

LOCALIZAÇÃO DA *RICKETTSIA BRASILIENSIS*
NAS CELLULAS DOS DIVERTICULOS
INTESTINAES DO *AMBLYOMMA CAJENNENSE*

POR

J. LEMOS MONTEIRO E FLAVIO DA FONSECA

Em trabalhos anteriores (1,2) e em outro mais recente (3) foram descritas numerosas experiencias de transmissão experimental do virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" por meio de *Ixodidae*, evidenciando-se, sobretudo, o papel possivelmente representado em condições naturaes pelo *Amblyomma cajennense*, especialmente á luz de certos aspectos da infecção, inclusive o epidemiologico.

Nesta nota, resumimos algumas pesquisas preliminares feitas para a verificação da presença e localização da *Rickettsia brasiliensis* em exemplares de *A. cajennense* experimentalmente infectados, mostrando que este assumpto precisa de ser continuado e ampliado para que se elucide completamente o papel deste carrapato na transmissão da nossa Rickettsiose.

Em exemplares de numerosos lotes de *Amblyomma cajennense* infectados foi effectuada, em periodos diversos, a pesquisa das Rickettsias, quer em emulsões com elles preparadas, quer após fixação, inclusão e coloração adequada de cortes nelles praticados; aqui assignalaremos apenas os resultados dos exames em exemplares dos lotes que se acham documentados com desenhos das respectivas preparações. Citaremos, ao mesmo tempo, os resultados das provas de infecção de cobaia com exemplares de carrapatos de um dos lotes estudados, para confirmação da infecção dos exemplares em que foram encontradas Rickettsias, estando estas provas já descriptas, para os outros lotes, em trabalhos anteriores.

Antes de mais nada devernós indicar, em resumo, a technica por nós empregada para a fixação e coloração dos cortes de carrapatos.

Methodo de estudo e technica

Exemplares de *Amblyomma cajennense* são postos a alimentar em cobaias infectadas durante 3 ou 4 dias, no periodo de reacção febril, nas condições descriptas com maior minucia em outro trabalho (3). Exemplares desprendidos ou retirados no final desse prazo, mantidos separadamente em tubos apropriados, são, decorrido certo numero de dias, lavados convenientemente, emulsionados para pesquisa directa em esfregaços ou fixados para posterior inclusão.

Fixação e inclusão — Empregamos mais communmente a technica de Hoare (4), que assim se pode resumir:

Fixador: liquido de Bouin modificado:

Sol. saturado de acido picrico em alcool a 90 %	75	partes
formol (40%)	25	"
acido acetico	5	" ;

a quantidade a usar é addicionada, na occasião, de 1 ou 2 gottas de chloroformio;

fixação durante 24 horas, sendo que nas primeiras o frasco deve ser collocado na estufa a 56°.

A marcha a seguir, até inclusão, é:

Alcool a 90°, durante 3 a 7 dias, sendo o alcool trocado varias vezes; depois, passar por 24 horas nas seguintes misturas:

alcool absoluto;

mistura, em partes iguaes, de alcool e chloroformio;

chloroformio aquecido, saturado de parafina;

parafina pura, estufa a 56°, por 5 — 6 horas;

inclusão.

Coloração dos cortes — O methodo preferido para coloração dos cortes, após dissolução da parafina e hydratação, é o de Giemsa, sendo indispensavel uma differenciação cuidadosa afim de se conseguirem bons preparados. Para esta differenciação foram empregadas duas technicas. Na primeira, a coloração era feita durante 12 - 24 horas no soluto do corante (1 gotta para cada 2 cc.), seguindo-se uma lavagem e differenciação com agua destillada fracamente acidulada com acido acetico, até coloração rosea, seguindo uma lavagem em agua corrente e destillada, alcool absoluto, xylol e montagem em oleo de cedro.

Na segunda technica, a de Mudrow (5), que é mais simples, a differenciação se torna mais perfeita, fornecendo preparados mais claros e que melhor se prestam á conservação.

Resume-se no seguinte: tomam-se 4 frascos de Borrel, perfeitamente limpos e seccos; nos 2 primeiros (I e II) colloca-se acetona pura, neutra, e, nos outros 2 (III e IV), xylol puro.

A coloração é feita durante 20 - 30 minutos em soluto de Giemsa (1 gota para 1 cc. de agua destillada, de $pH = 7.2$); após lavagem por meio minuto em agua destillada, retira-se o excesso dagua da lamina; passa-se em acetona I, por 15 - 30 segundos; por acetona II por 10 segundos; por xylol III por 1 minuto, controlar a coloração com objectiva secca para se saber si a differenciação está perfeita ou si ha necessidade de se retornar á acetona II, e, finalmente, xylol IV por 10 minutos, seguindo-se a montagem em balsamo do Canadá.

