CRIAÇÃO ARTIFICIAL DE AMBLYOMMA CAJENNENSE PARA O PREPARO DA VACINA CONTRA A FEBRE MACULOSA

POR

J. TRAVASSOS & A. VALLEJO-FREIRE

(Do Laboratório de Virus e Riquétsias do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

CONTEÚDO

- A Introdução
- B Considerações sóbre as vacinas contra as riquétsioses
- C O Amblyomma cajennense e o preparo da vacina contra a febre maculosa pela técnica de Spencer e Parker
- D Pessoal e instalações.
- E Amblyomma cajennense. Ciclo evolutivo e identificação
- F Amblyomma cajennense. Criação artificial
 - 1. Colheita das fêmeas. Fecundação
 - 2. Postura dos ovos
 - 3. Fase larval 1.ª alimentação infetante
 - 4. Fase ninfal 2.ª alimentação infetante
 - 5. Fase adulta Alimentação estimulante
- G Preparo da vacina
 - 1. Trituração, desintoxicação e purificação
- 2. Provas de esterilidade, inocuidade e capacidade antigénica
- H Aplicação da vacina
 - 1. Doses
 - 2. Reações
 - 3. Resultados
 - I Bibliografia

A — INTRODUÇÃO

Dilatam-se cada vez mais os limites geográficos da incidência da febre maculosa na América do Sul.

Reconhecida pela primeira vez no Estado de São Paulo, Brasil, em 1929 (1,2) e aparentemente circunscrita a áreas suburbanas da Capital, a febre maculosa foi nestes últimos anos continuamente identificada em outras regiões, não só do nosso País, como do continente sulamericano.

No Brasil, só no Estado de São Paulo, onde ela é melhor conhecida, várias centenas de casos fatais da doença foram observados em cêrca de 30 áreas diferentes e distanciadas umas das outras. Em muitas dessas áreas, novos casos são constatados anualmente e, em algumas delas, já foram encontrados vetores naturalmente infetados, o que permite considerá-las verdadeiros focos de infecção.

No Estado de Minas Gerais, a febre maculosa foi diagnosticada nas mais variadas localidades e, ultimamente, no Estado do Rio de Janeiro, alguns casos foram reconhecidos em quatro zonas diferentes.

À medida que se difundem os conhecimentos relativos ao diagnóstico desta riquetsiose, o número de casos aumenta nas estatísticas demógrafo-sanitárias. A larga disseminação dos vetores (carrapatos do gênero Amblyomma) responsáveis pela propagação da infecção, faz com que grandes extensões territoriais sejam consideradas focos potenciais da doença.

Acentua-se, desta sorte, e cada vez mais, a importância desta grave infecção, que atinge principalmente o trabalhador rural. Certamente, com o tempo poderá assumir proporções de grande significação nacional e quiçá continental, não só quanto ao número de casos como quanto à extensão das áreas atingidas, dada a tendência natural à formação de novos núcleos de colonização agrícola-pastoril em regiões até então despovoadas.

O número de casos até agora conhecidos não exprime a realidade do problema. Mesmo no interior do Estado de São Paulo, onde a densidade de população rural é das maiores do País, grande é ainda o número de pequenos núcleos praticamente à distância do contrôle direto dos serviços de saúde pública. Entretanto, vários casos de febre maculosa têm sido surpreendidos nestes últimos anos. Estes, certamente passariam desapercebidos ou seriam rotulados sob outras denominações, não fôra o contato cada vez maior das nossas autoridades sanitárias com o trabalhador rural. O aparecimento de casos da doença entre trabalhadores recém-chegados a certas áreas até então aparentemente indenes, é que, pôr vêzes, desperta a atenção e faz descobrir, por cuidadoso inquérito retrospectivo, a incidência da doença, sem que tivesse sido anteriormente reconhecida e comunicada às autoridades sanitárias.

O combate aos carrapatos, medida altamente dispendiosa e sòmente aplicável a zonas de grande valor econômico, torna impraticável o seu emprêgo na maioria das regiões atingidas. A vacinação repetida constitui o meio mais prático de proteção direta do homem.

A vacina preventiva é cada vez mais solicitada. Apesar de sua produção sempre crescente, a necessidade de proteger as populações dos focos cada vez mais numerosos não tem ultimamente permitido ao nosso Laboratório atender a

todos os pedidos de vacina, quer das autoridades sanitárias do nosso e dos outros Estados, quer de outros serviços médicos, civis e militares ou diretamente de particulares, que já a procuram espontaneamente.

O interêsse ultimamente manifestado por investigadores de diversas instituições científicas no sentido de conhecerem detalhes dos métodos de trabalho usados no Instituto Butantan para o preparo da vacina preventiva contra a febre maculosa e, principalmente, as técnicas de criação e manuseio de Ixodidas, induziunos a publicar êste artigo de divulgação (*).

Descreveremos, assim, neste trabalho, as instalações, métodos e técnicas especializadas, que vimos aperfeiçoando e adaptando às nossas condições de trabalho no decorrer dos últimos anos.

Alguma experiência adquirida no constante manuseio de Ixodidas, utilizando a técnica padrão de Spencer-Parker, permitiu-nos igualmente adotar na rotina modificações que julgamos proveitosas na execução de certos detalhes técnicos. Essas modificações referem-se aos métodos de criação dos Ixodidas e aos meios de proteção de que nos servimos para conseguir segurança e eficiência nos serviços.

No intuito de tornar facilmente reproduzíveis os diversos métodos utilizados, objetivamos por meio de desenhos e fotografias todas as fases da técnica.

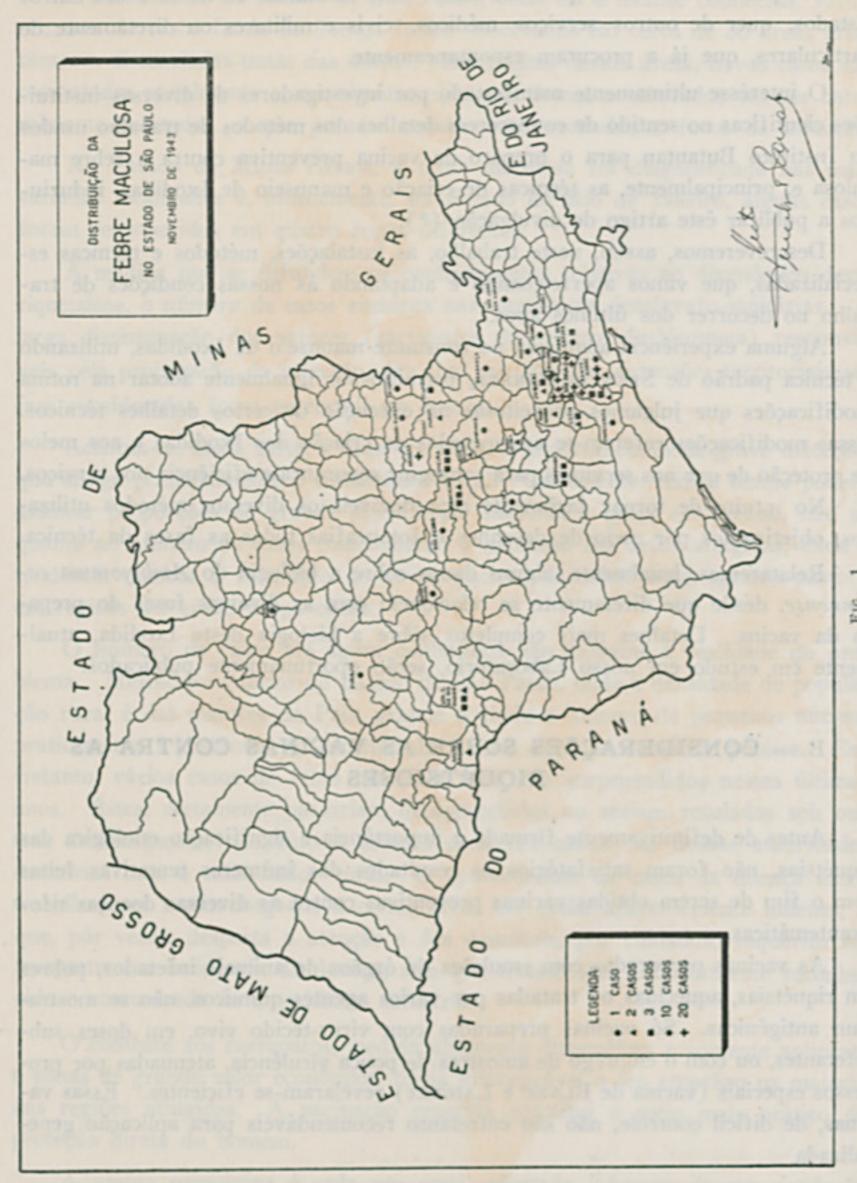
Relataremos, igualmente, alguns dados sôbre a biologia do Amblyomma cajennense, desde que diretamente se relacionem com as diversas fases do preparo da vacina. Detalhes mais completos sôbre a biologia dêste Ixodida, atualmente em estudo em nosso Laboratório, serão oportunamente publicados.

B — CONSIDERAÇÕES SÕBRE AS VACINAS CONTRA AS RIQUÉTSIOSES

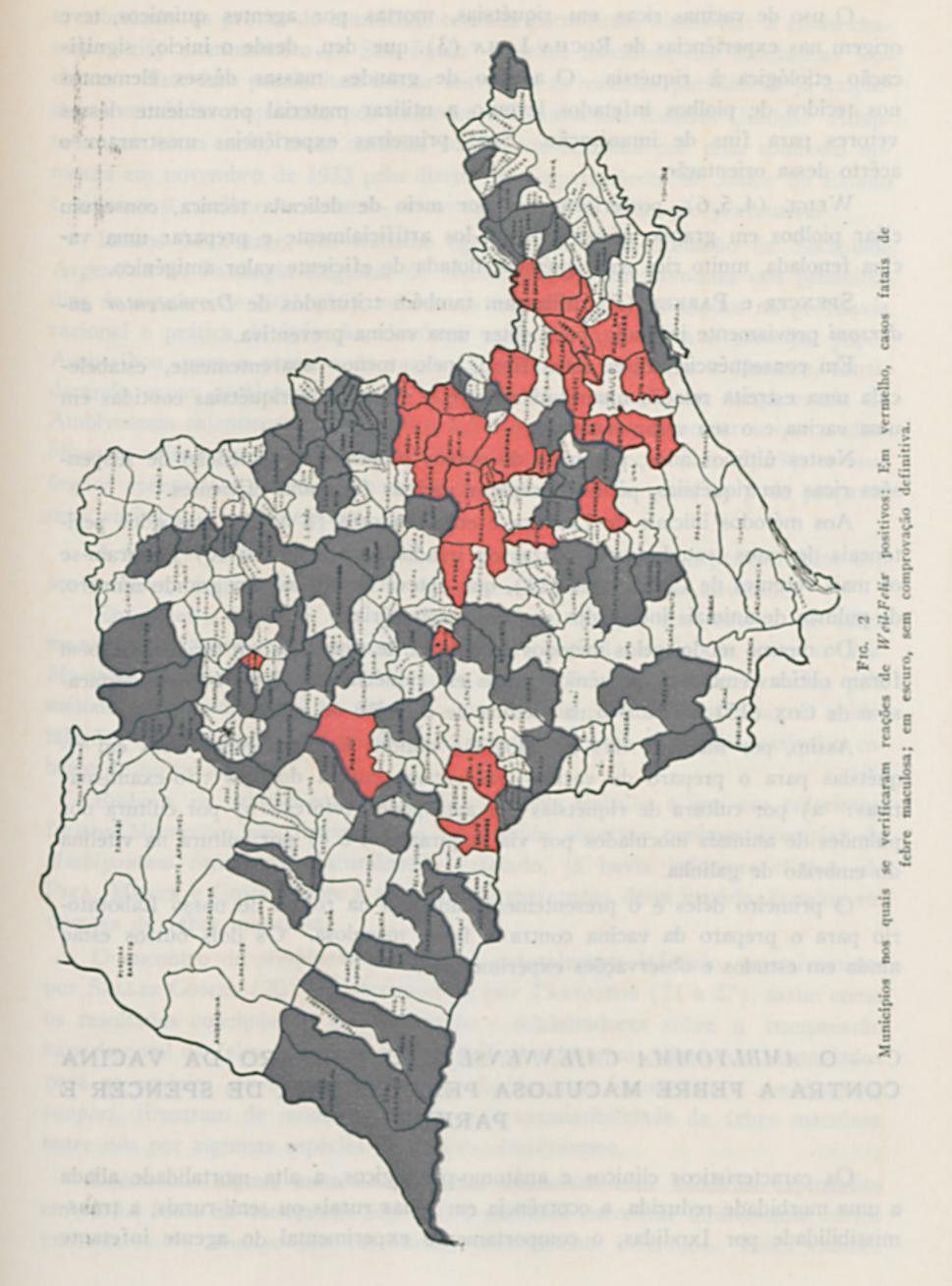
Antes de definitivamente firmada a importância e significação etiológica das riquétsias, não foram satisfatórios os resultados das inúmeras tentativas feitas com o fim de serem obtidas vacinas preventivas contra as diversas doenças tifoexantemáticas.

As vacinas preparadas com emulsões de órgãos de animais infetados, pobres em riquétsias, aquecidas ou tratadas por vários agentes químicos, não se mostravam antigênicas. Só vacinas preparadas com virus-tecido vivo, em doses sub-infetantes, ou com o emprêgo de amostras de pouca virulência, atenuadas por processos especiais (vacina de Blanc e Laigret) revelaram-se eficientes. Essas vacinas, de difícil contrôle, não são entretanto recomendáveis para aplicação generalizada.

^(*) Esta descrição, não é sinão uma simples adaptação do protocolo geral das técnicas empregadas no Instituto Butantan e obrigatoriamente feitas em cada serviço.



Distribuição da febre maculosa no Estado de São Paulo, até novembro de 1943.



O uso de vacinas ricas em riquétsias, mortas por agentes químicos, teve origem nas experiências de Rocha Lima (3), que deu, desde o início, significação etiológica à riquétsia. O achado de grandes massas dêsses elementos nos tecidos de piolhos infetados levou-o a utilizar material proveniente dêsses vetores para fins de imunização. Suas primeiras experiências mostraram o acêrto dessa orientação.

Weigl (4, 5, 6), posteriormente, por meio de delicada técnica, conseguiu criar piolhos em grande número, infetá-los artificialmente e preparar uma vacina fenolada, muito rica em riquétsias, dotada de eficiente valor antigênico.

Spencer e Parker (7) utilizaram também triturados de Dermacentor andersoni previamente infetado, para obter uma vacina preventiva.

Em consequência dêsses fatos ficou, pelo menos aparentemente, estabelecida uma estreita relação quantitativa entre o número de riquétsias contidas em uma vacina e o seu valor vacinante.

Nestes últimos anos, por meio de outros processos de obtenção de suspensões ricas em riquétsias, pôde-se preparar vacinas fenoladas eficientes.

Aos métodos iniciais de ZINSSER e colaboradores (8 a 13) (raspados peritoneais de ratos tratados pelo benzol ou irradiados pelos raios X) juntaram-se os mais recentes de Castañeda (14), que obteve riquétsias, em grande número, de pulmão de animais inoculados por via respiratória.

Do mesmo modo, pelos métodos de cultura de riquétsias em tecidos, também foram obtidas emulsões antigênicas, ricas em riquétsias. Dêstes últimos destacase o de Cox (15), de cultivo na vitelina de embrião de galinha.

Assim, por meio de três métodos são obtidos hoje antígenos ricos em riquétsias para o preparo de vacinas preventivas contra doenças tifo-exantemáticas: a) por cultura de riquétsias nos artrópodos vetores; b) por cultura nos pulmões de animais inoculados por via respiratória; e c) por cultura na vitelina do embrião de galinha.

O primeiro dêles é o presentemente adotado na rotina de nosso Laboratório para o preparo da vacina contra a febre maculosa. Os dois outros estão ainda em estudos e observações experimentais.

C — O AMBLYOMMA CAJENNENSE E O PREPARO DA VACINA CONTRA A FEBRE MACULOSA PELA TÉCNICA DE SPENCER E PARKER

Os característicos clínicos e anátomo-patológicos, a alta mortalidade aliada a uma morbidade reduzida, a ocorrência em zonas rurais ou semi-rurais, a transmissibilidade por Ixodidas, o comportamento experimental do agente infetante

e, sobretudo, as provas de imunidade cruzada permitiram identificar o então chamado "tifo exantemático de São Paulo" à febre maculosa das Montanhas Rochosas. Este fato possibilitou adotar entre nós as medidas profiláticas já amplamente estudadas e aplicadas por Spencer e Parker nos Estados Unidos. Adaptadas ao nosso meio, essas medidas foram aconselhadas por uma comissão nomeada em novembro de 1933 pelo diretor do Departamento de Saúde do Estado e visavam o combate ao vetor — o carrapato — e a vacinação preventiva.

Lemos Monteiro, em trabalho apresentado à 9a. Reunião da Sociedade Argentina de Patologia Regional do Norte, reunida em Mendoza nos primeiros dias de outubro de 1935 (16), relatou os métodos a serem usados na profilaxia racional e prática da infecção, dando à vacinação preventiva o principal papel. Aconselhou, para o preparo da vacina, a técnica de Spencer e Parker, considerando como problema inicial a ser resolvido, a criação em larga escala do Amblyomma cajennense. Com efeito, Lemos Monteiro demonstrou que o Ambliomma cajennense, além de ser um ótimo vetor da infecção (17, 18, 19), os seus órgãos apresentam grande número de riquétsias com as quais se pode preparar uma vacina do tipo americano.

A infecção acidental e fatal de que foram vítimas êsse experimentador e o seu auxiliar, Edison Dias, interrompeu bruscamente as suas atividades.

Em janeiro de 1936, um de nós assumiu a direção dos serviços de febre maculosa do Instituto Butantan, tendo a preocupação inicial de criar o Amblyomma cajennense em grande número, com o fim de preparar a vacina pelo método mais aconselhável no momento, preparando para isso aparelhagem e instalações indispensáveis ao bom êxito do empreendimento e o mais possível a coberto de novos acidentes.

Embora, na ocasião em que publicara aquêle trabalho a que nos referimos, Lemos Monteiro não tivesse ainda conseguido observar nenhum exemplar de Amblyomma cajennense naturalmente infetado, já havia informes clínicos de Piza, Meyer e Gomes sôbre a presença de carrapatos desta espécie, fixados em doentes de febre maculosa.

O encontro de Amblyomma striatum naturalmente infetado, primeiramente por Salles Gomes (20) e posteriormente por Travassos (21 a 27), assim como os resultados concludentes de Monteiro e colaboradores sobre a transmissão experimental da febre maculosa pela espécie Amblyomma cajennense e ampliados para as espécies Amblyomma striatum, Amblyomma brasiliensis e Amblyomma cooperi, firmaram de modo definitivo a transmissibilidade da febre maculosa entre nós por algumas espécies do gênero Amblyomma.

Decorridos alguns anos de pesquisas intensivas com Ixodidas capturados em vários focos da doença em São Paulo, pudemos encontrar ultimamente vários exemplares de Amblyomma cajennense naturalmente infetados. Estes exames

positivos não só foram obtidos com exemplares adultos, como com larvas e ninfas, estas últimas cuidadosamente estudadas e identificadas após a terminação do ciclo em laboratório.

O fato de ter sido o Amblyomma striatum o primeiro Ixodida encontrado naturalmente infetado em São Paulo, fez com que êle fosse focalizado como a espécie de escolha para o preparo da vacina. Contudo, por ser o Amblyomma cajennense mais abundante in natura, mais facilmente criado no laboratório e em seus órgãos ter sido evidenciada a abundante reprodução de riquétsias, foi êste último o escolhido. Agora, os nossos recentes resultados positivos de infecção natural vêm mostrar quão acertada foi essa escolha.

O estudo minucioso da infecção experimental do Amblyomma cajennense evidencia que, tal como no caso do Dermacentor andersoni, o agente infetante se reproduz no seu organismo e se transmite também congenitamente às gerações seguintes.

As riquétsias no Ixodida infetado podem ser encontradas nas células dos tecidos dos órgãos internos. Em cortes histológicos, têm sido evidenciadas riquétsias em grande número principalmente nas células epiteliais dos divertículos intestinais, na sua maior parte de localização intracelular (19).

