

## APLICAÇÃO DE VACINA VIVA AVIRULENTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM SÊRES HUMANOS

(Nota Prévia)

Humberto MENEZES <sup>(1)</sup>

### RESUMO

Um mutante da cepa Y que já se mostrara avirulento e imunogênico para animais de laboratório foi utilizado para vacinar seres humanos.

Não houve sinais clínicos nem laboratoriais de infecção.

Descreve-se e se discute os resultados de algumas provas imunológicas.

### INTRODUÇÃO

Desde 1968 quando publicamos nosso primeiro trabalho sobre o efeito protetor da cepa Y, avirulenta, do *Trypanosoma cruzi* contra infecção de camundongos pela cepa homóloga virulenta (MENEZES <sup>1</sup>), temos procurado demonstrar, através de uma série de experiências, que aquela cepa ou melhor que o mutante daquela cepa que denominamos PF (MENEZES & ALBUQUERQUE <sup>8</sup>) é realmente avirulento (MENEZES <sup>5, 6, 7</sup>) que protege diferentes espécies de animais de laboratório (MENEZES <sup>1, 3, 4</sup>) e que essa proteção se faz não só contra a cepa Y virulenta mas também contra cepas virulentas diversas (MENEZES <sup>2</sup>).

Damos hoje um passo mais adiante, procurando demonstrar que a avirulência do mutante PF não se limita só aos animais de laboratório mas se manifesta também no homem.

### MATERIAL E MÉTODOS

1) Dois voluntários, masculinos, brancos, um com 52 anos (Fr 54-1) e outro com 32 anos (Fr 54-2), em perfeito estado de saúde,

foram submetidos previamente aos seguintes exames: a) Reação de Guerreiro & Machado no sangue (duas reações para cada paciente, realizadas em dois diferentes Laboratórios); b) hemocultura para *Trypanosoma* (3 tubos de meio líquido de Warren para cada prova e para cada paciente); c) imunofluorescência do soro para *Trypanosoma cruzi*; d) xenodiagnóstico (5 ninfas de *R. prolixus* para cada prova e para cada paciente). Exame dos triatomíneos 30 dias após o repasto; e) soroprecipitação para *Trypanosoma cruzi* segundo a técnica descrita por MUNIZ <sup>9</sup>; f) exame direto do soro sanguíneo para a pesquisa de tripanosomas segundo a técnica de STROUT <sup>13</sup>; g) inoculação do soro sanguíneo centrifugado, em camundongos de 10 g de peso (5 camundongos para cada prova e para cada paciente); h) eletrocardiograma; i) hemograma; j) hemossedimentação (técnica de Wintrobe); k) eletroforese das proteínas do soro (eletroforese em papel).

1) Determinação do pulso, pressão arterial e temperatura (antes das vacinas e no decorrer dos primeiros 15 dias que se seguiram à aplicação das mesmas);

Apresentado perante o VIII Congresso Brasileiro de Patologia, Fortaleza, Ceará, 8-7-1970

(1) USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Departamento de Patologia. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

2) *Vacinas* — Foram utilizadas duas doses de vacinas:

a) A primeira constou de uma suspensão, em solução salina, de *Trypanosoma cruzi*, cepa PF, com 21 dias de idade, cultivado em meio difásico de Packchanian. Esta cultura correspondia ao 315.º repique da antiga cepa Y, virulenta.

As culturas foram tôdas realizadas no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A suspensão dos tripanosomas foi feita segundo técnica anteriormente descrita (MENEZES<sup>3</sup>) e aplicada imediatamente após o seu preparo.

No subcutâneo da face anterior de um dos ante-braços, foi injetada a dose de 0,1 ml da vacina, contendo cerca de  $5 \times 10^4$  tripanosomas, sendo 60% de formas móveis e aproximadamente 10% de formas metacíclicas.

Oito, 15 e 30 dias após essa 1.ª vacina foram repetidos todos os exames referidos no item 1.

Quarenta dias após a 1.ª vacina foi aplicada a 2.ª; b) Esta foi preparada a partir da cultura n.º 318 do *Trypanosoma cruzi*, cepa PF, em meio líquido de Warren. A cultura tinha 15 dias de idade no dia da sua utilização. Intencionalmente foi usado um grande volume de meio de cultivo (200 ml), de modo a se obter um elevado número de tripanosomas. Nos 0,2 ml injetados por via subcutânea, em cada voluntário, havia cerca de  $3 \times 10^7$  parasitas, sendo mais ou menos 50% de formas móveis e aproximadamente 5,5% de metacíclicas. A suspensão final da 2.ª vacina foi feita em solução salina contendo 1.000 UI de Penicilina potássica e 1.000 µg de streptomina por ml. A adição destes dois antibióticos alterou a morfologia e a motilidade dos parasitas. Os flagelados tomaram aspecto globoso e os seus movimentos se tornaram lentos. A contagem dos parasitas, em ambas as vacinas, foi feita em câmara conta-glóbulos, segundo PETA-NA<sup>12</sup>.