As pesquisas registadas neste trabalho foram feitas em exemplares de *Amblyomma cajennense* infectados nas seguintes condições:

Lote III, em 4 exemplares, sendo 3 ♀ e 1 ♂ alimentados na cobaia infectada No. 864, durante a reacção febril, nos dias 21 a 23 - X - 932, sendo os carrapatos fixados depois de 7 e 15 dias do fim da alimentação.

Lote V, alimentados na cobaia No. 917, durante a reacção febril, nos dias 6 a 11 - XII - 932, sendo fixados a 24 do mesmo mês; a pesquisa foi feita numa ♀ fixada após ter desovado.

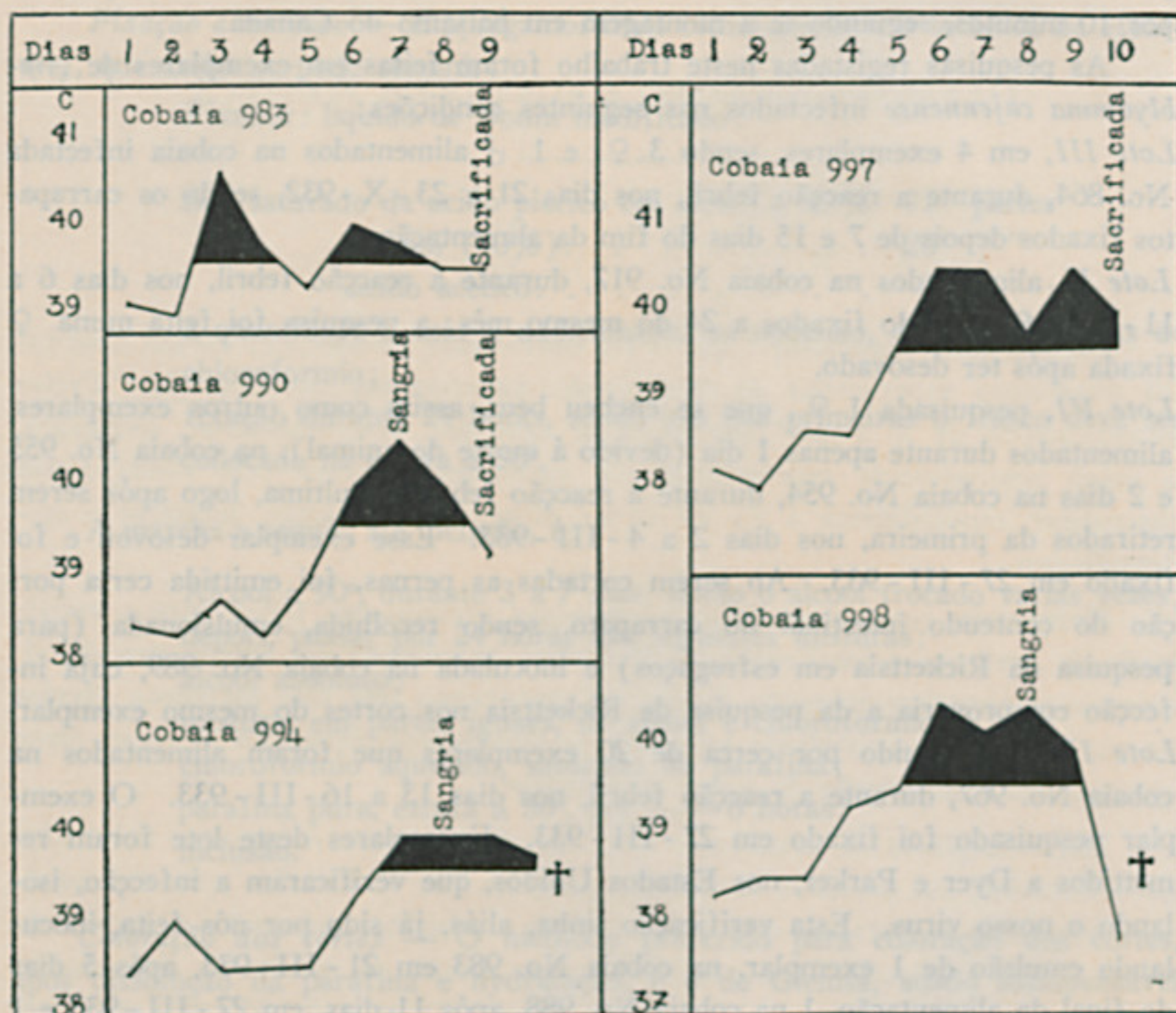
Lote VI, pesquisada 1 ♀, que se encheu bem, assim como outros exemplares, alimentados durante apenas 1 dia (devido á morte do animal), na cobaia No. 955 e 2 dias na cobaia No. 954, durante a reacção febril, na ultima, logo após serem retirados da primeira, nos dias 2 a 4 - III - 933. Esse exemplar desovou e foi fixado em 27 - III - 933. Ao serem cortadas as pernas, foi emittida certa porção do conteudo intestinal do carrapato, sendo recolhida, emulsionada (para pesquisa da *Rickettsia* em esfregaços) e inoculada na cobaia No. 989, cuja infecção comprovaria a da pesquisa de *Rickettsia* nos cortes do mesmo exemplar.

