

Morfologia do *Mycobacterium leprae hominis* e do *M. leprae muris*. Estudo baseado na microscopia eletrônica e de contraste de fases*

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Do Instituto Oswaldo Cruz e Membro do Comitê de Leprologistas
da Organização Mundial de Saúde)

(Com 4 estampas em negro)

Bacilo de Hansen — O meu pranteado Mestre ADOLFO LUTZ, trabalhando na Clínica Dermatológica do Prof. P. G. UNNA, em Hamburgo, publicou em 1886 um artigo sobre a morfologia do bacilo de Hansen examinado em suspensão aquosa de leproma, cuja estampa mostra bacilos com um, dois e até 5 e 6 granulações (cocótricas); bacilos em massa globóide e grânulos livres com pedículos. Em 1923 A. PALDROCK (Rapport III Conf. Internationale de la lèpre, p. 138) completou esse estudo em material obtido pelo método de HACK (Derm. Centralb., VI Jahrg. Heft 4), que é idêntico ao de Lutz, corado, descrevendo (V. Estampa 1) bacilos com grânulos presos à membrana; outros com brotos (bourgeonnements), com um grânulo terminal; grânulos livres e com cauda simulando notas musicais; brótos em forquilha, e, por fim, formas ramificadas raras, semelhantes às descritas no bacilo de Koch.

Concluiu PALDROCK que: "*Ces granulations representent les éléments de reproduction du microbe de la lèpre.*" Pela microscopia de contraste de fases verificamos, no bacilo vivo, tôdas as formas descritas no bacilo morto e corado, por PALDROCK, e mais que esse germe tem membrana, tem halo e é móvel.

Microscopia eletrônica — O microscópio eletrônico trouxe considerável progresso à morfologia do bacilo de Hansen. Para este exame o material é fixado pelo calor e sofre intenso bombardeio eletrônico que produz a condensação das granulações metacromáticas do bacilo em barras e bolas negras como se fôsem coradas, que se dispõem sobre-

* Trabalho apresentado ao VI Congresso Internacional de Leprologia, Madrid, 3 a 10-X-1953 e publicado na "Memória" do mesmo Congresso, pp. 843/47. Entregue para republicação a 30-5-55.

tudo nas extremidades dos bacilos. Essa nova técnica microscópica veio provar que o bacilo de Hansen tem membrana, e um halo que é mais visível quando envolve as globias ou feixes bacilares. Mostra, também, grânulos livres de vários tamanhos, antes considerados como impurezas dos corantes; grânulos externos presos à membrana e às vezes ramificações do bacilo.

Na Estampa 2 vêem-se 16 electronomicrografias de 3.500 diâmetros, ampliados para 5.500 x e 7.500 x feitas no Instituto Oswaldo Cruz pelos Drs. HANS MUTH e PENNA FRANCA, com a minha colaboração. Em suspensão aquosa de leproma do doente CÍCERO (figs. 1 a 9) vemos um feixe de bacilos (fig. 1); um bacilo homogêneo com nítida membrana (fig. 2); as figuras 3 a 5 mostram condensações metacromáticas irregulares, cercadas por espaços claros, delimitados por nítida membrana. A figura 6 mostra um grânulo livre. As figuras 7 a 9 mostram bacilos cercados por um halo (gloea de Lutz?). As figuras 10 a 12 representam bacilos de emulsão fresca de leproma do doente JACYR: a 10 com duas condensações em barra, polares; a 11 com três condensações pouco nítidas (bacilo jovem?) e a 12 com um grânulo de cada lado, presos à membrana bacilar, simulando gemulação. As figuras 13 a 16 mostram, na linfa subcutânea da doente LAYSE, o bacilo de Hansen sob várias formas, inclusive um feixe (fig. 13) e uma globia (fig. 16) nitidamente envoltos por um halo claro. Tôda essa morfologia é artificial porquanto o material é fixado e degradado pelo bombardeio electrónico.

