

## AUTOVACINAS

### TÉCNICAS DE PREPARO E FATORES DE EFICIÊNCIA

Rolando CURY \*

RSPSP-150

CURY, R. — *Autovacinas: técnicas de preparo e fatores de eficiência.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 6:371-83, 1972.

RESUMO: Verificou-se que a obtenção de excelentes autovacinas é possível usando-se a técnica de semeadura, dos germes apropriados, isolados de um material clínico em meios de cultura selecionados. As condições do cultivo devem ser adequadas para estimular, ou pelo menos preservar, as qualidades antigênicas dos germes. O processo de inativação necessita ser cuidadosamente acertado, a fim de não lesar os antígenos presentes. Foram descritos métodos capazes de cumprir estes requisitos, e que ao mesmo tempo fossem práticos e relativamente simples em sua execução, com equipamentos ao alcance de qualquer laboratório clínico.

UNITERMOS: *Autovacinas (Preparo) \*; Vacinas \*; Imunização \*.*

#### 1 — INTRODUÇÃO

Normas de preparação de autovacinas já tinham sido redigidas por nós, quando ainda chefiávamos a Bacteriologia do Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo, a fim de servirem de guia aos técnicos que conosco trabalhavam.

Ocorre-nos, agora, completar e detalhar essas normas, dado o interesse por elas despertado entre os profissionais e os resultados favoráveis obtidos na práti-

ca, observados e relatados por médicos clínicos do citado Hospital.

Refere-se, considerando-se as circunstâncias em que foi estudado, às autovacinas para uso na espécie humana, embora esse uso pudesse facilmente ser adaptado aos animais, dada a similitude dos processos patológicos e a inexistência de limites entre a bacteriologia do homem e a dos animais.

O objetivo deste trabalho é procurar o aprimoramento das técnicas e discutir os fatores de eficiência na preparação de autovacinas.

#### 2 — MATERIAL E MÉTODOS

##### 2.1 — Seleção dos germes a serem utilizados numa autovacina.

A seleção das espécies de germes de um material clínico, para incorporação numa autovacina não é, na prática, tão fácil quanto se poderia julgar. Em muitos casos surgem dúvidas sobre o papel patogênico de certos germes. Já se tem observado casos de germes considerados saprófitas desempenharem papel patogênico em certas ocasiões e sob determinadas condições.

A recomendação de ordem geral é: sempre que haja dúvida, incluir a espécie de germes em questão, na autovacina.

\* Da Disciplina de Patologia e Clínicas das Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo — Cidade Universitária — São Paulo, SP., Brasil. Chefe aposentado da Secção de Produção (de Soros e Vacinas), do Instituto Biológico de São Paulo; ex-Bacteriologista do Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo.

Estabelecemos o seguinte esquema, por ordem decrescente de importância:

- a) germes considerados agentes etiológicos de doenças bem definidas, ou de processos infecciosos diversos;
- b) germes de infecção secundária;
- c) germes de ação patogênica duvidosa;
- d) germes saprófitas de flora normal;
- e) germes saprófitas ocasionais e germes contaminantes do material.

Quando isolamos e classificamos os germes de um material clínico, ao selecioná-los para autovacina, procuramos situá-los dentro desse esquema. Isto exige, sem dúvida, conhecimentos de Bacteriologia e de Patologia Clínica e deve ficar a cargo do orientador do laboratório.

Os que se enquadram num dos três primeiros grupos devem fazer parte da autovacina. Os do quarto e quinto grupos serão excluídos.

Lembrar que a classificação de uma espécie de germe, neste esquema, deve levar em consideração a idade do paciente; sabe-se que há germes patogênicos para prematuros que não o são para crianças e outros são patogênicos para crianças mas não afetam ou pouco afetam os adultos.

Uma questão também a ser considerada é a do número de espécies de germes a serem incorporados a uma autovacina.

Alguns pesquisadores já alegaram a possibilidade da concorrência de antígenos, em prejuízo da imunidade, quando se preparavam vacinas com mais de uma espécie de germe e recomendaram nestes casos, vacinar contra cada espécie em separado, usando vacinas monovalentes.

Todavia, a experiência tem demonstrado o contrário, conforme os trabalhos de RAMON<sup>15</sup> e após os excelentes resultados

obtidos com o uso dos antígenos mistos. Exemplo: tifo — paratifo — disentericos, tétano — tifo — paratifo — (Te-TAB), difteria — pertussis — tétano (vac. triplíce), difteria — pertussis — tétano — poliomielite<sup>13</sup>, etc.

Não se deve, pois, ter receio de associar vários germes numa autovacina, embora seja desaconselhável a incorporação de germes sem significação, só pelo fato de se encontrarem no material clínico. Todavia, é evidente que, tendo as autovacinas uma concentração total de germes (turvação da suspensão), aproximadamente constante, sendo as doses pré-estabelecidas, quanto menos espécie de germes contiver, maior será o estímulo antigênico específico para cada germe.

## 2.2 — Meios de cultura.

No cultivo dos germes aeróbios e anaeróbios patogênicos para o homem e os animais não existe, atualmente, um meio de cultura universal, capaz de preservar ou estimular as propriedades antigênicas de cada um dos microrganismos da variada flora já conhecida.

