

Alguns aspectos citológicos da *Leptospira Icterohaemorrhagiae* em microscópio eletrônico

por

Mário Santos e Hans Muth

Instituto Oswaldo Cruz.

O estudo morfológico da leptospira tem apresentado resultados sujeitos a controvérsias por inúmeros autores.

Depois da utilização rotineira do microscópio eletrônico um novo impulso foi dado às referidas investigações e o presente trabalho é uma pequena contribuição ao esclarecimento de uma questão tão debatida.

Alguns aspectos interessantes foram observados por diversos autores que procuraram uma explicação biológica para os seus achados. TOOD (1) e PETIT (2) evidenciaram pequenos grânulos no citoplasma, visíveis ao ultra microscópio, considerados de natureza degenerativa, ao contrário de outros, que julgaram os mesmos grânulos com função no ciclo evolutivo dêste espiroqueta (3).

BABUDIERI (4) analisando os trabalhos de JACOB (5) e GIESZYKIENVICZ (3) considerou os referidos grânulos como oriundos da concentração hipertônica de cloreto de sódio.

O mesmo autor (6 e 7) em outros dois trabalhos, examinando alterações do citoplasma em culturas velhas não encontrou aspecto particular a não ser quando surge fenômeno de autólise em que o protoplasma se torna mais diáfano assumindo aspecto reticular com raros grânulos opacos distribuídos com certa regularidade ao longo do protoplasma.

MATERIAL E MÉTODO

A amostra utilizada em nossos estudos foi isolada por nós de *Rattus norvegicus*, amostra 43, e caracterizada como *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Foi cultivada em meio de Vervoort modificado, em condições de aerobiose e a temperatura de 28 a 30°C. A semeadura foi feita em balões contendo 50 a 100 ml. do referido meio.

A cultura foi mantida no laboratório pelo espaço de 11 e 12 meses.

Antes de estudarmos a morfologia desta cultura ela foi inoculada em cobaias jovens e feita a semeadura para observarmos vitalidade e virulência.

A referida amostra continuou virulenta, fato interessante que valeu comunicação feita por um de nós (M.S.) á Am. Soc. of Bact.

A cultura foi examinada em campo escuro apresentando os seguintes caracteres: movimentos lentos, espirais dando a impressão de solução de continuidade e numerosos grânulos fora do citoplasma.

Este material foi então morto pelo formol na concentração de 0,3% e depois centrifugado a 3.600 R.P.M. durante 15 minutos para sedimentar as grandes partículas em suspensão.

O líquido sobrenadante foi decantado e centrifugado novamente a 8.500 R.P.M. durante 30 minutos.

O sedimento foi lavado 3 vezes com água destilada formolada a 0,3% e centrifugado a 8.500 R.P.M. na temperatura +2° durante 30 minutos após o que foi observado ao microscópio eletrônico utilizando a seguinte técnica.

TÉCNICA

Após a fixação com a solução de Formol a 0,3% em água destilada e lavagem com água destilada, o material foi depositado em processo rotineiro sobre um porta-objeto recoberto pela película de Parlodion (2% em acetato de amila).

O sombreamento foi feito com crômo e sob ângulo indicado em cada micrografia.

O material foi examinado num Microscópio Eletrônico RCA do tipo EMU-2C.

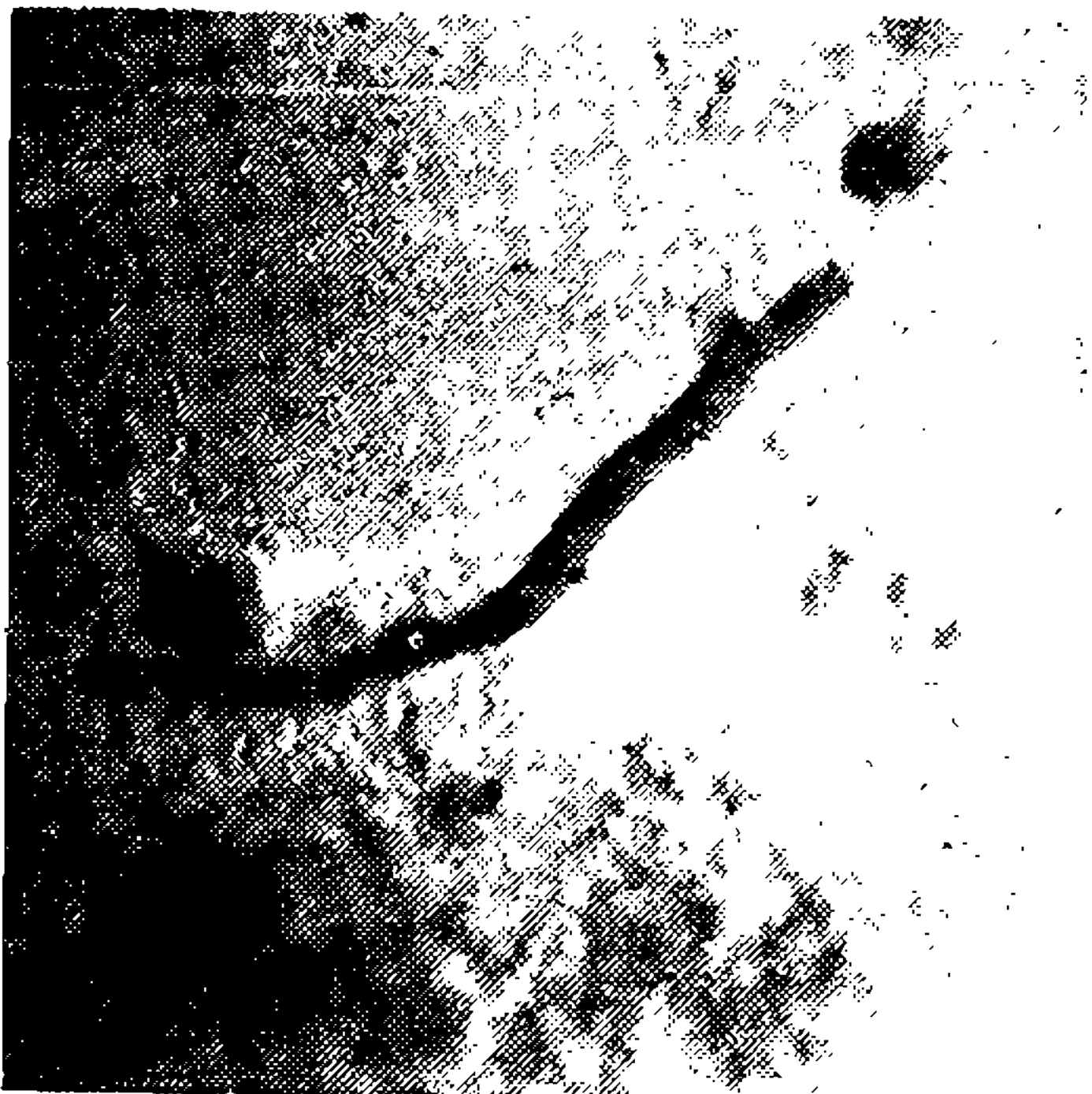
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observamos corpos de leptospira com zonas de condensação do citoplasma assumindo aspecto granular, Figs. 1, 3, 9, 4, 7, 12. Nas figs. 6 e 7 podemos ver com nitidez um desses grânulos desmembrando-se do corpo da leptospira e cuja imagem é semelhante a outros grânulos esparsos.