Microscopia de contraste de fases — Com a colaboração dos biofísicos Professôres HANS MUTH e J. C. CARDOSO iniciei, no Instituto Oswaldo Cruz, o estudo morfológico dos bacilos vivos, da lepra humana e da lepra murina comparativamente com os de várias culturas de micobactérias, pela microscopia de contraste de fases, com resultados muito instrutivos. Em suspensões aquosas de lepromas, filtradas em gaze para eliminar os detritos tissulares, de vários doentes, assim como em linfa subcutânea de lesões lepromatosas, verificamos muitos grânulos livres, de vários tamanhos, com intenso movimento rotatório; bacilos granulados com movimentos próprios em parafuso, em rabanada ou em cambalhotas, com lenta progressão em sentido contrário ao da corrente do líquido ambiente (água destilada esterilizada); elementos bacilares cabeçudos, com cauda, semelhantes a girinos, com lento mas bem visível movimento próprio. Todos êsses elementos apresentando nítida auréola.

Os bacilos das emulsões de leproma apresentam movimentos mais lerdos que os da linfa subcutânea, talvez pelo seu hábito de vida enclausurada entre tecido compacto. O movimento dos germes varia de intensidade segundo a temperatura da preparação e vai desaparecendo à medida que o líquido vai secando. Por um exame demorado se verifica que os grânulos se locomovem dentro dos bacilos, contribuindo para a sua progressão. Assim o bacilo se adelgaça na cauda e engrossa na cabeça, no sentido em que se movimenta. Tem-se a impressão que o citoplasma é líquido.

Um exame ainda mais demorado e atento mostra bacilos cujo maior grânulo forma um prolapso e sai do corpo bacilar, partindo em intenso movimento rotatório. Há bacilos com granulação ou bifurcação. Também se vêem grânulos com pedículos, em forma de cometas. A adição de formol no material faz cessar todos êsses movimentos.

Bacilo de Stefansky — Êste bacilo, proveniente de esfregaços de lepromas e órgãos de ratos e de camundongos experimentalmente infectados, é pleomórfico, fortemente ácido-álcool resistente e Gram positivo. Os bacilos adultos são todos granulados, do tamanho do de Hansen, porém mais delgados e de extremidades irregulares. Em esfregaços corados pelo método de FONTES se distinguem do bacilo de Hansen pelas suas finas granulações, regulares, de côr roxo-azulada. São freqüentes, tanto em esfregaços como em cortes do baço e dos testículos dos murídeos, corados pelo método de ZIEHL-NEESEN, as massas bacilares de forma irregular e as belíssimas globias gigantes.

Microscopia eletrônica — Por êste método de exame foram BISHOP, SUHRLAND e CARPENTER (Memória del V Congreso Internacional de la Lepra, p. 488) os primeiros a demonstrar a estreita semelhança entre o bacilo de Hansen e o bacilo de Stefansky (the morphology of the human and murine strains of *Mycobacterium leprae* closely resembled each other).

Examinando, repetidas vêzes, ao microscópio eletrônico RCA do Instituto Oswaldo Cruz, suspensões aquosas frescas de lepromas de murídeos confirmei, graças à colaboração dos biofísicos Drs. H. MUTH e PENNA FRANCA, essa estreita semelhança morfológica entre os agentes etiológicos das duas lepras. Fizemos igual exame em material da lepra bubalorum, gentilmente enviado de Java pelo Dr. BOENJAMIN, sem chegarmos a uma conclusão por se tratar de lepromas fixados e antigos.

As 15 figuras da Estampa 3 representam electronomicrografias do diâmetro de 3.500 x e ampliações para 5.500 x e 7.500 x. As figuras 1 e 2 mostram o bacilo de Stefansky sombreado com crômo, sôbre um ângulo de 25°. A figura 3 mostra condensações cromáticas em barra e ramificações. As figuras 4, 6, 7, 8 e 9 mostram bacilos com condensações idênticas às do bacilo de Hansen. As figuras 5, e de 10 a 15, mostram elementos cercados por um halo claro. Nas figuras 10, 11 e 14 há elementos mais curtos e homogêneos (*trapus*), com halos, que me parecem ser o bacilo associado ao de Stefansky da amostra do Instituto Pasteur de Paris. As figuras 1 e 2 da Estampa 4 são electronomicrografias feitas no Hospital Naval de Buenos Aires pelo Prof. M. G. MALFATTI, de emulsão fresca de leproma de rato que lhe levei do Rio de Janeiro, mostrando bacilos ampliados dos 3.700 diâmetros (medida normalmente adotada por aquêle professor), com condensações de cromatina em barras polares e grânulos livres.