Lote IX, constituido por cerca de 20 exemplares que foram alimentados na cobaia No. 967, durante a reacção febril, nos dias 13 a 16 - III - 933. O exemplar pesquisado foi fixado em 27 - III - 933. Exemplares deste lote foram remettidos a Dyer e Parker, nos Estados Unidos, que verificaram a infecção, isolando o nosso virus. Esta verificação tinha, aliás, já sido por nós feita, inoculando emulsão de 1 exemplar, na cobaia No. 983 em 21 - III - 933, após 5 dias do final da alimentação, 1 na cobaia No. 988, após 11 dias, em 27 - III - 933 e 1 na cobaia No. 1004 em 6 - IV - 933, isto é, 21 dias após a alimentação infectante.

Resultados das experiencias

Infecção dos carrapatos — Apenas assignalaremos os resultados da verificação da infecção de exemplares dos lotes VI e IX, que forneceram especimes para fixação e cortes, pois os obtidos com os dois lotes restantes estão já expostos em outros trabalhos.

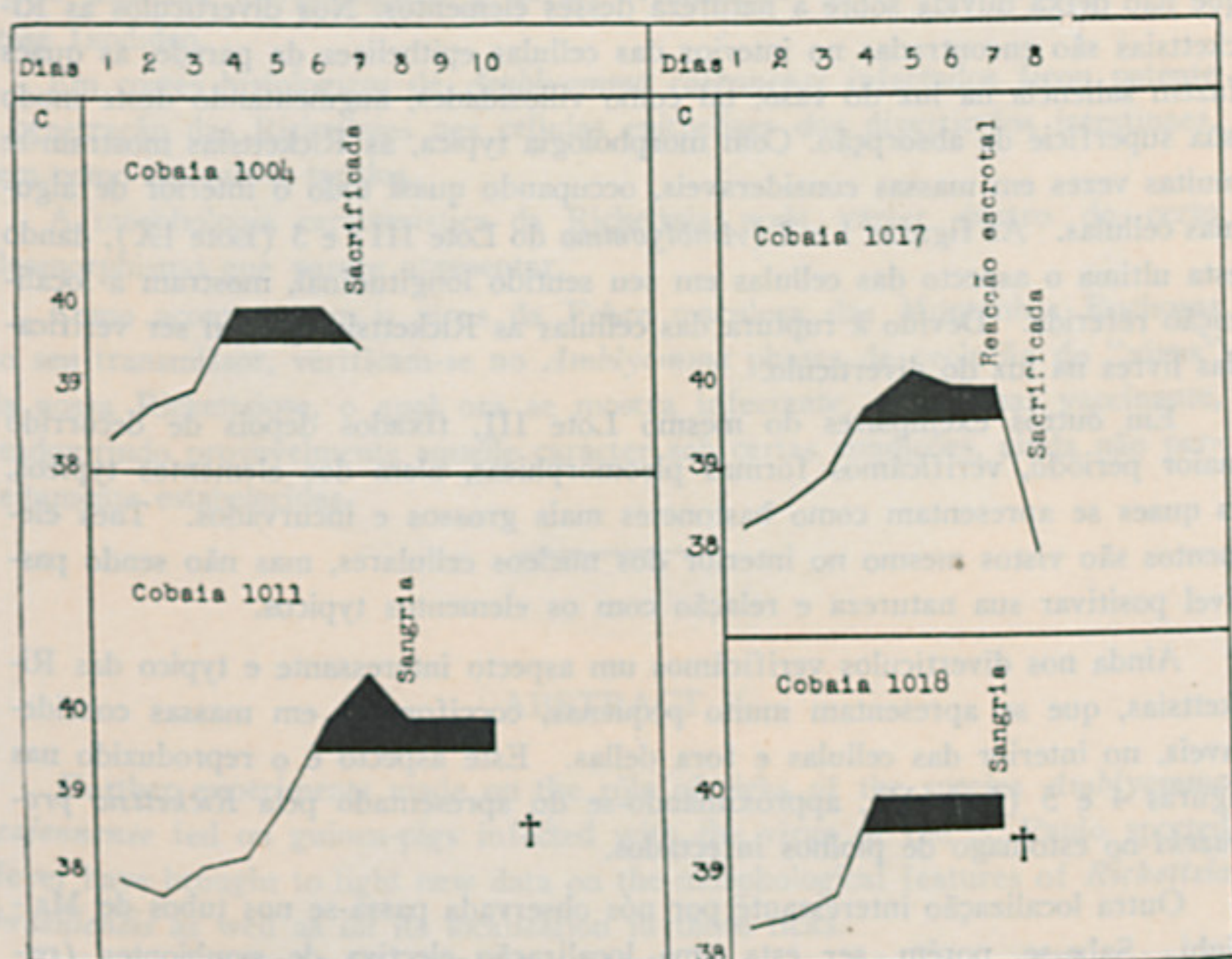
Cobaia No. 989 — inoculada em 27-III-933 com emulsão de material proveniente de um *Amblyomma* ♀ (Lote VI), após ligeiro corte na cuticula externa. Não apresentou reacção febril característica, o maximo attingido tendo sido 39°2. Após 36 dias foi reinoculada com o virus activo, de passagem (emulsão de cerebro da cobaia No. 1024), não apresentando reacção, mostrando-se immunizada. Posteriormente, 21 dias após esta ultima injeccão, foi inoculada com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, que tambem não provocou qualquer reacção.