Todavia, é possível selecionar um pequeno grupo de meios de cultura, de fácil preparação em qualquer laboratório medianamente equipado, permitindo a obtenção de excelentes cultivos de praticamente toda a flora patogênica habitual.

Os poucos meios fora da rotina, podem ser preparados na ocasião do uso, ou melhor, com um ou dois dias de antecedência, a fim de que sejam submetidos a uma prova de esterilidade, isto é, incubados antes da sementeira pelo menos durante 24 horas, na estufa, a 37°C.

A nossa experiência, aliada aos dados da literatura, indica que o laboratório deve estar equipado para preparar os seguintes meios de cultura:

- a) caldo simples, com pH 7,4 e suas variantes:
  - caldo simples com 1/1.000 de glicose
  - caldo simples com 5% de soro estéril
  - caldo simples com 0,5% de glicerina estéril.
- b) ágar simples, com pH 7,4 e suas variantes:
  - ágar simples com 3 a 5% de soro
  - ágar simples com 3 a 10% de sangue
  - ágar simples com 5% de sangue aquecido (ágar chocolate).
- c) ágar semi-sólido (0,6 a 0,8% de ágar - pH 6,8 a 7,0)
- d) meio de tioglicolato-dextrose
- e) ágar triptose (uso restrito no preparo de autovacinas).

No laboratório clínico moderno já é hábito ter-se em estoque meios de cultura manufaturados sob forma desidratada, postos à venda no comércio por várias firmas idôneas (Difco, Oxoid, Fisher, etc.). O preparo de um meio de cultura nessas condições consiste apenas em reidratar, de acordo com as especificações do fabricante, distribuir em recipientes adequados e esterilizar.

O laboratório clínico deve dispor também dos seguintes ingredientes que permitem um preparo rápido de certos meios de cultura nas ocasiões necessárias:

- a) soro estéril de equino, carneiro, coelho, etc., (inativado a 56°C durante 30 minutos) conservado em geladeira, em tubos, ou ampolas estéreis;
- b) sangue desfibrinado, estéril, de carneiro, coelho, etc., mantido em geladeira e renovado sempre que se alterar.

### 2.3 — *Cultivo.*

Obtidas as culturas puras das espécies de germes a serem utilizados, serão

eles então semeados em separado nos meios de cultura mais adequados à preparação da autovacina correspondente.

As descrições que se seguem indicam um volume de meios de cultura e um volume de suspensões bacterianas que, em condições normais, a prática nos mostrou serem suficientes para a preparação de uma partida individual de autovacina destinada a uso humano.

Os meios de cultura a serem utilizados, volumes de meio, pH, temperatura e tempo de incubação, etc. serão, de preferência, os seguintes, conforme a natureza dos germes:

a) *Streptococcus* sp. — preparar o inóculo em meio líquido e semear cerca de 5 ml em 50 (a 60) ml de caldo glicosado (ou, de preferência, caldo-soro ou, melhor ainda, caldo-soro-glicosado), colocado em um balão de 125 ml de capacidade e previamente aquecido a 37°C em estufa. Incubar 4 a 5 horas a 37°C. No caso de *Streptococcus pyogenes* é preferível usar 2 balões com 50 (a 60) ml de meio cada um e incubar apenas 2 e 1/2 horas<sup>16</sup>. Agitar bem, durante 15 a 20 segundos em cada hora, evitando molhar o tampão. Após a incubação, verificar a pureza, centrifugar, reunir os sedimentos (suspensos em alguns ml restantes do caldo) em um só tubo, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

b) *Pneumococos* — espalhar o inóculo em duas placas de ágar sangue, incubá-las 24 horas a 37°C, em jarra, com atmosfera de 10% de gás carbônico<sup>9</sup>. Após a incubação, verificar a pureza e suspender o crescimento de cada placa em 3 a 4 ml de salina, com auxílio de uma espátula de Drigalski. Reunir as suspensões das duas placas em um só tubo estéril, centrifugar, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

c) *Staphylococcus* sp. — inóculo em meio líquido, espalhar 0,5 a 1 ml, com

espátula de Drigalski, na superfície de ágar simples semi-sólido, em placa de Petri (usar duas placas). Incubar 24 horas a 37°C em atmosfera de 10 a 20% de gás carbônico<sup>6,14</sup>. Após a incubação, verificar a pureza, suspender a cultura crescida em cada placa (delicadamente, evitando ferir o ágar), com 4 a 5 ml de água fisiológica estéril, usando a espátula de Drigalski. Assepticamente, com pipeta, reunir as suspensões das duas placas em um só tubo estéril e deixar sedimentar as possíveis partículas de meio de cultura (não os germes). Transferir cuidadosamente o sobrenadante turvo para outro tubo e completar para 10 ml com água fisiológica estéril.