As figuras 3 e 4, electronomicrografias ampliadas para 38.500 x e 12.000 x, feitas no Instituto Oswaldo Cruz pelo Dr. PENNA FRANCA, mostram, respectivamente, um feixe de bacilos negros cercado por um halo claro contendo, aqui e ali, minúsculas granulações livres, de cromatina.

As formas dos bacilos da figura 4 são muito interessantes pelas suas condensações homogêneas, polares, bacilos êsses sempre envoltos por halos claros, delimitados por nítidas membranas.

Vê-se, pelas formas acima descritas, que o bacilo de Stefansky sofre considerável alteração na sua estrutura pelo bombardeio electrónico.

Microscopia de contraste de fases — Suspensão aquosa de leproma de rato, examinada por êste método a 400 x mostrou abundantes bacilos com um grânulo central, dois nas extremidades, ou três ou mais grânulos, formando cocótricas, com movimentos idênticos aos descritos no bacilo de Hansen. As globias parecem imóveis, porém os bacilos livres que as circundam têm movimento intenso. O exame dêsse material a 1 000 x não oferece vantagem para o estudo. Nas emulsões de gânglios axilares de ratos leprosos os bacilos aparecem em menor número e as granulações são mais abundantes, sempre com intenso movimento rotatório.

A suspensão de leproma tratada por soluto forte de formol e examinada nas mesmas condições da suspensão fresca, mostrou bacilos parados, sem sequer o movimento browniano e em condições muito favoráveis para o estudo da sua morfologia estática.

