin. Microbiol.** 36 (1): 01-05, 1998 .
- OLSÉN, B; JAENSON, T. G. T.; NOPPA, L.; BUNIKIS, J.; BERGSTRÖM, S. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. **Nature.** 362 (25): 340-342, 1993
- PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. **Cornell-Vet.**, 82: 253-274, 1992.
- PAVLOVSKY, E. N.. **Natural Nidality of Transmissible Diseases.** Peace Publishers Moscow, 250p, 1965.

PESSÔA, S. B.. **Parasitologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan. 849p, 1963.

PIESMAN, J.. Experimental acquisition of the Lyme disease *Spirochete, Borrelia burgdorferi* by larval *Ixodes dammini* (Acari: *Ixodidae*) during partial blood Meals. **J. Med. Entomol.**, 28(2): 259-262, 1991.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; SINSKY, R. J.; SPIELMAN, A.. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **J. Clin. Microbiol.**, 25(3): 557-558, 1987.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A.. Concurrent *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* infection in nymphal *Ixodes dammini*. **J. Clin. Microbiol.**, 24(3):446-447, 1986.

PIESMAN, J.; OLIVER, J. R.; SINSKY, R. J.. Growth kinetics of the Lyme disease Spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in the vector tick (*Ixodes dammini*). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 42: 352-357, 1990.

POLLACK, R.J.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. **J. CLIN. Microbiol.** 31 – 1251-1255, 1993.

PREAC- MURSIC, V.; WANNER, G.; REINHARDT, S.; WILSKE, B.; BUSCH, U.; MARGET, W.. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast – L- Form variants. **Infection** . 24 (3) 218-226. 1996.

PREAC-MURSIC, V.; WILSKE, B., REINHARDT, S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 10 (12) 1076-1079, 1991.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R.. **Clin. Vet. Microb.**, 1st Edition: 292-303, Wolfe Publishing, London, 1994.

- RADOLF, J. D.; BOURELL, K. W.; AKINS, D. R.; BRUSCA, J. S.; NORGARD, M. V.. Analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane architecture by freeze-fracture electron microscopy. **J. Bacteriol.** 176 (1): 21-31, 1994.
- RANDOLPH, S. E.; GERN, L.; NUTTALL, P.A.. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitol. Today**, 12(12): 472-479, 1996.
- RASIAH, C.; RAUER,S.; GASSMANN, G. S.; VOGT, A.. Use of a hybrid protein cositing of the variable region of the *Borrelia burgdorferi* flagellin and part of the 83-kDa protein as antigen for serodiagnosis of Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.**, 32 (4):1011-1-17, 1994.
- RAWLINGS, J. A. ; FOURNIER, P. V.; TELTOW, G. J. Isolation of *Borrelia Spirochetes* from patients in Texas. **J. Clin. Microbiol.**, 25 (7) 1148-1150, 1987.
- RESTREPO, B. I.; CARTER, C. J.; BARBOUR, A.G.. Activation of a *vmp* pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. **Mol. Microbiol.**, 13 (2): 287-299, 1994.
- RIBEIRO, J. M. C.. Role of saliva in tick/host interations. **Exp. Appl. Acarol.**, 7:15, 1989.
- RIBEIRO, J. M. C.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A.. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, 161: 332-344, 1985.
- RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N.; PEISMAN, J.; SPIELMAN, A.. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease Spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 24 (2): 201-205, 1987.

- RICHTER Jr., P. J.; KIMSEY, R. B.; MADIGAN, J. E.; BARLOUGH, J. E.; DUMLER, J. S.; BROOKS, D. L.. *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). **J. Med. Entomol.**, 33 (1):1-5, 1996.
- RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C.. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **J. Clin. Microbiol.**, 32 (9): 2107-2112, 1994.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.. **Imunologia**. Quarta edição, Ed. Manole Ltda.. 28.14p, 1997.
- ROTHWELL, J. T.; CHRISTIE, B. M.; WILLIAMS, C.; WALKER, K. H.. Suspected Lyme disease in a cow. **Aust. Vet. J.**, 66 (9): 296-298, 1989.
- ROUSH, J. K.; MANLEY, P. A.; DUELAND, R. T.. Rheumatoid arthritis subsequent to *Borrelia burgdorferi* infection in two dogs. **JAVMA**, 195 (7): 951-953, 1989.
- RUSSELL, H.; SAMPSON, J. S.; SCHIMID, G. P.; WILKINSON, H. W.; PLIKAYTIS, B.. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. **J. Infect. Dis.**, 149 (3): 465-470, 1984.
- SAMBRI, V.; CEVENINI, R. Incorporation of cysteine by *Borrelia burgdorferi* and *B. hermsii* **Can. J. Microb.** 38 (10) 1016-1021, 1992.
- SCHLESINGER, P. A.; DURAY., P. H.; BURKE, B. A.; STEERE, A. C.; STILLMAN, M. T. Maternal- fetal transmission of the Lyme disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi* **Ann. Intern. Med.** 103 (1) 76-78, 1985.