Graphico I

Cobaia No. 983 — (Graphico 1) inoculada em 21 - III - 933 com emulsão de 1 *Amblyomma* ♀ (Lote IX), alimentado, 5 dias antes, na cobaia No. 967, de 13 a 16 - III - 933. Apresentou reacção febril e infecção característica como se verifica no Graphico 1, onde estão registadas apenas as 4 primeiras passagens feitas (cobaias Nos. 990, 994, 997 e 998).

Cobaia No. 988 — inoculada em 27 - III - 933 com emulsão de 1 *Amblyomma* ♀ (Lote IX) que, 11 dias antes, de 13 a 16, se havia alimentado na cobaia No. 967. Não apresentou reacção febril característica, pelo que foi reinoculada com o vírus activo (emulsão de cerebro da cobaia No. 1024) decorridos 36 dias, mostrando-se imunizada. Posteriormente também se mostrou immune ao vírus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.



Graphico II

Cobaia No. 1004 — (Graphico II) inoculada em 6 - IV - 933 com emulsão de 1 *Amblyomma* ♀ (Lote IX), alimentado 21 dias antes, de 13 a 16 - III - 933 na cobaia No. 967. Apresentou infecção e reacção característica, como se verifica no Graphico II, onde estão apenas também registados os resultados de algumas passagens feitas (cobaias Nos. 1011, 1017 e 1018).

Pesquisas e algumas localizações da Rickettsia brasiliensis nos carrapatos infectados — Em esfregaços directos de emulsão dos carrapatos, como os assignalados e feitos com exemplar do Lote VI, as *Rickettsias* apresentam a morphologia typica, com coloração de aspecto bipolar ou de finos bastonetes, que se coram em roseo pelo methodo de Giemsa. Nos cortes e com a coloração pelo Giemsa, segundo os methodos acima indicados, o seu aspecto morphologico

é typico, dependendo a coloração em grande parte da boa differenciação conseguida, apresentando-se corados em violeta ou roseo nas boas differenciações ou mais ou menos azuladas, mas não perfeitamente differenciadas.

Nos differentes lotes estudados, de carrapatos infectados, foram verificadas algumas localizações da *Rickettsia brasiliensis*. Em primeiro logar assignalamos a presença dos microorganismos nos diverticulos intestinaes dos *Amblyomma*, o que não deixa duvida sobre a natureza desses elementos. Nos diverticulos as *Rickettsias* são encontradas no interior das cellulas epitheliaes da parede, as quaes fazem saliencia na luz do vaso, tal como villosidades, augmentando deste modo sua superficie de absorpção. Com morphologia typica, as *Rickettsias* mostram-se muitas vezes em massas consideraveis, occupando quasi todo o interior de algumas cellulas. As figuras 1 e 2 (*Amblyomma* do Lote III) e 3 (Lote IX), dando esta ultima o aspecto das cellulas em seu sentido longitudinal, mostram a localização referida. Devido á ruptura das cellulas as *Rickettsias* podem ser verificadas livres na luz do diverticulo.

Em outros exemplares do mesmo Lote III, fixados depois de decorrido maior periodo, verificámos formas pleomorphicas, alem dos elementos typicos, as quaes se apresentam como bastonetes mais grossos e incurvados. Taes elementos são vistos mesmo no interior dos nucleos cellulares, mas não sendo passivel positivar sua natureza e relação com os elementos typicos.

Ainda nos diverticulos verificámos um aspecto interessante e typico das *Rickettsias*, que se apresentam muito pequenas, cocciformes, em massas consideraveis, no interior das cellulas e fora dellas. Este aspecto é o reproduzido nas figuras 4 e 5 (Lote V), approximando-se do apresentado pela *Rickettsia prowazeki* no estomago de piolhos infectados.