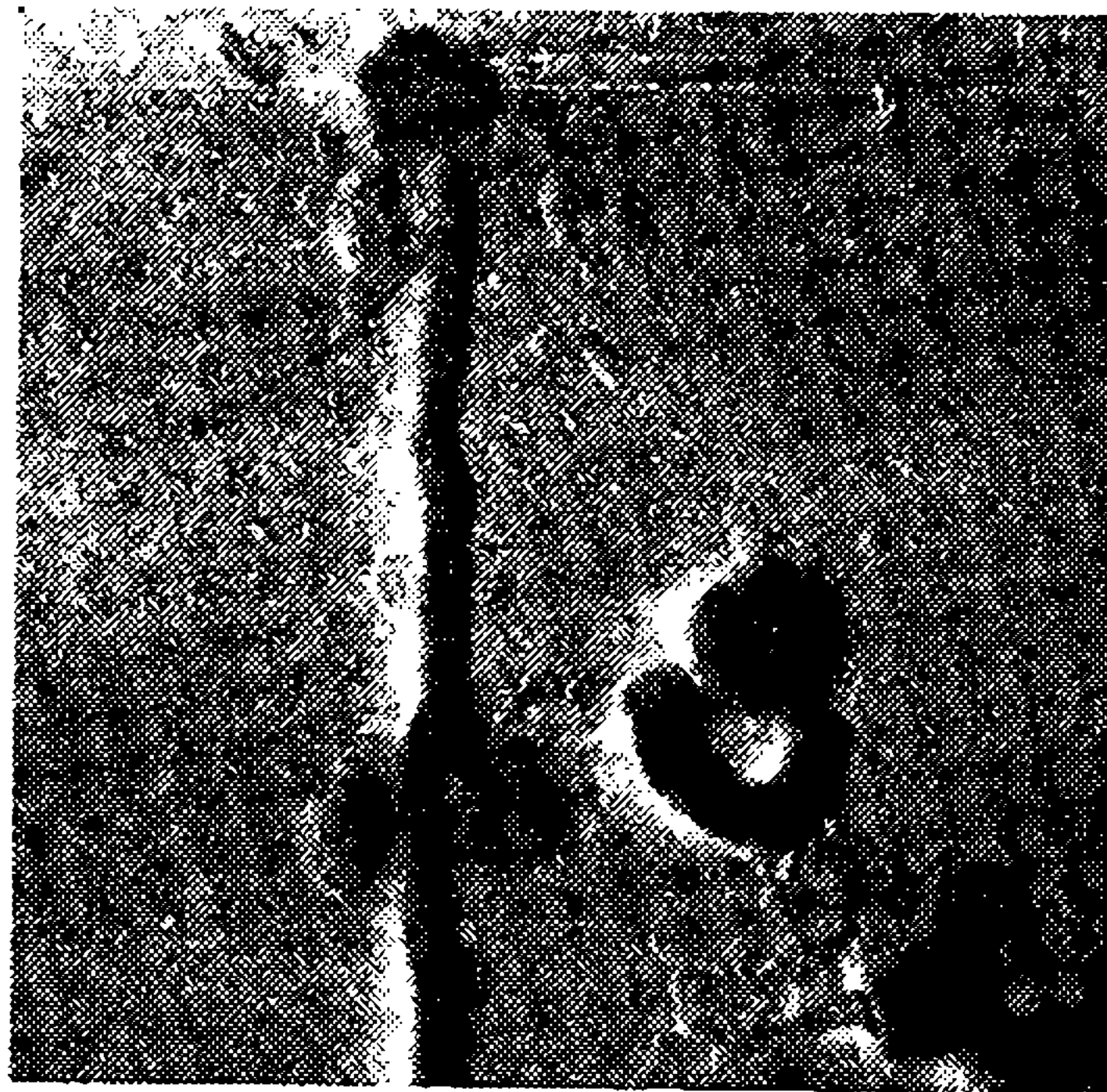
O número dessas formações é variável parecendo depender de muitas causas.

A deformação do corpo da leptospira parece depender da perda de consistência da própria membrana em virtude de alteração da sua permeabilidade fenômeno que deve preceder a formação dos grânulos.