Os exames mencionados no parágrafo 1 foram repetidos 8, 15 e 30 dias após o emprego dessa segunda dose.

Sessenta dias depois de aplicada a 2.ª vacina, ou seja 100 dias após o início da experiência, foram repetidos os seguintes exa-

mes: GUERREIRO & MACHADO (dois exames para cada paciente); xenodiagnóstico; hemocultura para tripanosomas, inoculação em camundongos do soro centrifugado dos pacientes, soroglutinação para tripanosomas e eletroforese das proteínas do soro.

3) Para comprovar a avirulência das vacinas usadas, 0,2 ml de cada uma delas foram injetados, subcutaneamente, a dois grupos de 5 camundongos, cada.

A pesquisa de parasitas no sangue periférico destes animais foi feita 8 e 15 dias após a vacinação.

4) Com o objetivo de demonstrar que as vacinas utilizadas eram avirulentas porém mantinham o seu poder imunizante, 30 dias depois da vacina, todos os animais vacinados e mais 10 outros de idêntico pêso que serviram como contrôles foram inoculados com 5.000 parasitas/g da cepa Y virulenta, colhidos de sangue de camundongos no 8.º dia de infecção.

## RESULTADOS

As Tabelas I e II dão um quadro sucinto dos resultados dos exames realizados.

As reações apresentadas pelos dois pacientes foram unicamente de ordem local.

No paciente FR-54-1 observou-se uma pápula eritematosa com diâmetro máximo de 8mm, 24 horas após a aplicação da 1.ª vacina e que desapareceu ao cabo de 5 dias.

Não houve repercussões gerais, como se pode observar pelo gráfico PPT-PA (Gráfico I), nem hipertrofia de gânglios regionais. Este mesmo paciente apresentou grande reação local após a 2.ª vacina, chegando o eritema a medir 60 mm de diâmetro no 3.º dia. Tal como na vacina anterior não houve comprometimento ganglionar nem repercussões gerais (Gráfico I).

As parasitemias, os xenos, as hemoculturas, as inoculações em camundongos e as reações de imunofluorescência do soro se mantiveram tôdas negativas, durante tôda a experiência (Tabela I).

A reação de GUERREIRO & MACHADO apresentou um resultado duvidoso e outro negativo, no 15.º dia e os dois resultados duvidosos no 30.º dia após a 2.ª vacina. Porém,

TABELA I

Resultados dos exames do paciente Fr 54-1

Exames	Antes das vacinas	8 dias após 1. <sup>a</sup> vacina	15 dias após 1. <sup>a</sup> vacina	30 dias após 1. <sup>a</sup> vacina	8 dias após 2. <sup>a</sup> vacina	15 dias após 2. <sup>a</sup> vacina	30 dias após 2. <sup>a</sup> vacina	60 dias após 2. <sup>a</sup> vacina	Observações
Xenodiagnóstico	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	5 minifas <i>R. prolixus</i> (5. <sup>o</sup> estágio)
R.F.C.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+ 1,7	+ 1,7	(-)	antígeno benzeno-clorof.
Guerreiro & Machado	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+ 1,5	(-)	meio líquido de Warren
Hemocultura	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Técnica J. Muniz
Aglutinação (Tit. dos soros)	1/40	1/40	1/320	1/160	1/320	1/640	1/20480	1/160	
Imunofluorescência do soro	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	(0)	5 camundongos exp. 8,15 e 30 dias
Inoculação	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Técnica de Strout
Parasitemia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Técnica de Wintrobe
E.C.G.	N	N	N	N	N	N	N	N	
Hemosedimentação	8 mm 1. <sup>a</sup> h	11 mm 1. <sup>a</sup> h	3 mm 1. <sup>a</sup> h	12 mm 1. <sup>a</sup> h	5 mm 1. <sup>a</sup> h	5 mm 1. <sup>a</sup> h	6 mm 1. <sup>a</sup> h	0	
Hemácias	4,3x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	0	4,9x10 <sup>6</sup>	4,3x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>6</sup>	0	mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	15,6	15,6	14,4	0	16,5	15,0	15,9	0	g %
Leucócitos	5.000	3.800	4.500	6.100	3.900	7.000	7.000	0	mm <sup>3</sup>
Neutrófilos	51	42	54	48	64	62	52	0	%
Eosinófilos	6	6	2	1	4	2	2	0	%
Linfócitos	35	47	38	46	27	34	39	0	%
Monócitos	7	3	6	5	5	2	6	0	%
Elektroforese das Proteínas — soro	N	2%	23%	23% Alb. 49%	15%	N	7% 5%	17,0% Alb. 48,5%	Elektroforese em papel
R.F.C. — Wassermann	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
Pulso	86	90	95	92	96	86	84	86	Bat./min.
Pressão-arterial	12,0 7,5	12,0 7,5	12,0 8,0	11,8 7,8	12,0 8,0	12,0 8,0	12,5 7,5	12,0 8,0	max. mmHg min.
Temperatura	36°:0	36,1	36°:3	36°:5	36°:2	36°:0	36°:0	36°:0	
Peso	83	83	83	83	83	83	85	85	Kg