Outra localização interessante por nós observada passa-se nos tubos de Malpighi. Sabe-se, porém, ser esta uma localização electiva de symbiontes (parasitos endocellulares dos organs genitales e dos tubos de Malpighi) das femeas na superfamilia *Ixodoidea*, segundo Mudrow (5), os quaes podem ser confundidos com aquelles elementos observados sob morphologia typica no cytoplasma cellular. As figuras 6, com pequeno augmento, assignalando o ponto examinado, e 7 com grande augmento, para a demonstração das *Rickettsias*, dão idéa dos microorganismos e da sua situação nos organs citados.

Proseguindo nestas pesquisas, ainda em andamento, podemos adeantar ternos sido dado observar a presença de microorganismos com os caracteres de *Rickettsia* em musculos e em tecidos pertencentes ao aparelho buccal. Não nos é, todavia, possivel sustentar a asserção por nós feita, em nota ao pé da pagina, em trabalho anterior (2), sobre a situação intranuclear das *Rickettsias* nas cellulas intestinaes dos carrapatos infectados. Tal verificação preliminar poude ser rectificada logo que nos foi dado obter material rico e mais bem corado.

SUMMARIO E CONCLUSÕES

Novos dados experimentaes demonstram a infectuosidade de carrapatos (*Amblyomma cajennense*) alimentados em cobaias infectadas com o "virus" do "Typho exanthematico de S. Paulo", incluindo-se entre elles alguns dos principaes aspectos morphologicos e certas localizações da *Rickettsia brasiliensis* nesse Ixodideo.

Em cortes histologicos de *Amblyomma cajennense* infectados ficou patente a penetração das Rickettsias nas cellulas epitheliaes dos diverticulos intestinaes, bem como de outros tecidos.

A morphologia caracteristica da Rickettsia pode variar dentro de certo pleomorphismo que parece apresentar.

Como acontece com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas no seu transmissor, verificam-se no *Amblyomma* phases de evolução do "virus" da nossa Rickettsiose, o qual ora se mostra infectante, ora apenas vaccinante, readquirindo provavelmente aquelle character sob certas condições, ainda não perfeitamente estabelecidas.

ABSTRACT

Further experiments made on the rôle of ticks of the species *Amblyomma cajennense* fed on guinea-pigs infected with the virus of the S. Paulo spotted fever have brought to light new data on the morphological features of *Rickettsia brasiliensis* as well as on its localization in those ticks.

Histological examination of infected ticks of that species showed the Rickettsiae to enter the endothelial cells of the intestinal diverticula and other tissues. The characteristic morphology of *R. brasiliensis* may vary within certain limits.

The same stages of evolution as found in the virus of the Rocky Mountain spotted fever within the body of its carrier seem to be borne by the virus of the S. Paulo spotted fever in the *Amblyomma*. The latter virus proves to be sometimes infecting, some other times immunizing, this change taking place under certain conditions not yet fully understood.

BIBLIOGRAPHIA

1. Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A. — Typho exanthematico de S. Paulo. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus por Ixodidae — Brasil Medico XLVI(3):49.1932 et Mem. Inst. Butantan VI:139.1931.

2. Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da — Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*) — Brasil Medico XLVI(48):933.1932 et Mem. Inst. Butantan VII:41.1932.
3. Monteiro, J. Lemos — Comportamento experimental do virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" após passagem pelo carrapato (*Amblyomma cajennense*) — Apres. Congr. Med. Paulista. Nov. 1933 et Mem. Inst. Butantan. VIII:1933-1934.
4. Wenyon, C. M. — Protozoology, New York, 1926.
5. Mudrow, E. — Über die intrazellulären Symbionten der Zecken — Zeitschr. f. Parasitenk. V(1):138.1932.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado ao 2.º Congresso Medico Paulista em novembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934)



