

PESQUISAS DOS CORPÚSCULOS *Nosema bombycis* EM DIAPAUSA

NIVALDO ALVES BONILHA

Serviço de Sericicultura --- Campinas

Uma das doenças mais terríveis da Sericicultura e que abalou a indústria sérica européia em 1850, foi, sem dúvida, a pebrina, doença específica do bicho da seda.

Os prejuízos atribuídos à pebrina foram enormes, vendo-se grandes criações serem dizimadas por esta doença, sem que meio algum do combate pudesse atenuar essa infecção.

A França, Itália e outros países vizinhos, puzeram-se em luta contra essa terrível enfermidade, arregimentando-se todos os recursos técnicos e científicos para um estudo etiológico e terapêutico.

Em 1849, GUÉRIM & MENEVILLE, em estudos de laboratório, puderam constatar que um sirgo atacado pela pebrina apresentava em sua hemolinfa, certos corpúsculos ovais, o que não era visto em bichos de sanidade perfeita.

Em 1850, DE FILIPPS, célebre cientista daquela época, dedicando-se ao estudo em questão, também observou na hemolinfa larval e nas maripósas, aquêles mesmos corpúsculos já enunciados por GUÉRIM & MENEVILLE.

Era, portanto, um ponto de partida, onde tôdas as atenções dos cientistas deveriam convergir-se.

De fato, decorridos mais alguns anos em constante trabalho, outros renomados pesquisadores chegaram a conclusão de que aquêles corpúsculos ovais, já encontrados em hemolinfas de bichos e maripósas infectas, seriam a verdadeira causa do mal.

Coube a NAJELI, em estudos mais aprofundados, classificá-los como sendo um micro organismo, ao qual denominou de *Nosema bombycis*.

A seguir, outros pesquisadores do assunto, dedicando-se às mesmas pesquisas, vieram comprovar tudo aquilo que seus sucessores já haviam afirmado.

Processos empíricos foram, então, empregados para debelar a doença, sem que nenhum dêles desse resultado satisfatório.

Os bichos doentes, isto é, aquêles que apresentavam os sinais característicos, ou sejam, seu corpo salpicado de pequenas manchas circulares, negras, eram eliminados das criações, decorrendo daí grandes prejuízos da ordem econômica. As mariposas com os mesmos caracteres eram, também, eliminadas.

Este processo de combate à doença, servirá, em parte, para atenuar a sua propagação e seus prejuízos, pois os sirgos e mariposas atacadas eram eliminados, não intervindo na reprodução.

No entretanto, continuava insolúvel o problema de como apareciam bichos e mariposas doentes, desde que tinham sido eliminados aquêles portadores da doença. A resposta coube a PASTEUR, em 1870, cinco anos após dar início ao estudo dessa enfermidade. Assegurou êle que os corpúsculos da *Nosema bombycis* se achavam também nos ovos e crisálidas, e que muitas mariposas que aparentemente não apresentavam sintomas da moléstia, guardavam dentro de si a infecção e que esta era transmitida a gerações futuras. Urgia, desta forma, achar um meio pelo qual se pudesse eliminar a mariposa, evitando-se assim a propagação da pebrina. Neste particular, lembrou e adotou o processo hoje mundialmente conhecido e seguido por todos os institutos produtores de ovos, isto é, o método celular de produção de ovos, conhecido, também, por método celular de PASTEUR. Consiste êste método em colocar dentro de cada saquinho ou cela uma mariposa fêmea, no qual depositará os ovos e, posteriormente examiná-la.

A transmissão da doença se dá por hereditáriedade, e desta forma, os ovos das mariposas examinadas e infectas devem ser eliminados. No entretanto, pode o sirgo adquirir a doença por via digestiva, e esta, uma vez adquirida, vai transmitir às gerações futuras êsse mal.

O esporo de *Nosema bombycis*, uma vez ingerido, por intermédio das fôlhas de amoreira, que é o seu alimento, vai até à porção mediana do intestino e aí inicia o seu desenvolvimento, levando cêrca de 4 dias para completar seu ciclo evolutivo.

O esporo da pebrina tem a forma ovóide alongada, é hialino brilhante, medindo 4 x 2 micros de diâmetro, passando da fase planonte à meronte e, finalmente, a esporos.

Em constantes observações, temos verificado a dificuldade em pesquisar aquêles corpúsculos em material fresco, isto é, assim que as mariposas põem os ovos.

LA FOA, entretanto, somente em trabalhos histológicos pôde constatar a presença daqueles corpúsculos e seu desenvolvimento, depois de passado certo tempo de hibernação.