- SCHWAN, T. G.; BURGDORFER, W.; GARON, C. F. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease *Spirochete*, *B. burgdorferi* as a result of in vitro cultivation. **Infection and Immunity**. 56 (8) : 1831-1836, 1988.
- SCHWAN, T. G.. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infet. Agents Dis.**, 5(3): 167-181, 1996.
- SCHWARTZ, B. S.; NADELMAN, R. B.; FISH, D.; CHILDS, J. E.; FORSETER, G. WORMSER, G. P.. Entomologic and demografhic correlates of anti-tick saliva antibody in a prospective study of tick bite subjects in Westchester County, New York. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 48(1): 50-57, 1993
- SCHWARTZ, B. S.; RIBEIRO, J. M. C.; GOLDSTEIN, M. D.. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. **Am. J. Epidemiol.**, 132: 58-66, 1990.
- SHIH, C. M.; SPIELMAN, A.. Accelerated Transmission Of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. **J. Clin. Microbiol.**, 31(11):2878-2881, 1993b.
- SHIH, C. M.; SPIELMAN, A.. Topical prophylaxis for Lyme disease after tick bite in a rodent model. **J. Infect. Dis.**, 168: 1042-1045, 1993a.
- SILVA, A. M.; FIKRIG, E.. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. **Parasitol. Today**, 13(7): 267-270, 1997.
- SINSKY, R. J.; PIESMAN, J.. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. **J. Clin. Microbiol.**, 27 (8): 1723-1727, 1989.

- SMITH, R. D.; BRENER, J.; OSORNO, M.; RISTIC, M.. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. **J. Invert. Pathology**, 32:182-190, 1978.
- SMITH, R. D.; MIRANPURI, G. S.; ADAMS, J. H.; AHRENS, E. H.. *Borrelia theileri*: isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. **Am. J. Vet. Res.**, 46(6): 1396-1398, 1985.
- SONENSHINE, D. E.. **Biology of ticks**. Vol. 2. Oxford University Press, New York; 464p, 1991.
- SPACH, D. H.; LILES, W. C.; CAMPBELL, G. L.; QUICK, R. E.; ANDERSON Jr., D. E.; FRITSCH, T. R.. Tick-borne disease in the United States. **New Engl. J. Med.**, 329(13): 936-947, 1993.
- SPIELMAN, A.; CLIFFORD, C. M.; PIESMAN, J.; CORWIN, M. D.. Human babesiosis on Nantucket Island , USA: description of the vector, *Ixodes (Ixodes) dammini*, N. Sp. (Acarina: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, 15(3): 218-234, 1979.
- SPIELMAN, A.; WILSON, M. L.; LEVINE, J. F.; PIESMAN, J.. Ecology of *Ixodes dammini* - borne human babesiosis and Lyme disease. **Ann.Rev. Entomol.** 30: 439-60, 1985.
- STANCHI, N. O.; BALAGUE, L. J. Lyme disease: antibodies against *Borrelia burgdorferi* in farm workers in Argentina. **Rev. Saúde Pública**, 27 (4): 305-307, 1993.
- STEERE, A. C.; GRODZICKI, R. L.; CRAFT, J. E.; SCHRESTA, M.; KORNBLATT, A. N.; & MALAWISTA, S. E. Recovery of Lyme disease spirochetes from patients. **Yale J. Biol. Med.**, 57: 557-560, 1984.

- STOENNER, H. G., DODD, T., LARSEN, C.. Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. **J. Exp. Med.**, 156(11): 1297-1311. 1982.
- STRAUBINGER, R. K.; SUMMERS, B. A.; CHANG, Y.; APPEL, M. J. G. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. **J. Clin. Microbiol.**, 35 (1): 111-116, 1997.
- STRLE, F.; NELSON, J. A.; RUZIC-SABLJIC, E.; CIMPERMAN, J.; MARASPIN, V.; LOTRIC-FURLAN, S.; CHENG, Y.; PICKEN, M. M.; TRENHOLME, G. M.; PICKEN, R. N.. European Lyme borreliosis : 231 culture- confirmed cases involving patients with erythema migrans. **Clin. Infect. Dis.** 23: 61-65, 1996.
- TAKADA, N.; ISHIGURO, F.; IIDA, H.; YANO, Y.; FUJITA, H.. Prevalence of Lyme *Borrelia* in ticks, especially *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae), in Central and Western Japan. **J. Med. Entomol.** 31(3): 474-478, 1994.
- TAKAHASHI, K.; ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; TAKAGI, T.; SASAKI, K.; FUJII, N. & KIMURA, K. Serological survey for *Borrelia burgdorferi* infection in cattle in Southern Hokkaido. **J. Vet. Med. Sci.**, 55(6): 921-924, 1993.
- TALHARI, S.; TALHARI, A. C.; FERREIRA, L. C. L. Eritema chronicum migrans, eritema migratório, doença de Lyme ou borreliose de Lyme. **Ann. Bras. Dermatol.**, 67: 205-209, 1992.
- TÄLLEKLINT, L.; JAENSON, T. G. T.. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia*-like spirochetes and density of infected ticks. **J. Med. Entomol.** 33(5): 805-811, 1996.
- TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A.. Copetence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme Disease Spirochete. **J. Med. Entomol.** 26(2): 118-121, 1989.