Gráfico I

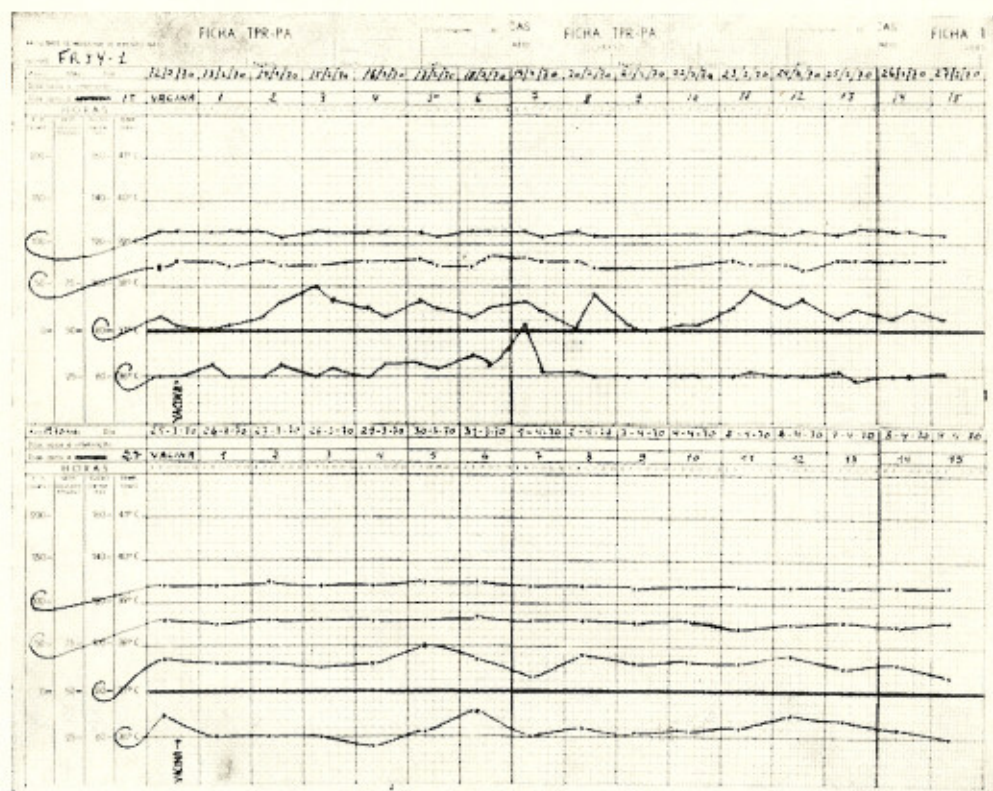


Gráfico II

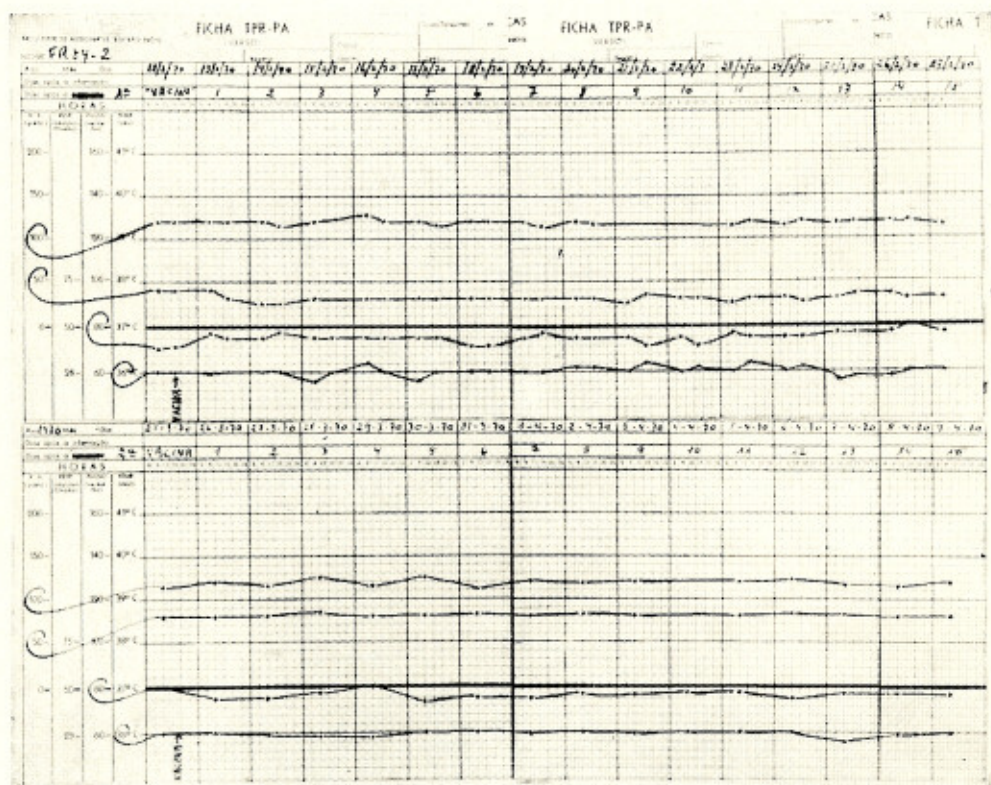


Gráfico III

PACIENTE FR 54 - 1 ECG

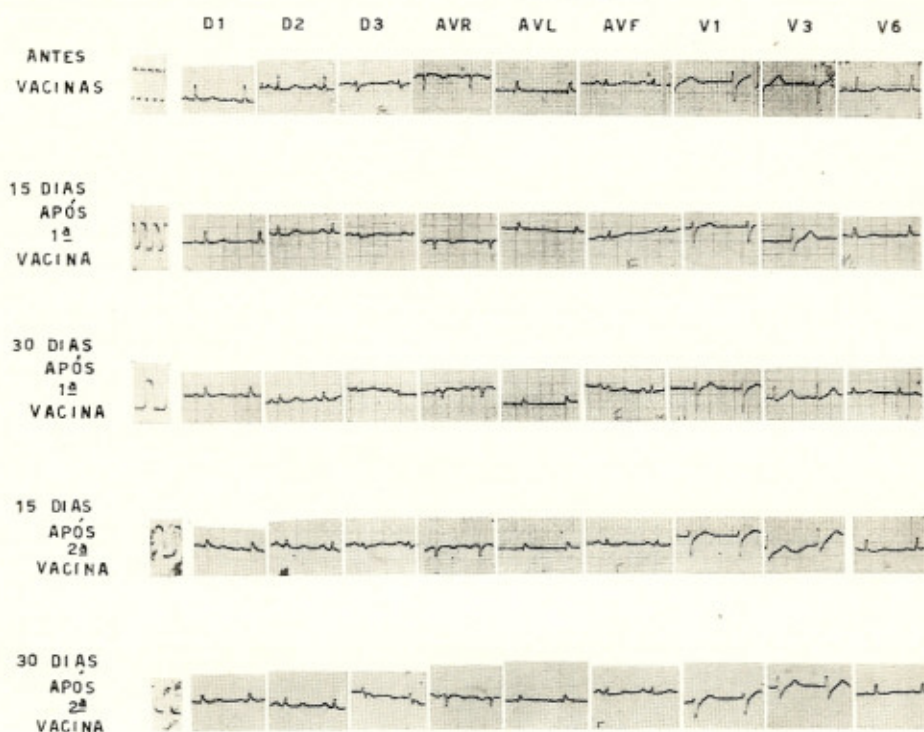


