

Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) em diferentes meios de cultivo¹

Angela de Oliveira², Aivaldo H. Fonseca³, Márcia M. Ishikawa² e Natalino H. Yoshinari⁴

ABSTRACT.- Oliveira A., Fonseca A.H., Ishikawa M.M. & Yoshinari N.H. 2004. [Cinetic growth of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) in different culture media.] Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* em diferentes meios de cultivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24(2):61-64. Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: aivaldo@ufrj.br

The cinetic of growth of *Borrelia burgdorferi* was studied during a 3-month period, using the following 8 culture 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 were maintained in culture tubes of 10 ml capacity. For each medium, the inoculum was standardized to contain initially 10² spirochetes for each 0.1 ml of culture. The growth was monitorized by counting the total number of spirochetes in 0.1ml of medium in a dark field microscope, using a 10x30 mm cover slip. For the first 12 days, counting was done each 24 hours, and afterwards once a week during 14 weeks. There occurred growth of *B. burgdorferi* in all tested media, with the best performance of three of them: BSK with rabbit serum, BSK swine serum + 5 fluorouracil, and CTB medium. Growth of *B. burgdorferi* was seen from the 4th week on, reaching its maximum within 8-12 weeks, depleting the culture medium after this time. Cystic forms of *B. burgdorferi* were observed with all tested media.

INDEX TERMS: Culture medium, *Borrelia burgdorferi*, borreliosis, Spirochaetaceae, bacteria cultivation, cinetic growth, cystic forms.

RESUMO.- Estudou-se a cinética de crescimento de *Borrelia burgdorferi*, por um período de 3 meses, utilizando os seguintes oito meios de cultivo: (1) BSK adicionado de soro de coelho, (2) BSK adicionado de soro de suíno, (3) BSK adicionado de soro de suíno + 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, o inoculo foi padronizado para conter no início 10² 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 e lamínula com dimen-

sões de 10x30mm, tendo sido utilizado microscópio de campo escuro. A contagem foi realizada durante 14 semanas, tendo sido diária nos primeiros 12 dias e semanal a partir desta data. Houve crescimento de *B. burgdorferi* em todos meios testados, com melhor performance para três deles: BSK adicionado de soro de coelho, BSK adicionado de soro de suíno + 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 começou a exaustão do meio de cultivo. Formas císticas de *B. burgdorferi* foram observadas em todos os meios testados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Meios de cultivo, *Borrelia burgdorferi*, borreliose, Spirochaetaceae, cultivo de bactérias, cinética de crescimento, formas císticas.

INTRODUÇÃO

A espécie *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt, Brenner 1984, é cosmopolita, acomete animais silvestres, domésticos e seres humanos, sendo transmitida por carrapatos. Animais sofrem doença benigna e desempenham papel de sentinela para o monitoramento da dispersão do agente em novas áreas geográficas (Lissman et al. 1984, Parker & White 1992). *B. burgdorferi* cres-

¹ Recebido em 17 de janeiro de 2001.

Aceito para publicação em 18 de setembro de 2003.

Parte da Tese de Doutorado da autora junto ao Curso de Pós-Graduação em Sanidade Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Trabalho realizado com suporte financeiro do CNPq.

² Doutoranda Sanidade Animal e CPGMV-PV, UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000.

³ Depto Epidemiologia e Saúde Pública, UFRRJ. E-mail: aivaldo@ufrj.br

⁴ Depto Reumatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

ce à temperatura de 33° C e pode ser visualizada 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 utilizados para cultivo são altamente enriquecidos, de custo elevado e como o período de incubação é longo, torna-se fácil o crescimento de microrganismos contaminantes, impedindo o seu desenvolvimento. Preac-Mursic et al. (1991) cultivaram *B. burgdorferi* em seis meios sólidos utilizando soro de coelho e albumina sérica bovina. Para tornar esses meios seletivos os autores adicionaram co-trimoxazol, 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* sp foram contadas e sua morfologia caracterizada.