- URIOSTE, S.; HALL, L. R.; TELFORD, S. R.; TITUS, R. G.. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E₂-dependent mechanism. **J. Exp. Med.**, 180: 1077-1085, 1994.
- WANG, G.; VAN DAM, A. P.; LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; PETER, O.; BARANTON, G.; BOER, R.; SPANJAARD, L. ; DANKERT, J.. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups V S 116 and M 19). **Inst. J. Syst. Bacteriol.** 47 (4): 927- 932. ,1997.
- WEBER, K.; PFISTER, H. W.. Clinical management of Lyme borreliosis. **Lancet**, 343(23): 1017-1020, 1994.
- WELLS, S. J.; TRENT, A.M.; ROBINSON, R.A.; KNUTSON, K.S. & BEY, R.F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.**, 54(3): 398-405, 1993.
- WILLIAMS, L.R.; AUSTIN, F.E.. Hemolytic activity of *Borrelia burgdorferi*. **Infect. Immun.**, 60(8): 3224-3230, 1992.
- WILLIS, T. Anaerobic Bacteriology. **Clinical and laboratory. Practice** . Butterworth, 3 ed. 1977.
- WITTENBRINK, M.M.; REUTER, C.; MANZ, M-L; KRAUSS, H.. Primary culture of *B. burgdorferi* from *Ixodes ricinus* ticks. **Zbl. Bakt.** 285 (1): 20-28, 1996.
- WORMSER, G. P.; NOWAKOWSKI, J.; NALDEMAN, R. B.; BITTKER, S.; COOPER, D.; PAVIA, C.. Improving the yield of blood cultures for patients with early Lyme disease. **J. Clin. Microbiol.** 36 (1): 296- 298, 1998.
- YOSHINARI, N. STEERE, A. C. & COSSERMELLI, W. Revisão da Borreliose de Lyme. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, 35(1): 34-37, 1989.

- YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; YSHIKAWA, M. M.; BATTESTI, D. M. B.; PIRANA, S.; FONSECA, A. H.; SCHUMAKER, T. T.. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, 52(2):111-117, 1997.
- YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; FONSECA, A. H.; BONOLDI, V. L. N.; BATTESTI, D. M. .; SCHUMAKER, T. S. & COSSERMELLI, W. Borreliose de Lyme - Zoonose emergente de interesse multidisciplinar. **NewsLab**, Ano III - n°12: 90-104, 1995.
- YOSHINARI, N. H.; OYAFUSO, L. K.; MONTEIRO, F. G. V.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; FERREIRA, L. G. E.; BONASSER, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, 48(4): 170-174, 1993a.
- YSHIKAWA, M. M. **Pesquisa de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi* em condições experimentais e de infecções naturais em bovinos.** Tese de Doutorado apresentada ao curso de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 84 p., 2000
- ZINGG, B. C.; LEFEBVRE, R. B.. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriaceae*, putative agent of epizootic bovine abortion. **Am. J. Vet. Res.**, 55(11): 1509-1515, 1994.

Apêndice 1. Composição dos meios CMRL e BSK para cultivo de *Borrelia* spp.

	CMRL – 1066	BSK	BSK II	BSK H
L- Alanina	0,025	0,025	0,025	0,025
L- Arginina	0,05787	0,05787	0,05787	0,05787
L-Acido Aspartico	0,03	0,03	0,03	0,03
L-Cisteina. HCl.H ₂ O	0,26	0,26	0,26	0,26
L-Cistina	0,02	0,02	0,02	0,02
L-Ácido Glutâmico	0,075	0,075	0,075	0,075
L-Glutamina	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicina	0,05	0,05	0,05	0,05
L-Histidina HCl.H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02
Trans-4-Hidroxi-L-Prolina	0,01	0,01	0,01	0,01
L-Isoleucina	0,02	0,02	0,02	0,02
L-Leucina	0,06	0,06	0,06	0,06
L-Lysina. HCl	0,07	0,07	0,07	0,07
L-Metionina	0,015	0,015	0,015	0,015
L-Fenilalanina	0,025	0,025	0,025	0,025
L-Prolina	0,04	0,04	0,04	0,04
L-Serina	0,025	0,025	0,025	0,025
L-Treonina	0,03	0,03	0,03	0,03
L-Triptofano	0,01	0,01	0,01	0,01
L-Tirosina	0,04	0,04	0,04	0,04
L-Valina	0,025	0,025	0,025	0,025
L-Ácido Ascórbico	0,025	0,025	0,025	0,025
PABA	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005
D-Biotina	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
Choline Chloride	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
Coenzima A.Na	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025
Cocarboxilase	0,001	0,001	0,001	0,001
2`-Deoxiadenosina	0,01	0,01	0,01	0,01
2`-Deoxiguanosina	0,01	0,01	0,01	0,01
2`-Deoxicitidina. HCl	0,0116	0,0116	0,0116	0,0116
Flavina Adenina Dinucleotideo. 2Na	0,000106	0,000106	0,000106	0,000106
Ácido Fólico	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
Mio-Inositol	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005
5-Metildeoxicitidina	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
β-NAD	0,007	0,007	0,007	0,007
β-NADP.Na	0,001	0,001	0,001	0,001
Niacinamida	0,000025	0,000025	0,000025	0,000025
Ácido Nicotínico	0,000025	0,000025	0,000025	0,000025
D-Ácido Pantotenico (hemicalcio)	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
Pirodoxal.HCl	0,000025	0,000025	0,000025	0,000025
Piridoxina. HCl	0,000025	0,000025	0,000025	0,000025

