

TÉCNICA DO PREPARO DA VACINA E ANTÍGENO PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

MARCELO OSVALDO ÁLVARES CORRÊA

Médico do Serviço de Leishmaniose com exercício no Instituto Adolfo Lutz

A finalidade do presente artigo reside na exposição da técnica seguida pela Comissão de Estudos da Leishmaniose, no preparo da vacina profilática e do antígeno para intradermo-reação de Montenegro, técnica esta apurada e estandardizada depois de passar por modificações inúmeras, ditadas pela experimentação e pela prática diária.

A vacinação preventiva com germes mortos foi pela primeira vez efetuada em larga escala pela Comissão de Estudos da Leishmaniose; já anteriormente Sales Gomes¹ havia tentado iniciar experiências nesse sentido com vacinas dosadas para tal fim, mas não lhe foi possível levá-las avante por motivos de força maior.

Os resultados obtidos foram assaz animadores, demonstrando claramente o aparecimento de notável resistência à leishmaniose nos indivíduos vacinados, como se depreende dos trabalhos publicados pela Comissão sobre o assunto 2-3. O real valor profilático da vacinação confere-lhe os méritos de, juntamente com a profilaxia medicamentosa do homem parasitado, — o único provável reservatório do parasita — constituir a coluna mestra da luta contra a endemia, tanto mais que o combate aos flebótomos transmissores ainda é possibilidade longínqua dado o conhecimento pouco satisfatório das espécies incrimináveis e suas respectivas biológicas.

A reação alérgica de Montenegro, ainda é o método mais prático e seguro para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, em se atendendo às condições de trabalho nas zonas rurais. Não é de absoluta especificidade, porquanto é positiva na tuberculose

Recebido para publicação em 15 de Outubro de 1941.

ganglionar⁴, podendo ser negativa nos casos em início e em raros casos antigos; é todavia o melhor método devendo ser interpretada segundo o critério clínico⁵, pois há possibilidade de reações negativas e falsas em casos especiais, como acima assinalámos.

Por conseguinte, cremos ser de interesse o relato da técnica empregada no preparo da vacina e do antígeno.

ISOLAMENTO DAS LEISHMANIAS

Efetuada com o fito de fornecer cepas para o preparo de vacina e antígeno, o isolamento tem obedecido à técnica que descrevemos abaixo, de resultados sempre positivos e com pequeno número de tubos contaminados.

Escolhe-se um nódulo de preferência ainda não ulcerado, fazendo-se cuidadosa assepsia da região com tinctura de iodo e lavando-se posteriormente com solução fisiológica esterilizada. Após anestesia local com cloretila, com uma agulha de punção, de calibre grosso, fazem-se várias perfurações em sentido oblíquo ao redor da lesão tendo-se o cuidado de evitar que a ponta da agulha ultrapasse a zona limítrofe da mesma, injetando-se ao mesmo tempo, solução fisiológica. Com uma pipeta Pasteur estirada, aspira-se então pelos orifícios assim feitos o líquido sanguinolento que se semeia em tubos para cultura, nunca menos de 10 para cada isolamento.

Em lesões francamente ulceradas faz-se assepsia com tinctura de iodo ou sublimado, lava-se com álcool e solução fisiológica e pratica-se a curetagem dos bordos da úlcera semeando o material com alça de platina.

As amostras com que trabalhamos atualmente são as seguintes, com seus respectivos números de repiques até 14-10-1941:

Amostra n.º 1 — Proveniente do Instituto Adolfo Lutz em 3-7-1939; número de repiques 123.

Amostra n.º 2 — Proveniente do Instituto Adolfo Lutz em 3-7-1939; número de repiques 120.

Amostra n.º 3 — Amostra J. V., proveniente do Instituto Adolfo Lutz em 3-7-1939; número de repiques 126.

Amostra n.º 4 — Amostra J. A., proveniente do Instituto Adolfo Lutz em 3-7-1939; número de repiques 127.