d) *Enterobacteriáceas* em geral — cultura em dois tubos, cada um com 10 ml de caldo glicosado, pH 7,2 a 7,4 (ou caldo simples ou caldo-soro). Incubar 14 a 16 horas a 37°C, agitando de quando em quando. Após a incubação, verificar a pureza, centrifugar, reunir os sedimentos dos dois tubos de cultura em um só tubo, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

e) *Haemophilus* sp. — cultura em duas placas de ágar chocolate (usando 10% de sangue e adicionando, para melhor crescimento, 1/1000 de extrato de levedo). Incubar 24 horas a 37°C. Após a incubação, verificar a pureza, suspender a cultura crescida em cada placa, com 4 a 5 ml de água fisiológica estéril. Reunir as suspensões das duas placas em um tubo estéril. Deixar sedimentar as partículas do meio de cultura (não os germes) e transferir cuidadosamente o sobrenadante turvo para outro tubo, centrifugar, lavar uma vez em salina estéril e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

f) *Bordetella* sp. — cultura em duas placas de ágar sangue (usando 15 a 20% de sangue e juntando, para melhor crescimento, 10% de infuso de batata)

ou, melhor ainda, em meio de Bordet e Gengou. Incubar 48 a 72 horas a 37°C. Após a incubação, verificar a pureza e suspender o crescimento dos germes de cada placa com 4 a 5 ml de água fisiológica. Reunir as suspensões em um tubo estéril e deixar sedimentar as possíveis partículas de meio de cultura (não os germes). Transferir então cuidadosamente o sobrenadante turvo para outro tubo e completar a 10 ml com água fisiológica estéril.

g) *Pasteurella* sp. — cultura em tubo com 15 ml de caldo-soro (ou caldo-soro glicosado). Incubar 24 a 48 horas a 37°C, agitando de quando em quando. Após a incubação, verificar a pureza, centrifugar, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

h) *Moraxella* sp. — cultura em tubo com 15 ml de caldo-soro. Incubar 48 a 72 horas a 37°C, agitando de quando em quando. Após a incubação, verificar a pureza, centrifugar, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril. Procurar preparar a autovacina sem demora, não deixando permanecerem por longo tempo, as culturas ou as suspensões, em ambiente ou em geladeira, porquanto o germe morre em 48h à temperatura ambiente, e mais rapidamente ainda na geladeira.

i) *Clostridium* sp. — cultura em 15 a 20 ml de meio de tioglicolato (ou tioglicolato-dextrose) Difco. Aquecer previamente o meio a temperatura de aproximadamente 80° C, deixar esfriar a 37°C e semear o germe. Incubar 24 horas a 37°C. Usar um tubo de cultura cujo diâmetro permita uma coluna alta do meio, favorecendo assim a anaerobiose. Para os anaeróbios muito exigentes, pode-se cobrir o meio com 0,5 a 1 ml de vaselina líquida estéril (ou então utilizar o meio de Tarozzi, que já é preparado com cobertura de vaselina. Todavia deve-se, na medida do possível, evitar esta prática, porquanto dificulta a obtenção

de uma suspensão limpa. Após a incubação, verificar a pureza, e nos casos em que o meio tenha sido coberto com vaselina deve-se aquecer ligeiramente esta camada de vaselina e retirá-la cuidadosamente, por aspiração, com uma pipeta munida de pera de borracha. Retirada a vaselina, agitar bem o tubo de cultura, deixar em repouso para sedimentar as possíveis partículas do meio de cultura (não os germes), e transferir o sobrenadante turvo para outro tubo limpo e estéril. Centrifugar, desprezar parte do sobrenadante e deixar um volume final de 10 ml para a suspensão.

j) *Outros germes aeróbios não especificados dentre os já citados* (caso se julgue conveniente a sua inclusão na autovacina) — cultura e obtenção da suspensão em 10 ml de água fisiológica de modo igual ao citado para enterobacteriáceas.

k) *Outros germes anaeróbios não pertencentes ao gênero "Clostridium"* (caso se julgue conveniente a sua inclusão na autovacina) — cultura de modo igual ao citado para os clostrídeos. Após a incubação, proceder, então, de modo diferente. Verificar a pureza, centrifugar, lavar duas vezes em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

Em certos casos especiais podem-se preparar também autovacinas contra infecções pelos seguintes microrganismos:

l) *Pseudomonas* sp., (só usar autovacinas com *Pseudomonas* nos casos em que seja absolutamente necessário e onde não haja outro recurso) — cultura em tubo com 15 ml de caldo simples glicerinado a 0,5%. Incubar 24 horas a 37°C.

Após a incubação, verificar a pureza, agitar bem a cultura durante 1 a 2 minutos, centrifugar, lavar duas vezes em salina e ressuspender em 10 ml de água

fisiológica estéril.

m) *Neisseria* sp., (gonococos e meningococos) e *Gemella* sp. — o inóculo é constituído pela suspensão de colônias típicas do ágar chocolate em 0,5 a 1 ml de caldo glicosado. Espalhar este inóculo em duas placas de ágar chocolate (para melhor crescimento incorporar ao meio 1/1.000 de extrato de levedo). Incubar as placas a 37°C ou, de preferência, se possível a 36°C<sup>20</sup>, durante 48 horas em jarra, com atmosfera úmida e 10% de gás carbônico<sup>12</sup>. A atmosfera úmida é obtida com disco de papel de filtro molhado<sup>2</sup>, colocado no fundo da jarra supracitada. Após a incubação, verificar a pureza, suspender o crescimento de cada placa em 3 a 4 ml de salina, com auxílio de uma espátula de Drigalski e reuni-los em um tubo. Centrifugar, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

n) *Brucella* sp. — obtido o isolamento do germe, cultura em 2 a 3 tubos com ágar triptose inclinado (ou ágar-batata), incubar 48 a 72 horas a 37°C. Tratando-se de *Brucella abortus*, incubar em atmosfera com 10% de gás carbônico. Após a incubação, verificar a pureza, suspender o crescimento de cada tubo com 2 a 3 ml de salina, reuni-los em um tubo limpo e estéril, centrifugar, lavar uma vez em salina e ressuspender em 10 ml de água fisiológica estéril.