A infecção do Ixodida é relativamente fácil, bastando para isso uma alimentação de algumas horas em animal infetado. Com uma única alimentação de exemplares adultos, seguida de intervalos de cêrca de 8-12 dias à temperatura ambiente, Lemos Monteiro conseguiu após trituração dêsses carapatos preparar uma emulsão fenolada vacinante para cobaia. Resultados mais regulares em capacidade vacinante, porém, são obtidos quando se utilizam emulsões de adultos conseguidos por criação artificial no laboratório, alimentando-os nas fases anteriores de larva e ninfa, em animais infetados. A infecção processa-se de modo relativamente fácil, quando os Ixodidas são colocados a sugar coelhos ou cobaias infetados no momento propício, isto é, na fase de reação febril.

D — PESSOAL E INSTALAÇÕES

Dado o perigo a que estão sujeitos os que manuseiam o material infetante necessário ao preparo da vacina, torna-se indispensável escolher cuidadosamente os auxiliares, especialmente aquêles que se destinam a trabalhar na criação dos Ixodidas. Deve-se dar preferência aos mais calmos e habilidosos, possuidores de suficiente prática de trabalhos com material infetante. Serão instruidos detalhadamente sôbre os diferentes modos pelos quais se podem contaminar, exigindo-se dêles treino prévio, técnica acurada na manipulação e cuidados especiais de inspeção do seu próprio corpo antes e depois de encetar os trabalhos com Ixodidas.

As infecções durante os trabalhos de laboratório são geralmente devidas:

- a) a acidentes por ocasião das manipulações de animais infetados: inoculações, necropsias, colheitas de material; ou devidos a descuidos no manuseio de recipientes contendo material infetante;
- b) à picada de Ixodidas infetados;
- ao esmagamento de Ixodidas infetados ou de outros hematófagos (repletos de sangue de animais infetados) entre os dedos, sujando-os com
 material infetante e permitindo a infecção pelas escoriações cutâneas ou
 pelas mucosas;
- d) à inspiração de partículas desprendidas por ocasião da trituração de Ixodidas ou em consequência do manuseio de recipientes contendo ou que contiveram hematófagos infetados, cujas fezes e outros detritos dessecados podem, ao se desprenderem, ser aspirados.

Os cuidados exigidos são:

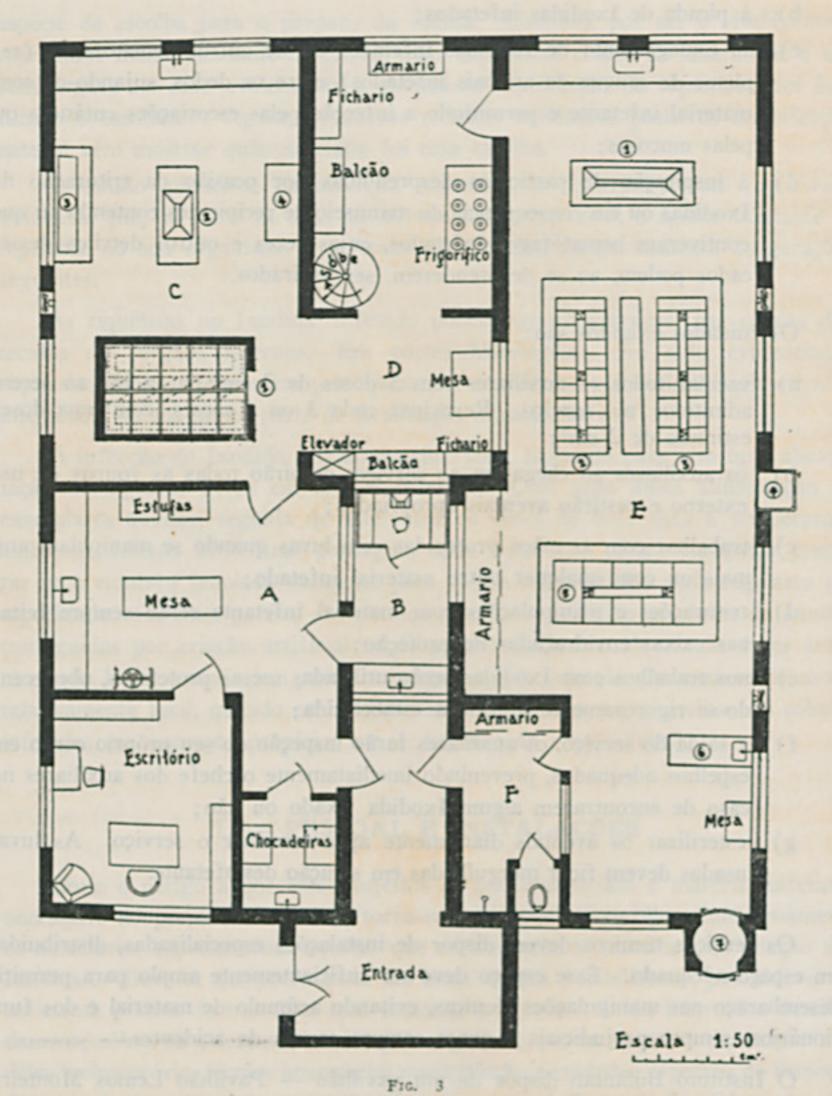
- a) vacinar todos os auxiliares com 3 doses de 2 cm³ da vacina ao serem admitidos ao serviço. Revacinar cada 3 ou 4 meses com uma doseestímulo de 2 cm³;
- b) os auxiliares ao chegarem ao serviço, despirão todas as roupas de uso externo e vestirão aventais apropriados;
- trabalhar com as mãos protegidas com luvas quando se manipulam animais ou com qualquer outro material infetado;
- d) triturações e manipulações com material infetante serão sempre feitas nas caixas envidraçadas de proteção;
- e) nos trabalhos com Ixodidas serão utilizadas mesas protetoras, obedecendo-se rigorosamente à técnica estabelecida;
- f) à saída do serviço, os auxiliares farão inspeção do seu próprio corpo em espelhos adequados, prevenindo imediatamente o chefe dos auxiliares no caso de encontrarem algum Ixodida fixado ou não;
- g) esterilizar os aventais diariamente após terminar o serviço. As luvas usadas devem ficar mergulhadas em solução desinfetante.

Os serviços técnicos devem dispor de instalações especializadas, distribuidas em espaço adequado. Esse espaço deve ser suficientemente amplo para permitir desembaraço nas manipulações técnicas, evitando acúmulo de material e dos funcionários, sempre prejudiciais e quase sempre causas de acidentes.

O Instituto Butantan dispõe de um pavilhão — Pavilhão Lemos Monteiro — para os serviços da Seção de Virus. O andar térreo dêste Pavilhão destina-se

exclusivamente ao estudo das riquetsioses e nêle estão instalados os serviços técnicos de preparo da vacina contra a febre maculosa.

A planta anexa mostra as instalações e distribuição dos serviços no pavimento térreo. A única comunicação que liga diretamente o edifício com o exterior dá



Planta do andar térreo do Pavilhão Lemos Monteiro. Serviço de febre maculosa.

acesso a uma entrada, onde está o vestiário geral utilizado pelos auxiliares antes de entrarem nos laboratórios propriamente ditos. Esta entrada comunica-se por meio de um corredor, à direita, com outro vestiário (F), ante-sala do biotério. Aí estão armários individuais, instalações sanitárias, chuveiro, jôgo triplo de espelhos e estufa para descarrapatização eventual dos "over-alls", que deverão ser utilizados por todos os auxiliares antes de entrarem nos diversos laboratórios ou no salão dos biotérios. Do lado esquerdo, o corredor comunica-se diretamente com o escritório e laboratórios (A), onde não são manipulados Ixodidas. Estes laboratórios, destinados a estudos bacteriológicos e sorológicos correlatos ao problema, contrôle da vacina, etc., estão igualmente aparelhados para trabalhos experimentais de culturas em tecido ou em embriões de galinha (B). O restante da parte esquerda do pavimento térreo constitui a sala de criação de carrapatos (C), contando com uma grande câmara-estufa (C 1), armários (C 3), geladeiras (C 4) e mesas de manipulações (C 2).

Toda a ala direita (E) compreende um grande salão destinado aos biotérios (E 2, 3 e 5), contando com dispositivos para facilitar a alimentação de Ixodidas. Aí estão mesas de proteção (E 1) e de necrópsias (E 6), além de um forno crematório para a incineração dos animais (E 7). Os alimentos destinados aos animais que permanecem no biotério, são depositados em uma caixa especial (E 4), comunicável com o exterior, a fim de evitar a entrada de funcionários estranhos aos serviços de biotérios.

Na parte central (D) estão instalados os frigoríficos para a conservação dos virus, bem como mesa e fichários de contrôle dos animais usados nas experiências em curso ou nos trabalhos de rotina. No centro da sala de contrôle um elevador permite a comunicação com o andar superior do "Pavilhão Lemos Monteiro", onde estão instalados os serviços de virus em geral, cuja seção de preparo e esterilização de material fornece todos os aparelhos ou demais utensílios de uso.

Esta distribuição foi feita em obediência a requisitos técnicos que julgamos de valia para o maior rendimento dos serviços, bem como à necessidade de aproveitar ao máximo o reduzido espaço de que podiamos dispor.

Os detalhes das instalações dêsses diversos laboratórios serão descritos a seguir e à medida que nos ocupamos das diversas fases do preparo da vacina.

E — AMBLYOMMA CAJENNENSE CICLO EVOLUTIVO E IDENTIFICAÇÃO

A zona de distribuição do Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) compreende toda a América do Sul e Central, podendo ser encontrado no sul da América do Norte, muito mais frequentemente, porém, nas zonas relativamente quentes. E' um dos Ixodidas mais frequentes no Brasil. De parasitismo extremamente eclético, êle pode ser visto fixado em animais de sangue quente, como em alguns de sangue frio. Quando adulto, parasita principalmente o cavalo, o boi e o cão. O seu hospedeiro habitual é o cavalo. Tem sido também encontrado nos seguintes animais: carneiro, cabra, porco e porco do mato, veado, capivara, cachorro do mato, coelho, cotía, tatú, tamanduá-bandeira e outros.

1. Ciclo evolutivo.

O Amblyomma cajennense faz um ciclo evolutivo que conta com quatro estádios diferentes: ovo, larva, ninfa e adulto. As larvas e ninfas distinguem-se dos adultos não só pelas dimensões, como também pela ausência do orifício genital.

A larva diferencia-se da ninfa por seu menor tamanho e pelo fato de ser hexápoda. A ninfa é octópoda. E' conhecida entre nós pelas denominações populares de "micuim", "carrapato pólvora", "carrapato fogo", além de outras, peculiares a cada região.

A ninfa é comumente chamada de "carrapatinho", denominação que o povo dá igualmente à larva. Aragão aconselha manter essa denominação somente para a ninfa.

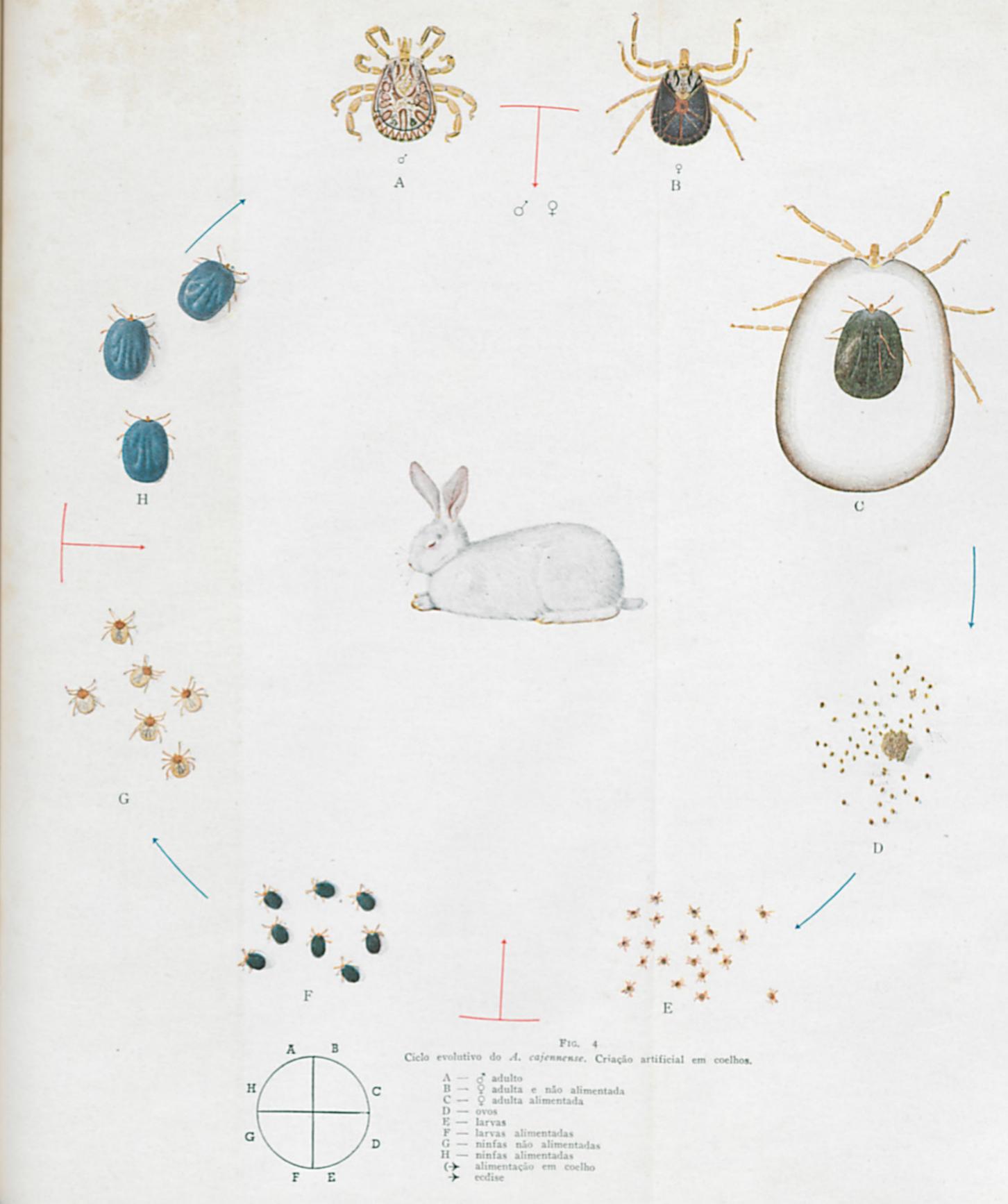
Os adultos são mais conhecidos pelos nomes de "carrapato rodoleiro" e principalmente "carrapato estrêla".

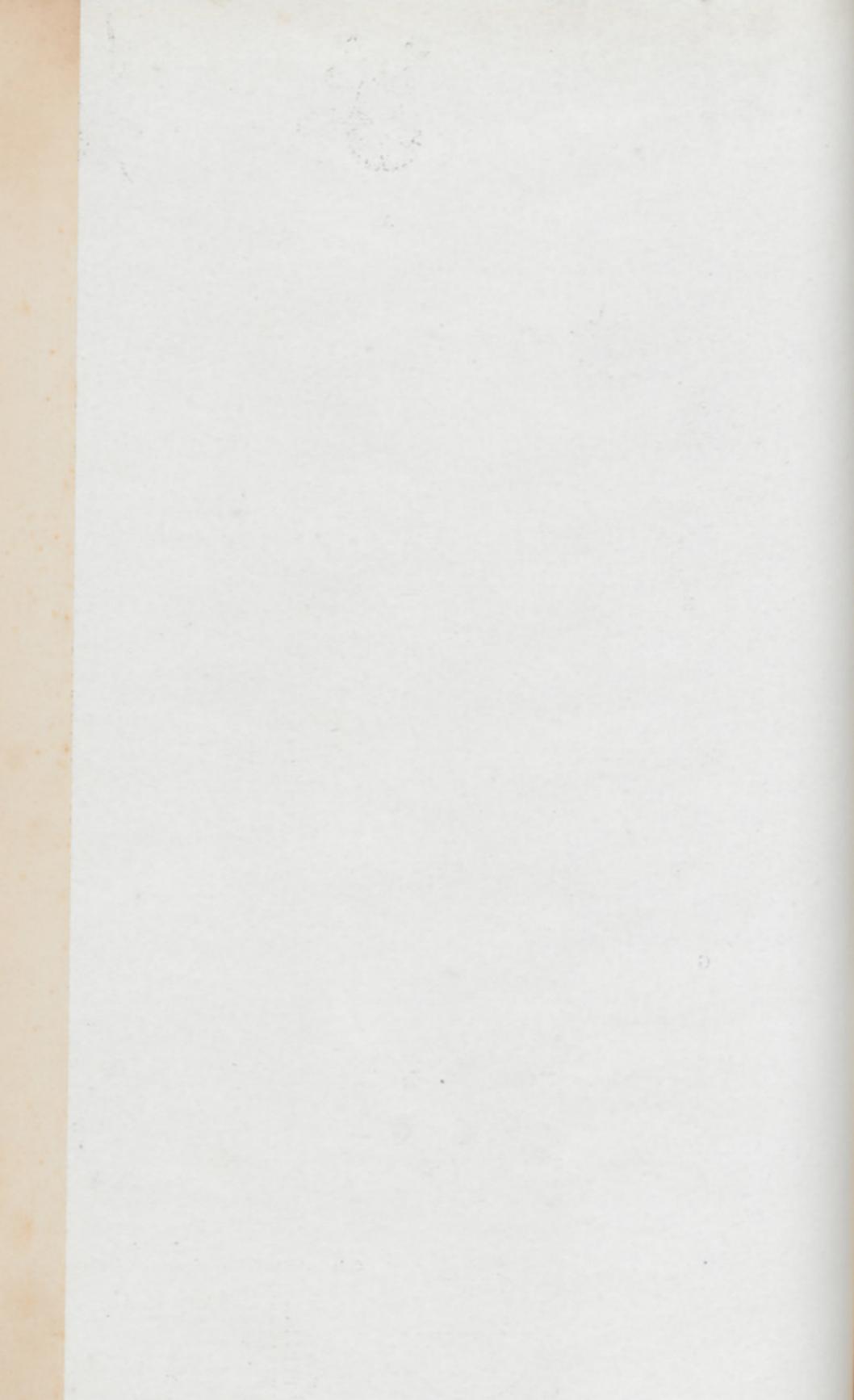
Somente na fase adulta distinguem-se os sexos: na fêmea, o escudo cobre somente a parte anterior do dorso e no macho inteiramente.

A fêmea, no momento propicio, fixa-se ao hospedeiro, e inicia a sua alimentação. Aos poucos aumenta de volume e, ao fim de alguns dias, repleta de sangue e distendida ao máximo, desprende-se do animal caíndo ao solo. Procura uma cobertura protetora em algum vegetal próximo e aí inicia dentro de poucos dias a postura dos ovos.

Decorridas algumas semanas e após a eclosão dos ovos, saem as larvas que esperam o momento propício para atingir um hospedeiro ao seu alcance para se alimentarem.

Após alguns dias de alimentação, desprendem-se do animal, caem ao sólo e transformam-se, dentro de alguns dias, em ninfas, procedendo-se assim, a 1.ª fase da metamorfose.





Estas, novamente, procuram alimentar-se em um novo hospedeiro, antes de se transformarem (2.ª metamorfose) na fase final de maturidade sexual, em carrapato adulto. Com a alimentação da fêmea, em um terceiro hospedeiro, inicia-se novo ciclo evolutivo.

Como vemos por essas resumidas noções gerais sôbre o ciclo evolutivo do Amblyomma cajennense, esta espécie vetora da febre maculosa, além de exigir três hospedeiros para a sua evolução, faz todas as fases de sua metamorfose fora dos mesmos. Este fato, aliado à indiferença com que ataca os diversos animais e mesmo o homem, permite que, uma vez infetado em qualquer de suas fases evolutivas, já na seguinte possa o Ixodida inocular o material infetante em outro animal ou, acidentalmente, ao homem.

2. Identificação.

Incluimos aqui os caracteres genéricos e específicos de acôrdo com a descrição de Robinson (28) e que correspondem aos da espécie com que trabalhamos:

Caracteres genéricos:

"Metastriata, isto é, sulcos anais em tórno do anus de situação posterior; geralmente ornados com manchas escuras e listras sóbre fundo pálido; olhos e festões presentes. Palpos geralmente longos, o 2.º artículo mais longo do que os demais. Os capítulos basais são de forma variável. Os exemplares machos não possuem escudos adanais, porém frequentemente têm placas ventrais. Espiráculos subtriangulares ou em forma de vírgula.