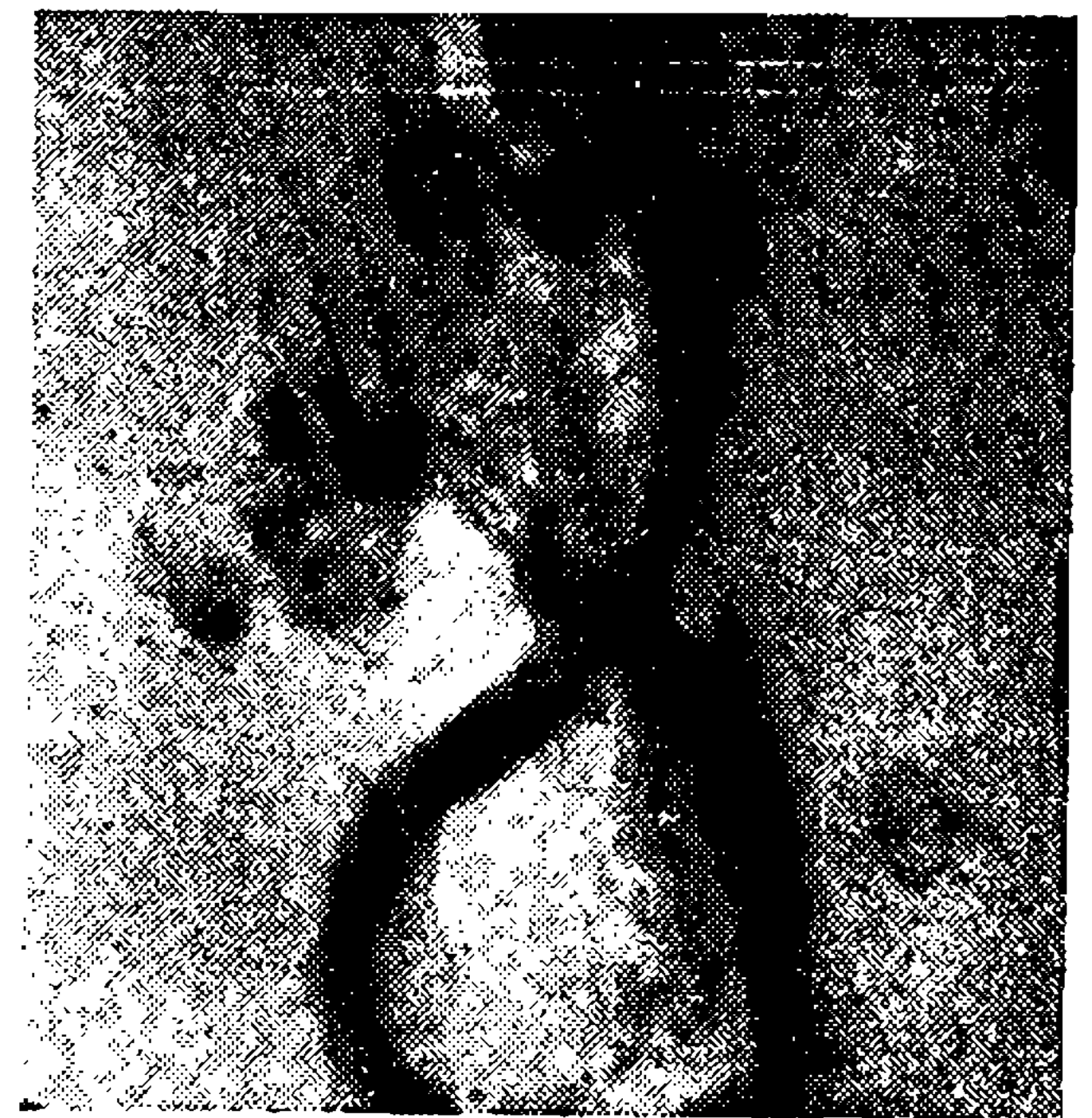
Notamos também nas mesmas condições de experiência, como na fig. 3, que os referidos grânulos tem dois aspectos diferentes: um é o que já referimos de forma irregular e opaco como se fôsse uma imagem de cromatina condensada e outro aspecto é também de forma irregular,