#### 2.4 — Verificação de pureza das culturas.

Após a incubação, verificar a pureza, reza das culturas deve ser feita em lâmina corada pelo Gram.

a) meios líquidos — um esfregão de cada cultura, em separado;

b) meios sólidos — examinar bem a superfície do meio e fazer esfregaços, de preferência, das colônias ou regiões suspeitas do enduto superficial.

Havendo contaminação das culturas (seja em meios sólidos ou em meios líquidos) ou então não havendo crescimento do germe ou dos germes, voltar ao material inicial fazendo novas sementeiras.

Todavia, nos casos de culturas obtidas em meios sólidos em placa de Petri, havendo contaminação com apenas 2 ou 3 colônias diferentes, pode-se procurar, com auxílio de espátula de platina (ou de pequena alça) flambada e amornada, retirar e desprezar a parte do meio onde estão as colônias e assim aproveitar a cultura para continuar a preparação da autovacina.

Não sendo possível separar o contaminante (*Bac. subtilis*, leveduras, etc.), obter novo material para a preparação da autovacina.

## 2.5 — Inativação dos germes.

Obtida a suspensão do germe ou germes, devem eles ser mortos para o preparo da autovacina.

Três processos serão utilizados para matar os germes:

### 2.5.1 — morte pelo iodo

As suspensões das Enterobacteriáceas em geral, *Haemophilus* sp., *Moraxella* sp., *Neisseria* sp. e *Gemella* sp. serão tratadas da seguinte maneira:

a) juntar assepticamente 4 a 6 gotas da solução de iodo para autovacina (I = 1 g, IK = 2 g, H<sub>2</sub>O = 100 ml), em cada 10 ml da suspensão bacteriana, agitar bem e tampar com rolha de borracha esterilizada;

b) incubar uma hora a 37°C (em estufa ou banho-maria), agitando de quando em quando;

c) após a incubação, neutralizar assepticamente, com uma solução esterili-

zada de hipossulfito de sódio a 10%, gota a gota, agitando bem após cada gota, até o líquido da suspensão bacteriana ficar incolor (usam-se no geral 4 a 6 gotas);

d) após a neutralização, examinar os tubos. Aqueles que tiverem partículas de resíduo devem ser agitados bem e a seguir deixados em repouso, para sedimentar as partículas (não os germes). Após essa sedimentação, transferir cuidadosamente e com asepsia o sobrenadante turvo para outro tubo estéril;

e) centrifugar todos os tubos, lavar duas vezes com água fisiológica e ressuspende os sedimentos finais em 5 ml de água fisiológica mertiolatada a 1/10.000.

### 2.5.2 — morte pelo formol

As suspensões de *Diplococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bordetella* sp., *Pasteurella* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Brucella* sp. serão tratadas da seguinte maneira:

a) examinar os tubos das suspensões microbianas. Aqueles que tiverem partículas de resíduo devem ser agitados bem e a seguir deixados em repouso para sedimentar estas partículas (não os germes). Após a sedimentação, transferir cuidadosamente o sobrenadante turvo para outro tubo estéril;

b) juntar assepticamente, para cada tubo com 10 ml da suspensão bacteriana, 0,4 ml de uma solução de formalina a 10%, agitar bem, tampar com rolha de borracha esterilizada. Incubar em estufa 72 horas a 37°C, agitando uma ou duas vezes ao dia;

c) após a incubação, centrifugar e desprezar apenas metade do sobrenadante, ou seja, 5 ml. O depósito de germes é agitado de novo, ficando ressuspenso nos restantes 5 ml.

### 2.5.3 — morte pelo calor

A suspensão de *Streptococcus* sp., é tratada da seguinte maneira:

a) dividir os 10 ml da suspensão bacteriana em vários tubos finos (5 mm x 150 mm, parede fina) limpos e estéreis, preparados especialmente para esta finalidade;

b) para matar os estreptococos, incubar então os tubos finos em banho-maria a 56°C, durante 15 a 20 minutos (a água do banho-maria deve estar acima do nível das culturas no tubo), agitando várias vezes durante este tempo;

c) após a incubação, reunir a suspensão dos vários tubos em um novo tubo limpo e estéril, centrifugar, lavar duas vezes em salina e ressuspender o sedimento final em 5 ml de água fisiológica mertiolatada a 1/10.000.

Não havendo indicação especial do clínico, preparam-se, habitualmente, no laboratório, dois frascos de 10 ml de autovacina para cada doente, um contendo autovacina mais concentrada (vacina "forte") e outro mais diluída (vacina "fraca").

O acerto da turvação é habitualmente feito usando-se a Escala de Mc FARLAND<sup>5</sup> (ou um nefelômetro).

A vacina "fraca" consiste apenas em diluir ao dobro parte da vacina "forte" com a turvação já acertada.