Nestas pesquisas, LA FOA também constatou a existência de um ciclo abreviado do *Nosema*, não passando pela fase meronte, isto é, de planonte a esporo diretamente, esporos estes binucleados a que êle chama de pseudosporos.

EXAMES DOS CORPÚSCULOS EM MARIPOSAS

Decorrido certo tempo de hibernação, toma-se a maripôsa que estava na cela e trituro-mo-la em um almofariz com um pouco de água, levemente alcalinizada. A seguir, retira-se uma gôta do triturado e leva-se ao microscópio. Em caso positivo, podemos perfeitamente observar o corpúsculo com suas formas típicas já enunciadas e com movimentos oscilatórios. Para um exame mais técnico, utilizaremos a eosina como corante.

EXAME DOS CORPÚSCULOS EM OVOS

Há diversos métodos aplicados, para pesquisas do *Nosema bombycis* em ovos, e, dentre êstes, contamos com os de PIGORINI, ACQUA, e o mais recente, o do Dr. D. RIVAS.

O método preconizado por LUIZ PIGORINI, autoridade italiana em Sericicultura, consiste em tomar certa porção de ovos, postos pelas mariposas, que se acham em celas, e submetê-las a espremedura juntamente com um pouco d'água. A seguir, adiciona-se água filtrada, e em seguida, filtra-se ficando assim os resíduos e outras impurezas retidas em gazes do filtro. Ao filtrado adiciona-se um pouco de éter, agita-se e leva-se ao centrifugador, por 3 a 5 minutos.

No tubo centrifugador verifica-se a formação de um depósito escuro na parte inferior. Com uma pipeta, ou então eliminando a parte líquida, por decantação, retiramos uma pequena porção daquele depósito e o levamos ao microscópio. E' um processo que dá resultado satisfatório.

O Prof. ACQUA, outra autoridade no assunto, propôs um método com pequena variação do antecedente. Aconselha o esmagamento dos ovos em almofariz e depois, trata-se o suco obtido, com hidróxido de potássio, filtrando-se o em seguida. Ao filtrado junta-se ácido clorídrico até a reação levemente ácida. Depois de breve repouso, centrifuga-se e observa-se o centrifugado ao microscópio.

No Instituto Pasteur, na França, o Dr. D. RIVAS propôs um método para pesquisas de ovos parasitos intestinais. Com este método, constatou ele além daqueles ovos, a presença também de amebas giardas, células epiteliais, bactérias, fermentos, etc.

A pedido do próprio PIGORINI, esta técnica do Dr. D. RIVAS começou a ser usada para pesquisas do *Nosema bombycis* com ótimos resultados.

O método empregado é o seguinte : a) pesa-se uma grama de ovos de bicho da seda, suspeito de *Nosema bombycis*; b) tritura-se estes ovos em almofariz com pouca água destilada; c) ao triturado, junta-se 5 cc. de ácido acético a 5% para cada grama de ovos; d) leva-se esta solução para um tubo de ensaio, agitando-o; e) filtra-se, separando-se as cascas através de gazes; f) adiciona-se partes iguais de éter em tubos de centrifugação; g) agita-se e leva-se à centrífuga, deixando cerca de 5 minutos.

Ao retirar os tubos verificamos que há 4 camadas bem distintas : 1a. — a primeira, um extrato solúvel, onde se percebe o éter; 2a. — a segunda, uma camada sutil, fortemente opalina esbranquiçada, limitada inferiormente por um anel de côr castanho; 3a. — a terceira, uma camada de aspecto fortemente opalescente, côr castanho escuro e sujo; 4a. — finalmente, a última camada, um sedimento também escuro.

Recolhe-se da última camada, com uma pipeta capilar, certa porção de material e leva-se ao microscópio para o devido exame. Nesse exame, veremos ressaltar nitidamente os corpúsculos por índice de refração deferencial do meio.

Interessante será adicionar algumas gotas de solução Sudam III, antes da centrifugação, o que faz realçar melhor os corpúsculos.

O resíduo acima obtido, é fixado com sublimado acético, como aconselha STEMPER, e, após esta fixação, colorido com Hematoxilina de Heidenhain.

Pela técnica de HEIDENHAIN, observa-se o esporo num fundo violeta, com uma cápsula incolor e internamente bem colorida, a massa nuclear não bem distinta. Num ponto pouco diferenciado, ressalta sob o fundo negro uma orla branca da cápsula. Pelo método de LA MALLORY, verifica-se que os esporos se colorem de alaranjado, sob um fundo azul violeta.