Riboflavina	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
Tiamina.HCl	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
Timidina	0,01	0,01	0,01	0,01
Uridina-5-Trifosfato.Na	0,001	0,001	0,001	0,001
Cloreto de Cálcio Anidro	0,2	0,2	0,2	0,2
Sulfato de Magnésio Anidro	0,09769	0,09769	0,09769	0,09769
Cloreto de Potássio	0,4	0,4	0,4	0,4
Acetado de Sódio Anidro	0,05	0,05	0,05	0,05
Cloreto de Sódio	6,8	6,8	6,8	6,8
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro	0,122	0,122	0,122	0,122
D-Glicose	1	1	1	1
Vermelho de Fenol.Na	0,02124	0,02124	0,02124	0,02124
Glutationa	0,01	0,01	0,01	0,01
D-Ácido Glucurônico. Na	0,00388	0,00388	0,00388	0,00388
Colesterol	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
Tween 80	0,005	0,005	0,005	0,005
Neopeptona			5	5
Soroalbumina Bovina Fração 5			50	50
Extrato de Levedura			2	2
HEPES			6	6
Glicose			5	
Citrato de Sódio			0,7	
Piruvato de Sódio			0,8	
N-Acetil Glicosamina			0,4	
Bicarbonato de Sódio			2,2	
Gelatina 7%			200 ml	
Soro de Coelho			6 %	

Concentração expressa em g/L

Apêndice 2. Diferentes meios de cultura, datas do preparo dos meios, repique e leitura final, relacionados ao Crescimento de *B. burgdorferi* amostra G39/40

Nome do Meio	Datas			% de Agar	Antibiótico	5 Fluorouracil	Soro de	Albumina	pH	Crescimento	Observações
	Preparo do meio	repique	leitura								
Agar Columbia	12/05/98	04/05/98	27/05/98	2,5	-	-	Suíno	--	7,3	++++	
Agar Columbia	12/05/98	04/05/98	27/05/98	2,5	-	-	Coelho	-	7,3	++++	
Agar Columbia	12/05/98	17/06/98	29/06/98	2,5	-	-	Coelho	-	7,3	Neg	
Agar Columbia	12/05/98	17/05/98	29/06/98	2,5	-	-	Suíno	-	7,3	++++	
Agar Columbia	12/05/98	28/06/98	11/08/98	2,5	-	-	Bovino	-	7,3	Neg	
Agar Columbia	12/05/98	13/05/98	21/05/98	2,5	-	-	Suíno	-	7,3	Neg	
Agar Columbia	12/05/98	13/05/98	21/05/98	2,5	-	-	Coelho	-	7,3	Neg	
Azul de bromotimol	17/06/98	25/06/98	29/06/98	-	-	-	-	-	7,5	Neg	
Azul de bromotimol	28/05/98	17/06/98	29/09/98	-	-	-	Coelho	-	7,5	Neg	
Azul de bromotimol	28/05/98	17/06/98	29/09/98	-	-	-	Suíno	-	7,5	Neg	
Azul de bromotimol	28/05/98	20/06/98	29/09/98	-	-	-	Coelho	-	“	Neg	
Azul de bromotimol	28/05/98	20/06/99	29/09/98	-	-	-	Suíno	-	“	Neg	
BHI	16/07/98	29/07/98	13/08/98	0,1	-	-	-	-	7,4	+++	
BHI	16/07/98	29/07/98	01/09/98	0,1	-	-	-	-	“	++++	Móvel

BHI	16/07/98	29/07/98	22/09/98	0,1	-	-	-	-	7,4	++++	
BHI	16/07/98	03/09/98	13/09/98	-	-	-	Suíno	-	7,4	++++	
BHI	27/08/98	03/09/98	11/05/99	-	-	-	Coelho	-	7,4	+++	
BHI + NAG	17/09/98	24/09/98	11/05/99	0,1	-	0,5 mL	-	-	7,4	+++	0,08 g
BHI	17/09/98	24/09/98	20/10/98	“	-	“	-	-	7,4	++	
BHI	17/09/98	24/09/98	01/10/98	0,1	-	2,0	-	-	7,4	+	
BHI	20/10/98	26/10/98	11/11/98	0,1	-	-	Bovino	-	7,4	Neg	
BHI	16/07/98	10/09/98	12/11/98	1,5	-	-	Coelho	-	7,5	++++	inclinado
BHI	28/08/98	09/09/98	12/11/98	1,5	-	-	Coelho	-	7,5	++++	inclinado
BHI	20/04/99	20/05/99	06/10/99	-	-	-	-	-	6,5	Neg	
BHI	20/04/99	20/05/99	06/10/99	-	-	-	-	-	7,0	++++	
BHI	20/04/99	20/05/99	06/10/99	-	-	-	-	-	7,5	Neg	
BHI	03/03/99	04/04/99	08/06/99	-	-	-	-	-	7,4	++++	
BHI	01/07/99	06/07/99	02/09/99	0,1	Rif+ Kan	-	Coelho	-	6,5	++	
BHI	03/09/99	04/04/99	08/06/99	-	-	5 mL	-	-	7,4	++++	
BHI + NAG	17/09/98	24/09/98	01/10/98	“	-	1,0 mL	-	-	7,4	+	0,08
BHI + NAG	17/09/98	24/09/98	01/10/98	0,1	-	-	-	-	7,4	+	0,08g
BSK padrão	21/02/00	04/04/00	09/06/00	-	-	-	Coelho	+	7,5	++++	
BSK padrão	27/07/99	10/09/99	17/09/99	-	-	-	Coelho	-	7,5	++++	