No caso de haver na autovacina mais de uma espécie de germe, cada cultura é acertada em separado e a seguir feita a mistura de culturas, usando-se volumes iguais de cada uma. A diluição para o acerto da turvação é sempre feita com água fisiológica mertiolatada a 1/10.000.

Turvação correspondente ao tubo da Escala de McFarland n.º:		
	vacina "forte"	vacina "fraca"
Adultos	3	1 1/2
Crianças	2	1

### 2.6 — Acerto do número de germes por ml da suspensão bacteriana e obtenção da autovacina.

Obtida a suspensão do germe ou dos germes mortos, num volume de 5 ml para cada cultura, passa-se para outra fase, que consiste em acertar a turvação (número de germes por ml) da suspensão ou suspensões destinadas à comparação de autovacinas.

### 2.7 — Provas de esterilidade das autovacinas

As autovacinas obtidas devem ser rotuladas e mantidas em geladeira até a ocasião do uso. Uma autovacina só poderá ser liberada para uso após as provas de esterilidade, efetuadas com o produto embalado.

Semear 2 a 3 gotas em cada um dos meios de cultura: a) caldo glicosado; b) tioglicolato (com vaselina) ou Tarozzi; c) meio de Sabouraud (2 tubos).

Incubar *a* e *b* a 37°C durante 72 horas; *c* será incubado em 2 tubos: um em ambiente e outro em estufa, a 37°C, observando-se ambos pelo menos durante 5 dias.

As autovacinas contaminadas serão inutilizadas, voltando-se, se possível, à cultura inicial ou então solicitando-se novo material.

## 2.8 — Instruções para a aplicação de autovacinas.

As injeções devem ser intradérmicas (de preferência) ou então, em certos casos, subcutâneas ou intramusculares.

A dose inicial é de 0,1 ml aumentada de 0,1 ml em cada aplicação até atingir 1 ml (conjunto de 10 injeções). Em seguida, aplicar mais 2 doses de 1 ml (total de 12 injeções). Nas doses acima, de 0,5 ml, torna-se difícil inoculá-las por via intradérmica num só local, devendo-se portanto, subdividir a dose em duas partes, inoculando-as em dois locais próximos um do outro.

Quando a aplicação é feita por via subcutânea, ou via intramuscular, após o conjunto de 10 injeções, aplicar mais 4 doses de 1 ml (total de 14 injeções).

O intervalo entre as injeções deverá ser sempre de 3 dias (salvo critério médico).

Após a aplicação da primeira série (vacina mais diluída), desprezar o resto do frasco. Aplicar, então, caso seja necessário, a segunda série (vacina mais concentrada) da maneira já indicada para a primeira série.

A vacina pode, às vezes, produzir reação local transitória (tumefação, calor, etc.), todavia, é desejável que não se produza reação geral (febre, mal estar, etc.); no caso de haver reação geral, repetir a mesma dosagem anterior. Caso persista a ocorrência da reação geral, le-

var a vacina ao Laboratório.

Quando uma vacina volta ao Laboratório, deve-se recorrer ao registro, a fim de verificar se, para sua preparação, foram utilizados germes cuja cultura continha endotoxinas ou exotoxinas:

a) no caso de germes com endotoxinas, a vacina deve ser novamente centrifugada e ressuspensa em nova solução estéril de água fisiológica mertiolatada a 1/10.000, ao dobro do volume primitivo. Embalar 10 ml deste volume e verificar novamente a esterilidade;

b) quando o germe ou germes produzem exotoxinas (transformadas em anatoxinas pelo formol), procura-se mantê-las para que a vacina não perca sua eficiência. Neste caso, deve-se apenas assepticamente diluir a vacina ao dobro com água fisiológica mertiolatada a 1/10.000 e verificar novamente a esterilidade;

c) nos casos em que a vacina contenha mistura de germes capazes de elaborar exotoxinas e outros que contêm endotoxinas, utilizar o indicado no item *b* para não se perder a exotoxina, embora no caso das endotoxinas obtenha-se apenas uma diluição capaz de atenuar as reações observadas, o que muitas vezes é suficiente ou então pelo menos mais satisfatório.

## 3 — DISCUSSÕES E CONSIDERAÇÕES SOBRE OS DETALHES DAS TÉCNICAS CITADAS NESTE TRABALHO

O problema fundamental do preparo das autovacinas consiste em estimular, ou pelo menos preservar, as qualidades antigênicas dos germes. Dentro deste princípio é que foi descrita a parte técnica deste trabalho, devendo ser obedecida em todos os seus detalhes quanto à sementeira em separado dos germes de um material clínico, às condições adequadas de meios de cultura, ao tempo de incubação, ao modo de inativa-

ção, etc..

A técnica assim detalhada constitui na realidade uma utilização e aplicação dos conhecimentos fornecidos pela Bacteriologia e pela Imunologia. cuja descrição minuciosa escapa ao âmbito deste trabalho.

Podese, todavia, abordar alguns princípios básicos. Por exemplo, as endotoxinas, oriundas da desintegração de certos germes, devem ser evitadas, na medida do possível, porquanto de um modo geral não são bons antígenos (embora muitos autores falem de vacinas com endotoxóides), e contribuem para causar reações locais e gerais desagradáveis nos vacinados. A maneira mais prática de diminuir sua presença, uma vez que se sabe ser muito difícil, ou pelo menos muito complicado, evitá-las por completo, consiste no uso de culturas novas (incubação inferior a 24 horas). Um exemplo típico é dado pelas endotoxinas de muitas enterobacteriáceas. Daí, para evitá-las na medida do possível, recomendarem-se culturas de 14 a 16 horas, o que seria tempo necessário para semear o germe à tarde e retirar o cultivo da estufa no dia seguinte, no período da manhã.