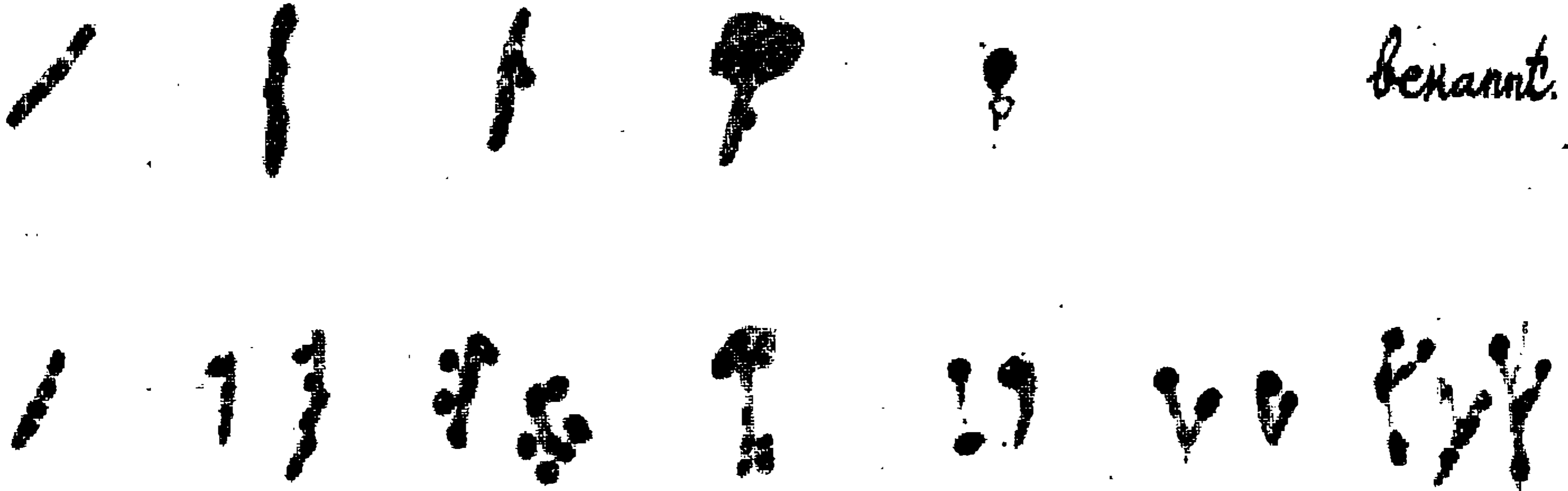
CONCLUSÃO

As microscopias electrónica e de contraste de fases, feitas concomitantemente em materiais de várias lesões da lepra humana e da lepra murina, poderão esclarecer muitos dos aspectos obscuros da biologia e da morfologia dos seus respectivos bacilos.

Escrito em Paris, a 28 de setembro de 1953.

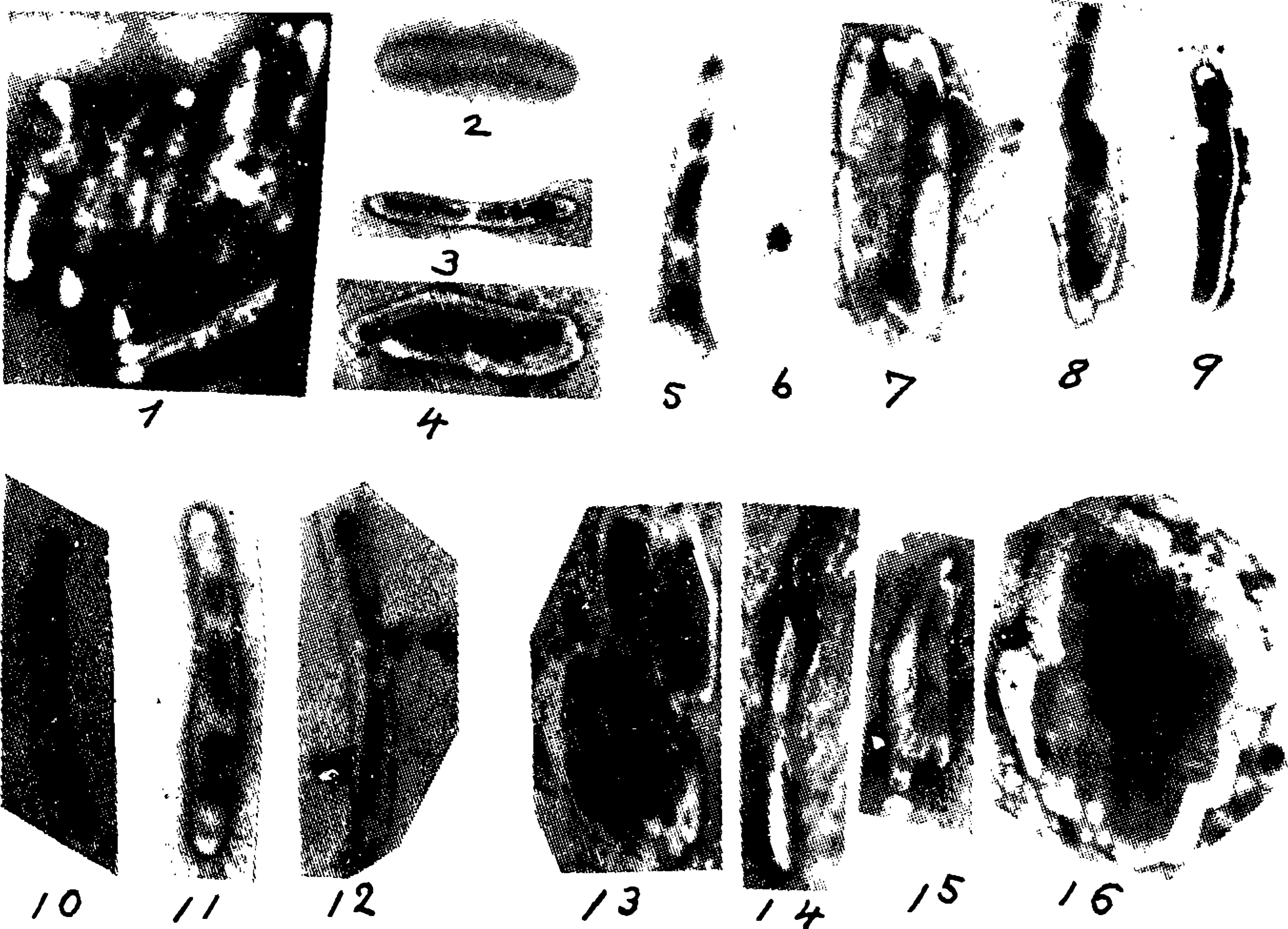
Condensation de la chromatine. Bourgeonnement. Bourgeons unis au corps bacillaire. Ombelles. Bourgeons séparés. Division des bourgeons. Formes ramifiées.