Espécie tipo: Amblyomma cajennense (Fabricius)."

Caracteres específicos:

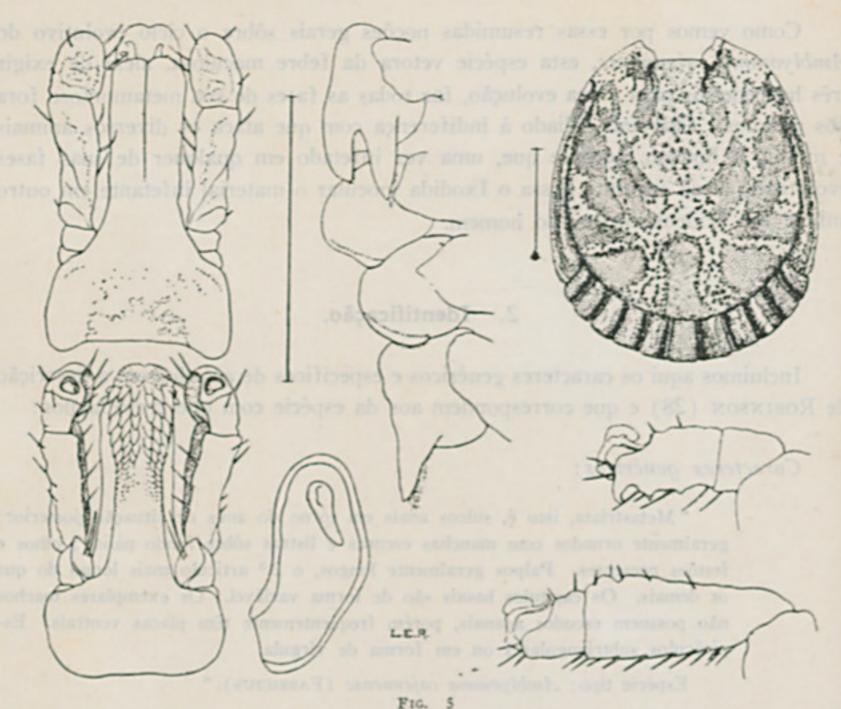
"Macho.

Diagnóstico: Carrapato pequeno ou de tamanho médio, com a ornamentação caraterística no escudo, formada por manchas ou listras vermelho-pardacentas sobre fundo pálido; sulco marginal contínuo; sulco cervical curto e profundo, sigmóide; patas de colorido pálido, coxa I com dois espinhos fortes, dos quais o externo mais longo e mais afilado; um espinho saliente e ponteagudo nas coxas II e IV; espinho longo, robusto e afilado na coxa IV."

Fêmea.

Diagnóstico: Escudo triangular, arredondado anteriormente, com o ângulo posterior de largura moderada, ornado com manchas vermelho-pardacentas sóbre fundo pálido; sulcos cervicais curtos, profundos e sigmóides, numerosas pontuações de tamanho médio uniformemente distribuidas; coxa I com dois es-

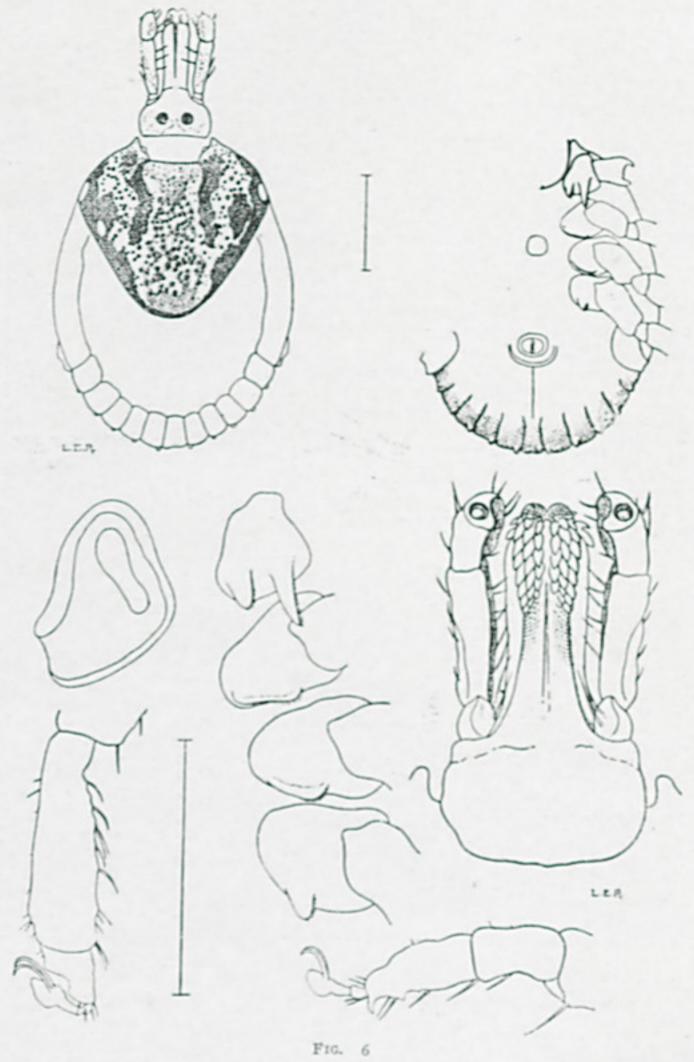
pinhos de pontas desiguais; coxas II e III com espinho saliente ponteagudo, coxa IV com um único espinho curto, rombo e arredondado, pouco mais longo do que largo; festões sempre com pequeno tubérculo no lado ventral, no ângulo póstero-interno."



Amblyomma cajennense, . Escudo, aspecto dorsal e ventral do capítulo, coxas I a IV, tarsos
I e IV (segundo Robinson in "The genus Amblyomma").

Robinson, em sua monografia "The genus Amblyomma" (28), ao descrever a espécie Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) coloca a Amblyomma sculptum Berlese, 1888, em sinonimia. Entretanto recentemente Rondelli (29) admite a possibilidade de ser Amblyomma sculptum considerado espécie afim ou variedade de Amblyomma cajennense. Sugere ainda Rondelli, dada a grande difusão desta última espécie, que o pequeno número de casos de febre maculosa em S. Paulo deva correr por conta da raridade relativa de A. sculptum ou de outra qualquer das pretensas espécies que revalida ou descreve e que poderiam ser os verdadeiros vetores da riquetsiose.

Não nos parece estar a razão com Rondelli, pois ainda almitindo a multiplicidade de espécies, as verificações de infecção e de transmissão até agora feitas não só com outras espécies de Ixodidas do gênero Amblyomma (A. striatum, A. brasiliense e A. cooperi), como com espécies de outros gêneros, Derma-



Amblyomma cajennense, Q. Face dorsal e ventral, aspecto do capítulo, espiráculo, coxas I a IV, tarsos I e IV (segundo Robinson in "The genus Amblyomma").

centor e Rhipicephalus, são demonstrativas de que todas se infetam facilmente e transmitem com muita regularidade a infecção a animais. Do mesmo modo que

Amblyomma cajennense, todas as demais espécies citadas acima transmitem a infecção de estágio a estágio de sua evolução. Desta sorte, parece-nos que pelo menos as espécies citadas do gênero Amblyomma, parasitos dos animais de sangue quente, podem, quiçá indiferentemente, infetar-se e transmitir a riquétsia da febre

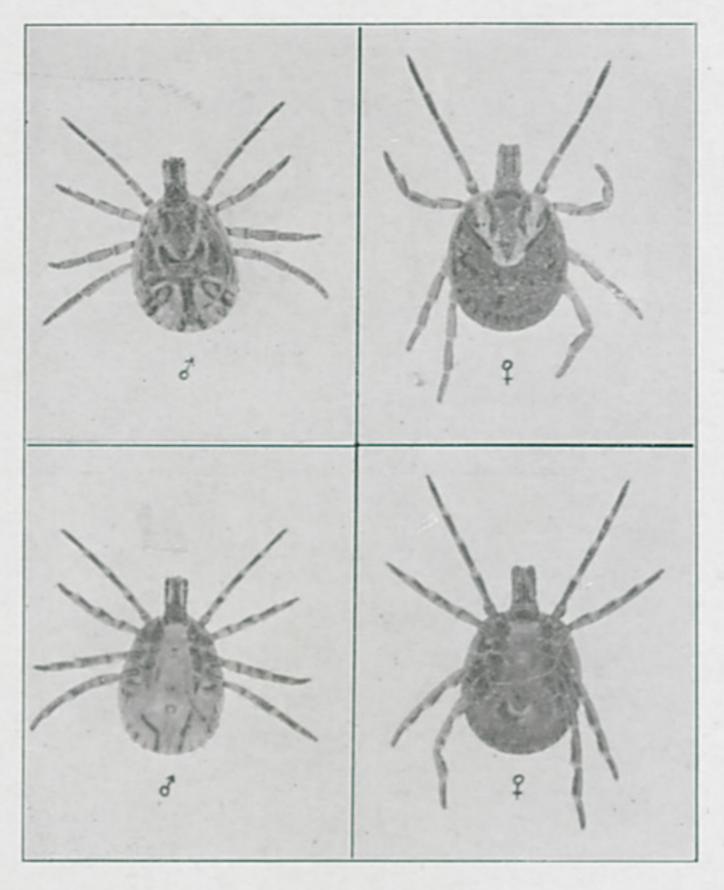


Fig. 7
Exemplares de Amblyomma cajennense, & e Q, face dorsal e ventral.

maculosa. Não podemos, assim, aceitar a sugestão de Ronde Li, que, confundindo um simples índice baixo de infecção natural do Amblyomma cajennense, tal como se dá também com o Dermacentor andersoni nos Estados Unidos, sugere uma "imunidade" para essa espécie em relação à febre maculosa e empresta a uma suposta variedade caraterísticos especiais de infecciosidade e transmissibilidade.

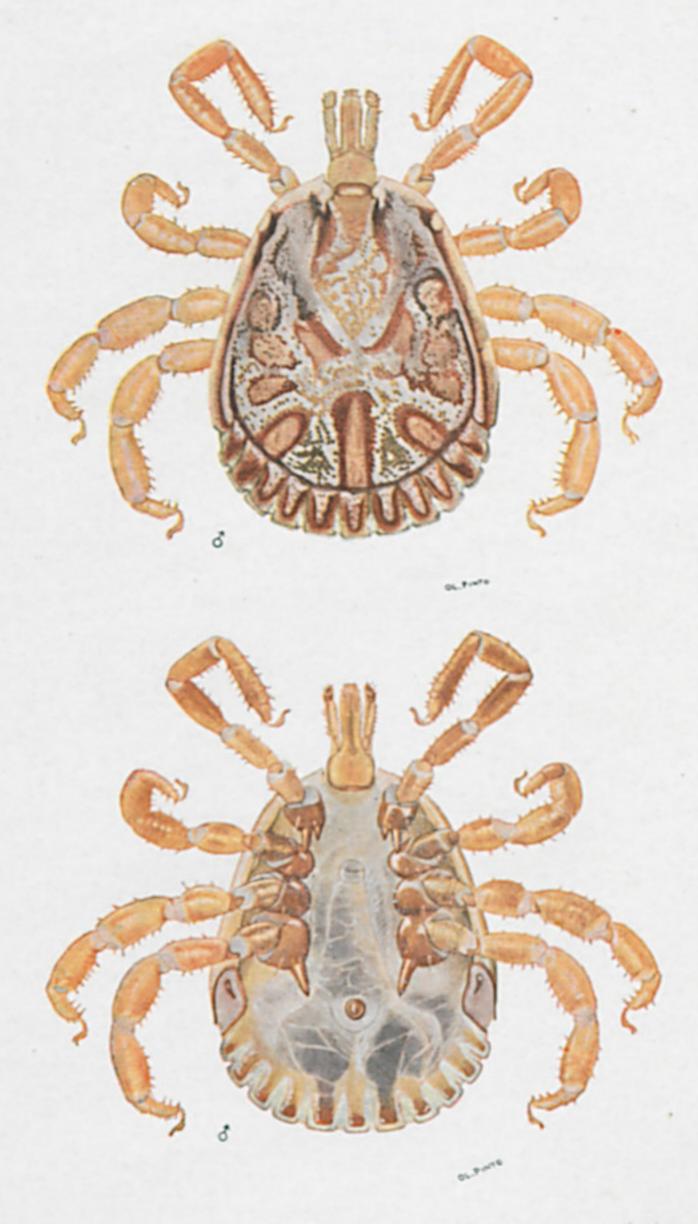


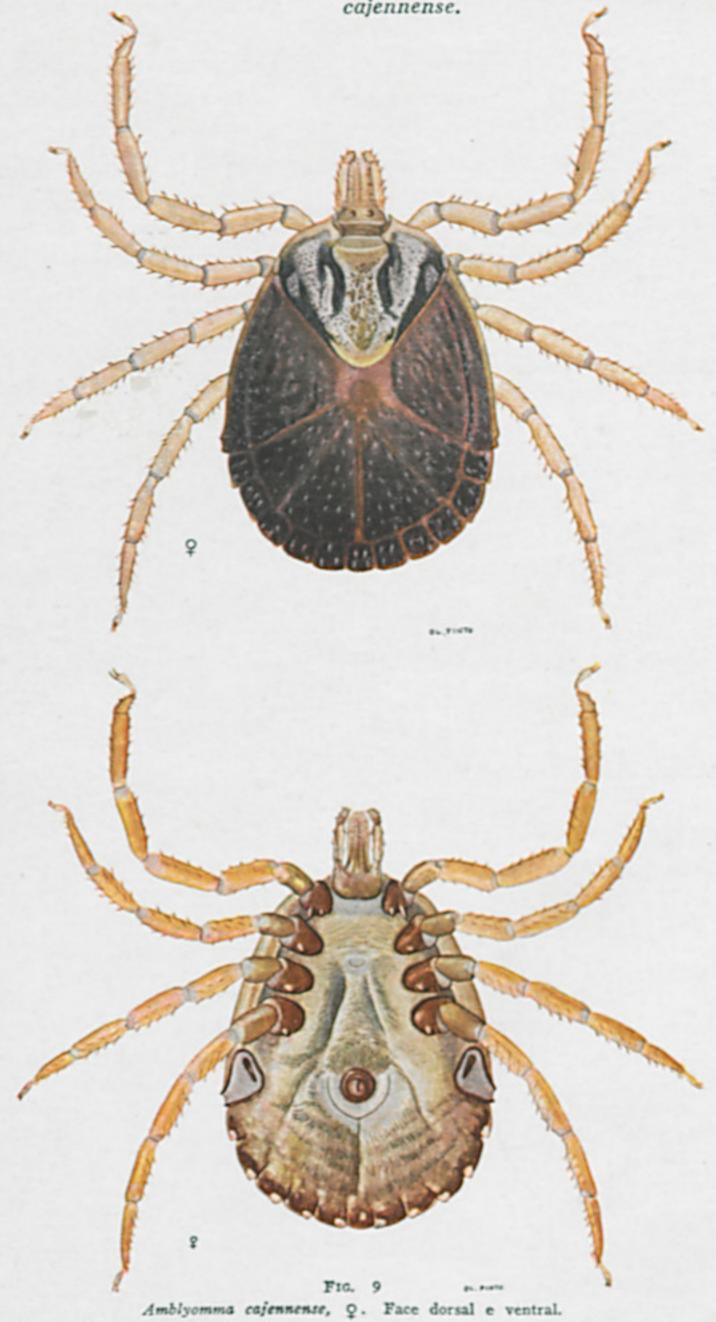
Fig. 8

Amblyomma cajennense, 3. Face dorsal e ventral.

The Thirth of the Committee of the Commi

James e Land of The detail e ventel

J. Travassos & A. Vallejo-Freire — Criação artificial de Amblyomma cajennense.



J. Traverses S. A. Variento-Latin - C. S. F. Traverses de Aleman de 105

Pro. 9
Lesbigarent enforcement, Q. Pros de cal e ventral.

Os dados diferenciais utilizados por Rondelli para justificar a validade destas pretensas espécies, não nos parecem igualmente suficientes; acreditamos mesmo terem sido o resultado de estudos feitos em pequeno número de exemplares, todos conservados. A variação de dimensões entre Ixodidas da espécie Amblyomma cajennense é muito grande, mesmo quando se examinam adultos provenientes de u'a mesma geração de ovos. Temos, por exemplo, largamente verificado que u'a maior ou menor sucção de sangue pelas ninfas de u'a mesma geração tem decisiva influência sôbre o tamanho do adulto correspondente, e naturalmente, sôbre o de partes de sua estrutura, como, por exemplo, o escudo que apresenta modificações de forma e tamanho provavelmente da mesma natureza das que serviram àquela autora para diferenciar as espécies mixtum, sculptum, tapiri e finitimum.

Não cabem aqui argumentações mais extensas a êste respeito. Entretanto, para que não surjam futuras dúvidas sôbre a espécie com que trabalhamos, incluimos propositadamente a descrição dos caraterísticos principais, constantemente encontrados nas muitas gerações de Amblyomma cajennense conseguidas com a finalidade de preparar a vacina e oriundas de fêmeas colhidas em diferentes locais do Estado de São Paulo, inclusive em focos de febre maculosa, onde têm sido encontrados Ixodidas naturalmente infetados. Os desenhos de exemplares adultos vistos pela face ventral e dorsal obtidos de Ixodidas vivos, são aqui incluidos com o fim de orientar e facilitar a sua identificação.

F — AMBLYOMMA CAJENNENSE — CRIAÇÃO ARTIFICIAL

1. Colheita das fêmeas. Fecundação.

A criação artificial do Amblyomma cajennense é feita em nosso laboratório a partir de exemplares adultos fêmeos, obtidos anualmente em grande número nos meses de outubro a março em equinos soltos durante alguns dias em pastagens. Esses Ixodidas são colhidos somente quando bem alimentados, repletos de sangue.

Abolimos ultimamente a prática de iniciar a criação a partir de exemplares adultos capturados quando ainda não alimentados, tal como o faz Parker. Nos laboratórios de Montana, onde a vacina é preparada com o Dermacentor andersoni, a criação artificial tem início, colhendo-se no campo, por meio de uma bandeira de flanela, grande número de exemplares na fase adulta, antes de se fixarem no hospedeiro, portanto, quando as fêmeas ainda não foram fecundadas, nem alimentadas. A fecundação e alimentação se faz ao colocar êsses Ixodidas (machos e fêmeas) em coelhos, por meio de aparelho especial aplicado ao corpo do animal.

Os coelhos utilizados para êste fim são previamente infetados. As larvas provenientes dos ovos das fêmeas alimentadas, já se mostram assim infetadas.

A técnica por nós usada é vantajosa, não só sob o ponto de vista econômico (menor uso de animais de laboratório), como também pelo fato de se obter maior rendimento em fêmeas bem alimentadas e em estado satisfatório para uma perfeita evolução. Este fato está principalmente ligado a dois fatores. Em primeiro lugar, apesar da ubiquidade de seu parasitismo, o Amblyomma cajennense não é, como no caso do Dermacentor andersoni, um carrapato de roedores, pelo contrário, prefere na fase adulta animais de grande porte, especialmente equinos e muares, de modo que a alimentação em roedores (coelhos e cobaias) não é feita de maneira tão rendosa. Em segundo lugar, temos verificado que somente as fêmeas fecundadas alimentam-se de modo satisfatório, o que se processa melhor na natureza. Não trabalhando nesta etapa inicial com larvas já infetadas eliminamos o perigo da manipulação do Ixodida na fase mais perigosa, que exige maiores cuidados técnicos dadas as suas pequenas dimensões.

Constantes verificações feitas em carrapatos parasitando cavalos mostram que a alimentação dos exemplares adultos fêmeos faz-se mais ou menos rapidamente, prolongando-se por 48-72 horas, desde que estejam elas previa ou concomitantemente fecundadas. Os machos procuram em geral as fêmeas quando estas já estão fixadas ao hospedeiro. Somente as que não se mostram em contacto com o macho, podem permanecer fixadas ao cavalo durante vários dias, porém sem que aumentem de volume. Desde que fecundadas, se alimentam completa e rapidamente. Verificamos que os exemplares fêmeos não se alimentam completamente sem que esta condição seja preenchida e que, pelo contrário, a alimentação é sempre rápida e total após a fecundação, não se prolongando geralmente além de 3 a 4 dias.