FIG. 1 × 940

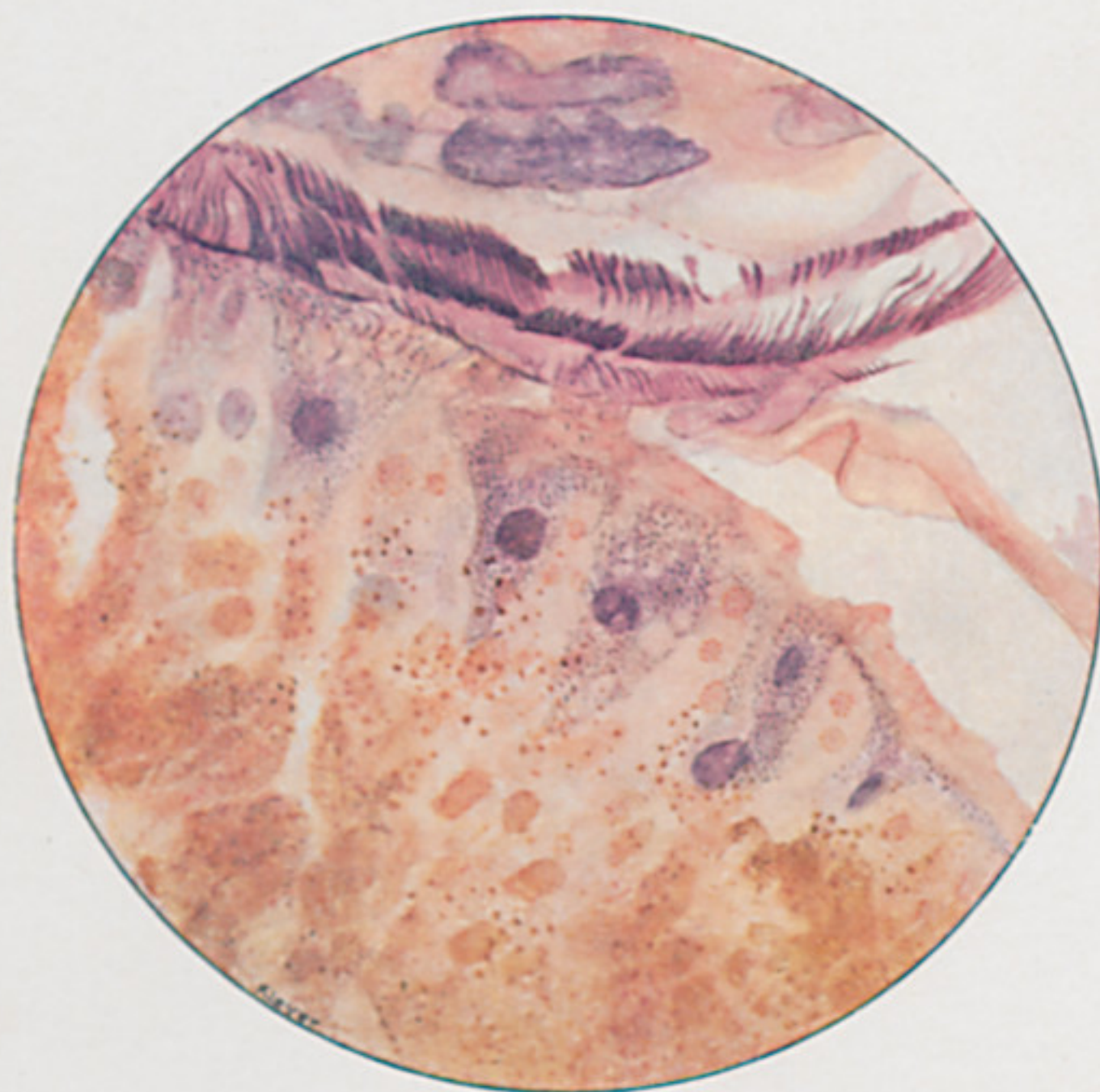


FIG. 2 × 940

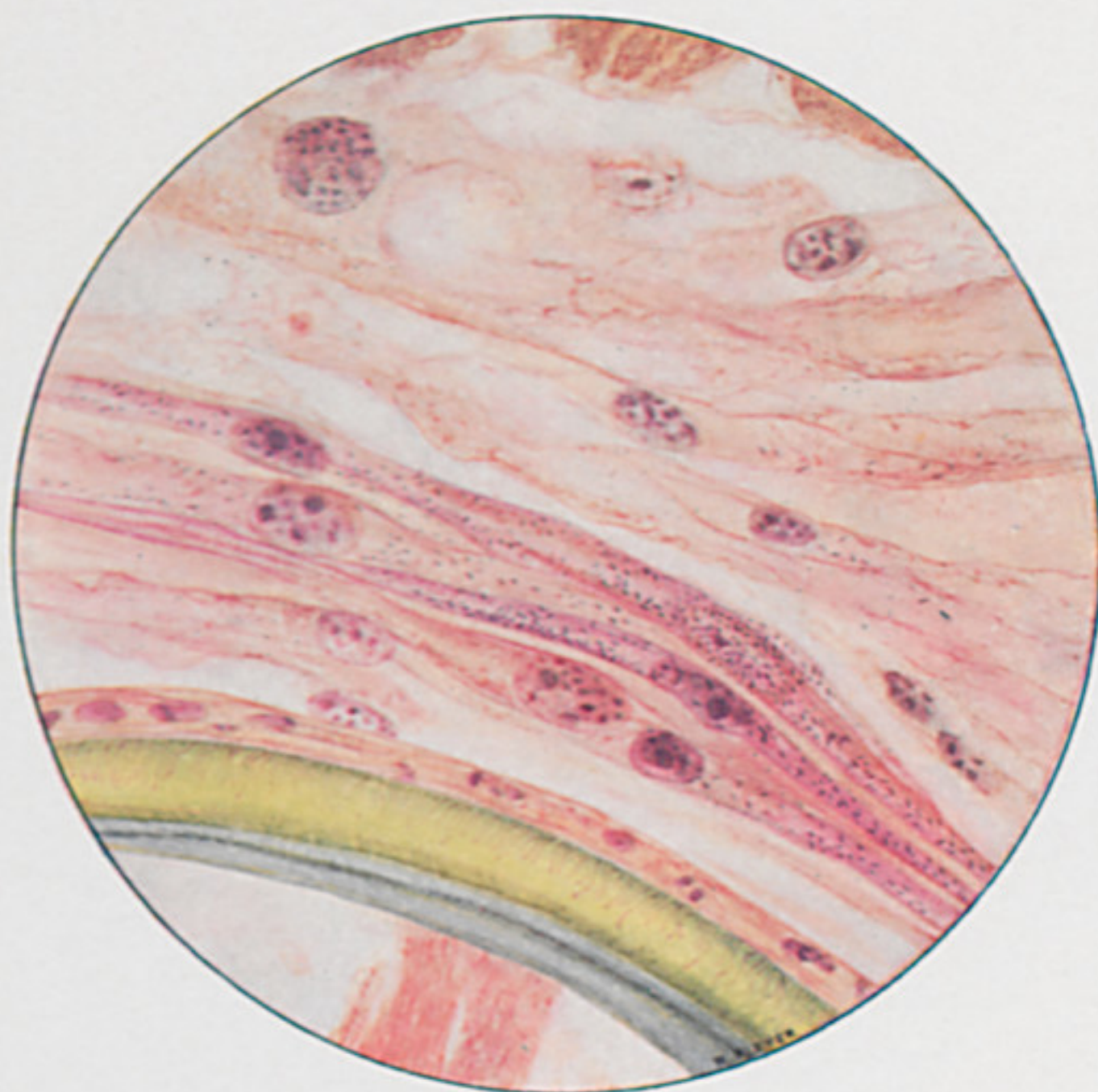