MEIROWSKI, 1914

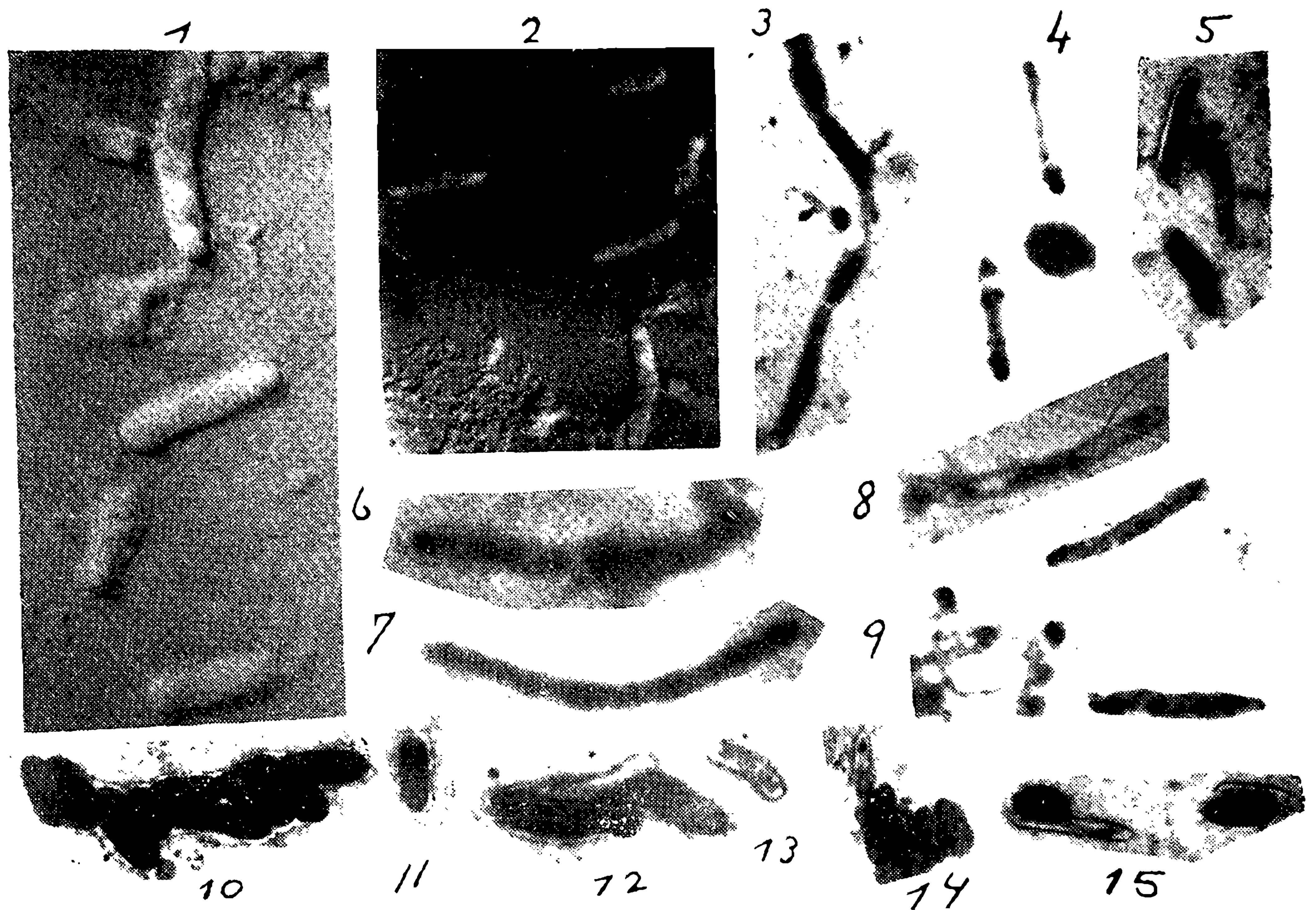


Evolution du bacille de la lèpre.

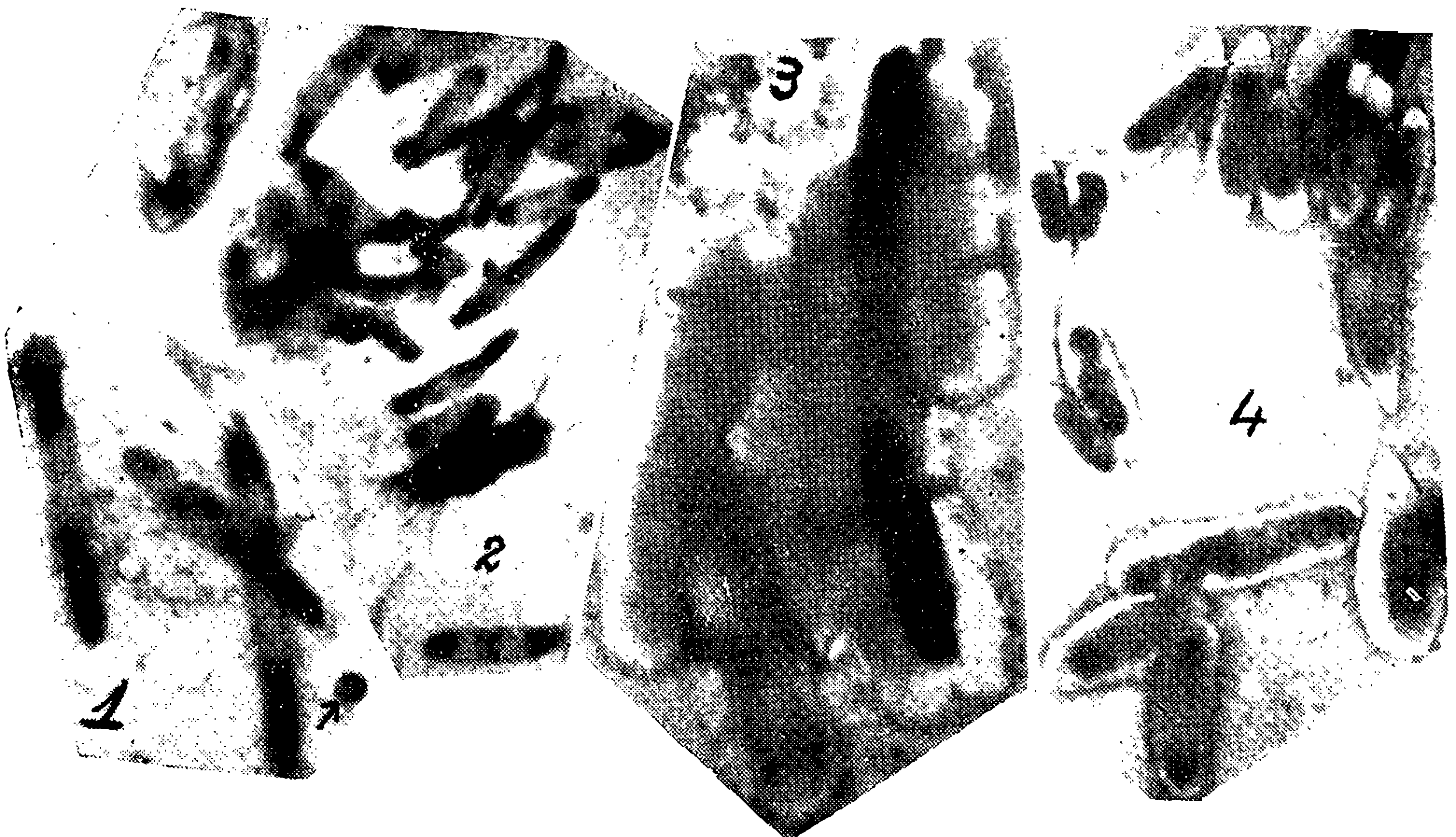
Estampa 1 — *Bacilo de Hansen*. Fig. 26 do Rapport da III Conférence Internationale de la Lèpre, 1923.