As fêmeas deverão ser colhidas bem cheias para que desovem a contento. Teoricamente, deveriam ser utilizadas apenas aquelas que após farta alimentação se desprendem espontaneamente dos animais parasitados; na prática, porém, isto é inatingível, devendo-se colher os Ixodidas quando ainda fixos à pele dos cavalos.

Várias pesadas de fêmeas colhidas dêste modo e que foram cuidadosamente observadas quanto ao rendimento da desova, mostram que fêmeas pesando cêrca de 0.5 g já podem ser aproveitadas para início da criação. Deve-se dar preferência, contudo, a fêmeas de maior pêso. Nas colheitas de grande número de fêmeas nos serviços de rotina, são mais freqüentes as de pêso entre 0.75 g a 0.9 g, podendo algumas atingir a mais de 1 grama.

Fixam-se, elas, de preferência, nas regiões mais vascularizadas, como, por exemplo, na parte inferior do animal, no pescoço ou principalmente na face interna e posterior das coxas, onde a epiderme é igualmente menos espêssa.

A colheita de Ixodidas deverá ser cuidadosa. Qualquer lesão poderá ocasionar a morte da fêmea ou a não desova. São principalmente prejudiciais as fraturas do aparelho de sucção, o que pode facilmente acontecer quando se procura por meio de trações bruscas destacar carrapatos fortemente fixados.

As fêmeas quando bem alimentadas, sempre se destacam facilmente. Qualquer auxiliar adquire a prática necessária em pouco tempo, que consiste em fazer manobras suaves de tração no sentido oposto ao da penetração do hipostoma.

Nas observações feitas no decorrer de 1939 sôbre 1.000 fêmeas cheias colhidas por auxiliar inexperto, 94 exemplares (9.%) morreram sem ter iniciado a desova; já na criação de 1942, entre 5.548 exemplares colhidos só no mês de novembro, apenas 308 exemplares (5.5%) morreram ou não desovaram em consequência de defeitos na manobra da colheita. Esta diferença correu, sem dúvida, em parte por conta das precauções tomadas ao destacar os Ixodidas fixados aos cavalos. Seria possível eliminar estas últimas perdas, selecionando as fêmeas bem cheias e desprezando aquelas que ao exame no microscópio entomológico mostrarem lesões do hipostômio.

A época em que Amblyomma cajennense é encontrado na fase adulta, inicia-se nos últimos dias de setembro e pode prolongar-se até fins de março. As larvas, pelo contrário, são mais freqüentes nos meses de maio e junho e as ninfas de julho até setembro. Esses limites não são, entretanto, fixos, pelo contrário, variam largamente nos diferentes localidades do território paulista, variação decorrente, sem dúvida, das diferenças climáticas das respectivas regiões, principalmente das relacionadas com a temperatura e o grau higrométrico. Nas condições de trabalho de criação artificial de Ixodidas em nosso laboratório, êste ciclo se reproduz de maneira aproximada e atingimos a fase adulta dos Ixodidas de nossa criação, quando mantidos à temperatura ambiente, quase sempre nos primeiros dias de setembro.

Os locais em que Amblyomma cajennense é encontrado mais frequentemente são aquêles nos quais abundam equinos e muares e onde, igualmente, são preenchidas certas exigências relativamente ao tipo de vegetação, umidade e temperatura.

Há no Estado de São Paulo algumas plantações de eucaliptos, que reunem de maneira ideal, todas as condições propícias à manutenção e reprodução de grande quantidade de Ixodidas. Uma dessas plantações constitui foco bem estudado de febre maculosa e o local tem mesmo a denominação de "carrapatal", tal a quantidade de Ixodidas, principalmente de Amblyomma cajennense, ali encontrada. Além da sombra relativa proporcionada pelos eucaliptos que permite manter um estado higrométrico favorável, há abundante vegetação ras-

teira e de arbustos, onde a desova das fêmeas faz-se satisfatoriamente; por outro lado, o grande número de muares e equinos usados pelos cortadores de lenha para o transporte, serve de abundante repasto às exigências nutritivas dos carrapatos, de modo a facilitar o seu ciclo evolutivo.

DISPOSITIVOS DE DUPLA PROTEÇÃO PARA A CRIAÇÃO DE IXODIDAS

Após prévia lavagem, seguida de secagem ao ventilador, cada exemplar fêmea é colocado em um dispositivo especial que denominamos "frasco de dupla proteção". Este dispositivo serve para conter os carrapatos em todas as fases evolutivas e consta de 2 tubos, um menor, chamado "tubo de contenção", no interior do qual são colocados os Ixodidas, e outro maior, servindo de continente do primeiro e denominado "tubo de proteção".

O "tubo de contenção" é um cilindro de vidro, medindo 2.5 cm de diâmetro por 3.5 cm de comprimento e aberto em ambas as extremidades. Uma tampa de alumínio perfeitamente adaptável ao diâmetro dêste tubo, mantém fixa numa das aberturas uma tela de organdí, de malhas suficientemente finas para não permitir a passagem das menores larvas. Esta peça de alumínio é perfurada no centro e fixa-se ao vidro — após adaptar o organdí — por meio de uma camada de parafina, que se aplica aquecida e fundida. A outra extremidade do tubo de contenção é fechada por uma rolha de cortiça recoberta com gase. O tubo fechado dêste modo permitirá a fácil aeração pelas aberturas superiores. A fêmea destinada à criação deverá ser colocada sobre a gase que cobre a rolha.

Usamos os tubos de contenção assim preparados preferentemente aos fechados em uma extremidade e abertos na outra, porque as nossas verificações têm evidenciado um retardamento considerável do início da saída de larvas, quando são usados os tubos fechados comuns. Acreditamos que o grau de umidade ótimo, agindo mais diretamente sóbre os ovos, facilite e mesmo ecelere a evolução.

Colocadas as fêmeas nos "tubos de contenção", êstes são guardados no interior dos "tubos de proteção", que medem 9 cm de comprimento por 3.5 cm de diâmetro e são abertos somente em uma das extremidades. Nêste tubo costumamos colocar uma base de areia de 2 a 2.5 cm de altura, que se molha freqüentemente com água e é destinada a manter a umidade requerida pelo Ixodida. A rolha de cortiça do "tubo de contenção" deve repousar na areia e a gase que envolve poderá assim permanecer úmida, transmitindo umidade ao Ixodida. A contínua evaporização da água da areia mantém no interior de todo o tubo de proteção um grau higrométrico ambiente ótimo.

O "tubo de proteção" é obturado na parte superior por meio de um pedaço de organdi fixado nos bordos externos superiores do tubo por uma tira de esparadrapo. Este dispositivo permite u'a maior segurança nas manipulações, bem como facilita a manutenção constante da umidade indispensável à boa evolução do Ixodida; igualmente veda a passagem de algum Ixodida, que por qualquer motivo possa transpor o obstáculo constituido pelo "tubo de contenção".

As indicações sobre data e local da colheita, número de ordem do tubo, bem como quaisquer outros informes, são anotados em ficha especial, onde se registram todos os dados relativos à evolução. No esparadrapo que serve para fixar o pedaço de organdi, ficará anotado apenas o número de ordem correspondente à ficha.

Os frascos de dupla proteção acima descritos, contendo os Ixodidas, são sempre colocados em caixas especiais, que podem receber 42 frascos cada uma. Estas caixas são mantidas em armários de capacidade para 2.100 tubos cada um.

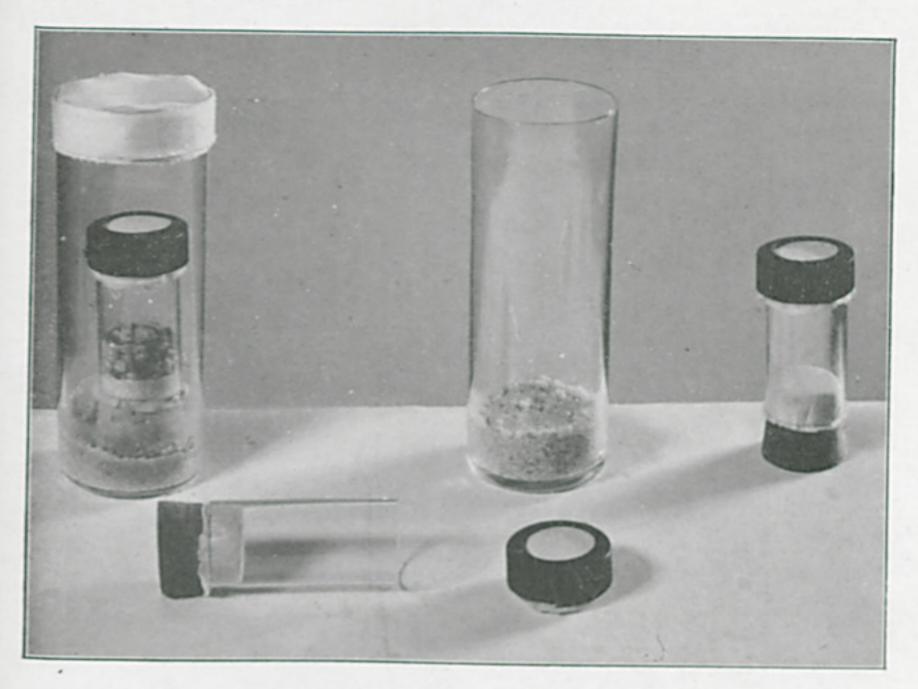


Fig. 10

Tubo de dupla proteção, com o tubo de contenção (menor) e o de proteção (maior).

Apesar da dupla proteção oferecida pelos tubos, o armário, que é de metal para facilitar a limpeza mais rigorosa, repousa em uma bacia que contém solução carrapaticida. Esta precaução impedirá, em caso de acidente, a passagem de carrapatos do armário para o piso da sala.

Todo êste conjunto tem-se mostrado satisfatório para a segurança do trabalho e estas precauções nos parecem de utilidade.

MODIFICAÇÕES NOS APARELHOS USADOS PARA A CRIAÇÃO DE IXODIDAS

Todos os dados sobre detalhes do ciclo evolutivo do Amblyomma cajennense incluidos neste trabalho, foram obtidos em observações de Ixodidas mantidos no nosso tubo padrão de "dupla proteção". Este dispositivo parece-nos bastante prático e os resultados de sua aplicação, sem dúvida, são satisfatórios quando o volume da vacina a produzir não é grande. Si, entretanto, se cogita preparar vacina em maior volume, o que requer como ponto de partida muitos milhares de fêmeas alimentadas e não se dispõe de muito pessoal, é de toda

a conveniência alterar as dimensões do aparelho de proteção e reunir em um só vários "tubos de contenção".

Passamos ultimamente a trabalhar com lotes de 50 a 100 tubos de contenção, colocados em um cristalizador de aproximadamente 10 cm de altura. Nêste cristalizador, que exerce a função do tubo de proteção, coloca-se, igualmente, a base de areia umedecida até a altura



Fig. 11 Armário com Ixodidas,

de 2 cm. Os tubos contendo carrapatos são dispostos sôbre a areia com a parte fechada pela rolha de cortiça voltada para baixo. Com organdí à prova de larvas preso ao bordo superior do cristalizador por meio de esparadrapo, obtem-se a dupla proteção desejada.

Para simplificar o trabalho, juntam-se no mesmo cristalizador somente Ixodidas da mesma fase evolutiva, colhidos num mesmo dia e nas mesmas condições de alimentação. Procedendo-se dêste modo, pode-se prever com certa segurança, qual o momento propício para a alimentação de todos os exemplares contidos no mesmo aparelho de proteção, desde que sejam bem conhecidos os dados referentes aos períodos de tempo necessários à evolução do carrapato nas suas várias fases.

Outro dispositivo frequentemente utilizado é o constituido de um tubo contenedor (A) fechado na extremidade inferior com o tecido de organdí (D) e na superoir com uma rolha de cortiça perfurada no centro, de abertura igualmente protegida com tecido à prova de larvas (E). Este tubo, cilíndrico é identico ou pouco mais longo do que o tubo padrão de contenção e deverá ficar suspenso pela parte mediana por meio de uma rolha de cortiça, que se adapta à parte superior aberta de um outro tubo (B), de diâmetro ligeiramente maior do que o nosso tubo de proteção. No fundo deste tubo coloca-se também a indispensável areia umedecida (C).

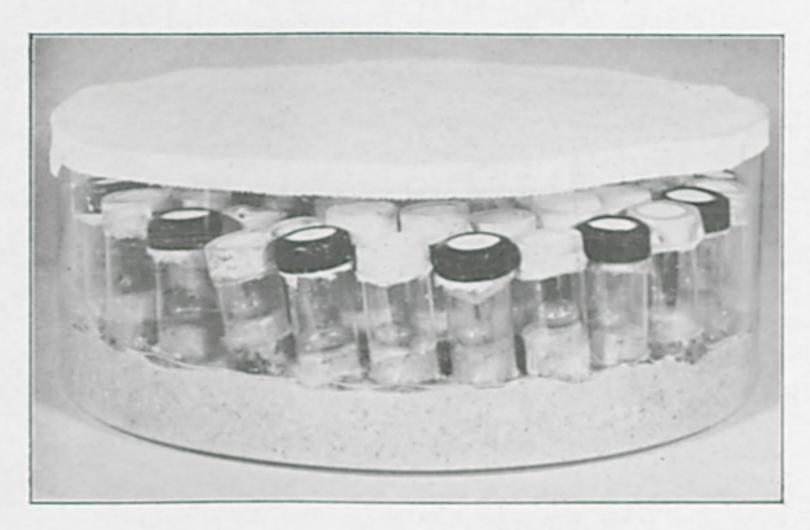


Fig. 12

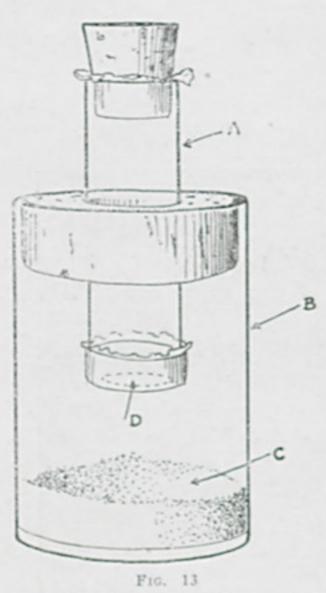
Aparelho de dupla proteção, contendo 100 tubinhos com carrapatos.

Os carrapatos mantidos no interior do tubo cilíndrico menor e, depositados sóbre o organdí, ficam em ótimas condições de aeração e sofrem a influência benéfica da livre passagem da umidade através do tubo de contenção, sem que sejam umedecidos por contato direto.

Aconselhamos, entretanto, utilizar êste modêlo somente quando se estudam Ixodidas não infetados.

Os inconvenientes que podemos apontar contra o uso generalizado deste dispositivo no manuseio de carrapatos infetados, são os seguintes: 1) fornece menor segurança do que o nosso tubo de dupla proteção; este, além da barreira apresentada pelo organdi protetor do tubo de contenção, apresenta novo obstáculo para a saída de Ixodidas, constituido pelo tubo de proteção, fechado com tecido à prova de larvas; 2) facilita na base do tubo de contenção o crescimento de bolores que frequentemente interferem na evolução normal dos ovos dos carrapatos ou das larvas e ninfas cheias; este crescimento se verifica à custa do material nutritivo constituido de detritos, principalmente plasma sanguíneo, que vem ade-

rente aos carrapatos; 3) nas observações muito prolongadas pode acontecer que o organdi venha a se desfazer devido a ação continuada da umidade e ao crescimento de bolores, acarretando a queda dos Ixodidas no interior do tubo maior. A resistência do organdi poderá ser aumentada, embebendo-o de parafina antes de fixá-lo ao tubo de contenção.



A — tubo de contenção; B — tubo de proteção; C — areia umidecida; D-E abertura protegida com organdi.

Nota: Quando, nos cristalizadores de que falamos, se deseja colocar tubos abertos nas duas extremidades, não devem êles ser deixados em contato direto com a areia úmida. Nesse caso, intercala-se entre a superfície da areia e a base dos tubos de contenção uma tela de metal inoxidável, sôbre a qual deverão repousar os tubinhos com os carrapatos.

CÂMARA-ESTUFA PARA IXODIDAS

Colocados os tubos de contenção com Ixodidas no interior dos tubos de proteção, podem éles permanecer ou nos armários já anteriormente citados ou ainda em uma câmara-estuía, de temperatura regulável e umidade constante, de modo a ser possível, quando necessário, apressar a postura e eclosão dos ovos ou facilitar a ecdise de larvas ou ninías.

A câmara-estufa usada para a criação dos Ixodidas é uma sala com 2.20 m de largura, 3.50 m de comprimento e 2.20 m de altura, completamente fechada por meio de caixilhos de vidro. No seu interior há duas estantes capazes de conter 120 caixas de Ixodidas, correspondendo a 5.040 tubos de dupla proteção.

Estas estantes são de metal e construidas de modo a ficar completamente isoladas das paredes solo é mergulhada em bacias escavadas no assoalho,

laterais. A base em que se apoiam ao solo é mergulhada em bacias escavadas no assoalho, centendo solução de carrapaticida.

A temperatura da estufa poderá ser regulada à vontade ou mantida constante pelo aparelho automático conectado a uma série de resistências distribuidas em posição apropriada no interior da câmara. O contrôle da umidade é feito por meio de um higrômetro registrador Zeiss. Um pequeno exaustor colocado na parte superior da câmara regula a aeração de combinação com o aparelho regulador da temperatura. No interior da câmara a temperatura não deve ir além de 26°C. Nossas experiências têm demonstrado, que as temperaturas mais elevadas, si bem que apressem de alguns dias o ciclo evolutivo do carrapato, podem, por vêzes, trazer como conseqüência um menor rendimento da criação, dada a facilidade com que morrem os Ixodidas que permanecem muito tempo expostos a essas temperaturas, tornando-se necessário manter constante e meticulosa vigilância para evitar perdas desastrosas.

A possibilidade de se controlar até certo ponto a ecdise das larvas, é, sem dúvida, da maior importância, porquanto a colheita de carrapatos no campo pode ser feita somente durante um período de tempo relativamente reduzido. Si bem que as fêmeas cheias possam

ser obtidas a partir do mês de setembro até março, a grande maioria é encontrada no curto período de tempo que vai de 15 de dezembro a 30 de janeiro.

Por vêzes, em colheitas satisfatórias chegam ao laboratório num mesmo período de tempo mais de 2.000 fémeas cheias, colhidas em idênticas circunstâncias. Ora, si todas permanecessem nas mesmas condições de temperatura e umidade, as larvas resultantes teriam de ser alimentadas na mesma ocasião, o que seria pouco prático, não só por exigir grande quantidade de pessoal técnico especializado e instalações mais amplas, como principalmente porque precisariamos contar, no mesmo momento, com grande número de coelhos para alimentar todas estas larvas, sem o que seriam perdidas muitas gerações de Ixodidas.



Fig. 14 Cămara-escura para Ixodidas.

2. Postura dos ovos.

Devemos considerar três períodos:

- 1. Período prévio à desova (protóquia).
- Período próprio à desova (cotóquia).
- Tempo decorrido entre o último dia de desova e a morte da fêmea (metatóquia).

Período prévio à desova (protóquia).

1a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

Mantidas as fêmeas de Amblyomma cajennense à temperatura ambiente do

laboratório, a desova tem início 5 a 9 dias após a colheita. As fêmeas observadas nesta nossa 1.ª experiência foram todas colhidas quando ainda fixadas nos eqüinos. Os resultados seriam possivelmente diferentes, si fizessemos a mesma observação a partir de exemplares que espontaneamente se desprendem dos cavalos após a alimentação. A variação dos resultados, entretanto, seria insignificante, pois no momento em que procedemos à retirada das fêmeas cheias, elas estão muito próximas a caír espontaneamente.