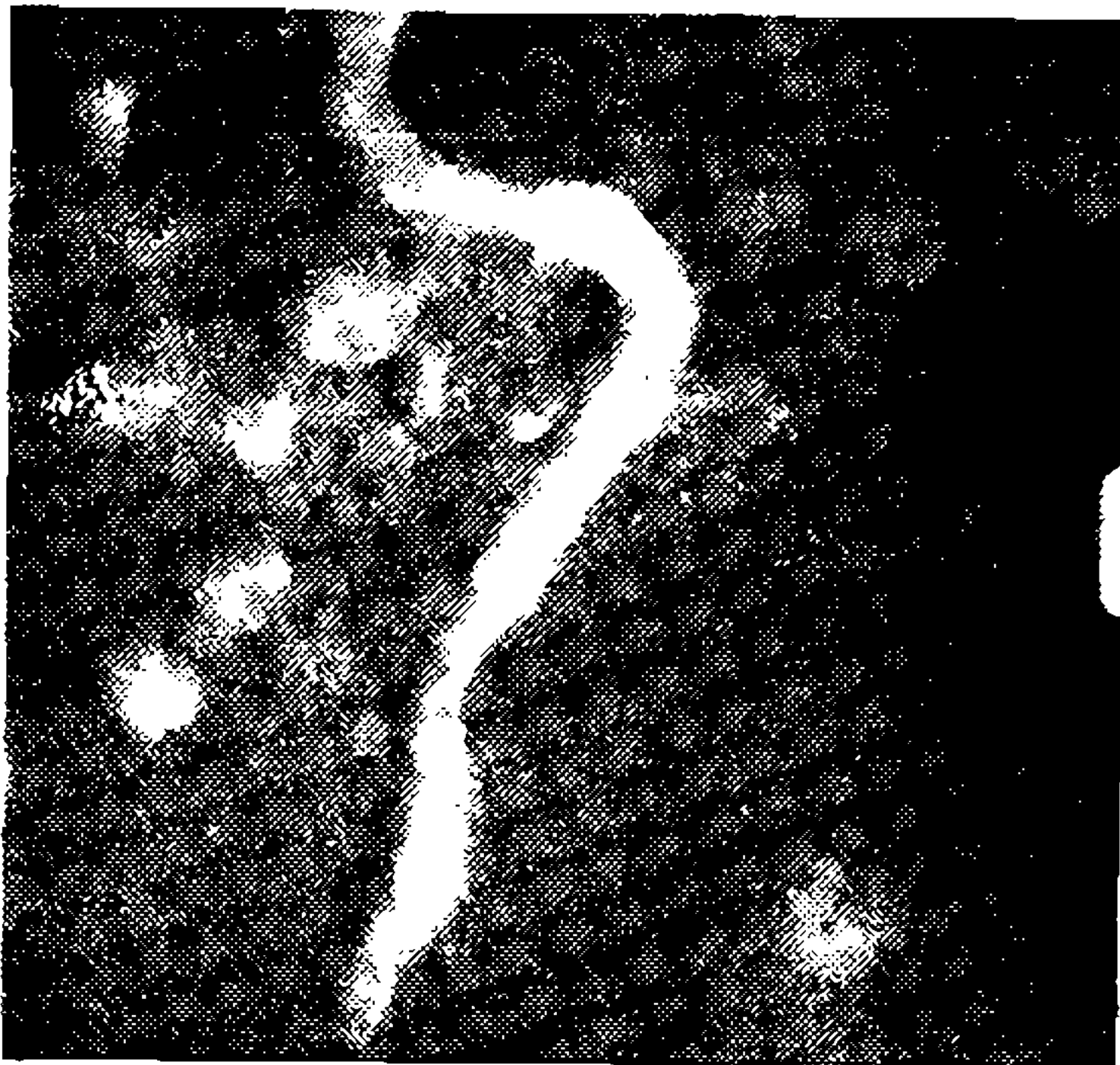
N.º 1
7500: 1 positivo



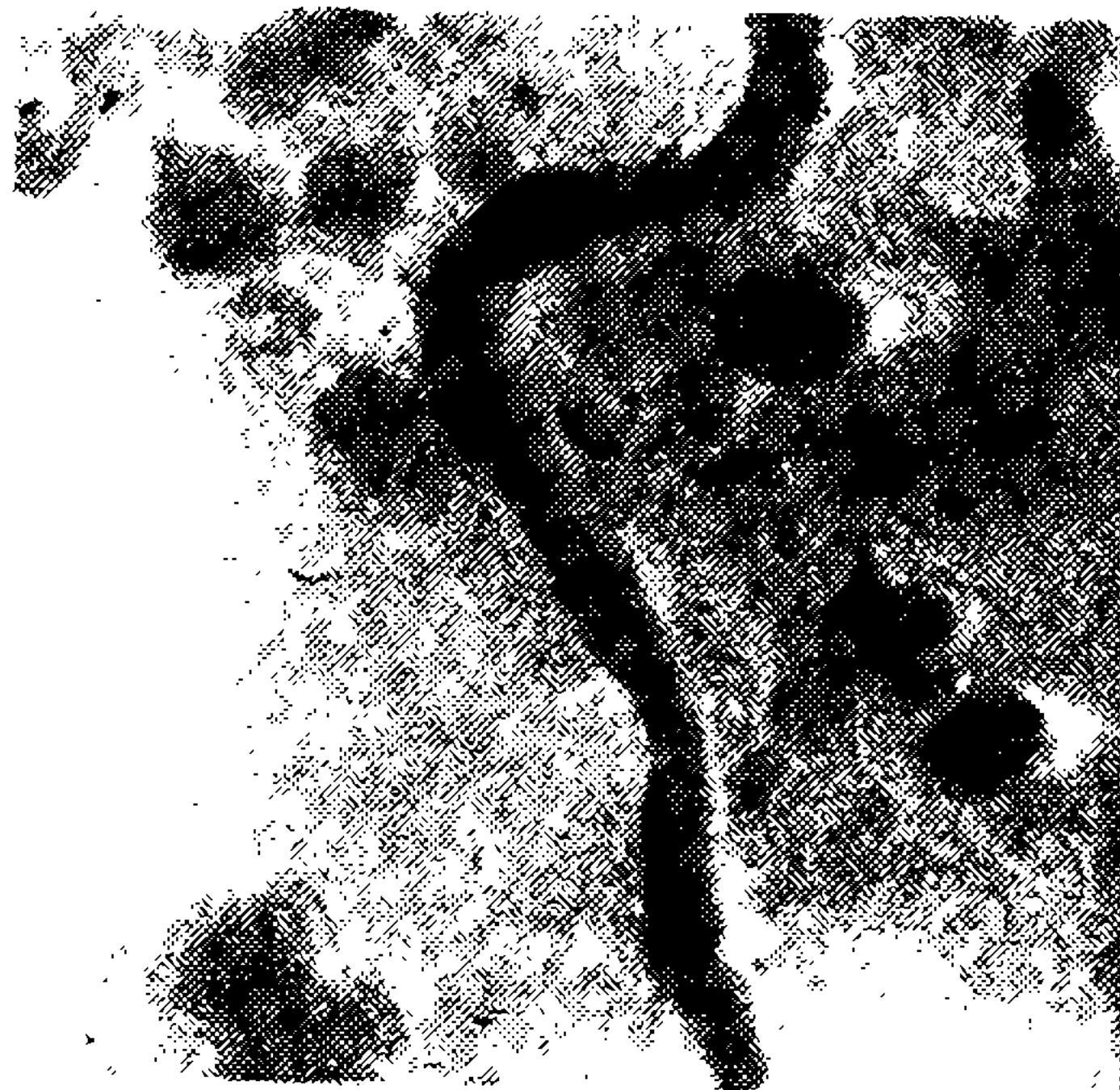
N.º 2
7500: 1 positivo



N.º 3
7500: 1 positivo



N.º 4
7500: 1 negativo



N.º 5
7500: 1 positivo



N.º 6
10500: 1 negativo



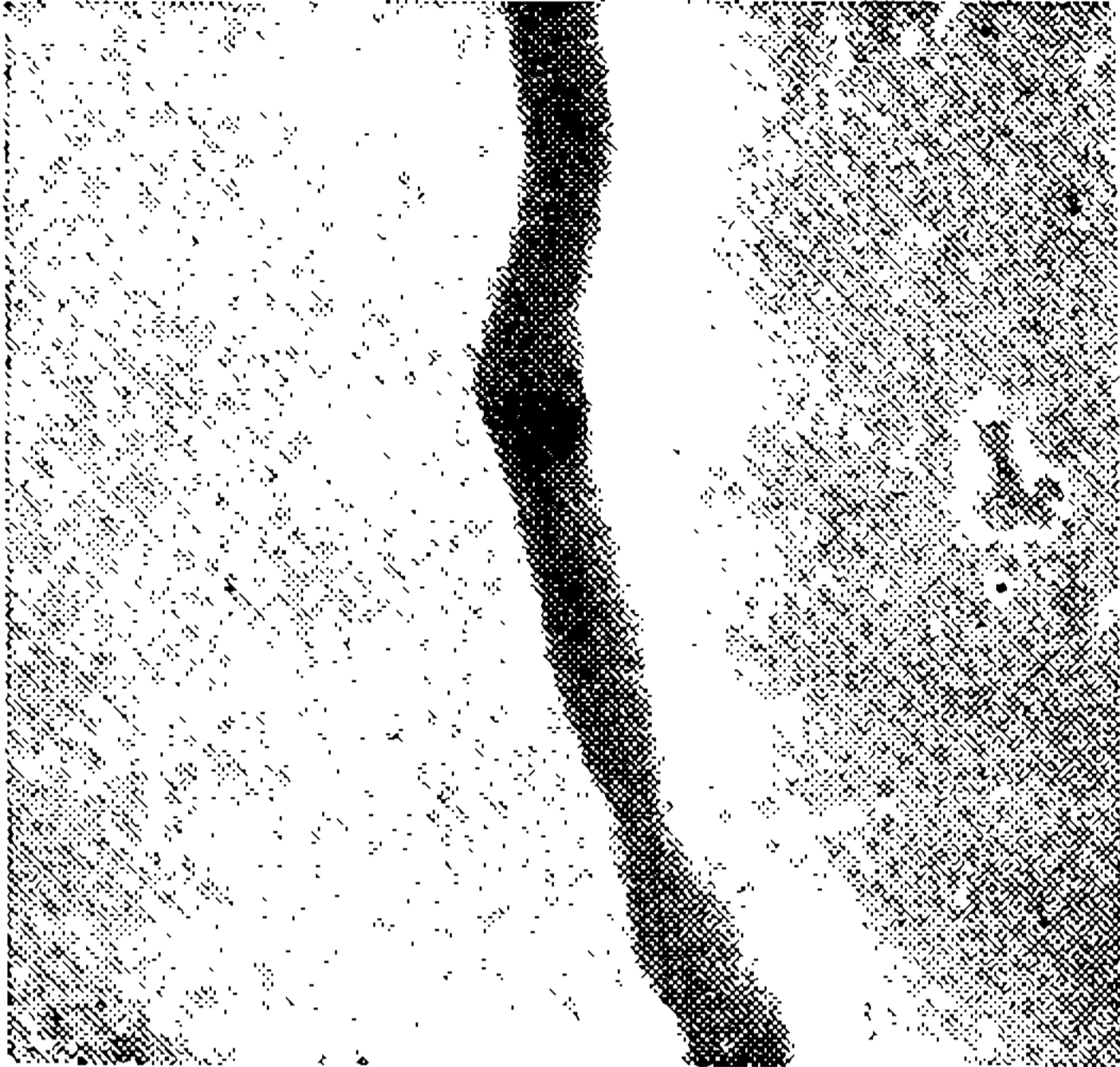
N.º 7
7500: 1 negativo



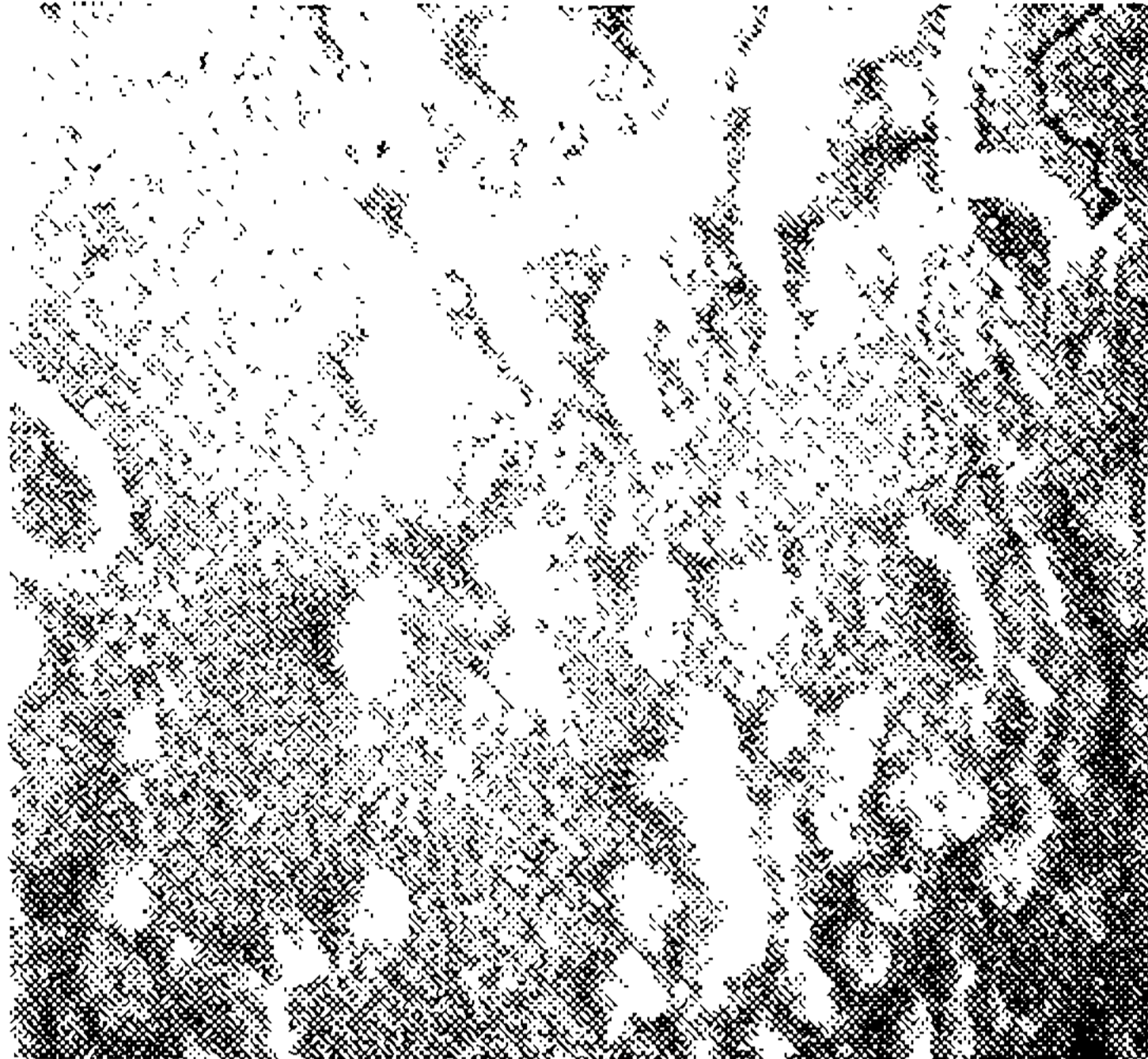
N.º 8
7500: 1 positivo



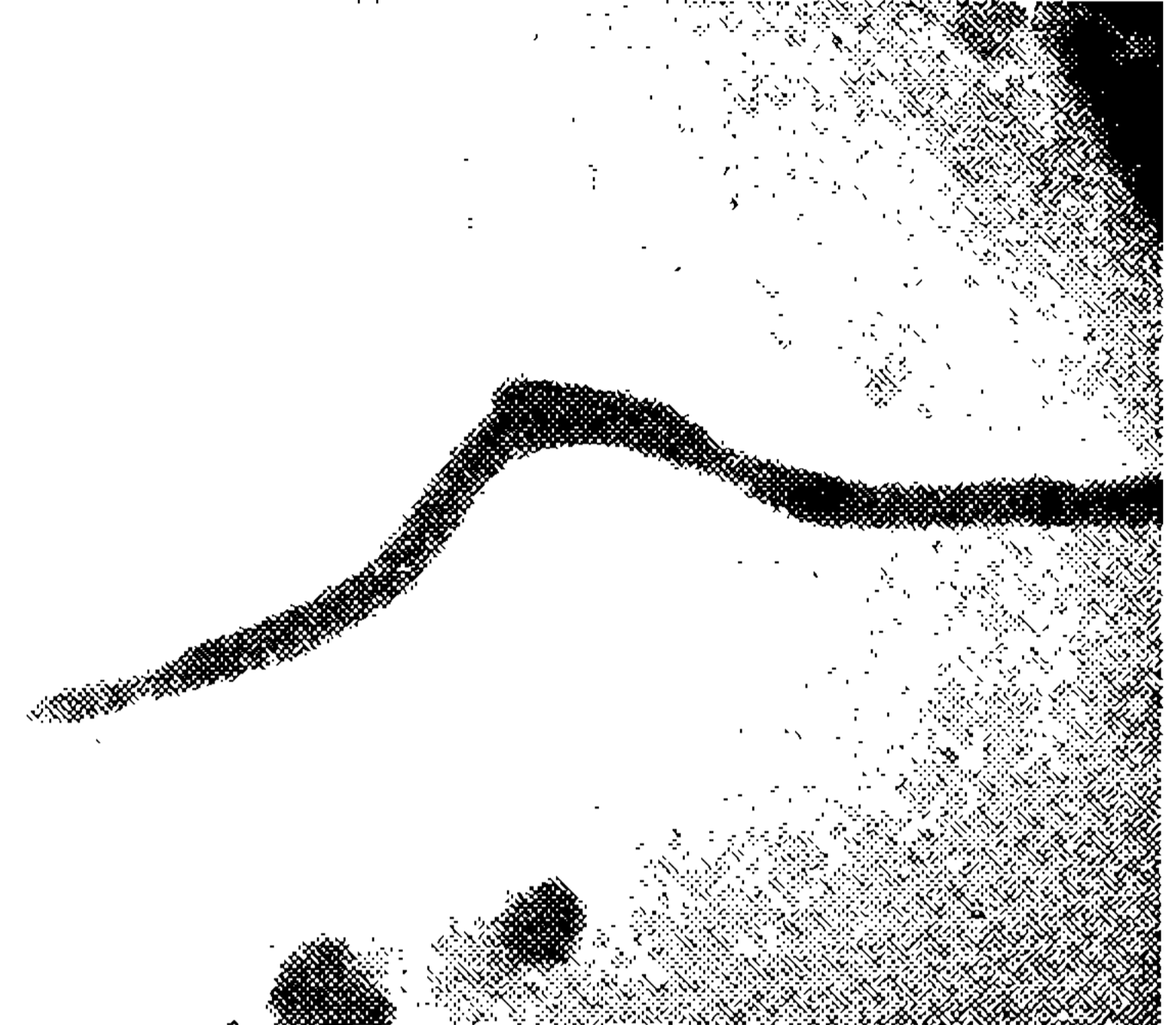
N.º 9
7500: 1 negativo



N.º 10
10500: 1 positivo



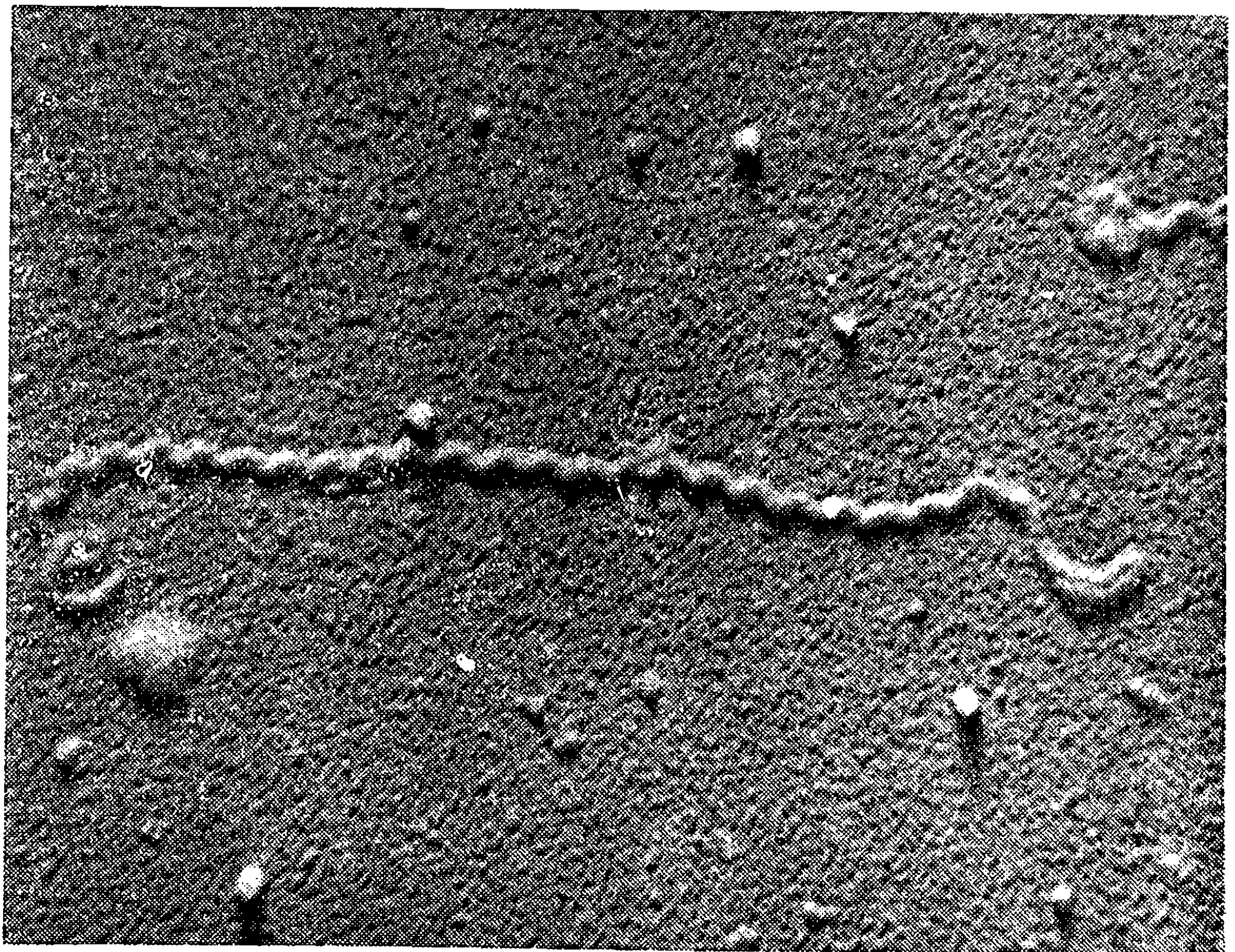
N.º 11
3600: 1 negativo



N.º 12
6000: 1 positivo



N.º 13
7500: 1 positivo



N.º 14
Original 3600: 1
Ampl. 9600: 1
Negativo

porém transparente como se estivesse esvaziado seu conteúdo primitivo, figs. 5, 7 e 13.