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

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra padrão de *Borrelia burgdorferi* (Cepa G39/40) foi proveniente do Laboratório de Doença de Lyme da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esta amostra foi conservada em tubos "nunc" contendo meio BSK com 80% de glicerol estéril, em botijão de nitrogênio líquido.

Os seguintes meios de cultura foram utilizados para crescimento das espiroquetas: BSK-coelho, BSK-suíno, BSK-suíno + 5-fluorouracil, PMR, CTB, Dubos, Caldo *Brucella* e BHI. Todos os meios foram adicionados 0,3% de agar-agar e 6% de soro de suíno. Em cada tubo com 3ml de meio foram inoculados 10ml das culturas de *B. burgdorferi*. Todos os tubos foram incubados a 34°C. Todos os meios foram preparados assepticamente e mantidos em tubos de ensaio com capacidade para 10ml. Para cada meio de cultivo o inóculo foi padronizado de modo a conter, no início, 10² espiroquetas para cada 0,1ml de cultivo.

Para contagem das espiroquetas, 10 ml da cultura homogeneizada, foi colocada sobre lâmina de microscopia com dimensões de 26x76mm e coberta com lamínula de 30x10mm. 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 12º dia; a partir desta data a contagem foi realizada 2 vezes por semana, até a 14ª 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os meios utilizados foram eficientes como substrato para crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Fig. 1 e 2). Foram observadas pequenas oscilações nos números de células nos primeiros 12 dias, cuja contagem permaneceu entre 20 e 140 unidades por 0,1 ml de meio (Fig. 1). A partir da segunda semana, foi observado discreto crescimento em todos os meios, com o platô de crescimento entre a 8ª e 13ª semanas, a partir de quando houve significativo decréscimo na contagem (Fig. 2). Os meios à base de BSK, propiciaram melhores condições para crescimento, tendo atingido o número de 1,2x10³ células na 12ª semana. Após 100 dias, as espiroquetas apresentavam-se finas, sem espiral e em número reduzido.