Em contraposição, as exotoxinas são bons antígenos (quando transformadas pelo formol em anatoxinas). Daí o fato, com raras exceções, de se estimular sua produção com o fornecimento de condições adequadas. No caso, por exemplo, dos estafilococos<sup>21</sup>, sabe-se que as culturas sem exotoxinas não tem efeito vacinante e a técnica de cultivo, segundo BURNET<sup>6</sup> com pequenas modificações introduzidas por PARISH e CLARK<sup>14</sup>, permitem obtenção de exotoxinas em 24 horas (evidentemente nas amostras capazes de produzi-las), enquanto que por outros métodos necessitar-se-iam de vários dias de cultivo. Outro detalhe consiste na adição do formol, ao invés do

iodo, não só para inativar o germe, como também para transformar a exotoxina. E ainda o pormenor, neste caso, de não se lavar os germes da cultura para não se perder a exotoxina solubilizada e sim procurar-se apenas sedimentar as partículas maiores (partículas de impurezas) transvasar o meio de cultura com os germes. Na possibilidade de haver teor elevado de exotoxinas solubilizadas, que poderiam provocar reações nos indivíduos hipersensíveis, utilizou-se a centrifugação e o desprezo da metade do sobrenadante.

Os fatos relacionados com a presença ou não de exotoxinas explicam o que foi escrito no texto sob o título "inativação dos germes". Quando há exotoxinas que interessam à imunização, indicou-se matar os germes das culturas com a adição do formol. Nos outros casos, preconizou-se o uso do iodo, meio mais rápido de inativação.

Muitos pesquisadores admitem que os estreptococos não são antigênicos e que as culturas desses germes dão vacinas ineficientes. Isto parece ter sido confirmado na prática.

Todavia, BAZELEY<sup>3</sup> verificou que o polissacáride capsular dos estreptococos é antigênico e que esta cápsula é encontrada unicamente nas culturas muito novas (de 4 a 6 horas). A cápsula praticamente desaparece nas culturas de 8 ou mais horas, daí o fato de muitos bacteriologistas não terem obtido sucesso ao usarem culturas no prazo habitual de cultivo, ou seja, 24 horas. Nos cultivos de 24 horas encontrar-se-iam certas exotoxinas que, no caso dos estreptococos, não interessam à imunidade, conforme afirmou SEASTONE<sup>16</sup>.

Preconizamos, neste trabalho, para os estreptococos em geral, cultura durante 4 a 5 horas em volume grande de meio (50 a 60 ml), concentrando-se depois por centrifugação. Entretanto, SEASTO-

NE<sup>17</sup> observou que para o *Streptococcus pyogenes*, mesmo esse tempo de 4 a 5 horas já é excessivo, recomendando culturas de 2 a 2 1/2 horas, já que a cápsula deste germe desaparece após 3 a 4 horas de cultura. Neste caso deve-se usar 2 balões com 50 a 60 ml de meio de cultura cada um, para se ter uma quantidade razoável de germes, após incubação e centrifugação.

Praticamente poder-se-ia estabelecer, segundo os dados citados, para os estreptococos alfa e gama hemolíticos, uma incubação de 5 horas, e para os beta hemolíticos, incubação de 2 1/2 horas (excetuando-se o *Streptococcus equi*, cuja cultura pode ser incubada durante 5 horas).

STAMP<sup>18</sup>, considerando o fato dos estreptococos acidificarem progressivamente o meio de cultura, observou que nessas condições, e também quando baixa o potencial de óxido-redução, o germe elabora o enzima protefnase, cuja presença é prejudicial à antigenicidade, sendo esta observação mais um fator contra o uso de culturas incubadas por tempo prolongado.

E, ainda, no caso especial de estreptococo, indicamos, de acordo com BAZELEY et al.<sup>4</sup>, a inativação da cultura pelo calor, já que este é o melhor método de preservar a capacidade antigênica desse germe. A vacina de estreptococos mortos pelo formol, na verificação desses autores, perde rapidamente sua eficiência em temperatura ambiente.

Nossa experiência pessoal no uso destas técnicas permite afirmar que se pode obter boas vacinas de estreptococos.

Recomendou-se cultivar os pneumococos em atmosfera com 10% de gás carbônico, desde que, além de estimular o

crescimento, algumas amostras só crescem nestas condições, conforme observou FLEMING<sup>9</sup>. Acresce, também, o fato de que a autólise espontânea, já observada em culturas de pneumococos por AVERY & CULLEN<sup>1</sup>, pode ser evitada pelo crescimento em atmosfera com gás carbônico, conforme afirma EATON<sup>8</sup>.