FIG. 3 $\times 940$

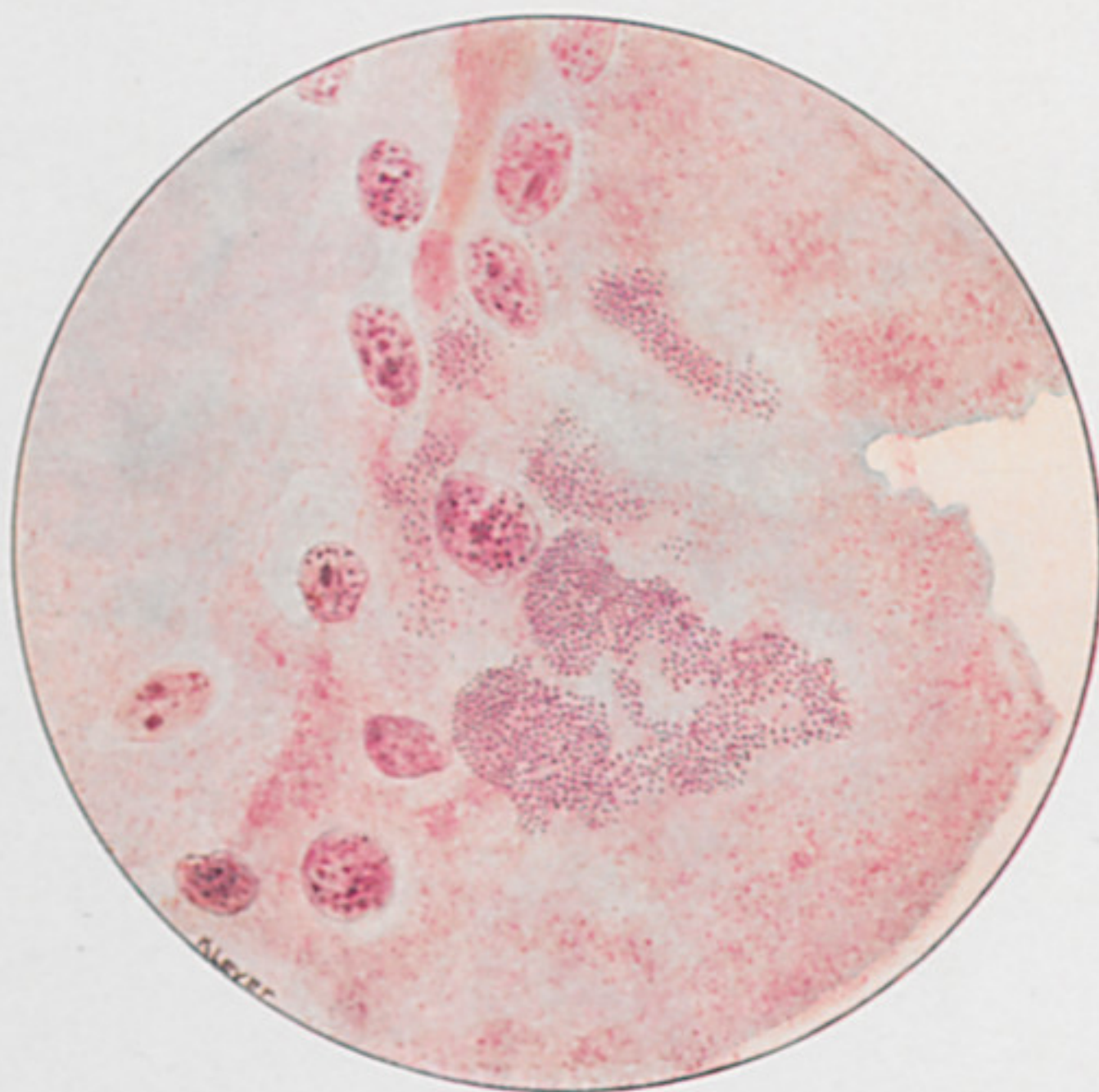


FIG. 4 $\times 940$