Gráfico IV

PACIENTE FR 54 - 2 ECG

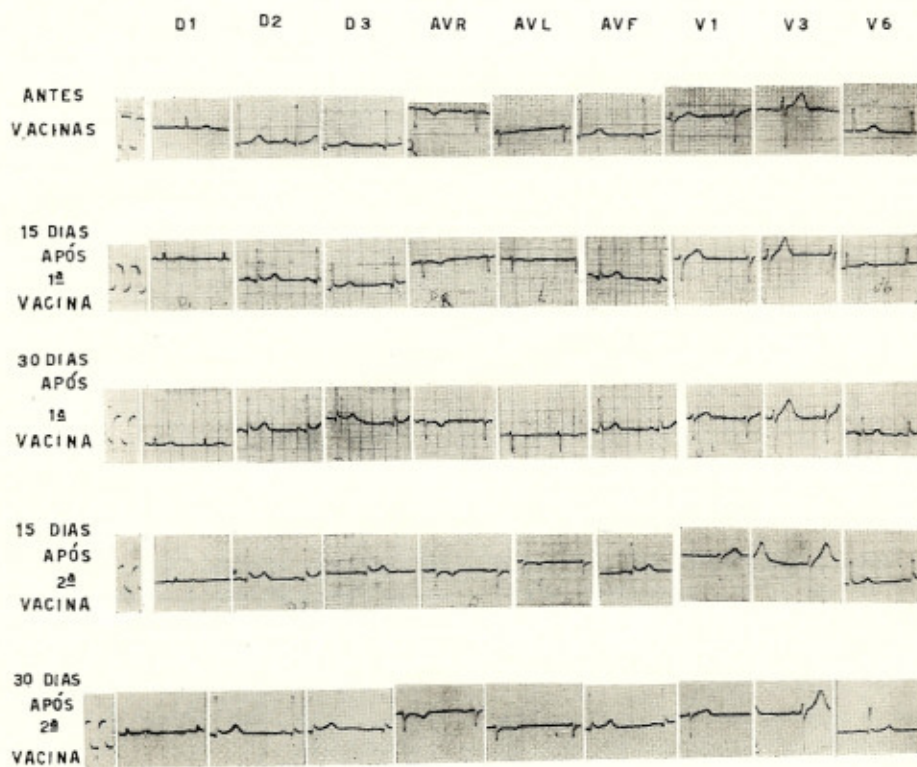


Gráfico V

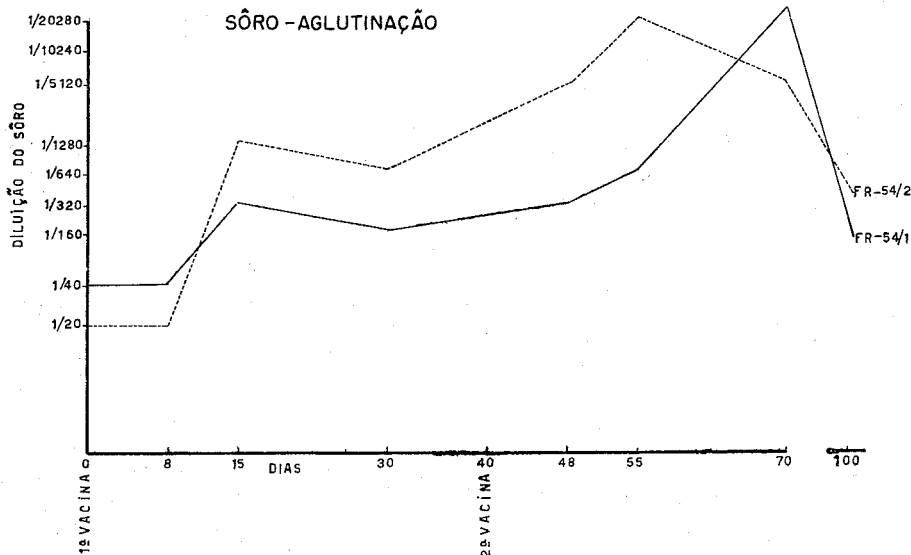
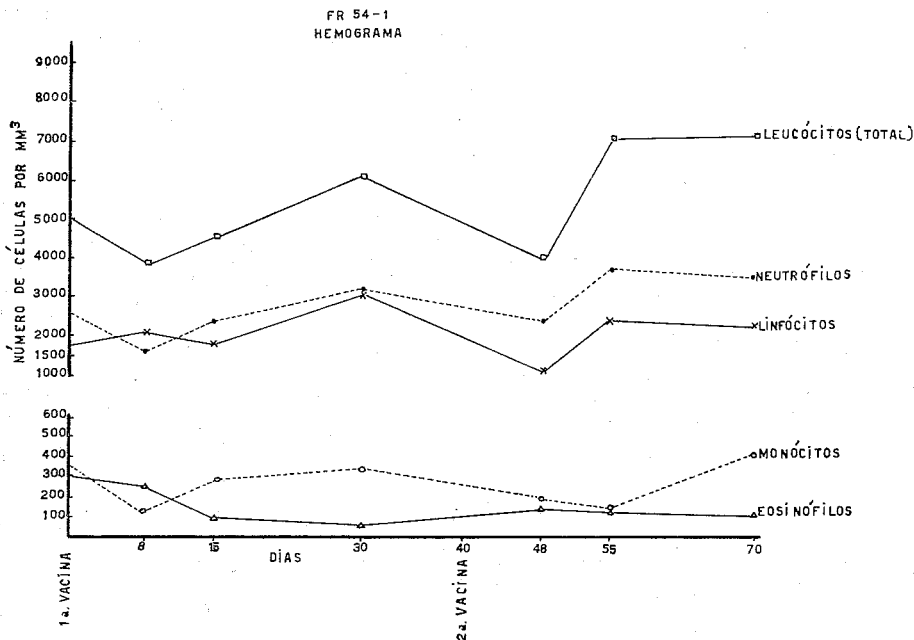


Gráfico VI



os dois testes realizados 60 dias após o emprego da 2.<sup>a</sup> vacina se apresentaram negativos.

As reações de aglutinação deram resultados bastante significativos.