Na fig. 12 observamos o esvaziamento de uma forma destas e o retraimento do seu conteúdo, em outras, observação facilitada com auxílio de lente.

A fig. 2 revela um aspecto freqüente encontrado em trabalhos desta natureza como no trabalho de CZEKALOWSKI, J. W. & EAVAS, G. (8): Isto é: formação de um grânulo com posterior segmentação do mesmo.

Finalmente a fig. 11 nos mostra grânulos com a mesma densidade que os fragmentos dos corpos da leptospira.

Como dissemos acima, a cultura contendo material com êste aspecto foi inoculada em cobaia cuja hemocultura nos forneceu de novo o germe reisolado, o que faz admitir constituírem êsses grânulos uma fase no ciclo vital da leptospira ou então elemento capaz de manter condições e fatores necessários a continuidade da espécie.

Na figura 14 observamos um aspecto normal de leptospira.

RESUMO

Os autores estudando culturas de 11 e 12 meses de *Leptospira icterohaemorrhagiae*, mantidas em meio de Schüffner modificado por Verwoort, observaram em microscópio eletrônico, corpos de leptospira com zonas de condensação do citoplasma assumindo aspecto granular Figs. 1, 3, 4, 9, 7, 12.

Nas Figs. 6 e 7 vemos com nitidez um desses grânulos desmembrando-se do corpo da leptospira e cuja imagem é semelhante a outros grânulos esparsos. O número dessas formações é variável, parecendo depender de muitas causas.

A deformação do corpo da leptospira parece depender da perda de consistência da membrana em virtude de alteração da sua permeabilidade, fenomenos que deve preceder á formação dos grânulos.

Notamos também nas mesmas condições de experiência, como na Fig. 3, que os referidos grânulos tem dois aspectos diferentes: um é o que já referimos de forma irregular e opaco como se fôsse uma imagem de cromatina condensada e outro aspecto é também de forma irregular, porém, transparente como se houvesse esvaziado seu conteúdo primitivo, Figs. 5, 7 e 13.

Na fig. 12, observamos o esvaziamento de uma forma destas e o retraimento do seu conteúdo em outra, observação facilitada com auxílio de lente.

