

A726

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN CIENCIAS VETERINARIAS *

BERNARDO EPSTEIN **

El microscopio electrónico tiene un poder de resolución mucho mayor que el microscopio óptico, debido a la corta longitud de onda del haz electrónico.

Tiene, por tanto, una resolución de alrededor de veinte A⁹ en condiciones favorables con un aumento de cien veces más que el microscopio óptico. Estos hechos hacen que el M. E. sea un elemento promisor en el estudio de aquellas enfermedades animales en que el agente etiológico es muy pequeño, en el caso de los virus particularmente.

Presentaré aquí un breve sumario de los trabajos realizados en nuestros Laboratorios en ese campo.

Debido a que el espécimen destinado para la observación en el microscopio electrónico debe ser muy delgado para ser parcialmente permeable al haz electrónico hubo que desarrollar técnicas especiales para examinar los materiales en el M. E.

VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA Y ESTROMAS DE GLÓBULOS ROJOS (B. Epstein, N. M. Fonseca y E. de Robertis).— Nosotros emprendimos el estudio de este virus en relación con la célula huésped, en este caso los eritrocitos de los animales infectados con los virus de la fiebre aftosa.

Es un hecho conocido en la literatura que el virus de la fiebre aftosa se encuentra en la sangre circulante asociado también al eritrocito, durante el período de generalización (Vallée y Carrée). Este hecho indica la posibilidad de estudiar los estromas de los glóbulos rojos, en animales infectados en diferentes períodos de la enfermedad; esto ha hecho posible observar cambios relacionados con la presencia de partículas de virus con el M. E.

Al mismo tiempo, controles experimentales de tests de infectividad de glóbulos rojos se han podido hacer por inoculación en animales susceptibles a este virus. En este experimento utilizamos el virus aftoso de Vallée, tipo O, adaptado al cobayo. La suspensión de virus obtenido de paredes vesiculares, fué centrifugado, filtrado e inoculado en el cojinete plantar del cobayo. Generalización de la enfermedad se obtiene en 24 horas. En este momento se sangra por punción cardíaca, luego esta sangre se lava en solución fisiológica, se inyecta

* Trabajo presentado al XV Congreso Internacional de Veterinaria realizado en Stokolmo, 1953.

** Profesor Agdo. de Histología de la Facultad de Veterinaria, Montevideo.

intradérmicamente y por vía subcutánea. La infección generalizada se obtiene dentro de las 42 horas, indicando la presencia del virus asociado al eritrocito. Se preparan frotis de sangre de diferentes especímenes en tiempos que oscilan entre las 24 a 92 horas después de inoculados.

Paralelamente se hacen experimentos de la transmisión del virus, con glóbulos rojos lavados, de diferentes tiempos de inoculación.

Se obtienen inoculaciones positivas a las 42 horas, coincidiendo con la generalización de la enfermedad. Se obtienen resultados negativos después de las 92 horas cuando los síntomas generales y la temperatura declinan.

Una técnica especial fué desarrollada en nuestro Laboratorio para ser permeable al haz electrónico los glóbulos rojos estudiados.

Los eritrocitos son hemolizados con agua destilada, después de lo cual los glóbulos rojos son transferidos sobre grillas standard de níquel, por la técnica de réplica de film de parlodio. El espécimen es tratado con sombreado de palladium en un ángulo de 9 a 10°. Se utilizó un microscopio R. C. A., tipo E M U 2C y las fotografías fueron tomadas con un aumento que oscila entre los cuatro mil a seis mil.

Se ha hecho control de experimento examinando varios miles de glóbulos rojos de diferentes cobayos normales. También se han hecho varios frotis de cada caso y se examinaron grillas de diferentes regiones del extendido.

La medida del grosor de los estromas es de 10 A°.