O teor de aglutininas obteve seu pico máximo, depois da 1.<sup>a</sup> vacina, no 15.<sup>o</sup> dia, de-

crecendo em seguida. Oito dias após a 2.<sup>a</sup> vacina eles voltaram a se elevar, atingindo o máximo no 30.<sup>o</sup> dia e iniciando sua descida no 60.<sup>o</sup> dia (Gráfico V).

Os eletrocardiogramas se apresentaram sempre dentro dos limites da normalidade (Gráfico III).

Os leucócitos sofreram uma redução apreciável 8 dias depois da 1.<sup>a</sup> e da 2.<sup>a</sup> vacina. Esta leucopenia acompanhou-se de neutropenia absoluta (Gráfico VI).

A hemossedimentação elevou-se ligeiramente 8 e 30 dias depois da 1.<sup>a</sup> vacina, retornando logo em seguida aos níveis normais (Gráfico VIII).

Gráfico VII

FR 54-2  
HEMOGRAMA

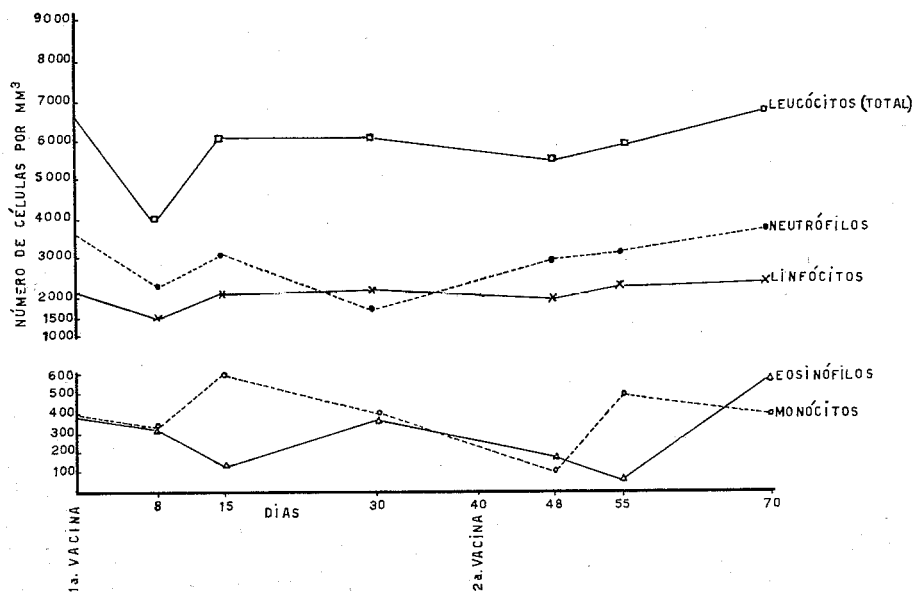


Gráfico VIII

FR 54  
HEMOSEDIMENTAÇÃO (WINTROB)