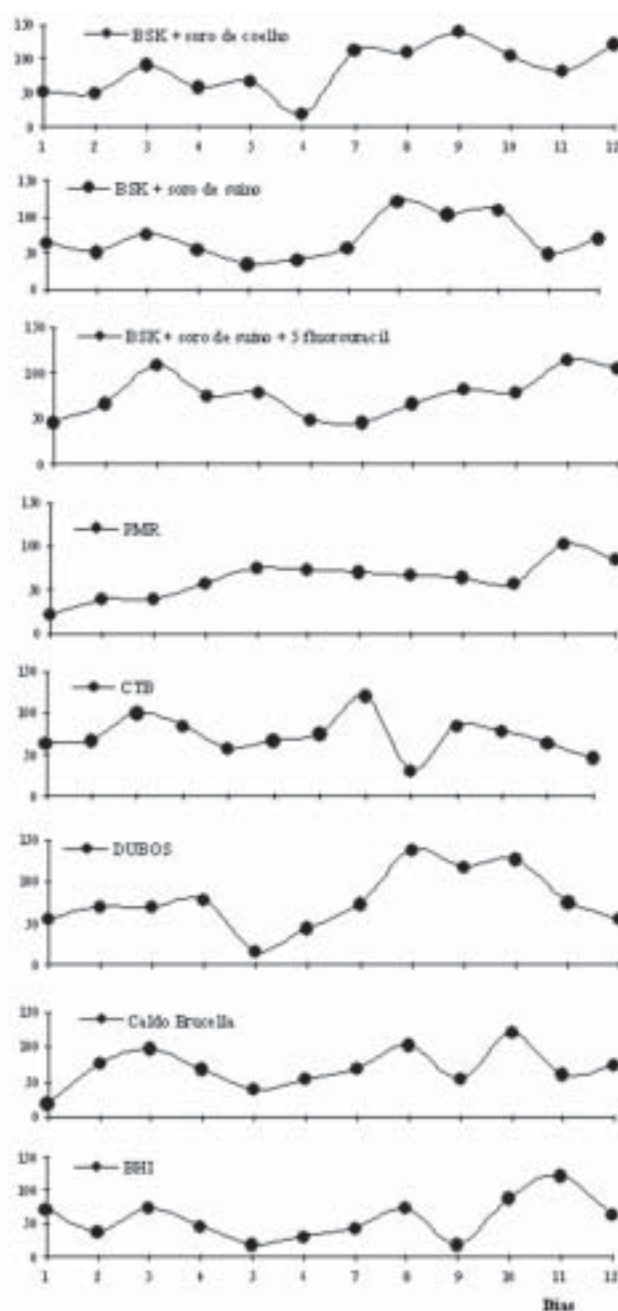


Fig. 1. Cinética de crescimento em dias de *Borrelia burgdorferi* nos meios BSK-coelho, BSK-suíno, BSK-suíno + 5-fluorouracil, PMR, CTB, Dubos, Caldo *Brucella* e BHI.

Bahrmand et al. (1996) descreveram um meio sólido para o crescimento de *B. microti* e *B. persica*, e demonstraram a redução do tempo de cultivo para 72 horas, o que permitiu um diagnóstico mais rápido. Estes autores obtiveram uma curva de crescimento para as duas amostras trabalhadas. Heroldova et al. (1998) estudaram o tempo de geração de *B. burgdorferi* 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.

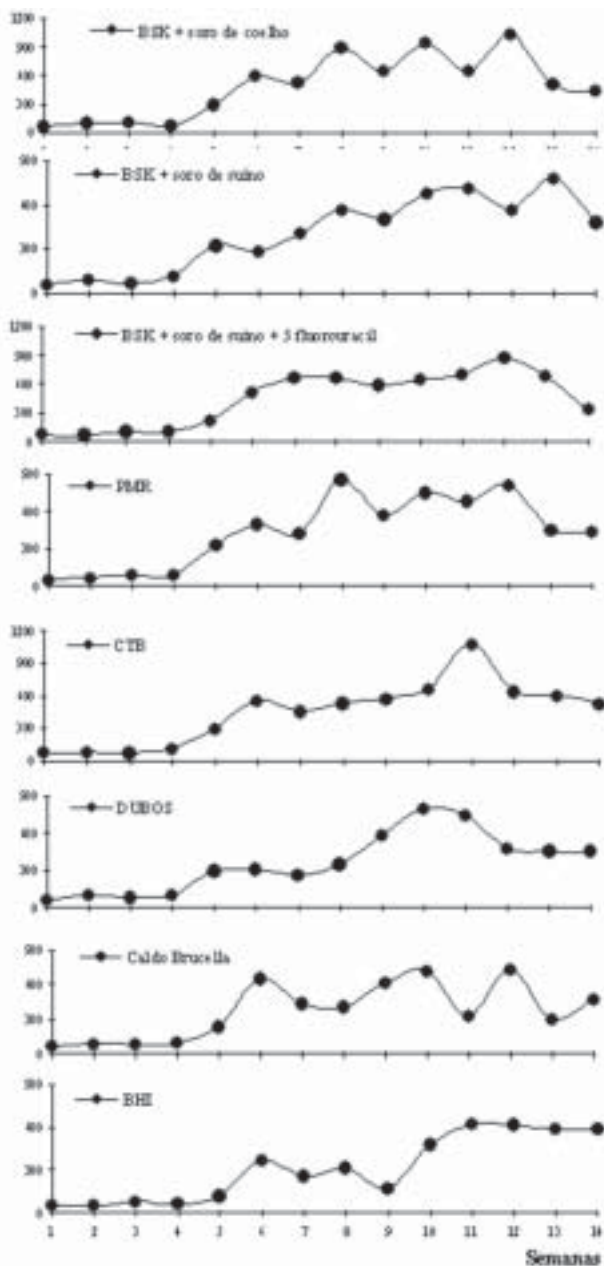


Fig. 2. Cinética de crescimento em semanas, de *Borrelia burgdorferi* nos meios BSK-coelho, BSK-suíno, BSK-suíno+5-fluorouracil, PMR, CTB, Dubos, Caldo *Brucella* e BHI.