A fig. 2 revela um aspecto freqüente encontrado em trabalhos desta natureza como no de CZEKALOWSKI, J. W. e EAVES, G., isto é: formação de um grânulo com posterior segmentação do mesmo.

Finalmente a Fig. 11 nos mostra grânulos com a mesma densidade que os fragmentos dos corpos da leptospira.

Como dissemos acima, a cultura contendo material com êste aspecto foi inoculada em cobaias cuja hemocultura nos forneceu de novo o germe reisolado, o que faz admitir constituirem êsses grânulos uma fase no ciclo vital da leptospira ou então elementos capazes de manter condições e fatores necessários à continuidade da espécie.

SUMMARY

The authors observing "Leptospira icterohaemorrhagiae's culture 11 and 12 months old, maintained in culture medium of Verwoort, modified found interesting aspects evidenced in the electronic microscope.

The authors noticed bodies of leptospira with condensation zones of cytoplasm assuming granular aspect (micrographs 1, 3, 4, 7, 9 and 12).

In the micrographs 6 and 7 we see clearly one of these granules dismembering of the leptospira body whose image looks like that of other granules in the micrographs.

We saw, in some conditions of experience, as in micrograph 3, that the above referred granules have 2 different aspects: one that isn't transparent and with irregular shape, looking like condensed chromatin and the other which has an irregular shape too, but is transparent, as if it had lost part of its primitive contents (micrographs 5, 7 and 13).

In micrograph 2 we see one frequent aspect in works of this kind like that of CZEKALWSKI, J. W. and EAVES G., the granule formation with segmentation following it.

As was said above a culture with this aspect was inoculated into guinea pigs whose hemoculture supplied again the germ isolated which guided us to the idea that these granules are a phase in the vital cycle of the leptospira or elements which can maintain condition and factors necessary to the continuity of the species.

ZUSAMMENFASSUNG

Den Autoren standen fuer ihre Beobachtungen Kulturen von *Leptospira icterohaemorrhagia* von 11 bis 12 Monaten Alter in einer Naehrloesung nach Schueffner, abgeaendert nach Verwoort, fuer ihre Beobachtungen im Elektronenmikroskop zur Verfuegung, die ihnen eine grosse Zahl sehr interessanter Bilder lieferten. Sie beobachteten Koerper von Leptospiren mit Bereichen einer Anreicherung des Cytoplasmas, aus der auf eine koernige Struktur geschlossen werden kann. (Abb. 1, 3, 4, 7, 9 und 12) In den Aufnahmen 6 und 7 sehen wir mit Deutlichkeit eines dieser Koernchen, das sich vom Koerper der Leptospire abloest und das in seiner Erscheinung den anderen bereits verteilten Koernchen aehnlich ist.

Die Anzahl dieser Formbildungen ist unterschiedlich und scheint von verschiedenen Ursachen abzuhaengen.

Die Koerperdeformation der Leptospiren scheint abhaengig zu sein von den Verlusten an Festigkeit der Koerpermembran infolge der Aenderung ihrer Durchlaessigkeit, eine Erscheinung, die der Bildung der Koernchen vorausgeht.

Unter denselben Versuchsbedingungen stellten wir fest, dass die Koernchen zwei verschiedene Erscheinungsformen aufweisen (Siehe Bild 3): eine, auf die wir uns schon bezogen, von unregelmassiger Form und undurchsichtig, als ob sie aus verdichtetem Chromatin bestuenden, und eine zweite, auch unregelmassiger Form; jedoch durchscheinend, als ob es den urspruenglichen Inhalt abgestossen haette. (Bild 5, 7 und 13) Aus Elektronenbild 12 ersehen wir die Entleerung einer solchen zweiten Form und auch das Zusammenballen des Inhalts in der Huelle.

Bild 2 zeigt eine Erscheinung, wie man sie haeufig in Arbeiten dieser Art antrifft so bei J. W. CZEKALWSKI und G. EAVES, naemlich die Bildung eines Koernchen mit darauf folgender Teilung desselben.

Bild 11 zeigt uns schliesslich Koernchen der gleichen Dichte wie die der Koerperabschnitte der Leptospiren.

Kulturen, enthaltend Material dieses Aussehens, wurden in Versuchstiere eingepflegt, deren Blutkultur uns von neuem isolierte Keime lieferten, was zu der Annahme fuehrt, dass diese Koernchen eine Zwischenform im Lebenszyklus der Leptospire darstellen und damit ein Element zur Aufrechterhaltung der Art.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden im Oktober 1951 hergestellt.

BIBLIOGRAFIA

1. TOCD, L.A., 1919, The granules of Spirochaeta duttoni. *Bull. Soc. Pathol. exotique*, 12 : 595.
2. PETTIT, A., 1928, Contribution a L'étude des Spirochétides, pag. 36, vol. I. Chez L'Auteur. Vanves.
3. GIESZCZYKIEWICZ, M., 1929, Sur des corpuscules apparaissant dans les cultures de Spirochaeta icterohemorragica Inada et Ido. *C.R.S.B.*, 33 : 217.
4. BABUDIERI, B., 1948, Recherche sulla cosiddetta "pseudospore" della leptospira. *Boll. della Soc. Ital. de Biolo. Sper.*, 24 : 727.
5. JAKOB, A., 1949, Über das Sogenannte Körnchenstadium bei Leptospiren. *Optik*, 5 : 564.
6. BABUDIERI, B., 1948, Recherche di microscopia elettronica. III. Studio del genere Leptospira. *Rend. Inst. Sup. di Sanità*, 11 : 1046.
7. BABUDIERI, B., 1948, Osservazioni al microscopio elettronico sulle spirochete della febbre ricorrente. *Rend. Inst. Sup. di Sanità*, 11 : 1067-19.
8. CZEKALOWSKY, J. W. & EAVES, G., 1954, Formation of granular Structures by Leptospirae as Revealed by the Electron Microscopie. *Jour. of Bact.*, 67 : 619.