As experiências levadas a têrmo nos anos de 1939, 1941-42 e 1942-43 confirmam os dados estabelecidos para o período prévio à desova. Na cria-

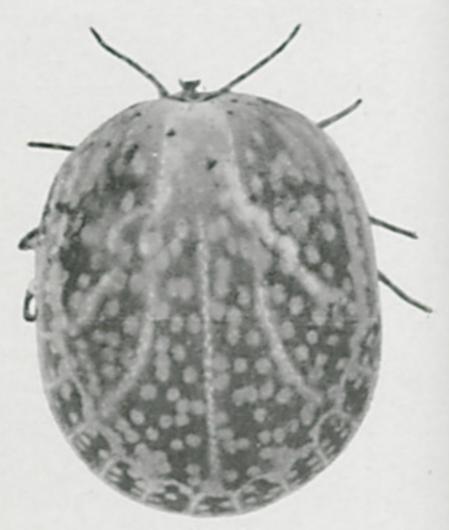


Fig. 15
Amblyomma cajennense, Q cheia.

ção de 1939, por exemplo, fêmeas de Amblyomma cajennense, retiradas de cavalos usados nos serviços do Instituto, constituindo três lotes separados, foram levadas ao laboratório logo após a colheita, colocadas no mesmo dia nos tubos individuais de dupla proteção e mantidas à temperatura do laboratório. Ao todo 301 fêmeas iniciaram a desova, ficando os três lotes usados nesta observação assim constituidos:

1.º loteº 35 fêmeas, colhidas a 17-1-39

2.º lote: 114 fêmeas, colhidas a 14-2-39

3.º lote: 152 fêmeas, colhidas a 1-3-39.

Os	resultados	obtidos	foram	os	seguintes:	
----	------------	---------	-------	----	------------	--

	Periodo	prévio à d (temperatura		óquia)	
Dias -	1.º lote	2.º lote	3.º lote	Total	%
4 5 6 7 8 9	- 21 9 5 -	- 2 87 21 4 -	6 36 34 24 47 5	6 59 130 50 51 5	1.99 19.60 43.18 16.61 16.94 1.66
Total	55	114	152	301	

As médias das temperaturas registradas nos meses de janeiro, fevereiro e março foram as seguintes:

Meses	mědia	média	amplitude	Máxima	Minima
	temp. máx.	temp. min.	média	absoluta	absoluta
janeiro fevereiro março	26.9	17.3	9.7	31.8	12.9
	28.9	17.3	11.6	31.9	15.4
	28.3	17.5	10.8	33.1	15.4

Analisando-se separadamente os resultados das observações em cada lote, que correspondem a carrapatos colhidos em 3 meses diferentes, observa-se que a desova se faz com menor oscilação do período prévio no lote correspondente ao mês de fevereiro, quando entre os dias 5.º e 8.º todos os Ixodidas iniciaram a desova. Nos outros dois lotes, embora a maioria das fêmeas tenha mantido o mesmo período de tempo para início da desova, 5-8 dias, êste, ainda que raramente, foi por vêzes mais precoce ou mais tardio. No conjunto verifica-se que 43.18% das fêmeas iniciou a desova no 6.º dia.

2a. Experiência: Temperatura constante de 26.ºC e umidade relativa de 90%.

Para verificar qual o tempo decorrido entre a colheita e o início da postura de fêmea de Amblyomma cajennense mantidas à temperatura constante e umidade controlada, destacamos um grupo de 464 fêmeas colhidas em condições idênticas às referidas na primeira experiência, entre os dias 15-11 e 15-12. Os tubos de dupla proteção, contendo as fêmeas para desova, foram colocados em nossa câmara de criação de Ixodidas, à temperatura de 26.ºC e o grau de umidade relativo a 90%. Nessa observação, o período prévio variou entre 4 e 12 dias, como se pode ver no quadro abaixo:

Período p	eríodo prévio à desova (Protóquia) temperatura 26°C				
Dias	N.* de ixodidas	%			
4 5 6 7 8 9 10 11 12	3 6 124 214 77 35 3 1	0.64 1.29 26.50 46.12 16.59 7.54 0.64 0.21 0.21			
Total	464				

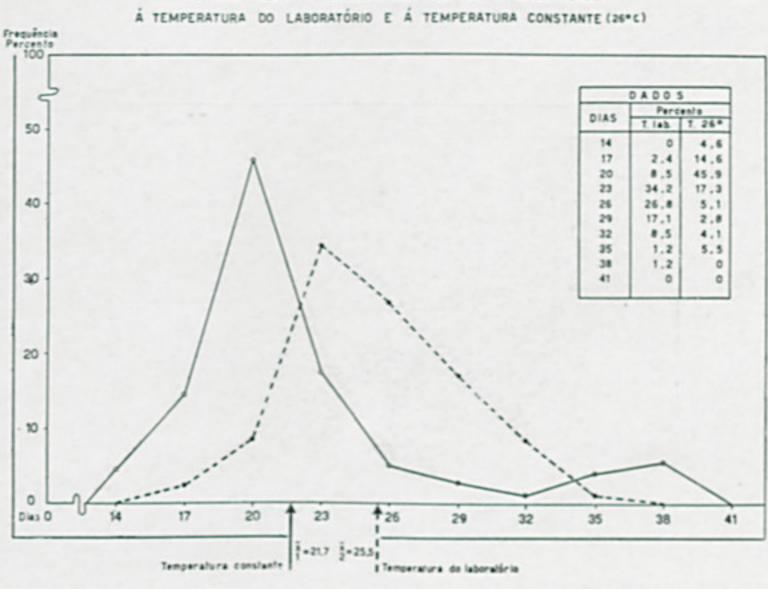
COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS

O gráfico comparativo dos resultados obtidos para o período prévio à desova nas condições das duas experiências (Fig. 16), evidencia que não houve diferença muito acentuada. À temperatura ambiente do laboratório, a curva de freqüência percentual, além de ser semelhante e bem uniforme, antecede de um dia a que representa a de temperatura constante. As médias aritméticas são respectivamente $\overline{X_1} = 6.3$ e $X_2 = 7.6$ dias.

3a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

Uma outra observação mais rigorosamente conduzida foi feita ainda êste ano com 100 fêmeas colhidas num mesmo dia em animais provenientes do mesmo local, selecionados em pêso e tamanhos mais ou menos idênticos e mantidas à temperatura ambiente do laboratório, sempre no tubo de dupla proteção

Período prévio à desova (protóquia) Temperatura ambiente. Início da experiência em 27-2-43			
Dias	N.º de carrapatos		
5 6 7	6 28 38		
8 9 10	8 19 1		
Total	100		



PERÍODO PRÉVIO À ECLOSÃO DE OVOS DE A CAJENNENSE

As temperaturas observadas durante o período da observação foram as seguintes:

Fig. 16

Dias	Temperatura máxima	Temperatura minima	Mědia
27	28.6	17.3	22.9
28	28.7	15.9	22.3
1	28.4	17.0	22.7
2	28.2	15.5	21.9
3	26.9	15.0	20.9
4	28.0	14.5	21.2
5	28.1	14.9	21.5
6	27.5	16.1	21.8
7	26.9	17.2	22.1
8	24.7	16 5	20.6

Nesta última experiência a maioria das fêmeas (38.0%) iniciou a postura depois de decorridos 7 dias da colheita.

É curioso notar que, selecionadas desta maneira, todas as 100 fêmeas tenham iniciado a desova, o que raramente acontece quando não se usam exemplares escolhidos.

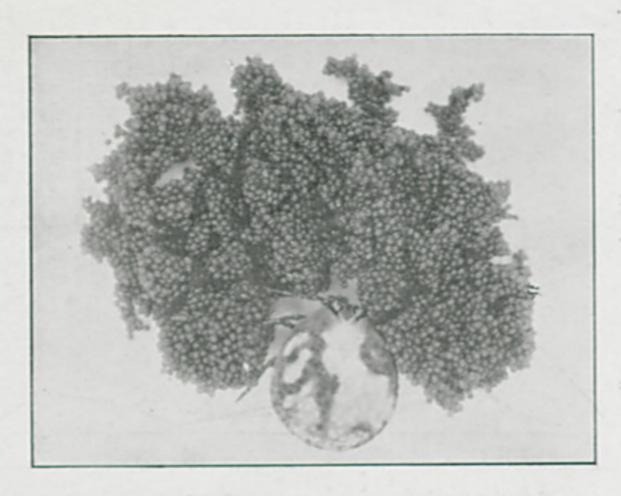


Fig. 17
Amblyomma cajennense, Q em desova.

Vê-se, então, a julgar pelas repetidas experiências feitas com diversos grupos de Ixodidas colhidos numa mesma ocasião, que o período prévio à desova por nós observado é aproximadamente a metade do verificado por Rohr (30) à temperatura ambiente (11 a 13 dias) e Lemos Monteiro à temperatura constante de 28.ºC (9 a 14 dias). Êste fato deve correr por conta das condições técnicas em que são mantidos os carrapatos em nosso laboratório.

Na fase inicial da criação, a umidade é mantida constante no interior dos tubos que contém os carrapatos, umedecendo-se com freqüência a areia colocada no tubo de proteção. Para esta manobra não se torna necessário retirar a gaze que protege a parte superior do tubo de proteção, bastando fazer escorrer a água pelas paredes laterais internas do organdí.

Período próprio à desova (cotóquia)

O período próprio à desova, isto é, o tempo decorrido entre o início e o fim da postura dos ovos, é maior do que o período prévio. A postura pode

prolongar-se por período de tempo variável entre 7 a 26 dias, quando as fêmeas permanecem à temperatura de 26.ºC e de 10 a 32 dias, quando à temperatura do laboratório.

1a. Experiência: Temperatura e umidades constantes.

O período próprio à desova foi observado numa primeira experiência em 448 fêmeas da criação, iniciada com a colheita feita durante o mês de novembro de 1941, tendo-se tido o cuidado de retirar diariamente de junto de cada fêmea todos os ovos postos no dia anterior, juntando-se num tubo de contenção separado. Esta observação, cujos resultados estão resumidos no quadro anexo, foi feita em carrapatos mantidos à temperatura constante de 26°C.

Peri Tempe	iodo próprio à desova (cot ratura 26°C, umidade relat	óquia) tiva 90%
Dias	N.º de Ixodidas	%
7	1	0.22
7 8 9	2	0.45
	11	2.45
10	26	5.80
11	34	7.54
12	89	19.86
13	70	15.65
14	100	22.34
15	61	13.61
16	19	4.24
17	9	2.45
18	3	0.66
19	3	0.66
20	3 3 4 1 9	0.89
21	1	0.22
22	9	2.45
23		
24	3	0.66
25	3 2 1	0.45
26	1	0.22
Total	448	

2a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

O período de tempo necessário à desova do Amblyomma cajennense pode ser maior quando as fêmeas são mantidas à temperatura do laboratório no mês de março. O quadro abaixo resume os resultados da experiência feita em um grupo de 100 Ixodidas, colhidos a 27-2-43:

Dias	N.º de Ixodidas	%
10	dura e uridades con	1.03
11	1	1.03
12	2	2.06
13	1	1.03
14	7	7.21
15	1	1.03
16	1	1.03
17	_	-
18	3	3.09
19	3 5 2 1 2 6	5.15
20	2	2.06
21	1	1.03
22	2	2.06
23		6.18
24	13	13.40
25	17	17.43
26 27	14	14.44
27	7	7.21
28	3	3.09
29	_	-
30	5	5.15
31	4	4.12
32	1	1.03

As médias das temperaturas observadas durante o mês de março de 1943 foram as seguintes:

Média temperaturas máximas 27.6°C

"mínimas 16.0°C

Temperatura média 21.8°C

"máxima absoluta 30.4°C (dia 27)

"mínima" 11.3°C (dia 17)

Amplitude média 11.6°C.

Desta segunda experiência foram excluidos três exemplares, que morreram logo após a postura dos primeiros ovos. Éstes resultados se referem, pois, àquelas fêmeas, que deram uma desova satisfatória, isto é, pelo menos um volume de ovos correspondente à metade do máximo geralmente observado. É de interêsse assinalar que todas as fêmeas, que desovaram somente durante 10 a 15

dias (em número de 13), estavam mortas no último dia em que a desova foi verificada, tendo havido, assim, uma precoce interrupção da postura dos ovos devido à morte da fêmea. Todas as demais, cujo período de desova se prolongou além de 16 dias, morreram somente decorridos alguns dias após o último em que houve desova, como, aliás, se verifica normalmente.

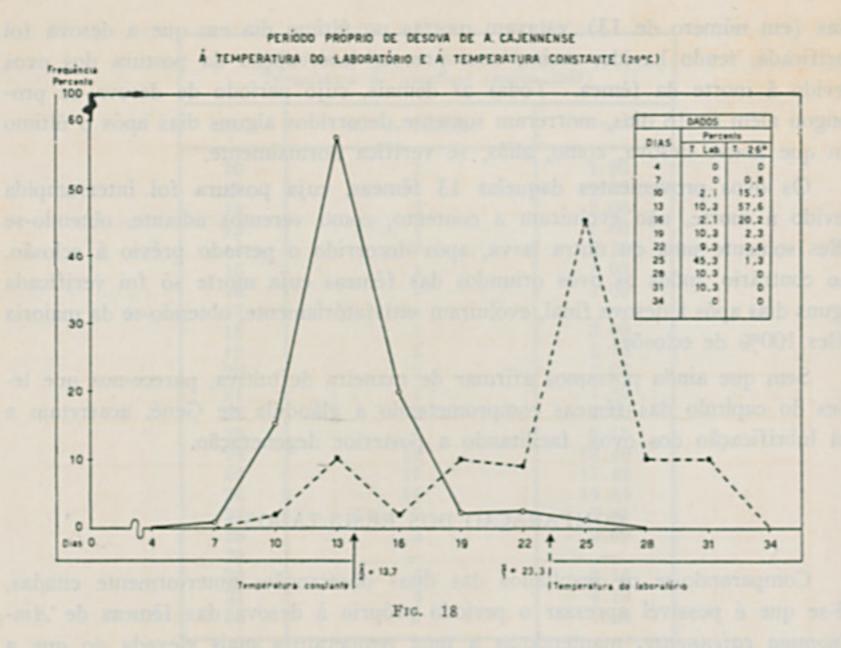
Os ovos provenientes daquelas 13 fêmeas, cuja postura foi interrompida devido à morte, não evoluiram a contento, como veremos adiante, obtendo-se dêles somente uma ou outra larva, após decorrido o período prévio à eclosão. Ao contrário, todos os ovos oriundos das fêmeas cuja morte só foi verificada alguns dias após a desova final, evoluiram satisfatóriamente, obtendo-se da maioria dêles 100% de eclosões.

Sem que ainda possamos afirmar de maneira definitiva, parece-nos que lesões do capítulo das fêmeas comprometendo a glândula de Gené, acarretam a má lubrificação dos ovos, facilitando a posterior degeneração.

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS

Comparando-se os resultados das duas observações anteriormente citadas, vê-se que é possível apressar o período próprio à desova das fêmeas de Amblyomma cajennense, mantendo-as a uma temperatura mais elevada do que a do laboratório (Fig. 18).

A maioria dos Ixodidas mantidos na estufa a 26°C fez a postura dos ovos durante 7 a 19 dias (95%), ao passo que entre os que permanecem à temperatura ambiente do laboratório, 95% fizeram a desova do 7.º ao 30.º dia. Na primeira experiência, 13.7 dias representam a média (X2) do período próprio à desova, enquanto que na segunda X foi igual a 23.3 dias. Há, desta sorte, uma abreviação prática de 10 dias no prazo necessário à postura, mostrando as curvas de frequência u'a melhor distribuição e uniformidade à temperatura constante do que à temperatura ambiente do laboratório. Esta curva até o 21.º dia foi bastante irregular, definindo-se somente após este prazo. Este fato fica bem evidenciado pela comparação das médias. A temperatura constante a média quase coincide com o máximo de frequência, caraterística da curva normal de frequência. A temperatura do laboratório, pelo contrário, a média distanciase sensivelmente do máximo de frequência, o que pode, sem dúvida, servir para confirmar o fato de, no primeiro caso, as condições biológicas terem sido realmente mais favoráveis. Em ambas as condições, o período correspondente às desovas mais rápidas foi sensivelmente igual, isto é, as causas determinantes sôbre a fêmea em desova agiram em períodos idênticos (morte da fêmea). Essa economia de alguns dias, somada à que pode ser feita nos demais períodos do ciclo evolutivo, traz vantagens apreciáveis, pois encurta o tempo de trabalho.



CARATERISTICAS DOS OVOS DE AMBLYOMMA CAJENNENSE

O número de ovos de uma postura atinge alguns milhares e geralmente são tanto mais numerosos, quanto maior é o tamanho da fêmea. No quadro apresentando adiante damos os resultados de quatro posturas observadas cuidadosamente, podendo-se apreciar o número de ovos postos diariamente, avaliados por contagem direta. Tratando-se de experiência realizada em ambiente, cujas temperaturas foram mais regulares e inferiores às das experiências atrás citadas, a desova se processou durante maior número de dias, como é natural.

A desova máxima diária observada corresponde à fêmea No. 4, no seu 5.º dia, com um total de 1.237 ovos.

As desovas em geral foram contínuas para todas as fêmeas, com exceção da fêmea No. 3, que passou o seu 9.º dia sem desovar.

A morte das fêmeas deu-se algum tempo após terminada a postura: duas delas 4, uma 5 e a outra 8 dias depois do término da desova.

A fêmea de maior pêso (960 mg) deu uma postura de 9.830 ovos e a de menor pêso (750 mg), 5.773 ovos.

Os ovos de Amblyomma cajennense em boas condições para a evolução são de forma ovóide e coloração pardacenta brilhante. Quando apresentam côr tendente para castanho escuro, quase negro, perdem aos poucos o brilho caraterístico, tornam-se em pouco tempo menores e encarquilhados e não mais evo-

luem até larvas. Decorridos alguns dias após o início da postura, pode-se observar no interior dos ovos a presença de pequena mancha de côr branca, que, com o correr dos dias, aumenta de tamanho, tornando-se por fim bem visível, mesmo à vista desarmada. Esta mancha é um índice prático da boa evolução dos ovos e da proximidade do início da eclosão. Segundo alguns autores, ela é constituida de guanina, produto de excreção dos tubos de Malpighi, que as larvas posteriormente eliminam, salpicando de branco as paredes do tubo de contenção.

AMBLYOMMA CAJENNENSE

Estudo da desova e evolução dos ovos

Colheita das fêmeas em 12-11-43

Péso em 12-11-43	960 mg	751 mg	767 mg	820 mg	Tempe	raturas
Fêmeas Nos.	1	2	3	4	Máxima	Minima
18—11	20 ovos	sob so	10 30 00	scalo op	23	23
19-11	149 >	- June	69	21	23	20
20-11	103 >	in min	195	95	23	22
21-11	128 »	19	193	391	23	21
22-11	338 >	318	656	533	23	21
23-11	882 »	708	221	1237	22.5	21
24-11	714 »	482	185	353	19.0	18
25-11	643 *	253	604	292	20.0	18.0
26-11	458 »	220	501	360	21	20.3
27-11	412 >	158	0	479	19	16
28-11	105 >	301	420	415	20	16
29-11	885 »	362	552	495	20	17
30-11	741 »	48	786	413	20	18
1-12	494 »	461	610	410	21	18
2-12	672 »	301	494	316	22	20
3-12	344 >	213	344	225	21	19
4-12	318 >	41	179	185	20	19
5-12	228 >	219	252	243	21	19.5
6-12	359 >	266	290	289	22	20.0
7-12	248 >>	176	249	236	22	21.0
8-12	201 »	159	209	142	22	21
9-12	283 *	213	275	245	24.5	21
10-12	210 »	164	218	178	25.0	23
11-12	111 >	120	123	114	25	23
12-12	115 >	162	146	84	25	24
13-12	85 »	179	118	167	26	24
14-12	29 »	42	79	45	26	25
15-12	4 >	114	54	41	25.5	24
16-12	0 ×	51	26	24	25	24
17-12	0 >>	3	21	33	25	23
18-12	0 »	0	0	10	22.5	20
19-12	0 »	0	0	0	21.0	19
20-12	0 >	0	0	0	20.0	20.0
21-12	0 >	+	0	0	20.0	19.5
22—12	+	-	+	+	20	18
Total ovos	9834 »	5753	8069	8071	22,2	20.38
Dias de desova	28	27	29	30		

3. Fase larval — 1.ª alimentação infetante

Eclosão dos ovos de Amblyomma cajennense

a) Período prévio à eclosão.