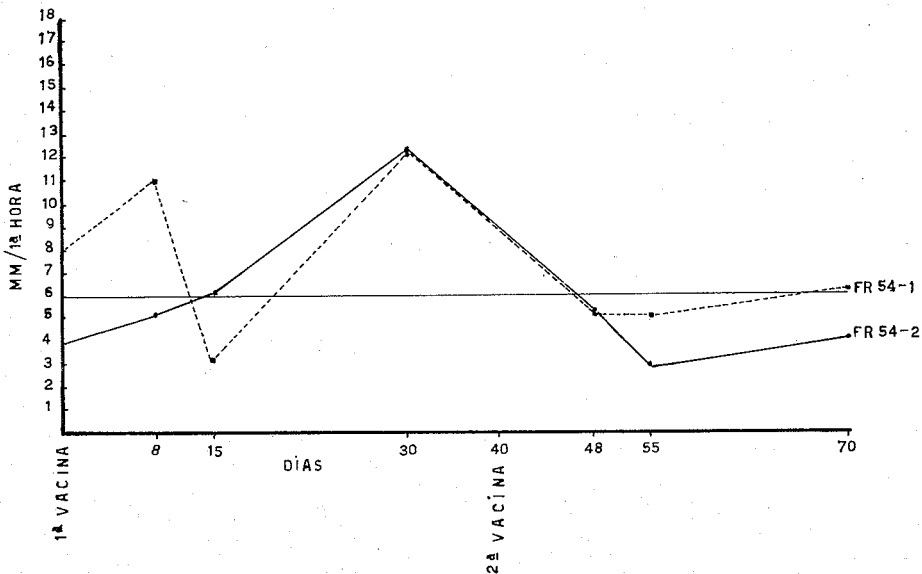
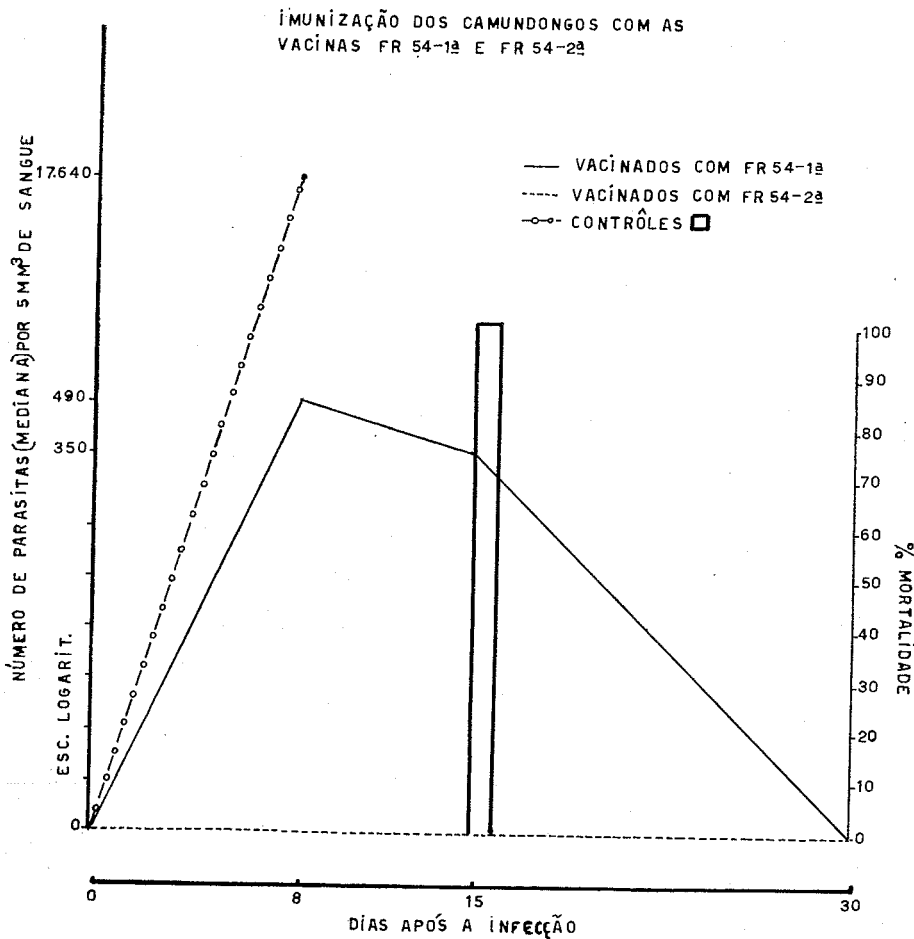




Gráfico IX

FR 54



Não houve alterações significativas na eletroforese das proteínas do soro (Tabela I).

O pulso, a pressão arterial, a temperatura e o peso não mostraram alterações que pudessem ser consideradas como patológicas.

O paciente Fr 54-2 mostrou um quadro geral semelhante porém com certas pequenas diferenças que merecem destaque.

Após 24 horas da 1.<sup>a</sup> vacina, apareceu na zona da injeção um discreto eritema circular com cerca de 5 mm de diâmetro e que desapareceu por completo passados 3 dias.

Com a 2.<sup>a</sup> vacina surgiu igualmente, 24 horas depois, uma discreta pápula com eritema, medindo no conjunto 5 mm de diâme-

tro. Esta lesão desapareceu por completo ao cabo de 2 dias.

Após um período de 12 dias apareceu, na área da vacinação, um nódulo subcutâneo, duro, indolor, móvel, sem reação eritematosa, medindo 15 x 15 mm. Não houve reação ganglionar e 11 dias depois esse nódulo desapareceu por completo sem ter provocado qualquer outra complicação local ou geral.

A reação de GUERREIRO & MACHADO, uma única vez e num único laboratório, apresentou resultado duvidoso (título 1,7).

As aglutininas atingiram mais precocemente os altos níveis observados no caso Fr 54-1 (Gráfico V).

Não houve leucopenia absoluta mas a neutropenia absoluta se apresentou no 8.º dia da 1.ª vacina e se fez mais acentuada no 30.º dia após a mesma (Gráfico VII).

Os camundongos imunizados com as vacinas empregadas nos dois pacientes mostraram grande resistência frente a uma infecção virulenta.

O percentual de mortalidade foi 0% em ambos os grupos contra 100% nos animais contrôles; todavia, só os animais que receberam a 2.ª vacina não apresentaram parasitemia positiva após a infecção (Gráfico V).

#### COMENTARIOS E CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta uma série de aspectos interessantes que está a merecer atenção particular dos especialistas.

Em primeiro lugar parece confirmar as experiências realizadas em animais de laboratório de que a cepa PF é avirulenta.

Infelizmente não dispomos de técnicas imunológicas adequadas para demonstrar que os indivíduos vacinados estão imunes.

Esta demonstração teve que ser feita de modo indireto, infetando os animais que receberam as mesmas vacinas.