No caso da *Pseudomonas*, recomendamos só usá-la em autovacinas quando for absolutamente necessário e onde não houver outro recurso, e isto foi dito com base em nossa experiência pessoal. Inoculando, por via subcutânea, uma vacina preparada com *Pseudomonas aeruginosa*, morta pelo formol, em animais de laboratório, obtivemos reações locais mais ou menos severas, exigindo tratamento posterior. Esta verificação não nos anima a recomendá-la na vacinação humana, daí as ressalvas já citadas.

Não foi esquecido também o fato dos *Haemophilus* necessitarem de fatores X e Y do sangue, para seu desenvolvimento. Todavia, foi indicado o cultivo da *Moraxella* em meios com acréscimo apenas de soro, dada a afirmação de KORMER et al.<sup>11</sup> de que o sangue integral de carneiro exerce sobre esse gênero ação impiedante.

Estas considerações sobre alguns aspectos dos detalhes citados no cultivo e na inativação de certos germes mostram, como já tivemos o ensejo de citar, que os dados fornecidos pela Bacteriologia e pela Imunologia foram utilizados, procurando-se a obtenção de autovacinas nas melhores condições possíveis em relação aos nossos conhecimentos atuais.

Entretanto, convém lembrar que nem sempre uma técnica usada, embora excelente, na produção em grande escala de uma vacina comercial pode ser adaptada à obtenção de autovacinas em condições de laboratório.

#### 4 — CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE AUTOVACINAS NAS DOENÇAS DOS ANIMAIS

As autovacinas em Medicina Veterinária têm tido, até o presente, um uso muito mais restrito do que na espécie humana.

Várias explicações podem ser admitidas:

a) as doenças infecciosas dos animais são consideradas problemas de rebanho, e é hábito encontrar vacinas comerciais para uso profilático nas regiões onde tais doenças ocorrem;

b) as vacinas comerciais geralmente contêm antígenos para os patógenos mais freqüentes na etiologia de cada doença; as perdas que podem ocorrer nos casos de complicações são consideradas apenas sob o ponto de vista econômico e admitem-se como sendo ocorrências praticamente inevitáveis, derivadas naturalmente dos índices de letalidade da doença;

c) existe o hábito já arraigado de se tratarem as doenças com medicamentos ou com o soro específico, quando este pode ser encontrado;

d) são raros os laboratórios para o preparo de autovacinas veterinárias, tornando assim bem mais fácil a aquisição de medicamentos à venda em qualquer drogaria, farmácia ou casa de artigos agro-pecuários.

Todavia, embora seja indiscutível a importância do uso profilático de vacinas nos animais, é desejável que sejam mudadas as demais idéias com relação às chamadas "perdas inevitáveis", quando na realidade muitas delas poderiam ser evitadas.

Quanto ao uso das medicações: quimioterápica, antibiótica ou sintomática, nada impede que sejam empregadas sinergicamente com as autovacinas.

É interessante lembrar que nem sempre os agentes etiológicos são sensíveis

a determinados antibióticos ou sulfas, e que as medicações sintomáticas podem, às vezes, trazer apenas alívio temporário dos sintomas.

Muitos surtos ocorrem onde não se encontram patógenos comuns, e sim outros menos freqüentes, capazes de provocar sintomas semelhantes e para os quais não é de hábito encontrar vacinas já prontas no comércio. É o caso das enterites dos bezerros, onde não se encontra a *Salm. dublin* e sim outras bactérias também enteropatogênicas ou os casos de enterites dos leitões onde não se isolam *Salm. kunzendorf* e *Salm. choleraesuis*. É o caso, também, das infecções piogênicas, nem sempre devidas aos estreptococos e estafilococos. E isso sem mencionar as mastites, cujos agentes etiológicos podem ser tão variados, que desanimam o uso das medicações biológicas profiláticas ou curativas específicas que poderiam ser encontradas no comércio.

Na Medicina Veterinária o emprego de autovacinas se reveste de aspecto próprio diferente do da Medicina Humana.

No homem, a autovacina é empregada com efeito curativo quase sempre apenas no próprio indivíduo, reservando-se as vacinas de estoque para uso profilático nas populações.

Em veterinária, uma autovacina pode ser usada no próprio animal a título curativo, mas, dadas as possibilidades de contágio dos que estão no mesmo rebanho, em muitos casos é aconselhável usar o mesmo germe ou germes da autovacina, para o preparo de vacinas de uso profilático nos animais ainda sadios do rebanho, conviventes com os doentes ou expostos à infecção do rebanho, impedindo assim que se dissemine a doença.

A nossa experiência permite sugerir o emprego de autovacinas (ou, em certos casos, talvez melhor seja dizer apenas vacinação curativa) nas seguintes doen-

ças dos animais: enterites infecciosas, mastites, infecções estafilocócicas e estreptocócicas, piobacilose, coriza bacilar, vibriose, leptospirose (quando se consegue isolar o agente), etc. Dizemos *sugerir*, porquanto são raros, ou mesmo inexistentes, os trabalhos a respeito de autovacinas, ou ao menos só de vacinação curativa, para muitas destas doenças.

Evidentemente, considerando o que dissemos no início deste trabalho, a sugestão prevalece para os casos crônicos das doenças citadas.

E, finalmente, a propósito de autovacinas veterinárias, frisamos que o único tipo de autovacina que nos foi solicitado algumas vezes, durante todos os anos em que chefiámos a Secção de Produção de Soros e Vacinas do Instituto Biológico de São Paulo, foi aquela contra a papilomatose bovina, doença causada por vírus.