Contrariamente, en los estromas de cobayos infectados con fiebre aftosa, se observan alteraciones típicas. Las observaciones se hicieron sobre 8 diferentes animales y se observaron 105 electromicrografías; 24 horas después de la inoculación, masas redondas de una alta densidad electrónica se distinguen al azar. En la superficie de los glóbulos sus medidas oscilan entre 100 y 500 m μ y ellas sobresalen de la superficie. Su número es alrededor de 20 ó más por célula. Es a las 42 horas de inoculados que se observan los cambios más típicos. Las partículas aparecen entonces más claramente definidas y muestran una disposición en anillo cerca del borde de la membrana, sus medidas oscilan entre 200 y 500 y se encuentran en el número de 25 a 30 por célula. A las 72 horas de inoculadas estas masas aparecen distribuidas al azar contándose de 2 a 90 por célula. Noventa y dos horas después de inoculadas las masas de inclusión han desaparecido por completo del estroma. Es interesante señalar que en algunos casos parece que hay partículas más pequeñas, de 20 a 70 m μ contenidas dentro de las masas mayores. Paralelamente se hicieron tests de inoculación que permitieron establecer una relación entre la presencia de estas masas en el estroma y la infectividad de los eritrocitos lavados.

ESTUDIO CON M. E. DE LA ANAPLASMOSIS EN GLÓBULOS ROJOS DEL BOVINO (E. de Robertis y B. Epstein).—El Anaplasma marginale (Theiler, 1909) es adecuado para las observaciones con M. E., ya que su medida oscila entre 0,4 a 1 μ de diámetro. Con el microscopio óptico se lo ha descripto generalmente como un cuerpo marginal, constituido por una masa única de cromatina sin protoplasma, que se multiplica por división binaria.

Si bien algunos autores lo consideran bacteria, su naturaleza de protozoario es muy aceptada.

La observación con M. E. se realizó sobre glóbulos rojos de bovinos infectados, en preparados hechos con la técnica descrita para la fiebre aftosa.

Los parásitos consisten en una masa redonda de 1μ de diámetro aproximadamente, con una clara constitución interna. Estas masas centrales parecen indivisas, pero en su periferia se encuentran cuerpos redondeados de 170 a 200 $m\mu$ de diámetro que sobresalen en la superficie. Además de estas formas elementales que se observan dentro del anaplasma se pueden encontrar fuera del parásito pequeños cuerpos dispersos que oscilan en su medida entre 170 a 430 $m\mu$ de diámetro y 69 % de ellos tienen aproximadamente 170 a 200 $m\mu$ de diámetro.

Tenemos la impresión general que el parásito puede dar origen a una gran cantidad de cuerpos elementales que se distribuyen sobre el estroma globular.

ESTUDIO CON M. E. EN CORTES FINOS DE LA MIXOMATOSIS INFECCIOSA DEL CONEJO (B. Epstein, Magdalena Reissig y E. de Robertis).— Recientes avances en la técnica de cortes finos para el M. E., han permitido el estudio histológico y citológico de las alteraciones producidas por el virus en los tejidos animales. Para este estudio se ha elegido la mixomatosis infecciosa del conejo. Éste proceso patológico es de doble interés, ya que se trata de un virus que produce tumores subcutáneos múltiples y también en el lugar de la inoculación.

Esta enfermedad fué descrita por Sanarelli en 1898 por primera vez en el Uruguay, y después comprobada en epizootias de distintos países.

La medición de las partículas aisladas del virus ha dado cifras que oscilan de 175 $m\mu$ de diámetro hasta 368 $m\mu$ de diámetro en lavados conjuntivales de conejos mixomatosos. Con el M. E. la observación de partículas aisladas da entre 225 $m\mu$ y 290 $m\mu$ de diámetro.

Nuestra experiencia fué realizada con la muestra de virus C. P. M. aislada de infecciones naturales en el Uruguay. Esta enfermedad se reproduce por inoculación de filtrados de tumores mixomatosos o por eritrocitos lavados en suero fisiológico de estos mismos animales.

Fragmentos de tumores en últimos estadios de la enfermedad, que es siempre fatal, entre el sexto y noveno día, son cortados en trozos de 1 mm. e incluidos en metacrylate, de acuerdo con la técnica descrita por Newman, Borysko y Swerdlow. Los cortes se hacen con cuchilla de vidrio en un micrófono de termoexpansión. Se retira el metacrylate con una mezcla de acetato de amilo y son finalmente observados con un microscopio electrónico R. C. A. tipo EMU 2C provisto de la pieza de campo polar descrito por Hiller, obteniendo microfotografías de 2.000 X a 4.000 X.

Observaciones citológicas con el microscopio óptico revelan pocas inclusiones en los citoplasmas de las típicas células estrelladas de estos tumores, similares a las descritas por distintos autores.