BSK padrão	21/02/00	17/03/00	10/04/00	-	-	-	Coelho	+	7,5	++++	jarra com vela
BSK padrão	21/02/00	04/04/00	09/06/00	-	-	-	Coelho	+	7,5	++++	Jarra com envelope de CO ₂
BSK padrão	28/08/98	09/09/98	11/11/98	1,5	-	-	Coelho	+	7,5	++++	agar inclinado
BSK Sigma	02/09/97	09/09/98	29/09/98	0,1	-	-	Coelho		7,5	+++	
BSK Sigma	02/09/97	09/09/98	29/09/98	0,1	-	-	Suíno		7,5	+++	
BSK Sigma	12/05/98	13/05/98	29/06/98	-	Kan	+	Coelho	+	7,5	++++	
BSK Sigma	12/05/98	13/05/98	29/06/98	-	Kan	+	Suíno	+	7,5	++++	
BSK Sigma	02/09/97	09/09/97	24/09/97	1,5	-	-	Coelho	+	7,5	Neg	Mini Placa + sangue
BSK Sigma	02/09/97	09/09/97	24/09/97	1,5	-	-	Suíno	+	7,5	++++	Mini placa + sangue
BSK Sigma	14/07/98	29/07/98	06/08/98	0,1	-	-	Coelho	+	7,5	+++	
BSK Sigma	14/07/98	29/07/98	06/08/98	-	-	--	Coelho	-	7,5	Neg	
BSK Sigma	14/07/98	29/07/98	06/07/98	-	-	-	Coelho	+	7,5	Neg	
BSK Sigma	15/10/98	04/05/99	27/05/99	5,0	-	-	Coelho	+	7,5	++	mini placa + sangue
BSK Sigma	15/10/98	04/05/99	27/05/99	5,0	-	-	Suíno	+	7,5	++++	mini placa + sangue
BSK Sigma	15/10/98	04/05/99	27/05/99	5,0	-	-	bovino	+	7,5	++++	mini placa + sangue
BSK Sigma	22/07/98	23/07/98	13/08/98	-	-	-	Suíno	-	7,5	Neg	Sem gelatina
BSK Sigma	22/07/98	23/07/98	13/08/98	-	-	-	Suíno	-	7,0	Neg	Sem gelatina
BSK Sigma	22/07/98	23/07/98	13/08/98	-	-	-	Suíno	-	6,5	++++	
BSK Sigma	22/07/98	23/07/98	13/08/98	-	-	-	“	-	5.9	Neg	

BSK Sigma	26/05/98	24/06/98	12/08/98	0.1	-	-	Coelho	-	7,5	++++	
BSK Sigma	26/05/98	24/06/98	12/08/98	0,1	-	-	Suíno	-	7,5	++++	
BSK Sigma	26/05/98	02/07/98	12/08/98	0,1	Kan	-	Coelho	-	7,5	++++	
BSK Sigma	26/05/98	30/06/98	12/08/98	0,1	Kan	-	Coelho	-	7,5	++++	
BSK Sigma	22/10/98	26/10/98	03/02/99	1,5	-	-	Coelho	-	7,5	++++	mini placa + sangue
BSK Sigma	15/10/98	26/10/98	03/02/99	-	-	-	Suíno	-	7,5	++++	Móveis
BSK Sigma	23/09/99	03/02/99	18/03/99	-	Kan	+	Suíno	-	7,5	++++	
BSK Sigma	24/09/98	04/05/99	27/05/99	5,0	-	-	Coelho	-	7,5	+++	
BSK Sigma	24/09/98	23//06/99	16/09/99	-	Kan e Rif	-	Coelho	-	7,5	++	Vit.B 12
BSK Sigma	27/07/99	20/08/99	30/08/99	-	-	-	Coelho	-	7,5	++++	
BSK Sigma	27/07/99	17/08/99	14/12/99	-	-	-	Coelho	-	7,5	++	Imóvies e finas
BSK Sigma	01/07/99	8/12/99	28/12/99	-	-	-	-	+	7,5	++	Móvel
BSK Sigma	27/07/99	16/09/99	17/09/99	-	-	-	Coelho	+	7,5	++++	
BSK Sigma	25/05/99	16/09/99	17/09/99	-	-	0,3 mL	Suíno	+	7,5	++++	
BSK Sigma	25/05/99	16/09/99	17/09/99	-	-	-	Suíno	+	7,5	++++	
BSK Sigma	04/09/99	02/05/99	12/05/99	-	-	-	Caprino	+	7,5	+++	
BSK Sigma	04/09/99	02/05/99	30/05/99	-	-	-	“	+	7,5	++++	
Caldo Brucela	20/10/98	26/10/98	20/12/98	-	-	-	Coelho	-	7,2	Neg	
Caldo Brucela	20/10/98	26/10/98	18/03/99	-	-	-	Suíno	-	7,2	++++	

Caldo Brucela	20/10/98	26/10/98	18/03/99	-	-	-	Bovino	-	7,2	++++	
Caldo Brucela	20/10/98	03/02/99	18/03/99	-	-	-	-	-	“	++++	
Caldo Brucela	20/04/99	04/05/99	18/05/99	-	-	-	-	-	6,5	Neg	
Caldo Brucela	20/04/99	04/05/99	18/05/99	-	-	-	-	-	7,0	+++	Finas e Móveis
Caldo Brucela	20/04/99	04/05/99	18/05/99	-	-	-	-	-	7,5	++++	
Caldo Brucela	19/10/98	20/04/99	11/05/99	-	-	-	-	-	7,2	Neg	
Caldo Brucela	19/10/98	04/04/99	08/06/99	-	-	-	-	-	7,2	++++	
Caldo Casoy	03/08/98	03/09/98	14/10/98	-	-	-	-	-	7,3	Neg	
Caldo Casoy + NAG	31/08/98	03/09/98	14/10/98	-	-	+	-	-	7,3	Neg	0,1 g
Caldo Casoy	31/08/98	03/09/98	03/02/99	-	-	-	-	-	7,3	+++	
CTB	14/05/98	17/06/98	12/08/98	-	-	-	-	-	7,3	++++	
CTB	14/05/98	17/06/98	22/09/98	-	-	-	-	-	7,3	++++	
CTB	14/05/98	30/06/98	12/08/98	-	-	-	-	-	7,3	+++	
TB	14/05/98	04/05/99	22/06/99	-	Kan	-	-	-	7,3	++++	
CTB	01/07/98	02/07/98	16/09/98	0,1	-	-	Suíno	-	7,3	Neg.	
CTB	01/07/98	15/07/98	25/08/98	-	-	-	Suíno	-	7,3	+++	
CTB	01/07/98	15/07/98	25/08/98	-	-	-	Equino	-	7,3	Neg.	
CTB	14/05/98	14/05/98	08/06/98	-	Kan	-	-	-	7,3	++++	
CTB	14/05/98	04/05/99	20/06/99	-	Kan	-	-	-	7,3	++++	