Estampa 2 — *Bacilo de Hansen*. Electrônomicrografias de H. Muth e P. Franca. Ampliações de 5.500 a 7.500.



Estampa 3 — *Bacilo de Stefansky*. Electrônomicrografias de suspensão de leproma de rato. Ampliações de 3.500, 5.500 e 7.500.



Estampa 4 — *Bacilo de Stefansky*. Electrônomicrografias de suspensão de lepromas de rato. Figs. 1 e 2, ampliações de 3.700 diâmetros, do Prof. M. G. Malfatti, de Buenos Aires, mostrando bacilos de vários tamanhos, com condensações polares das granulações metacromáticas e grânulos livres. Fig. 3, massa de bacilos (38.500 x) com halo (gloea) e Fig. 4, bacilos (12.000 x) com condensações homogêneas e polares, envoltos por halos claros (Dr. P. Franca).

ABSTRACT

Morphology of Mycobacterium leprae hominis and M. leprae muris based on electron and phases contrast microscopy

by

H. C. de Souza-Araujo, M. D., Dr. P. H.

Hansen's Bacillus: By electron microscopy this bacillus shows membrane and halo, this being more visible when surrounding the globi or bundles of bacilli; shows, also, free granules of various sizes which were before considered as dust of the dyes; shows external granules bound with the membrane and sometimes branching.

By phases contrast microscopy examining leproma suspensions and subcutaneous lymph at 400 x we saw many free granules with intense rotatory movement; granulated bacilli with screw, skip or stroke motion, producing slow progressive motion. All such elements are surrounded by a halo, corresponding to the classical gloea. By a patient and delayed examination we were able to see that the internal granules are motile and help the progression of the bacilli, giving the impression that the cytoplasm is liquid. By a lasting observation we could see the larger granules form prolapse, like a pseudopode and abandon the bacilli and going in very rapid rotatory movement. There are branched bacilli; there are pedunculated free granules like comets. The addition of a drop of formol at the preparation stops all movements.

Stefansky's Bacillus: Repeated examination by RCA electron microscope, type EMU-25 of fresh suspensions of rat lepromas, led us to confirm the close relationship between human and murine leprosy agents. We examined also material from carabo (*Lepra bubalorum*) from Java, but due to fixation, the material was unsuitable for comparative studies. The Stefansky's bacilli showed also membranes and halos, internal or external granules (smaller than those of Hansen's bacillus). The bacilli shaded by chromium look thicker and shorter than those of Hansen. Due to electron bombardment both, Hansen's and Stefansky's bacilli suffer considerable alterations in their structure, showing black bars of chromatin condensation at their extremities as also in their centers. By phase microscopy the

Stefansky's bacilli showed elements with 1, 2 (bipolar), 3 or more internal small granules, developing identical movements as those of Hansen. The globi seem to be non-motile but the free bacilli appearing around the globi show intense movement. At 1000 x the examination is less satisfactory than at 400 x. The addition of formol solution in the preparation suppresses all movements, even the brownian, but the material becomes more suitable for the study of static morphology of the bacilli.

CONCLUSION — The electron and phases contrast microscopy of leprous material from different types and phases of the disease may explain some of the unknown aspects of the biology and morphology of the bacilli.