As aglutininas do soro atingiram níveis muito altos comparáveis com aqueles descritos por MUNIZ<sup>11</sup> na fase aguda da infecção humana quando também se observam intensas reações de precipitinas e de fixação do complemento.

Os títulos máximos das aglutininas foram, em geral, observados ao fim do 15.º das vacinas o que está de acordo com as observações de MUNIZ & col.<sup>10</sup>, em macacos *Rhesus*.

A reação de fixação do complemento de GUERREIRO & MACHADO foi a que forneceu os resultados mais interessantes e polêmicos.

Se se admite como válida a opinião até hoje geralmente aceita de que uma reação positiva (salvo os raros casos falsos-positivos) é sinal de prévia infecção por *T. cruzi*, forçoso é concluir que os indivíduos vacinados com as formas vivas do mutante PF não se infetaram.

Convém mais uma vez lembrar que infecção aqui é usada no sentido de infecção-doença.

Esta hipótese é reforçada pelos resultados negativos da prova de imunofluorescência que é considerada por alguns pesquisadores (VIEIRA<sup>14</sup>) como mais sensível e mais específica do que a da fixação do complemento com antígeno benzeno-cloroformado.

Pesquisas mais extensas se fazem necessárias pois se se confirmarem as observações aqui relatadas é inegável que se acha aberta a possibilidade para a imunização em massa contra a tripanosomose cruzi.

#### SUMMARY

*Immunization of human beings with a live avirulent strain of Trypanosoma cruzi. (Preliminary report)*

The mutant PF of the former virulent Y strain of *T. cruzi* was demonstrated, in previous papers, to be avirulent for laboratory animals and to protect them against infections with homologous and heterologous virulent strains.

In the present communication the Author tries to show that the same avirulence is also valid in man.

Two adults volunteers received two doses of vaccine with an interval of 40 days between doses.

The first dose had  $5 \times 10^4$  trypanosomes being 60% mobile parasites and almost 10% metacyclic forms.

The second dose had  $3 \times 10^7$  parasites with almost 50% of trypanosomes with movements, and approximately 5.5% metacyclic forms.

A series of tests was done previously and within 8, 15 and 30 days after the first dose and 8, 15, 30 and 60 days after the second one (Tables I and II).

The xenodiagnosis, blood cultures, blood inoculations of mice and serum immunofluorescence to *T. cruzi* were consistently negative.

The FCT (Guerreiro and Machado) presented two doubtful results in a patient and

one in the other, but at the end of the 60<sup>th</sup> day of the second vaccine the test became negative in both.

The possibility of active immunization without permanent infection (premunition) is indicated.

#### AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Fabio L. Vichi, Astolfo Ferraz, Rosa Albuquerque, José Verissimo, Rubens Vieira e J. O. de Almeida, pelos exames complementares realizados. Agradecimento especial é feito ao técnico Hélio R. Rocha pela ativa colaboração dada a este trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent cultivated strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:1-4, 1968.
2. MENEZES, H. — Active immunization of mice with the avirulent y strain of *Trypanosoma cruzi* against heterologous virulent strains of the same parasite. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:335-342, 1969.
3. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a non virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:258-263, 1969.
4. MENEZES, H. — Imunização ativa de macacos cebus com vacina viva avirulenta do *Trypanosoma cruzi*. Apresentado, em parte, perante a XVII Assembléia Médica do H.S.E., Rio — Guanabara, 23-10-1969.
5. MENEZES, H. — I — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:64-68, 1970.
6. MENEZES, H. — II — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:129-135, 1970.
7. MENEZES, H. — III — The avirulence of the cultivated Y strain of *Trypanosoma cruzi* (No prelo).
8. MENEZES, H. & ALBUQUERQUE, R. — Imunização de camundongos com "vacina" viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi*. III — Variação do meio de cultura. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 4:69-74, 1970.
9. MUNIZ, J. — Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações da imunidade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 41:303-333, 1944.
10. MUNIZ, J.; NOBREGA, G. & CUNHA, M. — Ensaio da vacinação preventiva e curativa nas infecções pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 44:529-541, 1946.
11. MUNIZ, J. — Contribuição para um melhor conhecimento da ação patogênica do *S. cruzi* no organismo humano. *Hospital (Rio)* 72:676-700, 1967.
12. PETANA, W. B. — A method for counting trypanosomes using Gram's iodine as diluent. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 57:382-383, 1963.
13. STROUT, R. G. — A method for concentrating hemoflagellates. *J. Parasit.* 48:100, 1962.
14. VIEIRA, R. R. — *Estudo comparativo das reações da imunofluorescência e da fixação de complemento na Moléstia de Chagas*. Tese. Fac. Med. Ribeirão Preto, São Paulo, 1967.

Recebido para publicação em 28/8/1970.