CTB	14/05/98	04/05/99	28/06/99	-	Kan	-	-	-	7,3	++++	
CTB	14/05/98	16/09/99	17/09/99	0,3	-	-	Suíno	-	7,3	++	
CTB	14/05/98	16/09/99	26/10/99	0,3	-	-	Suíno	-	7,3	++++	
Dubos	27/04/99	04/05/99	20/05/99	-	-	-	-	-	6,5	+++	
Dubos	27/04/99	04/05/99	20/05/99	-	-	-	-	-	7,0	++++	
Dubos	27/04/99	04/05/99	08/06/99	-	-	-	-	-	7,5	Neg	
Dubos	27/04/99	04/05/99	28/07/99	-	-	-	-	-	7,5	+++	
Dubos	27/04/99	04/05/99	27/07/99	-	-	-	-	-	6,5	++++	
Dubos	27/04/99	16/09/99	17/09/99	-	-	-	-	-	7,0	+++	
Dubos	27/04/99	16/10/99	26/10/99	-	-	-	-	-	7,0	++++	
Meio de Noguchi	20/10/98	26/10/98	10/11/98	-	-	-	-	-	7,0	Neg	
Meio de Noguchi	20/10/98	30/10/98	10/11/98	-	-	-	-	-	“	Neg	
Middlebrook	27/04/99	04/05/99	20/05/99	-	-	-	-	-	6,5	++++	
Middlebrook	27/04/99	04/05/99	20/05/99	-	-	-	-	-	7,0	Neg	
Middlebrook	27/04/99	04/05/99	20/05/99	-	-	-	-	-	7,5	++++	
Middlebrook	27/04/99	04/05/99	08/06/99	-	-	-	-	-	7,5	++	
Middlebrook	27/04/99	04/05/99	27/07/99	-	-	-	-	-	7,0	Neg	
N N N		06/05/99	18/05/99	-	-	-	Coelho	-		+++	
N N N	-	06/05/99	16/06/99	-	-	-	“	-	-	Neg	

PMR	17/06/98	15/07/98	28/07/98	-	-	-	Eqüino	-	6,8	Neg.	piruvato
PMR	17/06/98	15/07/98	09/07/98	-	-	-	Suíno	-	6,8	++++	
PMR	“	“	28/07/98	-	-	-	“	-	6,8	Neg.	
PMR	17/06/98	29/07/98	11/08/98	-	-	-	“	-	6,8	+++	Resazurina
PMR	17/06/98	17/06/98	11/08/98	-	-	-	“	-	6,8	Neg	
PMR	20/04/99	20/04/99	18/05/99	-	-	-	Coelho	-	6,5	++++	
PMR	20/04/99	20/04/99	18/05/99	-	-	-	“	-	7,0	++++	
PMR	20/04/99	20/04/99	18/05/99	-	-	-	“	-	7,5	++++	
PMR	27/07/98	29/07/98	23/09/98	-	-	-	Suíno	-	6,4	++++	
PMR	27/07/98	29/07/98	11/08/98	-	-	-	Suíno	-	6,4	Neg	Tween 80
PMR	01/07/98	15/07/98	25/08/98	-	-	-	Eqüino	-	6,8	Neg	
PMR	01/07/98	02/07/98	16/09/98	-	-	-	Suíno	-	6,8	++++	
PMR	26/08/98	03/09/98	08/12/98	-	-	-	“	-	6,8	++++	
PMR	17/07/98	23/07/98	08/12/98	-	-	-	Coelho	-	6,8	++++	
PMR	20/04/99	20/04/99	16/09/99	-	-	-	Coelho	-	6,5	++++	
PMR	20/04/99	20/04/99	08/06/99	-	-	-	Coelho	-	7,0	++++	
PMR	20/04/99	20/04/99	18/05/99	-	-	-	Coelho	-	7,5	++++	
PMR	25/05/99	01/06/99	08/06/99	-	Rif	-	Eqüino	+	6,8	++++	
PMR	25/05/99	01/06/99	08/06/99	-	Kan	-	Eqüino	+	6,8	Neg	