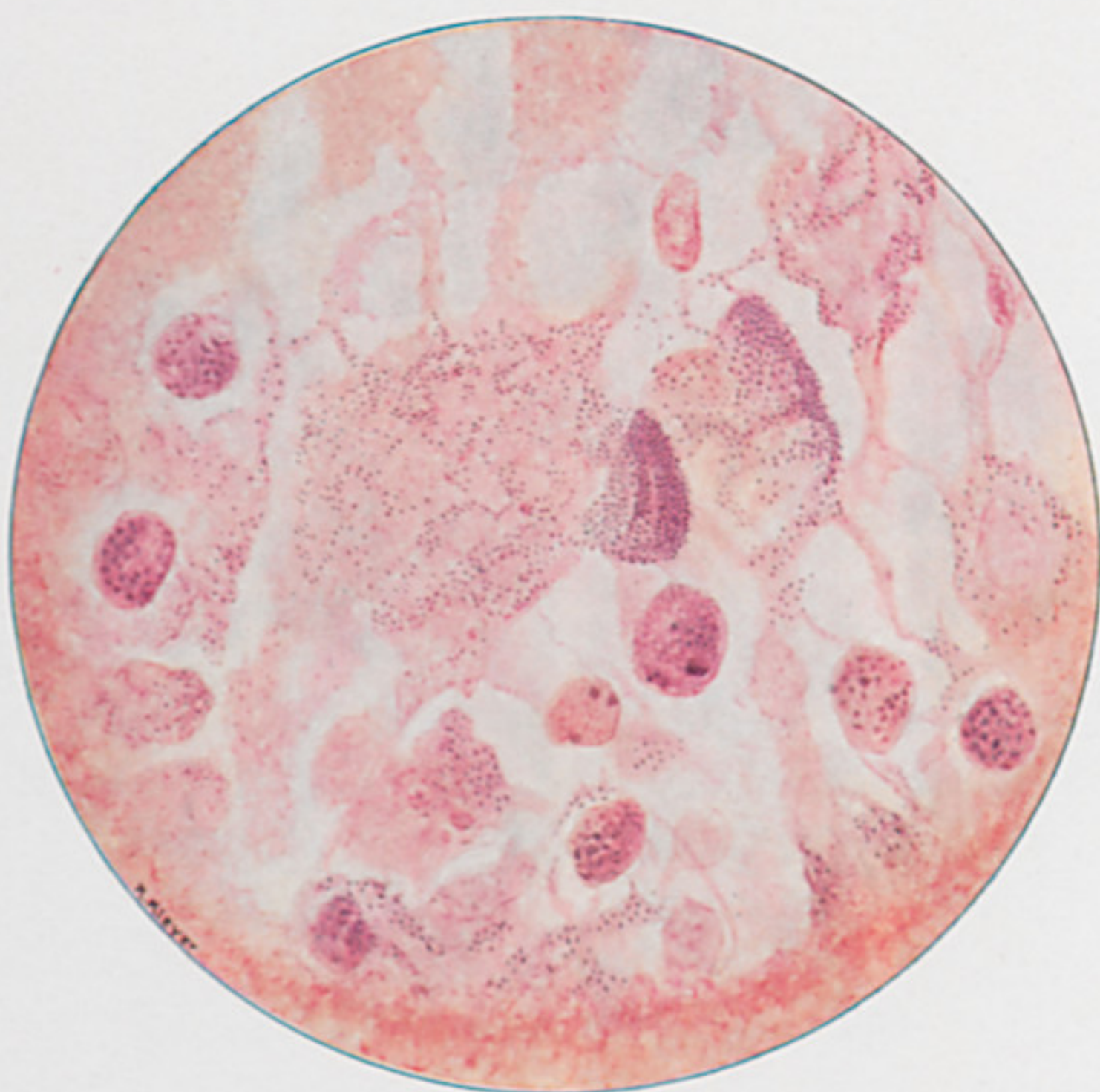


FIG. 5 $\times 940$



FIG. 6 $\times 80$



FIG. 7 $\times 940$