

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Antonio G. Ferri

## NOVA TÉCNICA PARA PREPARAR A VACINA CONTRA ESPIROQUETOSE AVIÁRIA\*

(A NEW TECHNIC TO OBTAIN A VACCINE AGAINST AVIAN  
SPIROCHAETOSIS)

W. M. CORREA  
Assistente

A vacina contra espiroquetose aviária utilizada em nosso meio é aquela de Aragão modificada por Reis e Nóbrega e que consiste na emulsão de sangue, fígado e baço de aves infectadas, em água glicerinada.

NÓBREGA e REIS<sup>1</sup> obtiveram uma vacina inoculando *T. anserina* no embrião de galinha. A vacina não foi produzida industrialmente pela técnica trabalhosa da inoculação e coleta de fígado e baço embrionários.

Baseados no trabalho daqueles pesquisadores procuramos simplificar a técnica a ponto de tornar industrial essa fonte de antígeno.

### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos ovos embrionados de 5, 10 e 15 dias, inoculando-os:

- I) Sobre a corioalantóide.
  - a) Por via lateral por picada com furo de compensação na câmara de ar.

---

(\*) Trabalho realizado na seção de Ornitopatologia do Instituto Biológico de São Paulo.

- b) Por fenestração da câmara de ar, deposição do material sôbre a membrana testácea lesando-a em seguida para penetração do agente.

II) Na cavidade alantóica introduzindo verticalmente, através da câmara de ar, o corpo de uma agulha hipodérmica 25 x 7.

O material infectante foi sangue citratado, obtido de ave previamente inoculada e constatada doente por exame de sangue ao campo escuro no terceiro dia após a inoculação; as doses injetadas nos ovos embrionados foram de 0.05 — 0.1 e 0.2 ml.

O exame de ovos inoculados, vivos e mortos, foi realizado desde o terceiro até o sétimo dia, verificando-se a existência ou não do **T. anserina** por microscopia de campo escuro e de fase, tanto do líquido alantóico quanto do sangue cardíaco.

A coleta de material para vacina foi feita de ovos embrionados vivos, no sexto dia, em proveta graduada aproveitando-se os líquidos, embrião e membrana corioalantóica, desprezando-se a casca, clara e o saco vitelino com a gema.

Lemos volumetricamente a proveta e adicionamos água glicerinada a 50% a fim de conseguir uma diluição de 1:4 que denominamos suspensão mãe glicerinada.

Por outro lado, parte do material sofreu a mesma diluição em solução fisiológica adicionando-se 0,3% de formol, e a este material chamamos suspensão-mãe salina.

Um e outro conjunto de suspensões-mãe foram separadamente homogeneizados em liquidificador, filtrados grosseiramente através de gaze estéril e guardados em temperatura ambiente.

A vacina glicerinada e a salina foram provadas em aves adultas, da seguinte maneira:

1.º) inoculávamos 1 cm<sup>3</sup> de vacina, via intramuscular, no peito de cada ave, em diluições, feitas no momento, 1:5, 1:10 e 1:20, a partir das suspensões-mãe;

2.º) três dias após inoculávamos 0,2 ml de sangue infectante nessas galinhas e em testemunhas que não haviam recebido a vacina;

3.º) decorridos mais três dias examinávamos o sangue em campo escuro considerando positivas (vacinação inefetiva) as que apresentassem, nesse ou no dia subsequente, espiroquetas ao exame de sangue em campo escuro.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente pudemos descartar as inoculações em ovos de 5 e 15 dias porque nos primeiros havia alta mortalidade e nos segundos o período de reprodução do espiroqueta chegava até o dia de eclosão, assim passamos a fazer as inoculações em ovos embrionados de 10 dias.

O mesmo sucedeu quanto às doses, pois, a de 0,05 ml mostrou-se insuficiente e a de 0,2 ml matava grande quantidade de embriões; como qualquer das três vias de inoculação teve por resultado a reprodução dos espiroquetas, passamos a utilizar-nos apenas da via intra-alantóica por picada através da câmara de ar.

A partir do 3.º dia após a inoculação houve morte de embriões que atingiu à cifra de 20% do total até o 7.º dia.

As lesões observadas nos embriões foram aumento do fígado e do baço apresentando-se esses órgãos congestos e com focos necrótico-inflamatórios de coloração branca ou branco-acinzentada, de tamanho e forma irregulares.

A pesquisa de espiroquetas revelou-os desde o quarto até o sétimo dia com um climax numérico no sexto dia. Nos embriões colhidos mortos geralmente não observamos o microorganismo e quando o vimos foi dificilmente, tal a sua exigüidade.

As provas com as vacinas foram realizadas 7, 90 e 180 dias após sua preparação, num total de 40 galinhas e mais 8 testemunhas conforme o quadro I.