Terminada a desova, são necessários alguns dias para que os ovos sofram a eclosão e dêm origem às primeiras larvas ou neolarvas. A determinação dêsse período de tempo, que denominaremos período prévio à eclosão, foi feita em duas séries de observações realizadas com várias gerações de ovos de Amblyomma cajennense. A primeira, com ovos de Ixodidas mantidos à temperatura constante de 26°C e umidade relativa de 90%, e a segunda com gerações de ovos que permaneceram à temperatura ambiente do laboratório.

O material utilizado constou de ovos das fêmeas usadas nas experiências anteriormente citadas, coletados diariamente num só tubo de contenção correspondente a cada fêmea. Os resultados serão, pois, relativos à evolução do conjunto de ovos da postura total de cada fêmea, isto é, de ovos depositados durante todo o período próprio à desova; não se referem, portanto, ao prazo real necessário à evolução dos ovos da postura de um mesmo dia. Levamos somente aqui em consideração os resultados do conjunto, devido à sua direta importância para os trabalhos da criação de Ixodidas destinados ao preparo da vacina.

1a. Experiência: Temperatura e umidade constantes.

Duzentas e vinte gerações de ovos mantidos à temperatura constante de 26°C foram observadas na primeira experiência. O início da eclosão se processou entre fins de dezembro e 15 de janeiro. O quadro anexo resume os resultados.

2a. Experiência: Temperatura ambiente do laboratório.

Uma segunda experiência foi feita no corrente ano com 82 gerações de ovos provenientes da desova de fêmeas colhidas no mesmo dia, no mesmo local e mantidas em idênticas condições à temperatura ambiente do laboratório.

A desova começou nos primeiros dias de março, sendo o início da eclosão verificado entre fins de março e princípio de abril. Os resultados foram os seguintes:

	I	eriodo prévio à eclosão	CHI AMIDAS A	
Dias	(A) Temperatura 26°C	(B) Temperatura ambiente (março 1943)	(A)	(B)
	N.º de gerações de ovos	N.º de gerações de ovos		
13	3		1.36	_
14	1	- /	0.45	-
15	. 6	-//	2.77	_
16	· 6 5 9	/	2.27	
17		1/ V	4.69	1.21
18	18	1	8.18	1.21
19	34 26	1 2	15.45	1.21
20 21	41	3 3 8	11.81	3.65 9.78
22	25	8	11.36	13.41
23	9	111	4.09	10.97
27	4	9	1 81	12.19
27 25	5	10	2.27	8.53
26	6	7	2.77	6.09
27	-	5	-	6.09
28	2	5 5	0.99	6.09
29	4	5	1.81	4.87
30		4	-	4.87
31 32	1	1	0.45	1.21 2.43
33	8	2	0.45 3.68	1.21
34	2	1	0.99	1,21
35	1	11 11	0.45	A REPORT
36	9		4.09	1.21
37	too suitatement is a	binds and all the same and	0 45	norm A
Total	220	82	Interview sind	otmaino

As temperaturas registradas durante o período prévio à eclosão dos ovos utilizados nesta experiência foram as seguintes:

março — média temperatura máxima média temperatura mínima 16°C

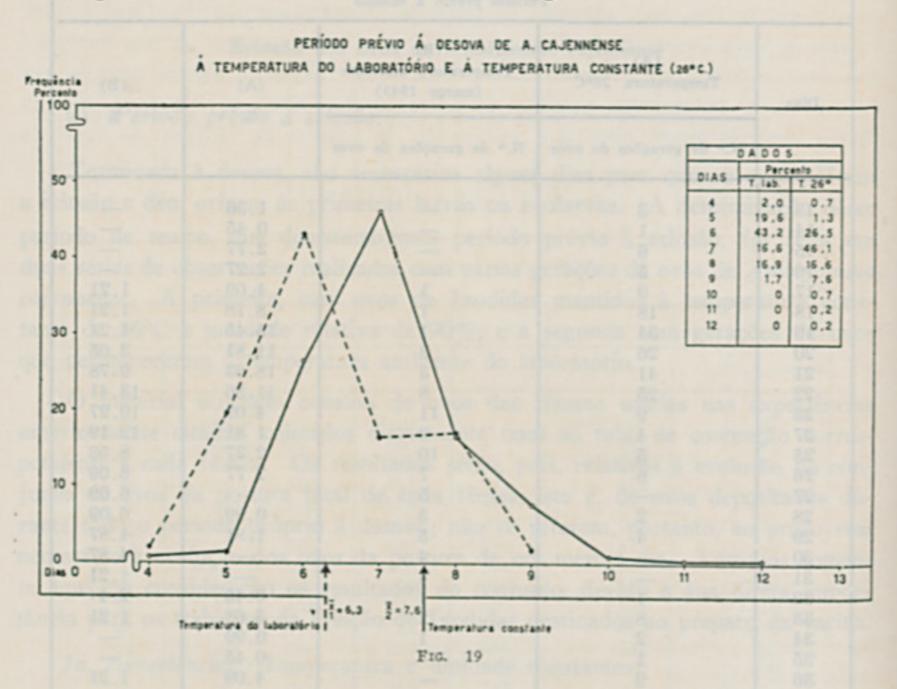
temperatura máxima absoluta temperatura mínima absoluta 11.2°C (em 28.4°C (em 27.3)

abril — média temperatura máxima média temperatura mínima 12.3°C

temperatura mínima 12.3°C

temperatura mínima absoluta 7.9°C (em 28.4°C (em 9.4)

O gráfico comparativo destas duas experiências mostra que a distribuição da frequência em ambas as curvas é bastante regular.



A curva que representa os resultados obtidos à temperatura constante é no seu conjunto mais normal do que a que representa os da temperatura ambiente do laboratório, mostrando, também neste caso, que o período prévio à eclosão à temperatura constante precede de 4 dias o da temperatura ambiente do laboratório nos meses em que a experiência foi feita. A média no primeiro caso foi de 21.7 dias (X₁) e no segundo 25.5 dias (X₂).

b) Período próprio à eclosão.

A eclosão observada em ovos da postura total de uma fêmea, isto é, de toda uma geração de ovos, quando mantidos à temperatura constante de 26°C e umidade relativa de 90% pode se prolongar durante 17 a 23 dias. Na experiência à temperatura ambiente do laboratório, realizada no decorrer dos meses de abril e maio de 1943, com as mesmas gerações de ovos utilizados na experiência anterior, verificou-se que o período próprio à desova foi consideravelmente menor do que naquela em que os ovos permaneceram à temperatura regular de 26°C.

Dias	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Total
(1) tempe- ratura do laboratório	2	6	5	14	14	19	12	5	2		200	120		80	125	m	709	79
(2) tempe- tura a 26°C	100	03				1		94	100	100	1	1	23	108	72	14	1	220

A disparidade observada nos resultados destas duas experiências é apenas aparente ou, então, pelo menos neste caso, os resultados não são comparáveis. Na segunda experiência, executada à temperatura de 26°C, para se julgar o momento correspondente à saída total das larvas, foi levada em conta a separação destas de seus detritos. Isto devido à mobilidade que apresentam as larvas a esta temperatura e à manifesta tendência que têm de subir pelas paredes do tubo de contenção logo após a eclosão, procurando alcançar a parte superior, onde então se agrupam. Verificamos, entretanto, que as larvas, mesmo alguns dias depois da eclosão dos ovos, continuam no fundo do tubo e só alguns dias depois se libertam, afastam os detritos e sobem a parede do tubo de contenção.

O início e o fim da eclosão só poderão ser bem observados com auxílio do microscópio entomológico. A côr dos detritos é apenas um índice prático, porém não exato, do fim das eclosões. Uma observação mais cuidadosa demonstra que a coloração amarelo clara, que apresentam os detritos livres das larvas, não é verificada imediatamente após a saída desta, mas, pelo contrário, só se torna evidente alguns dias depois da eclosão de todos os ovos. No lote de Ixodidas que permaneceu à temperatura ambiente, a observação foi realizada com o auxílio do microscópio entomológico, motivo pelo qual conseguimos surpreender na maioria das vêzes, a saída das primeiras larvas alguns dias mais cedo do que quando observámos à vista desarmada. Com o fim de facilitar ainda mais o exame e torná-lo mais rigoroso, espalhamos os ovos em placas de Petri nos últimos dias da eclosão, não só para verificar as últimas eclosões, como também para avaliar o rendimento ou percentagem de ovos evoluidos satisfatoriamente.

Desta forma, os dados máximos levados em conta na última experiência, sem dúvida mais exatos, diferem grandemente da experiência realizada no ano anterior, cujos resultados evidentemente estão prejudicados. Uma nova experiência somente poderá ser feita no prôximo ano, ao iniciarmos a criação e esclarecerá então melhor a influência da temperatura, tornando comparáveis os resultados das observações.

Percentagens de eclosões dos ovos de Amblyomma cajennense

A eclosão dos ovos, quando mantidos em boas condições, é quase sempre total. Contudo, podem ser verificadas posturas, nas quais só um reduzido número de ovos dão saída a larvas. Em geral, os ovos provenientes de fêmeas que morrem durante a postura, geram ovos que não evoluem satisfatoriamente. A mesma causa que acarreta a morte da fêmea deve ter influência sôbre a viabilidade dos ovos. Acreditamos que as lesões ocasionadas pela retirada defeituosa das fêmeas, quando ainda fixas aos animais, acarretem igualmente o comprometimento de certas glândulas que segregam substâncias impermeabilizadoras dos ovos, substâncias estas, que exercem uma função protetora contra a dessecação durante a evolução normal até a eclosão das larvas.

Quando a evolução dos ovos se faz satisfatoriamente, a eclosão se verifica em 100% dos ovos. Assim, por exemplo, em ovos provenientes de 79 fêmeas mantidas à temperatura do laboratório, obtivemos as seguintes percentagens de eclosões, avaliadas por observação cuidadosa ao microscópio entomológico:

	67	gerações	de ovos	tiveram	eclosão	to	tal (1	00%)	
	2	30 11 101	00 00 99	- ,,	"	de	95%	dos ovos	aproximadamente
	3	"	"	"	"		90%		"
	2	"	"	"	"	"	80%	"	,,
	2	"	"	"	"	,,,	70%		
	1	"	"	"	• "		40%		,,
	2	"	"	"	"		30%		"
	_						aib i		
Total	79								

A eclosão total pode ser praticamente julgada pelo aspecto dos detritos das membranas ou envoltórios dos ovos, depositados no fundo do tubo, junto com a fêmea já morta. Quando todos os detritos têm côr amarelo-creme e não são encontrados resíduos de coloração marron claro, êste caraterístico pode servir de índice prático da eclosão de todos os ovos. As neolarvas se agrupam na maior parte na extremidade superior do tubo de contenção e, uma minoria, na periferia da extremidade inferior, no círculo de contato do tubo com a rolha de cortiça coberta pelo organdí, exatamente onde é maior a umidade.

As neolarvas provenientes de ovos de desovas incompletas não são aproveitáveis para a limentação infetante. Mesmo as oriundas de posturas medianamente volumosas, não devem ser aproveitadas, pois a prática nos tem largamente demonstrado o constante inaproveitamento final, geralmente ocasionado por uma alimentação sempre defeituosa por parte destas neolarvas, mesmo quando colocadas a se alimentarem em momento propício.

Considerações sôbre a evolução do Axblyomma cajennense até a fase de neolarva

Nas experiências anteriores, ao estudarmos a evolução da espécie Amblyomma cajennense, mostrámos as acentuadas variações do número de dias necessários à postura e eclosão dos ovos, verificadas entre diversas gerações de Ixodidas mantidos à temperatura do laboratório.

O total de dias decorridos entre a colheita das fêmeas alimentadas e o final da eclosão não foi, no entanto, muito variável. As variações mais pronunciadas verificadas nos resultados parciais corresponderam quase sempre aos exemplares que não evoluiram a contento ou mesmo não deram saída a larvas, de modo que não foram computados entre as gerações que fizeram evolução completa.

Entre as 79 gerações observadas, os dias requeridos para a completa evolução, desde a colheita das fêmeas até a saída de todas as larvas, variaram entre 64 e 80 dias; a grande maioria (91%) o fez entre o 67.º e 70.º dia. Colhidas as fêmeas a 27 de fevereiro, a eclosão dos ovos estava praticamente terminada entre os dias 5 e 8 de maio.

ab canazao	To						colhe do la								vos.	30	A IDA	A S
No. de dias	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	Total
No. de geração	1	0	1	19	26	19	8	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	79
9/0	1.26		1.26	24 05	32.41	24 05	10 12	1.26		2 53	V-0	200	1.26	7.00	B	00	1.26	9 50

Resumo esquemático da evolução até larva:

Si esquematizarmos, para uma orientação prática, a evolução do Amblyomma cajennense no período que vai da colheita das fêmeas cheias até a eclosão total dos ovos, levando em conta somente o dia em que maior percentagem de Ixodidas completou a evolução correspondente a cada período estudado, teremos os seguintes dados:

P. C.	Pos	tura	Eel	osão	T
Fase	Período prévio	Período próprio	Periodo previo	Período próprio	Total
Dias (Temperatura-laboratório)	7	25	23	12 (*)	67
Dias (Temperatura — 26°C)	7	14	21	20 (*)	63

(*) A comparação entre os resultados obtidos à temperatura do laboratório e à temperatura de 26°C só é possível entre os dados da postura e do período prévio à eclosão, porquanto pelas razões que explicamos atrás, não são comparáveis os números correspondentes ao período próprio à eclosão.

Rendimento

Todos os detalhes relativos à evolução dos Ixodidas que usamos nas experiências anteriores, podem ser analisados no quadro que inserimos no final dêste capítulo. Vemos, desta sorte, que das 100 fêmeas colhidas obtivemos somente 79 gerações de larvas em condições satisfatórias para se proceder à primeira alimentação infetante.

Na experiência feita entre Ixodidas que permaneceram sob a influência da temperatura e umidade sempre variáveis do ambiente do laboratório, as perdas foram assim distribuidas:

- 1. Até o período próprio à desova 18 gerações de ovos
- 2. Até a eclosão 3 gerações.

As 18 gerações de ovos inaproveitados eram provenientes da postura de fêmeas que morreram antes de concluida a desova.

Três exemplares morreram depois de um único dia de desova e os 15 outros quando já haviam desovado durante 10 a 15 dias.

Em quase todos os casos de posturas parciais, os ovos nunca evoluem de maneira satisfatória; não são tão brilhantes, nem de dimensões tão grandes quanto os ovos normais, em poucos dias escurecem, desidratam-se rápidamente, não dando mais saída a neolarvas.

Entre as gerações de ovos das fêmeas que desovaram satisfatoriamente, três não evoluiram a contento, tendo-se verificado a eclosão de apenas raros ovos (1 ou 2 dezenas no máximo). Correspondem êles às fêmeas: No. 33, cujo período próprio da desova foi de 23 dias; No. 43, com desova durante 25 dias, e No. 59, com o mesmo número de dias para o período de desova.

ESTUDO DO CICLO EVOLUTIVO DO AMBLYOMMA CAJENNENSE ATÉ A FASE DA LARVA

Observação de 100 gerações de ovos. Fêmeas colhidas a 27-2-43

			Exp	eriência à	temperat	ura ambi	iente			
Femes No.	Inicio da desova	Protogula Desova Periodo prévio	Fim da desova	Cotoquia Desova Periodo proprio	Inicio - eclosão	Eclosão Periodo previo	Film da eclosão	Eclosão Periodo proprio	Percen- tegens de eclosões	Total de dias
1 2	5-3 7-3	6 8 7	1-4 28-3	27 21	23-4 24-4	22 27	8-5 5-5	13 11	100 100	68 67
1 2 3 4 5 6 7 8	6-3 6-3 7-3	7 [6	28-3 20-3 + 5-4 1-4	14 30 25	28-4 26-4	23 25	8-5 .5-5	10 9	95 100	69 67
6 7	6-3 7-3 6-3	8 6	202	25 24 25 24	25-4 26-4 26-4	23 25 26 25 27	7-5 7-5 6-5	12 11 10	100 100 100	69 69 67
9 10	8-3 6-3	9	20-3 + 31-3	12 25	24-4	24	6-5	12	100	68
11 12 13	9-3 4-3 6-3	7 0 5 7	1-4 30-3 20-3 + 31-3 19-3 + 30-3 20-3 +	10 26 14	23-4	24	5-5	12	100	67
14 15 16	7-3 6-3 5-3	8 7	25-3 5-4	0.1	25-4 23-4	31 18	5—5 5—5 9—5	10 12	100 100	67 67
17 18	6-3 5-3	6 7 6 9 7	30-3 1-4 1-4	24 27 24	26-4 24-4 23-4	27	7	13 13 12	90 100 100	67 71 69 67
19 20 21	8-3 6-3 5-3	7 6	31-3	24 27 24 25 27 22 23 25	23-4	23 22 23 22 27 33	5—5 5—5 7—5 5—5	12 14	100	67
22 23 24	4-3 7-3 6-3	6 5 8 7	26-3 31-3 31-3 19-3 + 1-4	23 25	22-4 3-5 28-4	28	15-5 8-5	13 12 10	100 95 100	69 67 76 70
25 26 27	8-3 5-3 6-3	9 6 7	19-3 + 1-4 (+)	11 27 —	23-4	22	5-5	12	100	67
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33	6-3 6-3 5-3	7 7 6	19—3 + 5—4 31—3 24—3 +	13 30 - 26	25-4 29-4	20 29	7-5 11-5	12 12 12	100 100	- 69 73
31 32 33	5-3 4-3 8-3	6 5 9	31-3	19 32 23	2!-4 28-4	17 28	6—5 (*) 17—5	14	100	68
34 35 36	8-3 5-3 8-3	9 6 9	1-4 5-4 5-4	24 31 28	4-5 25-4 27-4 22-4	34 20 22	5-5 6-5 6-5	13 10 9	90 100 100	80 67 68
37 38 39	6-3 6-3 6-3	7 7 7	1-4 26-3 + 31-3	28 26 20 25 25	22-4 - 28-4 25-4	21 28 25	8-5	14 10	100	68 70 67
40 41 42	6-3 5-3	7 6 6	31-3 4-4 24-3	25 30 19	25-4 27-4 25-4	25 23 32	5-5	10 10 11	100 100 100	67 69 68
43 44	5-3 5-3 8-3	6 9 9	24-3 30-3 1-4 5-4	25 24	28-4 24-4 29-4	19 23 24	6 —5 6—5 7—5 5—5		100 100	68
45 46 47	8-3 5-3 5-3	6 6	5-4 1-4 19-3 + 5-4	28 27 14	24-1	23	5-5	12 8 11 — 13	100	69 67 —
48 49 50	6-3 7-3 6-3	7 8 7	1-4 1-4 31-3 20-3+ 1-4 20-3+ 5-4 1-4	30 25 26	24-1 25-4 25-4 26-4 26-4 26-4 24-4 26-4	20 24 25 23	8-5 7-5 6-5	13 12 10 13	100 100	70 69 68 68
51 52 53	8-3 6-3	9 7	$\frac{31-3}{20-3} + \frac{1-4}{1-4}$	23 14 24	26-4	25	6-5 - 7-5	13 11	100 — 100	69
54 55	8-3 6-3 5-3 8-3	7 6 9	20-3 + 5-4 1-4	14 31 24	26-4 24-4	21 23	6-5 6-5	10 12	100 100	68 68
56 57 58	6-3	7 7	31-3 31-3 30-3	25 25 25 25	24-4	26 24	6-5	10 12	100 100	68 68
59 60 61	5-3 6-3 8-3	6 7 9	30-3 23-3 +	24 15 25	29-4 25-4 22-4 26-4	30 26 —	6-5	11 13	100	68
62 63 64	6-3 6-3 6-3	7 7 7	31-3 30-3 30-3 30-3 23-3+ 31-3 24-3 1-4 26-3 20-3+ 31-3 31-3 4-4 1-4 20-3+ 20-	18 26 20	26-4 25-4 2-5	22 33 24 37	- 5 5 5 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	12 11 9	100 100 100 30	67 70 68 73
65 66 67	6-3 6-3 4-3	7 7 5 9	20-3 + 31-3	14 27 23 30	21-4	21 26	5-5	14	100	67
68 69	8-3 5-3 6-3	9 6 7	31-3 4-4 1-4	30 26	25-4 25-4 26-4	26 19 25	- 5 - 5 - 5 - 6 - 5 - 6 - 5 - 7 - 7 - 8 - 6 - 5 - 7 - 8 - 7 - 5 - 7 - 7 - 7 - 8 - 7 - 7 - 7 - 7 - 7 - 7 - 7 - 7	11 13 10	100 100 100	69 68 68
70 71 72 73	8-3 6-3 6-3	9 7 7	20-3 + 1-4 20-3 +	12 26 14 19	29-4	28	7-5	- 8 - 15	100	69 70
74 75	5-3 5-3 6-3	6 6 7	24-3 (+)	19 24	23-4	30 26	8-5 6-5	15	100 100	-
74 75 76 77 78	6-3	7 7	1-4 1-4 1-4 1-4	24 26 26 26	25-4 2-5 - 21-4 26-4 23-4 25-4 - 29-1 23-1 25-4 25-4 25-4 25-4 25-4 25-4 25-4 25-4	26 27 29 22 29 23	7-5 8-5 5-5	11 9 8 12 7	100 100 100	68 69 70 67
79 80 81	6-3 8-3 6-3	9 7	31-3	24 25	30-4 23-4	29 23 30	7-5 6-5 5-5	13	80 100	69 68
82 83 84	5-3 5-3 5-3	6 6	23-3 31-3 31-3	18 26 26 25	22-4 22-4 25-4	22 25	5-5 6-5	13 13 11	100 100 100	67 67 68
84 85 86 87	6-3 5-3 6-3	7 6 7	31-3 23-3 1-4	25 18 26 27	28-4 23-4 25-4 26-4	28 31 24 25	6-5 4-5 6-5	8 11 11 10	100 100 100	68 66 68
88 89 90	5—3 5—3 8—3	6 9	1-4 30-3 5-4	25 28	25-4		6-5 6-5 6-5	11 8	100 100 100	68
91 92 93 94	7-3 5-3 4-3 4-3	690000000000000000000000000000000000000	23-3 5-4 30-3 23-3	25 28 16 31 25 19 24 23 26 23 22 24	23-4 30-4 23-4 22-4 26-4	26 23 31 25 24 30 26 25 24 29 31	55555555555555555555555555555555555555	12 8 10	70 30 100	68 67 70 64 69 68 69 68 70 69 69
94 95 96 97	6—3 8—3	5 7 9	31-3	19 24 23	25 4	26 25	7-5 7-5 8-5	15 11 12	100 100 80	69 68 69
98 99	5-3 8-3 8-3	6 9 9	1-4 1-4 31-3	26 23 22	25—4 30—4 1—5	24 29 31	8-5	11 12 12 9 7	100 70 40	68 70 69
100	7-3	8	1-4	24	24-4	23	8-5	14	90	69

NOTA: (+) Morte da femea antes do inicio da desova

Interrupção da desova devido à morte da femea

Eclosão de raros ovos; degeneração dos demais.