#### 5 — CONCLUSÕES

Desejamos salientar os seguintes itens fundamentais:

a) é possível preparar excelentes autovacinas usando-se a técnica de semeadura, em separado dos germes isolados de um material clínico;

b a obtenção de autovacinas eficientes é subordinada ao cultivo dos germes em condições adequadas para estimular, ou pelo menos preservar, suas qualidades antigênicas;

c) a concentração de uma cultura, o método de inativação dos germes, o estímulo à produção de exotoxinas e o processo de se evitarem endotoxinas são fatores que devem ser levados em consideração na obtenção de uma boa vacina;

d) é errôneo acreditar na pouca eficiência das autovacinas em geral, quan-

do a realidade nos mostra que o maior fator de ineficiência reside na má preparação das mesmas ou no seu uso inadequado. Na obtenção de boas vacinas autógenas, ou mesmo heterólogas, é imprescindível a aplicação dos conhecimentos atuais fornecidos pela Imunologia e pela Bacteriologia, abandonando-se quaisquer processos ou métodos contrários a estes conhecimentos e nunca usá-los a pretexto de serem mais cômodos, menos trabalhosos ou mais tradicionais.

RSPSP-150

CURY, R. — [*Autogenous vaccine: preparation technique and efficiency factors*] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 6:371-83, 1972.

**SUMMARY:** *A very good autogenous vaccine may be obtained by inoculation, in a separate medium, of microorganisms collected from clinical material. A selected culture medium and adequate culture conditions are necessary to stimulate or at least preserve the antigenic properties of microorganisms. The inactivation process must be used carefully in order to prevent damage to existing antigenous contents of the bacteria. A description of a method capable of covering every requirement and which would at the same time be practical and of a relatively simple execution, with the equipment available in any clinical laboratory was attempted in this study. This method has been selected from the best present knowledge of bacteriological technique. It is not considered beyond improvement, in part or in whole, as new and better knowledge is added to Immunology and Bacteriology.*

**UNITERMS:** *Autogenous vaccine (Preparation) \*; Vaccines \*; Immunization \*.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVERY, O. T. & CULLEN, G. E. — Studies on the enzymes of pneumococcus. IV. Bacteriolytic enzyme. *J. exp. Med.*, 38:199-206, 1923.

2. BAILEY, W. R. & SCOTT, E. G. — *Diagnostic microbiology*. Saint Louis, C. V. Mosby Company, 1962.
3. BAZELEY, P. L. — Studies with equine streptococci. 2. Experimental immunity to "Str. equi". *Aust. vet. J.*, 16:243-58, 1940.
4. BAZELEY, P. L. et al. — The keeping qualities of strangles vaccine. *Aust. vet. J.*, 25:130-3, 1949.
5. BIER, O. — *Bacteriologia e imunologia*. 12.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Melhoramentos, 1965.
6. BURNET, F. M. — The production of staphylococcal toxin. *J. Path. Bact.*, 33:116, 1930.
7. DIFCO Manual of Dehydrated Culture Media and Reagent for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. 9th ed. Detroit, Difco Lab. Inc., 1964.
8. EATON, M. D. — Studies on pneumococcus variation. I. Variants characterized by rapid lysis and absence of normal growth under the routine method of cultivation. *J. Bact.*, 27:271-91, 1934.
9. FLEMING, A. apud WILSON & MILES<sup>21</sup> p. 681-2.
10. FRANKEL, S. et al. eds. — *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 6th ed. Saint Louis, C. V. Mosby Company, 1963.
11. KOLMER, J. A. et al. — *Métodos de laboratório*. México, Editorial Interamericana, 1960.
12. MCLEOD, J. W. et al. — Cultivation of the gonococcus as a method in the diagnosis of gonorrhea with special reference to the oxidase reaction and to the value of air reinforced in its carbon dioxide content. *J. Path. Bact.*, 39:221-31, 1934.
13. OEHME, J. & HENNESSEN, W. — Erfahrungen mit einem neuen Vierfachimpfstoff. *Klin. Wschr.*, 38:181-2, 1960.
14. PARISH, H. J. & CLARK, W. H. M. — Staphylococcal toxin and antitoxin. *J. Path. Bact.*, 35:251-8, 1932.
15. RAMON, G. — *Le principe des anatoxines et ses applications*. Paris, Masson & Cie., 1950.
16. SEASTONE, C. V. — Capsules in young cultures of streptococcus hemolyticus. *J. Bact.*, 28:481-7, 1934.
17. SEASTONE, C. V. — The occurrence of mucoid polysaccharide in hemolytic streptococci of human origin. *J. exp. Med.*, 77:218, 1943.
18. STAMP, Lord — Studies on O/R potential, pH and proteinase production in cultures of *Streptococcus pyogenes*, in relation to immunizing activity. *Brit. J. exp. Path.*, 34:347-64, 1953.
19. The OXOID manual of culture media, ingredients and other laboratory services, 3rd ed. London, Oxoid Limited, 1965.
20. WADSWORTH, A. E. — *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. 3rd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1947.
21. WILSON, G. S. & MILES, A. A. — *Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*. 5th ed. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1964.

Recebido para publicação em 9.10.1972

Aprovado para publicação em 25.10.1972