QUADRO 1  
PROVAS DA VACINA

| TIPO DE VACINA | DIAS APÓS O PREPARO | ÍNDICE DE POSITIVIDADE |       |      |
|----------------|---------------------|------------------------|-------|------|
|                |                     | Dil.                   | Susp. | Mãe  |
|                |                     | 1:5                    | 1:10  | 1:20 |
| Glicerinada    | 7                   | —                      | —     | +    |
|                | 90                  | —                      | —     |      |
|                | 180                 | —                      | ±     |      |
| Salina         | 7                   | —                      | —     | ±    |
|                | 90                  | —                      | ±     |      |
|                | 180                 | ±                      | +     |      |

+ = mais de 50% de positividade

± = menos de 50% de positividade

— = 100% de negatividade

Como se infere do quadro I não fizemos mais que uma prova com a diluição 1:20 porque já da primeira vez houve ineficiência; a diluição que melhor resultado apresentou foi a de 1:5 da vacina glicerinada a qual, após 6 meses em temperatura ambiente protegeu 100% das aves vacinadas; sem dúvida, essa melhor eficiência quando comparada com a vacina diluída em solução fisiológica é devida ao poder estabilizante da glicerina, pois, os outros componentes eram todos iguais; por outro lado melhorará a estabilidade do produto ao estocarmos a suspensão-mãe em geladeira.

Quando comparada com a vacina de Aragão ou sua modificação, vemos que nosso método é vantajoso pela eliminação das aves para obtenção do antígeno com todo seu corolário de trabalhos e dificuldades como: pessoal auxiliar, captura para inocular, manutenção durante os dias de incubação da moléstia, recaptura para sangria cardíaca e abertura para retirada do fígado e do baço. Ao mesmo tempo diminui muito o preço da vacina pois cada ave fornece ao redor de

1.500 a 2.000 doses enquanto cada ovo nos dá 150 doses não exigindo mais que um auxiliar para todos os trabalhos.

Relativamente ao método de NÓBREGA e REIS a técnica atual é vantajosa por exigir uma só perfuração no pólo da câmara de ar do ovo e a introdução da agulha sem maiores cuidados, pois, sempre irá ao interior da câmara alantóica, e por outro lado a coleta do material é mais simples por não exigir abertura do embrião ao mesmo tempo em que aumenta o rendimento da vacina, pois, é óbvio que em todos os órgãos há espiroquetas e portanto, antígeno.

Nós nos utilizamos de material proveniente de galinhas infectadas, nessas condições sugerimos que se pesquise:

1.º) se a passagem seriada em ovos embrionados modifica a constituição antigênica do *T. anserina*;

2.º) se o tempo de incubação do agente não se altera pela adaptação da amostra do ovo embrionado;

3.º) se não se modificam as propriedades biológicas perdendo o microorganismo o seu poder patogênico;

4.º) se não haverá modificações morfológicas ou biológicas de outro caráter.

Obviamente, se utilizarmos aves para manutenção de amostra do *T. anserina* as sugestões anteriores serão prescindíveis.

### CONCLUSÕES

Obtem-se uma boa vacina embrionária de produtividade industrial, contra a espiroquetose aviária, nas seguintes condições:

1.º) inocular 0,1 ml de sangue citratado, infectante, obtido de ave doente, no saco alantóico, via câmara de ar, em ovos embrionados de 10 dias;

2.º) descartar os ovos mortos e colher líquidos, embrião e membrana coriolantóica no 6.º dia após a inoculação;

3.º) suspender na proporção de 1:4 em água glicerina-da a 50%; passar pelo liquidificador; filtrar em gaze estéril

e estocar em geladeira; diluir a 1:5 a suspensão-mãe no momento de liberar para o comércio;

4.º) a vacina assim obtida inculada na dose de 1 cm<sup>3</sup>, por via intramuscular, imuniza aves adultas num período de 72 horas, mesmo seis meses após estoque em temperatura ambiente.

São necessárias algumas pesquisas sobre possíveis modificações biológicas de *T. anserina* se fôr o mesmo mantido em passagem seriada por ovos embrionados.

#### SUMMARY

This paper reports a new embryonated egg technique in order to obtain a vaccine against avian spirochaetosis.

Fowl-eggs about 10 days of incubation are infected in the allantois with 0.1 ml of citrated blood of a sick fowl.

The surviving embryos on the sixth day are collected with fluids and membranes; the egg shells, vitellus and albumen are discarded.

Collected material is then diluted 1:4 in glycerine-water 50%, liquidified and passed through steril gauze.

The suspension is stored in a refrigerator and diluted 1:5 when necessary.

This kind of vaccine is proved active six months after production even when stored at room temperature, on the dose of 1 ml injected by intramuscular route.

The immunity is completed three days after inoculation.

Some problems such modifications on biological properties and reproduction time of the *Borrelia anserina* are abrded.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) NÓBREGA, P. e REIS, J. — 1941 — *Arch. Inst. Biol. São Paulo*, 12: 87