ESTUDO DO CICLO EVOLUTIVO DO AMBLFOMMA CAMENNENSE ATÉ A

		1-12			
	33.				
				-	

Rendimento da criação em larga escala até a fase de larva

Criação de 1938 — Na criação de Amblyomma cajennense iniciada em 1938 com a colheita de 1.000 fêmeas cheias, perderam-se durante o período aqui considerado 231 gerações, ou seja, 23.10% do total. Morreram antes de iniciar a postura 94 fêmeas (9.4%), possivelmente devido às lesões provocadas na ocasião da colheita; as demais 137 (13.70%) gerações de ovos não aproveitados eram provenientes de posturas médias ou mesmo totais, que não evoluiram satisfatoriamente até a fase de larva.

Criação de 1943 — Para os trabalhos de produção da vacina iniciamos a criação de Ixodidas com a colheita de 5.548 fêmeas de Amblyomma cajennense. Vejamos em resumo qual foi o rendimento até o período de eclosão entre exemplares mantidos até a fase de neolarvas à temperatura ambiente do laboratório.

1.	fêmeas mortas antes de iniciar a postura	308 ou 5.55%
	estavam em boas condições ou somente em número reduzido	497 ou 8.95%
	Total de perdas até eclosões dos ovos	805 ou 14.50%

As restantes, ou sejam 4.743 gerações de ovos, deram praticamente eclosão total dos ovos, isto é, 100% de larvas aproveitáveis.

3. Fase larval — 1.ª alimentação infetante.

Alimentação das neolarvas

Caraterísticas das larvas de A. cajennense: Escudo — Comprimento 0.235, largura 0.336. Muito mais largo do que longo. Sulcos cervicais rasos, longos e mais ou menos paralelos. Superfície lisa, levemente chagrinada, sem pontuação. Capítulo — Comprimento 0.18, largura 0.15. Base curta e larga, com pontas arredondadas dos lados. Superfície lisa, sem pontuações. Palpos longos, com artículos 2 e 3 quase iguais, pêlos finos e em pequeno número. Comprimento total dos artículos II e III cêrca de 0.11. Hipostômio — Curto e alargado na ponta. Dentição 2/2. Comprimento cêrca de 0.086. (Cooley, R. A. & Kohls, G. M. (31)).

Período de espera

Processada a saída de todas as neolarvas, denominação que se dá às larvas não alimentadas, estas sobem pelas paredes do tubo de contenção e se amontoam próximo à abertura superior protegida pelo organdí. Decorridos alguns dias, só resta no fundo dos tubos detritos formados pelos envoltórios dos ovos. Após a eclosão, a côr dêsses detritos, que inicialmente é castanho pouco escuro, clareia aos poucos, apresentando a princípio coloração amarelo sujo e em pouco tempo se transforma em amarelo quase canário. Nessa ocasião, as neolarvas, que ao sair dos ovos são claras e relativamente transparentes, já se apresentam bem mais escuras, o que provavelmente decorre de u'a maior quitinização, não só das patas, como do próprio corpo do carrapato. A intensidade dessa quitinização pode servir de índice prático para julgar qual o momento propício à alimentação. Quando a quitinização é verificada em 100% das neolarvas, a mobilidade destas é sempre acentuada e, si colocadas a se alimentarem em coelhos, o fazem de maneira constante, colhendo-se ao fim de 8 dias elevada percentagem de larvas cheias; o contrário, quando ainda restam muitas larvas se quitinizarem, o rendimento em larvas cheias nunca é satisfatório.

O exame da intensidade de quitinização das patas das larvas deverá ser feito com auxílio de uma lente de aumento médio, não sendo para isso necessário tirar o tubo de contenção do interior do tubo protetor. Orientando-nos dêste modo, temos obtido o máximo aproveitamento dos animais usados para a alimentação das larvas.

Após repetidas experiências concluimos que o período de tempo que se deve deixar transcorrer entre o fim da eclosão e a alimentação das neolarvas, que permanecem à temperatura ambiente do laboratório durante os meses de maio e junho, deve ser no mínimo 32 dias. A escolha deve recair de preferência no 38.º ao 40.º dia, mesmo quando, devido à espera prolongada, uma pequena parte das neolarvas morra antes de chegado o momento de colocá-las nos coelhos. E' sempre preferível agir assim, pois o rendimento obtido é sempre maior neste caso do que si colocarmos a se alimentarem larvas quando ainda não aptas a picar.

O período de espera pode ser prolongado satisfatoriamente, si as neolarvas forem mantidas à temperatura mais baixa (entre 14.º e 16.ºC), o que retarda a atividade metabólica do Ixodida, enquanto se aguarda a possibilidade de proceder à sua alimentação.

Para esta última exigência possuimos uma geladeira especial, regulada à temperatura conveniente, na qual pode permanecer grande número de caixas com vidros de proteção repletos de larvas, aguardando o momento da alimentação.

Técnica para alimentar as neolarvas

É com a alimentação das neolarvas que verdadeiramente se inicia a criação artificial dos Ixodidas. Esta fase é das mais delicadas, pois que de cada fêmea se obtêm em média 7.000 ovos e, portanto, 7.000 larvas. Em consequência da quantidade e da diminuta dimensão destas, foi necessário aperfeiçoar uma técnica que permitisse, não só bem aproveitar os animais que vão servir para alimentá-las, como também que fornecesse perfeita segurança durante o trabalho.

Preparo dos coelhos

Inoculação infetante. — Coelhos de pêso não inferior a 2.5 quilos são inoculados por via peritoneal com virus da febre maculosa. Para estas inoculações
utilizam-se 2-a 5 cm³ de sangue dos cobaios que servem para manter as diferentes
amostras de virus no laboratório, por meio de passagens em série, feitas de cobaia
a cobaia, por inoculação peritoneal. A sangria deverá, ser feita durante a reação
febril do animal, preferivelmente no 2.º ou 3.º dia de reação térmica, quando se
deve verificar a esterilidade do sangue por semeadura em meios aeróbios e anaeróbios. Quatro a cinco dias após a inoculação, os coelhos podem ser preparados
para o serviço de alimentação das larvas.

Colocação dos saquinhos protetores. - Verificada a predileção das larvas de Amblyomma cajennense a se fixarem na orelha dos coelhos, onde se alimentam melhor e mais facilmente, resolvemos aproveitar esta circunstância para obter um alto rendimento. Com esta finalidade preparamos uma espécie de cartucho ou cilindro de organdi de dimensões que permitam conter com certa folga as orelhas dos coelhos (*). Estes cilindros ou cartuchos, após introduzida a ore-Iha no seu interior, são fixados na cabeça do coelho, em torno da base da orelha por meio de esparadrapo. Com o fim de facilitar a adesão do esparadrapo, retiram-se os pelos em torno da inserção do pavilhão auricular por meio de máquina de cortar cabelo, navalha ou mesmo usando qualquer depilatório (a). A fixação do cilindro de organdi na base das orelhas do coelho deverá ser feita de modo a não dificultar a circulação sangüinea. Uma tira de esparadrapo de 1.5 cm de largura deve prender inicialmente na cabeça e de forma circular subir até atingir a base do cilindro, de modo que uma volta do esparadrapo se venha sobrepor à metade superior da volta anterior, fechando-a por fim na base (b).

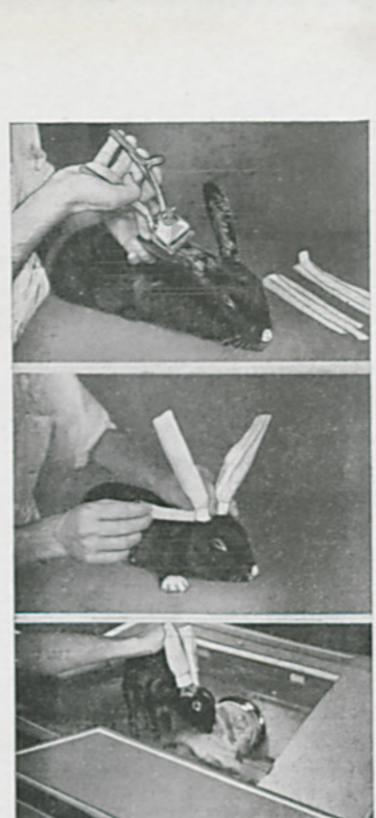
Fixação no interior das mesas de manipulação. - Colocados os saquinhos protetores, os coelhos são levados às mesas (**) de manipulação de Ixodidas (c), onde podem ser fixados em bandejas apropriadas, cuja parte mediana tem uma excavação em forma de meio cilindro longitudinal, servindo para conte-los e imobilizá-los por meio de fixadores armados de faixas de pano. Estes fixadores podem moverse longitudinalmente, deslisando sobre frisos dispostos paralelamente ao longo do meio cilindro excavado (d).

Uma toalha branca, tendo no seu terço anterior um corte suficientemente grande para permitir a passagem das orelhas do coelho, cobre todo o animal e evita que durante a manobra de colocação das neolarvas, estas possam vir a espalhar-se nos pelos do coelho, acautelando-nos, assim, contra a possivel dispersão de Ixodidas (e, f).

Colocação das neolarvas. - Cada coelho adulto, de peso não inferior a 2.5 quilos, pode servir para a alimentação infetante de larvas resultantes da desova de quatro femeas; em cada orelha são colocadas em media 14.000 neolarvas, isto e, o produto de quas gerações de ovos de Ambiyomma cajennense.

Coelhos de peso inferior, que geralmente não resistem a intecçao, não suportam tão grande número de neolarvas.

Imobilização das neolarvas. - Os tubos de contenção cheios de neolarvas são retirados do interior dos tubos de proteção e depositados na mesa de trabaino depois de permanecerem alguns minutos na geladeira. E naturai que a temperatura ambiente do zaporatorio, principalmente nos dias de verao, a mobilidade das neolarvas seja bastante grande, o que dificulta o trabalho de colocá-las nas oreinas dos coemos. Pela ação do 1710 Heam imobilizadas, simpaticando o manuseio.



b

C

d







^(*) Ressaltamos aqui a importância da escolha do tecido usado no preparo destes saquinhos ou cartuchos. É indispensável que as malhas do tecido não permitam a passagem das larvas, e não sejam tanibem demasiado apertadas, de modo a dificultar a aeração.

^(**) Adiante descreveremos as mesas de manipulação de Ixodidas.



Distribuição. — A colocação dos Ixodidas na parte interna do pavilhão auricular, envolto pelo saquinho protetor de organdi, é facilitada pelo uso de um funil de vidro ou mesmo um cartucho de papel; as neolarvas, primeiramente depositadas no receptáculo do funil, são, com o auxilio de uma espátula fina, manejada com precaução, levadas para o interior do pavilhão auditivo do coelho (g).

Terminada esta manobra, a abertura superior do saco protetor de organdi é fechada, dobrando-se a extremidade duas vêzes e obturando-a com esparadrapo (h). As neolarvas, que acidentalmente tenham caído na toalha, são facilmente visiveis e podem ser retiradas por meio do tubo coletor de carrapatos, ligado ao aparelho de vácuo facilmente manuseado pelo auxiliar (i). (Por ocasião da descrição dos detalhes técnicos acêrca da colheita de larvas cheias descreveremos o tubo ou aparelho de coleta). Esta última manobra é quase sempre desnecessária quando se usam Ixodidas previamente imobilizados pela permanência durante alguns minutos à baixa temperatura.

Retirado o pano que cobre o coelho, este pode ser desamarrado e manuseado sem perigo, fóra da mesa de proteção (j).

Proteção das orelhas dos coelhos. — Os saquinhos contendo as larvas são protegidos contra as tentativas feitas pelo coelho para retirá-los, por meio de um aparelho de couro, que permite o fácil arejamento através de duas fendas laterais (k). As fendas laterais são igualmente protegidas por meio de tela de arame fino.

O aparelho protetor é constituido de um cilindro de couro, medindo 15 cm de altura por 1 cm de diàmetro que permite conter as duas orelhas. A parte inferior do cilindro é fixada a uma faixa circular, também de couro, destinada a bem se adaptar à cabeça do animal, servindo de apóio às duas correias que a fixam abaixo do pescoço por meio de uma fivela que as ajusta perfeitamente. Desta mesma faixa circular parte posteriormente uma fita, também de couro, tendo na porção terminal um cinta com fivela para prender o aparelho ao corpo do coelho, atrás dos membros anteriores (k). Na parte superior mediana da fita acima referida, existe um botão de pressão, cujo negativo está colocado no cilindro de couro, de modo a poder fixá-lo no seu terço superior, dando ao mesmo tempo uma inclinação conveniente à perfeita posição das orelhas, sem prejudicar a circulação sangüinea.

Permanência no biotério. — Os coelhos, com as orelhas assim protegidas, são levados para os compartimentos isolados do biotério, onde permanecem durante todo o período da alimentação infetante das larvas (1). Deverão éles ser revistos duas vêzes por dia pelo menos, para controlar a perfeita adaptação dos aparelhos de proteção e tomar as medidas aconselhadas no caso de saída de Ixodidas.

Pelas nossas observações podemos afirmar que, bem conduzida esta técniea, são raras as vêzes em que as larvas são encontradas fóra das orelhas, no corpo do coelho ou nas paredes do biotério e mesmo assim, quando isto acontece, é somente com metalarvas, isto é, larvas já alimenatdas, apresentando, por conseguinte, pouco perigo para o serviço. São mais facilmente visíveis e pouco móveis, além do que, estando já bem alimentadas, não têm mais tendência a picar.

Biotérios

A riquétsia, agente etiológico da febre maculosa é incultivável nos meios artificiais de cultura; sua reprodução só é possível em presença de tecido vivo e se processa no interior das células vivas. O meio mais fácil usado nos trabalhos experimentais para manter e reproduzir êste material virulento, ainda é a inoculação seriada feita em animais sensíveis. Desta sorte, torna-se indispensável, quer para os trabalhos de rotina, quer para os de investigação, usar um grande número de animais (cobaias, coelhos), mantidos em rigorosas condições e procurar dentro do possível afastar as causas de erro que possam influir no julgamento das reações apresentadas. Nas experiências ou mesmo nas inoculações rotineiras dos trabalhos de febre maculosa, os animais de prova têm de ser mantidos no interior dos laboratórios, sob contrôle imediato dos técnicos e sem qualquer contato com o exterior. Devido a êste fato, tornou-se indispensável construir biotérios apropriados, que permitissem a manutenção, em condições satisfatórias, dos animais durante o período de observação, obedecendo a requisitos práticos:

- a) comportar grande número de animais no menor espaço possível;
- b) possuir compartimentos separados, de modo a isolá-los.
- c) contar com proteção eficiente contra possíveis acidentes devidos a defeitos nos aparelhos usados para manter os Ixodidas colocados aos animais;
- d) permitir fácil limpeza.

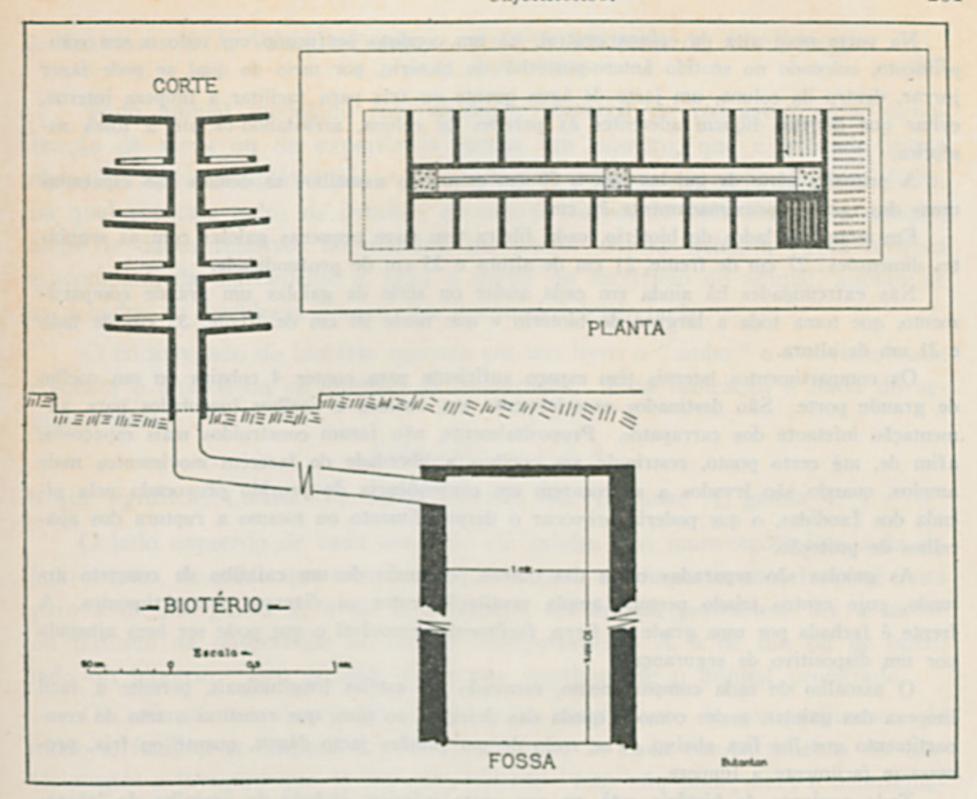
Em obediência a êstes princípios básicos, idealisamos e fizemos construir biotérios, que, a nosso ver, preenchem perfeitamente as exigências requeridas nos trabalhos desta natureza.

Foram construidos no interior do laboratório três biotérios de concreto armado: dois para pequenos animais e um para animais de maior porte.

Descreveremos apenas os biotérios destinados aos animais de pequeno porte (coelhos e cobaias). O biotério para animais maiores é do mesmo tipo e obedece às mesmas caraterísticas, variando apenas no número e nas dimensões dos compartimentos.