PMR	25/05/99	01/06/99	22/06/99	-	Kan	-	Eqüino	+	6,8	++++	
PMR	25/05/99	01/06/99	22/06/99	-	-	-	Eqüino	+	6,8	+++	
PMR	01/07/99	16/09/99	17/09/99	-	-	-	Suíno	+	7,0	++	
PMR	01/07/99	16/09/99	19/10/99	-	-	-	“	+	“	++++	
PMR	20/04/99	02/05/00	12/05/99	-	-	-	Coelho	-	7,0	Neg	
PMR	20/04/99	02/05/00	30/05/99	-	-	-	“	--	“	++++	
Stuart	09/07/98	09/07/98	14/07/98	-	-	-	Coelho	-	7,6	Neg	
Stuart	09/07/98	09/07/98	14/07/98	-	-	-	Equino	-	“	Neg	
Stuart	08/07/98	11/08/98	13/09/98	-	-	-	Coelho	-	“	+	
Tarozzi	23//07/98	29/07/ 98	11/ 04/98	0,3	-	-	-	-	6,0	Neg	
Tarozzi	23/07/ 98	29/07/ 98	11/04/ 98	0,3	-	-	-	-	7,0	Neg	
Tarozzi	23/07/ 98	29/07/ 98	11/04/ 98	0,3	-	-	-	-	7,6	Neg	
Tarozzi	23/07/98	10/09/98	22/09/98	0,3	-	-	-	-	6,0	+	
Tarozzi	23/07/98	10/09/98	22/09/98	0,3	-	-	-	-	5,0	+	
Tarozzi	23/07/98	26/10/98	31/11/98	0,3	-	-	-	-	7,0	++	
Tarozzi	23/07/98	26/10/98	10/11/98	0,3	-	-	-	-	7,0	++	
Tioglicolato	12/06/98	13/06/98	09/07/98	-	-	-	Suíno	-	7,1	++++	
Tioglicolato	12/06/98	13/06/98	09/07/98	0,1	-	-	Eqüino	-	“	++++	
Tioglicolato	12/06/98	02/07/98	21/07/98	-	-	-	Suíno	-	“	Neg	

Tioglicolato	12/06/98	02/07/98	21/07/98	-	-	-	Eqüino	-	“	Neg	
Tioglicolato	01/07/98	15/07/98	14/08/98	0,1	-	-	Suíno	-	“	+++	
Tioglicolato	01/07/98	15/07/98	14/08/98	0,1	-	-	Eqüino	-	“	+++	
Tioglicolato	14/07/98	15/07/98	11/08/98	-	-	-	Coelho	-	“	+++	
Tioglicolato	14/07/98	15/07/98	16/09/98	0,1	-	-	Suíno	-	“	+++	
Tioglicolato	14/07/98	15/07/98	16/09/98	0,1	-	-	Eqüino	-	“	++	
Tioglicolato	14/07/98	15/07/98	16/09/98	0,1	Kan	-	Suíno	-	“	-	
Tioglicolato	01/07/98	27/08/98	15/10/98	-	-	-	Suíno	-	“	++++	
Tioglicolato	14/07/98	10/09/98	15/10/98	-	-	-	Coelho	-	“	Neg	
Tioglicolato	27/08/98	10/08/98	11/11/98	-	-	-	Suíno	-	“	++++	
Tioglicolato	27/04/99	04/05/99	18/05/99	-	-	-	-		7,5	++++	
Tioglicolato	27/04/99	04/05/99	18/05/99	-	-	-	-		7	++++	
Tioglicolato	27/04/99	04/05/99	18/05/99	-	-	-	-		6,5	++++	
Tioglicolato	27/04/99	04/05/99	22/06/99	-	-	-	-		7,1	++++	
TSY	12/05/98	13/05/98	27/07/98	-	-	-	Suíno	-	7,4	+++	
TSY	12/05/98	13/05/98	09/06/98	-	-	-	Coelho	-	7,4	++	
TSY	17/07/98	11/08/98	12/08/98	0,1	-	-	Coelho	-	“	Neg	
TSY	12/05/98	17/06/98	22/09/98	0,1	-	-	Suíno	-	“	+++	
TSY	12/05/98	24/06/98	23/07/98	0,1	-	-	Coelho	-	“	+++	

TSY	12/05/98	23/06/98	23/07/98	0,1	-	-	Coelho	-	“	++	
TSY	12/05/98	01/07/98	12/08/98	0,1	-	-	Suíno	-	“	+++	
TSY	12/05/98	04/05/99	22/09/99	-	Kan	-	“	-	“	+++	

++++ = Crescimento exuberante; +++ = bom; ++ = razoável; + = raras; Neg = Negativo; NAG = N Acetil Glucosamina; Kan = Kanamicina e Rif = Rifampicina.

Apêndice 3. Diferentes meios de cultura, datas do preparo dos meios, repique e leitura final, relacionados ao Crescimento de *B. garinii* amostra 1B29