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 concluiu que todos eles foram capazes de suportar o crescimento ativo do microrganismo testado, e que 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 a importância dos

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. 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 de *Borrelia* spp *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.

Trabalho de Wittenbrink et al. (1996), indicou 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. O efeito do piruvato de sódio sobre o crescimento de *Borrelia in vitro*, estimula a glicólise quando presente em concentração baixa. Segundo Barbour (1986), *B. burgdorferi* é mais móvel em suspensões, a qual é acentuada quando se adiciona glicose ao meio de cultura.

Formas císticas de *B. burgdorferi* foram observadas com maior frequência nos meios de cultivo desfavoráveis, mas ocorreu também em meios favoráveis como no BSK. Segundo Brorson & Brorson (1997), condições desfavoráveis, representadas pela presença de antibióticos, estimulam a presença de formas císticas, e que este estado de baixa atividade é importante para sua sobrevivência em ambiente negativo. A eficácia do antibiótico requer um metabolismo ativo da bactéria, sendo provável que a forma cística de *B. burgdorferi* constitua 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 proteja contra estresse externo. No presente trabalho, foi observado reversão de formas espiraladas em formas císticas e vice-versa. Brorson & Brorson (1997) observaram a reversão para forma espiralada quando os cistos foram colocados no mesmo meio de cultura adicionado de soro, no qual elas se apresentavam móveis e espiraladas. É provável que fenômeno semelhante ocorra *in vivo*, em condições não favoráveis para estes microrganismos, e que estas observações podem auxiliar o diagnóstico e tratamento de infecções causadas em humanos e em animais.

REFERÊNCIAS

- Bahrmand A.R., Nekoui H. & Ardekani A.M. 1996. Nuevo medio sólido para el crecimiento de *B. persica* y *B. microti*. Rev. Cubana Med. Trop. 48 (1):40-44.
- Barbour A.G. & Hayes S.F. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50(4):381-400.
- Brorson O. & Brorson S.H. 1997. Transformation of cystic forms of *B. burgdorferi* to normal, mobile *Spirochetes*. Infection 25 (4):240-246.
- Callister S.M., Case K.L., Agger, W.A., Schell R.F., Johnson S.M. & Ellingson J.L.E. 1990. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoenner-Kelly Medium to detect *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28(2):363-365.
- Dodge R.W. 1973. Culture of ethiopian of *Borrelia recurrentis*. Appl. Microbiol. 25(6):935-939.

- Heroldova M., Nemeč M. & Hubalek Z. 1998. Growth parameters of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* at various temperatures. Zbl. Bakt. 288(4):451-455.
- Lissman B.A., Bosler, E.M., Camay, H., Ormiston, B.G. & Benach J.L. 1984. *Spirochetes* associated arthritis (Lyme disease) in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185 (2):219-220.
- Pollack R.J., Telford S.R., Spielman A. 1993. Standardization of medium for culturing Lyme diseases spirochetes. J. Clin. Microbiol. 3:1251-1255.
- Parker J.L. & White K.W. 1992. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. Cornell Vet. 82:253-274.
- Preac-Mursic V., Wilske B. & Reinhardt S. 1991. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10(12):1076-1079.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey, B.K. & Carter G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed., Wolfe Publishing, London, p.292-303.
- Wittenbrink M.M., Reuter C., Manz M.L. & Krauss H. 1996. Primary culture of *B. burgdorferi* from *Ixodes ricinus* ticks. Zbl. Bakt. 285(1):20-28.