- Amostra nº 5* — Isolada no Departamento de Parasitologia do Snr. A. B. C. em 3-1-1940; número de repiques ... 81.
- Amostra nº 6* — Isolada no Departamento de Parasitologia em 31-5-1940 de nódulo nasal do Rhesus nº 1 inoculado com amostra nº 5; número de repiques 52.
- Amostra nº 7* — Isolada no Departamento de Parasitologia em 18-4-1940 de nódulo nasal do Rhesus nº 2 inoculado com amostra nº 5; número de repiques 50.
- Amostra nº 8* — Isolada do Snr. A. N. no Departamento de Parasitologia em 29-7-1940; número de repiques 43.
- Amostra nº 9* — Isolada no Departamento de Parasitologia em 18-4-1940 de nódulo nasal do Rhesus nº 2 inoculado com amostra nº 6; número de repiques 42.
- Amostra nº 10* — Isolada do Snr. J. F. L. em Araçatuba em Outubro de 1940; número de repiques 32.
- Amostra nº 11* — Isolada do Snr. A. C. em Araçatuba em Outubro de 1940; número de repiques 35.
- Amostra nº 12* — Isolada no Departamento de Parasitologia em 11-4-1941 de nódulo nasal do Rhesus nº 11 inoculado com material de várias amostras; número de repiques 14.
- Amostra nº 13* — Isolada no Departamento de Parasitologia em Maio de 1941 de nódulo nasal do Rhesus nº 12 inoculado com material de várias amostras; número de repiques 10.
- Amostra nº 14* — Isolada no Departamento de Parasitologia em 23-6-1941 de nódulo do Rhesus nº 13 inoculado com material de várias amostras; número de repiques 8.

MEIOS DE CULTURA

Inicialmente foi usado o clássico meio de N. N. N. cujo rendimento entretanto não era dos mais satisfatórios, uma vez que havia necessidade de culturas bastante ricas dada a elevada concentração de leptomonas exigida pela vacina; por outro lado, neste meio as leptomonas aglutinavam em grandes grumos, tornando pouco homogênea a emulsão para a vacina ou antígeno. Por tais razões Rugai iniciou pesquisas sistemáticas visando a obtenção dum meio de cultura bastante satisfatório e econômico, objetivo este atingido

com o meio que descreve no número anterior desta Revista⁶. Com efeito, o funcionamento deste meio tem sido excelente proporcionando abundante crescimento e aglutinação muito menos intensa que a obtida com o meio de N. N. N.: o fator econômico foi respeitado uma vez que orçando em 3\$000 o preço de 1 litro deste último, o custo de igual quantidade do meio de Rugai orça em 4\$000.

Foi também experimentado por nós o meio de Salle⁷ que proporciona crescimento abundante e bastante homogêneo. Tendo em vista entretanto o seu alto custo — 14\$000 o litro — e a satisfatória homogeneidade do crescimento em meio de Rugai, mais simples e econômico, a preferência deste último se impõe.

TÉCNICA DE PREPARO

As várias amostras de leptomonas de que dispomos são mantidas em culturas por repiques sucessivos fazendo-se a semeadura em tubos de ensaio de 15 x 160 mms.. Distribuem-se 6 cc. do meio deixando-se os tubos inclinados até solidificar; juntam-se então 2-3 cc. de solução de cloreto de sódio a 12^o/₀₀ e guarda-se à temperatura ambiente, sendo conveniente usá-los dentro de 2-5 dias.

As culturas necessárias para semeadura das garrafas provêm de tubos maiores, de 21 x 210 mms. nos quais usamos 15 cc. do meio e 5-6 cc. de solução de cloreto de sódio a 12^o/₀₀; o fato de utilizarmos tubos de dimensões diferentes explica-se por razões econômicas.

Os repiques são feitos de um tubo para outro, após prévio exame ao microscópio da cultura, por meio duma alçada que se mistura com o líquido do tubo a repicar.

As culturas finais para o preparo da vacina e antígeno são feitas em garrafas de Roux deitadas.

Os frascos usados inicialmente são bem lavados com sabão comum e cheios com a seguinte solução, com a qual permanecem durante 24 horas;

Solução saturada de bicromato de potássio ..	50 cc.
Ácido sulfúrico	50 cc.
Água	1.000 cc.

Lava-se em água corrente e seca-se em estufa.

Como o gargalo do frasco é assaz largo, contorna-se este inconveniente que aumenta as possibilidades de contaminação, com o

seguinte artifício, correntemente usado: Tomam-se tubos de ensaio de 15 x 160 mms., corta-se o fundo, enrola-se em algodão e ajusta-se firmemente ao gargalo, fechando naturalmente a abertura externa com tampão de algodão. Protege-se o conjunto por um capúz de papel.

Em cada frasco distribuem-se 100 cc. da base do meio de Rugai e esteriliza-se a 110°C. durante 20 minutos; resfria-se a 56°C. e adicionam-se 15-20 cc. de sangue de coelho desfibrinado, mistura-se sem fazer bolhas e colocam-se as garrafas inclinadas até solidificar.