En el M. E. se observa un aumento del tejido colágeno en los nódulos. Se observan pocas células redondas con núcleos dentados, pero las células más típicas y predominantes son las estrelladas.

Se observa un engrosamiento irregular en la membrana nuclear.

La alteración más evidente es la presencia de inclusiones densas, de tamaño variado que algunas veces llena el citoplasma, dejando el núcleo aparente-

mente intacto. Estos cuerpos tienen densidad electrónica variable, siempre mayor que el citoplasma circundante. Muchas de estas inclusiones están rodeadas de un halo claro; la mayoría son homogéneas, pero otras evidencian una estructura interna, formadas por un agrupamiento de partículas pequeñas. En algunos casos se observa solamente el borde, que aparece festoneado, debido a la proyección de los gránulos internos. La medida de estos cuerpos varían entre 50 y 850 $m\mu$; 69 % miden 150 a 350 $m\mu$ de diámetro. Esta amplia variación de tamaño es demasiado grande para ser debida a secciones subtangenciales de las partículas de virus; las partículas más pequeñas miden de 30 a 45 $m\mu$ de diámetro.

Estas observaciones están de acuerdo con las realizadas por otros autores en molluscum contagiosum y en viruela aviaria y sugieren la existencia en la célula infectada de partículas de subvirus más pequeño del virus maduro y, probablemente, no infectantes. Nuestras observaciones nos hacen suponer la existencia en las células infectadas, de distintos estados de desarrollo del virus de la mixomatosis.

Durante estos estadios las partículas del virus experimentan cambios en su medida y en su densidad electrónica.

SUMARIO

Presentamos un breve sumario sobre el trabajo hecho en nuestro Laboratorio sobre enfermedades animales con el M. E.

FIEBRE AFTOSA.— Se inoculó a cobayos con la cepa Vallée tipo O del virus aftoso. Se vió que de 42 a 48 horas después de la inoculación los glóbulos rojos lavados en solución fisiológica eran infectantes para cobayos normales, sugiriendo que los eritrocitos son portadores de entidades virósicas. Después de 92 horas, cuando declinan los síntomas generales, ya no se obtiene más infección. Se desarrolló una técnica de réplica por medio de la cual se pudieron observar frotis hemolizados al M. E.

Se vieron masas densas redondas de 116 $m\mu$ de diámetro a 437 $m\mu$ de diámetro en los estromas de los hematíes de animales inoculados; estas masas nunca se vieron en los experimentos de control. Su número aumenta desde las 24 horas hasta las 42 y 72 horas. A las 96 horas de la inoculación, coincidiendo con la desaparición de la infecciosidad de los eritrocitos, también desaparecen las masas. Ellas se distribuyen en el glóbulo rojo, ya sea al azar o agregándose en líneas o anillos.

ANAPLASMOSIS.— Utilizando la misma técnica se observaron eritrocitos de bovinos infectados con anaplasmosis. Se vió que el parásito está compuesto por una masa única que mide de 0,5 a 1 micra de diámetro, tal como se ve con el microscopio óptico. Pero en la periferia del parásito y haciendo saliencia en la superficie, se pueden ver cuerpos más pequeños. Cuerpos pequeños de aspecto similar se encuentran diseminados por el eritrocito; su diámetro oscila entre 170 y 430 $m\mu$. El parásito da origen a estos pequeños cuerpos que se dispersan, sobre todo el eritrocito.

MIXOMATOSIS DEL CONEJO.— Se inoculó a conejos la cepa C. P. M. del virus de mixoma y los tumores subcutáneos se fijaron, incluyeron y cortaron para su observación con el M. E. Se observaron células redondas y las típicas células estrelladas de mixomatosis, además de alteraciones en la disposición del colágeno; el citoplasma de la célula mostró la existencia de un gran número de corpúsculos de tamaño y densidad electrónica variables, los mayores de los cuales poseían el tamaño y otras características de los cuerpos elementales del mixoma. Algunos de los corpúsculos muestran una constitución interna y están formados por el agrupamiento de partículas densas. La gran variación en tamaño y densidad de los cuerpos de inclusión sugieren la posibilidad de que existan diferentes estadios en el desarrollo.