Nome do Meio	Data início	Data repique	Eficiência	Agar %	Antibiótico	5 Fluorouracil	Soro	Albumina	pH	crescimento.	Obs
BHI	17/09/98	03/02/99	18/03/99	-	Rif. + Kan	1,0 mL	-	-	7,4	Neg	NAG
BHI	11/11/98	03/02/99	18/03/99	0,1	-	1,0 mL	-	-	7,4	Neg	
BHI	03/03/99	23/03/99	30/03/99	-	-	-	-	-	7,4	Neg	
BHI	03/03/99	23/03/99	13/04/99	-	-	-	-	-	7,4	++++	
BHI	03/03/99	07/07/99	11/08/99	-	-	1,0 mL	-	-	7,4	++++	
BHI	03/07/99	07/07/99	16/09/99	-	-	1,0 mL	-	-	7,4	++++	
BHI	19/08/99	23/08/99	24/08/99	0,3	Rif + Kan	-	Suíno	-	7,0	++	
BHI	19/08/99	23/08/99	15/12/99	0,3	Rif + Kan	-	“	-	7,0	++++	
BHI	19/08/99	12/11/99	16/12/99	-	-	-	-	-	7,0	+++	
BHI	03/03/99	07/07/99	01/08/99	-	-	2,5 mL	-	-	7,4	++	
BHI	07/07/99	23/03/99	22/06/99	-	Rif	2,5 mL	-	-	7,4	+++	
BSK	11/12/98	23/03/99	07/07/99	1,5	-	-	Coelho	+	7,5	++++	
BSK Padrão	02/09/98	03/02/99	13/04/99	-	Rif. + Kan	-	Coelho	+	7,5	++++	
BSK preparado	11/12/98	23/03/99	30/03/99	-	-	5 mL	-	-	6,5	Neg	piruvato
BSK Padrão	23/10/98	03/02/99	13/04/99	-	Kan	5 mL	“	+	7,5	+++	
BSK Padrão	01/12/98	23/03/99	13/04/99	-	Rif	5 mL	“	+	7,5	Neg.	Cte
BSK Padrão	02/09/98	03/02/99	07/07/99	-	-	-	Coelho	+	7,5	++++	

BSK Padrão	23/10/98	23/03/99	08/06/99	-	-	-	-Coelho	+	7,5	+	
BSK Padrão	23/10/98	23/08/99	24/08/99	-	Rif + Kan	-	Coelho	+	7,5	++	
BSK Padrão	23/10/98	23/08/99	23/11/99	-	Rif + Kan	-	“	-	“	++++	
BSK Sigma	15/10/98	20/08/99	18/11/99		-	-	Suíno	+	7,5	+++	
BSK Sigma	15/10/98	23/08/99	23/08/99	-	Rif + Kan	-	Suíno	-	7,0	++	
BSK Sigma	15/10/98	23/08/99	30/11/99	-	Rif + Kan	-	Suíno	-	“	+++	
BSK Sigma	15/10/98	23/08/99	24/08/99	-	Rif + Kan	0,3 mL	“	-	7,0	++	
BSK Sigma	15/10/98	23/08/99	30/11/99		Rif + Kan	0,3 mL	“	-	“	++++	
Caldo Brucella	19/10/99	03/02/99	18/03/99	-	-	-	Suíno	-	-	++++	
Caldo Brucella	19/10/99	03/02/99	19/08/99	-	-	-	-	-	-	++++	
Caldo Brucella	19/10/99	03/02/99	30/03/99	-	-	-	-	-	-	++++	
Caldo Brucella	19/10/98	03/02/99	18/03/99	-	-	-	Suíno	-	7,2	++++	
Caldo Brucella	19/10/98	03/02/99	13/04/99	-	-	-	“	-	7,2	+++	
Caldo Brucella	19/10/98	03/02/99	18/03/99	-	Rif + Kan	-	-	-	7,2	++++	
Caldo Brucella	19/10/98	03/02/99	30/03/99	-	-	-	-	-	7,2	++++	
Caldo Brucella	20/04/99	04/05/99	27/07/99	-	-	-	-	-	7,0	+++	
Caldo Brucella	04/05/99	04/05/99	27/07/99	-	-	-	-	-	7,5	+++	
Caldo Brucella	19/08/99	23/08/99	24/08/99	0,3	Rif + Kan	-	Suíno	-	7,0	+	
Caldo Brucella	19/08/99	19/08/99	18/11/99	0,3	Rif + Kan	-	Suíno	-	7,0	++++	
CTB	14/05/98	23/03/99	22/06/99	-	-	-	-	-	7,3	++++	

CTB	19/08/99	23/08/99	24/08/99	0,3	Rif + Kan	-	Suíno	-	7,0	+	
CTB	19/08/99	23/08/99	16/11/99	0,3	Rif + Kan	-	“	-	7,0	++++	
PMR	12/11/98	03/02/99	30/03/99	-	Rif + Ka	-	Cavalo	-	6,8	Neg	
PMR	12/11/98	03/02/99	30/03/99	-	Rif	-	Cavalo	-	6,8	++++	glucose
PMR	12/11/98	03/02/99	22/06/99	-	-	-	Cavalo	-	8,8	+++	
PMR	12/11/98	03/03/99	07/07/99	-	-	-	“	-	6,8	++++	
PMR	19/08/99	23/08/99	24/08/99	-	Rif + Kan	-	Suíno	-	“	+	
PMR	“	“	15/12/99	-	Rif + Kan	-	Suíno	-	-7,0	++++	
PMR	19/08/99	23/08/99	24/08/99	-	Rif + Kan	-	“	-	7,5	++	
PMR	19/08/99	23/08/99	16/09/99	-	Rif + Kan	-	“	-	“	++++	
Tarozzi	19/08/99	23/03/99	30/03/99	-	Rif	-	-	-	7,4	Neg	
Tarozzi	19/08/98	23/03/99	13/04/99	-	-	-	-	-	“	Neg	
Tarozzi	19/08/98	04/05/99	01/06/99	-	Rif	-	-	-	“	Neg	
Tarozzi	19/08/98	23/03/99	22/06/99	-	-	-	-	-	“	Neg	

++++ = Crescimento exuberante; +++ = bom; ++ = razoável; + = raras; Neg = Negativo; NAG = N Acetil Glucosamina; Kan = Kanamicina e Rif = Rifampicina.