Para a sementeira toma-se um tubo dos maiores — um para cada garrafa — examina-se previamente uma alçada do mesmo ao microscópio, juntam-se diretamente no tubo 15 cc. de solução de cloreto de sódio a 12‰, mistura-se bem, aspira-se com pipeta e transporta-se para o frasco de Roux. Guarda-se à temperatura ambiente.

Para a decantação, escolhem-se frascos com tempo de cultura entre 10-15 dias tirando-se uma alçada para exame, agita-se e aspira-se o conteúdo com pipeta de 20 cc. e lava-se o frasco com 10 cc. de solução de cloreto de sódio a 12‰, para acarretar o restante das leptomonas. O líquido extraído é colocado em tubos de centrifugação esterilizados, fechados com tampão de algodão solidamente presos por elásticos; centrifuga-se durante 10 minutos com velocidade de 3 a 5.000 rotações.

Decanta-se o líquido sobrenadante e lava-se o sedimento duas vezes, com solução de cloreto de sódio a 8,5‰, centrifugando sempre da mesma maneira.

Preparo da emulsão — em balão de 500 cc., com pérolas de vidro, colocam-se 300 cc. de solução de cloreto de sódio a 8,5‰ feita em água bi-distilada e esteriliza-se em autoclave a 120°C., meia hora. Os sedimentos do tubos são emulsionados com 10 cc. desta solução e adicionados ao balão, até se obter uma opacidade de suspensão igual à do padrão. Usam-se aproximadamente 6-8 garrafas para a emulsão da vacina e 1-2 para o do antígeno.

Guarda-se o balão em estufa a 40°C. durante 4 dias, agitando-se durante 10 minutos, 2 a 3 vezes por dia; ajunta-se então ácido fênico puro na proporção de 0,4%, guarda-se mais um dia e distribue-se em ampolas de 1 cc..

Como garantia final contra uma eventual contaminação, as ampolas são submetidas a 3 banho-marias a 60°, com duração de meia-hora cada um.

CONTAGEM DO NÚMERO DE LEPTOMONAS

O padrão é uma emulsão em que foi feita a contagem aproximada do número de leptomonas por centímetro cúbico, sendo renovado de 3 em 3 meses. A contagem é sempre feita logo que a emulsão é dada como satisfatória, porquanto os tempos posteriores alteram as leptomonas tornando pouco prática a contagem.

Está atualmente fixado como concentração ótima, para vacina o número de 90 a 100.000.000 de leptomonas por cc. e para o antígeno de 3. a 5.000.000.

Para a contagem emprega-se o hematímetro de Thoma-Leitz, fazendo-se a contagem tal qual se faz para glóbulos brancos: aspira-se até a marca 1, a emulsão a ser contada — antígeno ou vacina — e completa-se até a marca 11 com solução de formol a 10% que mata e fixa as leptomonas.

CONTROLE DE ESTERILIDADE

É feito pela secção competente do Instituto Adolfo Lutz sendo o conteúdo da ampola semeado em meios próprios para aeróbios, anaeróbios e cogumelos. Os meios usados são os seguintes:

A — MEIOS PARA AERÓBIOS

- 1 — Agar comum inclinado.
 - 2 — Caldo comum.
 - 3 — Meio semi-sólido de Hitchens.
- Incubar a 37°C. durante 15 dias.

B — MEIOS PARA ANAERÓBIOS

- 1 — Meio semi-sólido de Hitchens com Vaspar.
- Incubar a 37°C. durante 15 dias.

C — MEIOS PARA COGUMELOS

- 1 — Meio de Sabouraud (líquido).
- 2 — Meio de Sabouraud (sólido).
- 3 — Meio com mel.

Incubar a 20°C. ou deixar em temperatura ambiente, durante 15 dias.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — SALES GOMES, L. — 1939 — *Brasil Médico*, 33:49, 1079.
- 2 — PESSOA, S. B. & PESTANA, B. R. — 1940 — *Rev. de Biol. e Higiene*, 10 (2), 112-118, Junho.
- 3 — PESSOA, S. B. — 1941 — *A Folha Médica*, 25 de Julho.
- 4 — CORRÊA, Clovis — 19 — *Acta Médica*, vol. 6, n.º 2, pag. 91.
- 5 — PESSOA, S. B. & PESTANA, B. R. — 1940 — *São Paulo Médico*, Ano XII, vol. II ns. 5 e 6, Nov.-Dez.
- 6 — RUGAI, E. — 1941 — *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, Vol. I, n.º 1, Julho, pgs. 153-159.
- 7 — SALLE — 1931 — *J. Inf. Diseases*, 49, pg. 473.