Descrição dos biotérios

Os biotérios para coelhos e cobaias constam de um conjunto de gaiolas dispostas em 4 fileiras e apoiadas em uma coluna retangular central, cujo interior ôco, ligado aos condutos de esgotos, serve para a passagem dos detritos (dejetos, restos de alimentos ou, acidentalmente, carrapatos), que são assim levados para a fossa asséptica, situada fora do edifício.



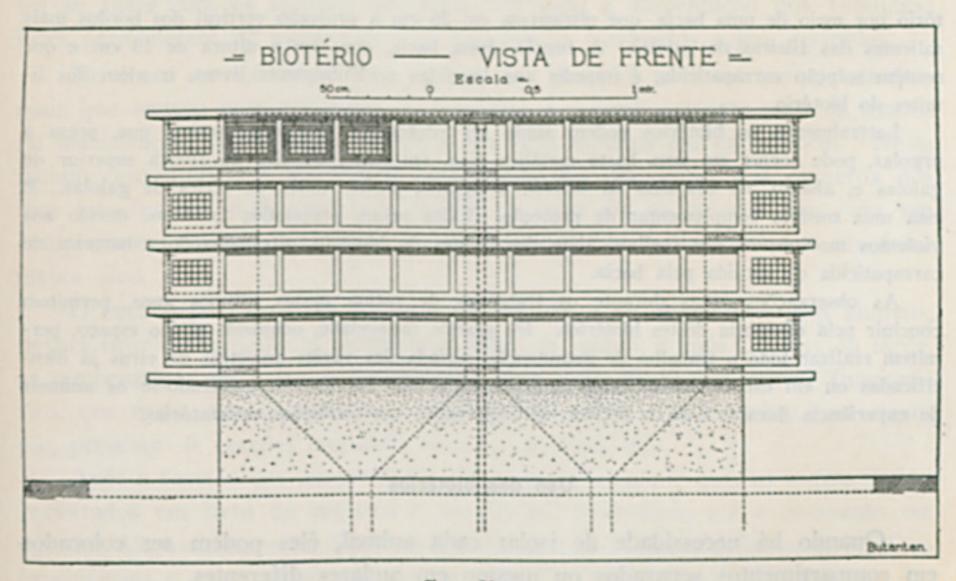


Fig. 21-a Planta do biotério para pequenos animais.

Na parte mais alta da coluna central, há um conduto perfurado em todo o seu comprimento, colocado no sentido ântero-posterior do biotério, por meio do qual se pode fazer jorrar, dentro da coluna, um jacto de água quente ou fria para facilitar a limpeza interna, evitar que detritos fiquem aderentes às paredes da coluna, arrastando-os até a fossa asséptica.

A primeira série de gaiolas fica a 70 cm acima do assoalho; as demais são espaçadas umas das outras aproximadamente 35 cm.

Em ambos os lados do biotério, cada fileira tem nove pequenas gaiolas com as seguintes dimensões: 27 cm de frente, 21 cm de altura e 35 cm de profundidade.

Nas extremidades há ainda em cada andar ou série de gaiolas um grande compartimento, que toma toda a largura do biotério e que mede 90 cm de frente, 35 cm de lado e 21 cm de altura.

Os compartimentos laterais têm espaço suficiente para conter 4 cobaias ou um coelho de grande porte. São destinados especialmente aos cobaios e coelhos inoculados para alimentação infetante dos carrapatos. Propositalmente, não foram construidos mais espaçosos, afim de, até certo ponto, restringir aos coelhos a liberdade de fazerem movimentos mais amplos, quando são levados a se coçarem em conseqüência do prurido provocado pela picada dos Ixodidas, o que poderia provocar o desprendimento ou mesmo a ruptura dos aparelhos de proteção.

As gaiolas são separadas umas das outras por meio de um caixilho de concreto armado, cujo centro telado permite ampla ventilação entre os diversos compartimentos. A frente é fechada por uma grade de ferro, facilmente removível e que pode ser bem ajustada por um dispositivo de segurança.

O assoalho de cada compartimento, escavado em estrias longitudinais, permite a fácil limpeza das gaiolas, assim como a queda das dejeções ao piso, que constitui o teto do compartimento que lhe fica abaixo. Por meio de um simples jacto dágua, quente ou fria, processa-se facilmente a limpeza.

Todo conjunto do biotério está, na sua parte inferior, isolado do assoalho do laboratório por meio de uma bacia, que ultrapassa em 25 cm a projeção vertical dos bordos mais salientes das fileiras de gaiolas. A função desta bacia, que tem a altura de 10 cm e que contém solução carrapaticida, é impedir aos Ixodidas acidentalmente livres, ir além dos limites do biotério.

Lateralmente, os biotérios podem ainda ser protegidos por uma cortina, que, presa a argolas, pode correr em uma haste metálica fixa, em cima, no alto da fileira superior de gaiolas e, abaixo, no assoalho da última, atingindo, assim, todas as séries de gaiolas. É esta uma medida complementar de proteção. Evita sejam projetados Ixodidas, devido aos violentos movimentos dos coelhos, além dos limites do biotério, ultrapassando a barreira de carrapaticida constituida pela bacia.

As observações feitas durante os trabalhos de rotina nestes últimos anos, permitem concluir pela eficiência destes biotérios. De grande capacidade, ocupando pouco espaço, permitem realizar todo o trabalho de manutenção seriada das várias amostras de virus já identificadas ou em estudo, assim como a alimentação dos carrapatos, mantendo-se os animais de experiência durante todo o período de observação em condições satisfatórias.

Uso dos biotérios

Quando há necessidade de isolar cada animal, êles podem ser colocados em compartimentos separados ou mesmo em andares diferentes.

Todo animal inoculado com qualquer material de passagem para manutenção de virus ou de experiência recebe um número, que é gravado numa chapa metálica, adaptável às orelhas. A êste número corresponde uma ficha, na qual constam todos os detalhes do animal fornecido pela Seção de criação, além de dados relativos ao material inoculado. Nesta ficha, a curva térmica é acompanhada diariamente e, após a morte ou sacrifício do animal, anotam-se os achados na necrópsia com a sua eventual interpretação.

O encarregado do biotério registra em um livro o "andar" e a divisão onde colocará o animal ou os animais já numerados. Esta indicação é dada do seguinte modo:

Cob. 2850 - 1 A 4

o que significa: Cobaia No. 2850, biotério No. 1, andar A, gaiola 4.

O lado esquerdo de cada conjunto de gaiolas tem numerações iguais às do lado direito, de modo que a mudança diária para o compartimento limpo é feita para a mesma gaiola A 4 do lado oposto. O animal permanece até a morte ou término da observação no mesmo compartimento A 4 de um ou de outro lado do biotério. Isto permite encontrar rapidamente o animal procurado.

Os animais em observação são trocados diariamente de compartimento, de modo a facilitar a limpeza e perfeita secagem de cada compartimento do biotério após a lavagem que se faz pela manhã. Isto não pode, nem é aconselhável se fazer com os animais que estão servindo à alimentação dos Ixodidas; êstes permanecem na mesma divisão até que os carrapatos sejam retirados.

No nosso serviço dispuzemos de um dos biotérios exclusivamente para animais que servem para alimentar os Ixodidas e o outro somente para os usados na manutenção das amostras de virus ou para animais em experiência. Neste último caso usamos a ala direita do biotério nos dias pares e a esquerda nos dias impares, de modo que pela manhã de cada dia os animais vão para um compartimento limpo, praticamente esterilizado com água quente e absolutamente sêco.

O encarregado do biotério, além da limpeza e da alimentação dos animais, deverá tirar diariamente, a partir de 8 horas da manhã e após 2 horas da tarde, as temperaturas de todos os animais, no que é auxiliado por outros funcionários, que nessa ocasião verificarão qualquer anomalia notada, como, por exemplo, presença de reações escrotais, escaras cutâneas, etc.

Após a tomada das temperaturas, são elas, juntamente com os outros dados, registrados em livro de registro e nas fichas individuais até o momento em que um dos assistentes da Seção, verificando o movimento geral, controlará as experiências e eventualmente mandará repetir a tomada das temperaturas, determinará os animais a sacrificar, suspenderá a observação de alguns, verificará as lesões evidenciadas na necrópsia ou fará passagens de virus.

Sala dos biotérios

A sala em que estão dispostos os diversos conjuntos de gaiolas tem dois exaustores, que esgotam o excesso de umidade e arejam o ambiente. Isto é principalmente necessário nos dias quentes de verão, em consequência da grande superfície de evaporação das bacias e do grande número de animais alí contidos.

As paredes e o teto da sala de biotérios deverão ser preferivelmente ladrilhados ou pintados a óleo, de modo não só a facilitar a limpeza diária, como evitar o crescimento de cogumelos em consequência da umidade alí mantida.

Nas experiências que requerem observações durante longos períodos de tempo, tanto as cobaias como os coelhos se ressentem da permanência muito prolongada no biotério; nesse caso precisamos intervir e reforçar a alimentação, juntando à ração diária alimentos frescos, óleo de figado de peixe contendo vitaminas A e D.

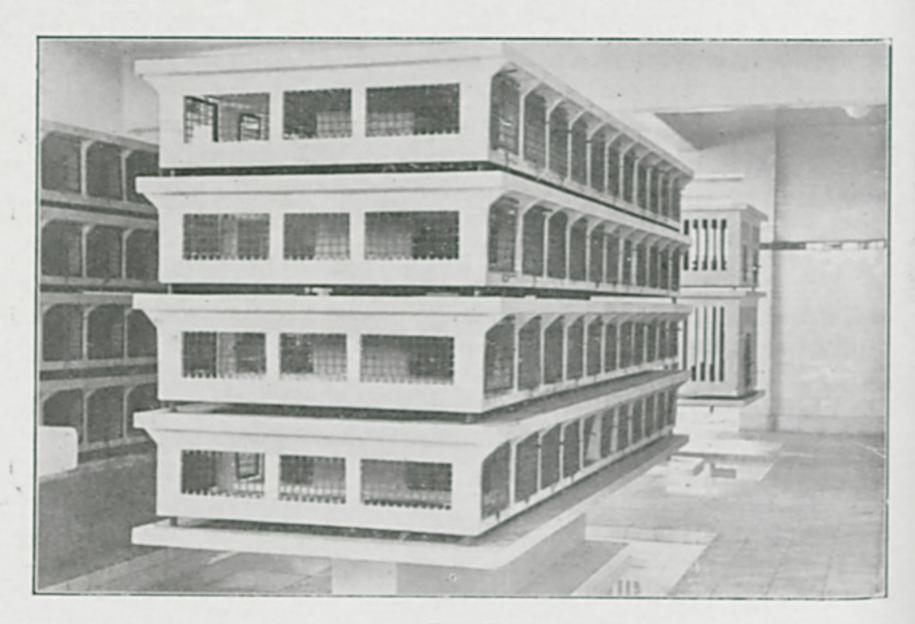


Fig. 22 Biotérios.

É de toda conveniência que o local onde se encontram os biotérios para observações dos animais durante longo periodo, fiquem situados de modo a permitir o isolamento, pelo menos durante algumas horas do dia, protegendo-se o recinto por meio de paredes envidraçadas.

A sala de contrôle geral está ao lado da sala dos biotérios e isolada desta por divisões de vidro.

Todo o alimento dos animais é trazido ao interior do laboratório por meio de uma caixa metálica, que da sala dos biotérios se comunica com o exterior.

Os animais sacrificados são logo após a necrópsia conduzidos a um forno crematório, cuja porta se comunica com o interior da sala de biotérios. Um botão elétrico aciona um massarico alimentado a óleo, que, funcionando alguns minutos, reduz a cinzas os animais alí colocados. A limpeza do forno para a retirada dos resíduos é feita por uma outra porta, que está ligada ao lado externo do pavilhão.

Mesa de proteção para trabalhos com Ixodidas

Esta mesa de proteção destina-se aos trabalhos de manipulação com Ixodidas infetados e foi especialmente construida para evitar o contato direto do técnico com o material infetante. Está localizada na própria sala dos biotérios. Compõe-se essencialmente de uma grande bacia de concreto armado, sustentada por uma coluna central, no interior da qual passam encanamentos para água quente e fria, esgotos, vácuo, gás, ar comprimido e corrente elétrica, necessários aos trabalhos. Na parte superior, a bacia tem a forma de um retângulo e mede 2 metros de comprimento por 80 cm de largura; destina-se a conter 2 bandejas, que se encaixam em suportes fixados na parte inferior por meio de fortes hastes metálicas. Com êste dispositivo as duas bandejas removíveis ficam perfeitamente isoladas do retângulo, que constitui as margens da bacia. Esta é cheia com uma solução concentrada de líquido carrapaticida para impedir a passagem de quaisquer carrapatos da bacia para a mesa propriamente dita.

O retângulo tem em todo o seu contôrno uma margem superior horizontal de 25 cm; na extremidade é ela bem maior, servindo de mesa auxiliar para depositar o material que deverá ser introduzido na câmara.

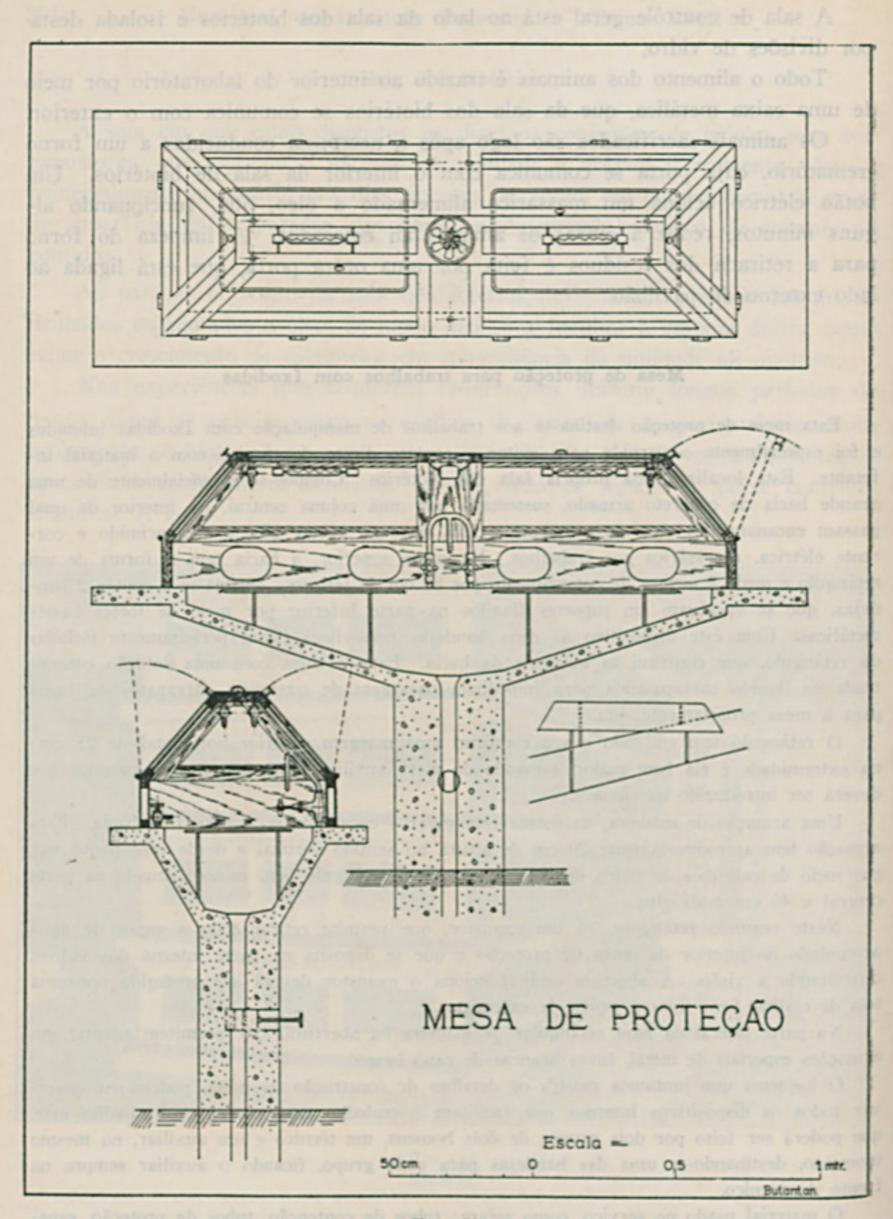
Uma armação de madeira, de forma retangular é encaixada no concreto da bacia. Esta armação tem aproximadamente 20 cm de altura no sentido vertical e desde êsse ponto vai, por meio de caixilhos de vidro, ligar-se a um outro retângulo bem menor, situado na parte central e 40 cm mais alto.

Nêste segundo retângulo, há um exaustor, que permite retirar todo o vapor de água acumulado no interior da mesa de proteção e que se deposita na parte interna dos vidros, dificultando a visão. A abertura onde funciona o exaustor deverá ser protegida por uma tela de malhas bem finas à prova de carrapatos.

Na parte lateral da base retangular de madeira há aberturas que permitem adaptar em armações especiais de metal, luvas brancas de cano longo.

O esquema que juntamos mostra os detalhes de construção da mesa, podendo-se observar todos os dispositivos internos que facilitam o trabalho com carrapatos, trabalho êste, que poderá ser feito por dois grupos de dois homens, um técnico e um auxiliar, no mesmo momento, destinando-se uma das bandejas para cada grupo, ficando o auxiliar sempre na frente do técnico.

O material usado no serviço, como sejam: tubos de contenção, tubos de proteção, esparadrapo, gaze, aparelhos para os coelhos, etc., bem como os animais já previamente inoculados, é introduzido na mesa pelas aberturas terminais ou mesmo pelas laterais. O fe-



F10. 23 Esquema da mesa de proteção.

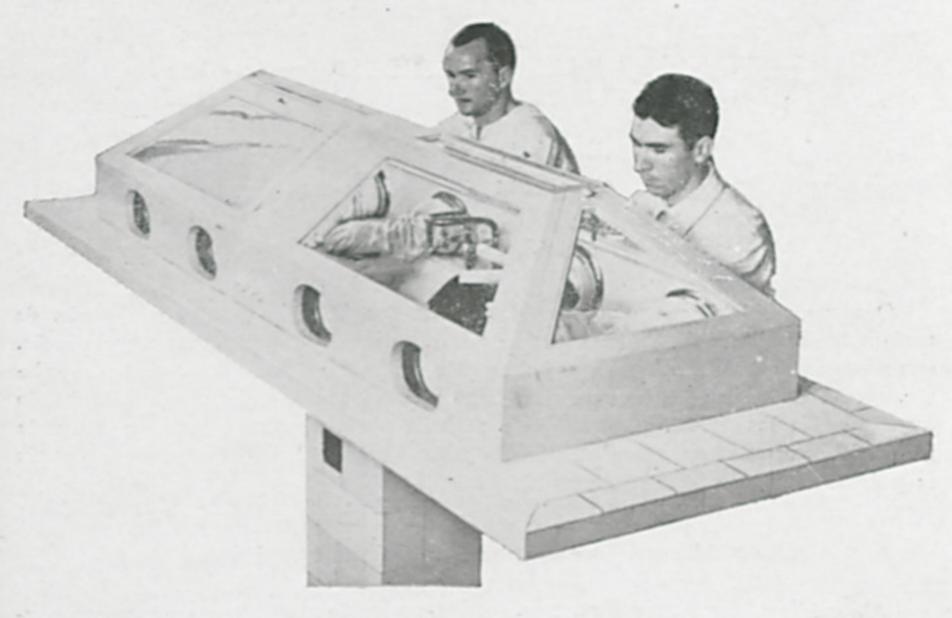
chamento da mesa de trabalho se faz de maneira perfeita, ajustando as aberturas ou janelas por meio de borboletas de pressão.

Terminados os trabalhos diários, o interior da mesa é lavado ou com água quente ligada à torneira existente no interior ou com solução de carrapaticida.

Tubo de colheita de carrapatos

O tubo de colheita destina-se a facilitar a coleta de Ixodidas nas fases de larva e ninfa, quer antes, quer depois da alimentação.

O aparelho ou tubo de colheita de Ixodidas consta de um tubo cilíndrico de vidro com diâmetro igual ao dos tubos de contenção, anteriormente descrito. Este tubo é estirado em uma das suas extremidades, tendo no conjunto um comprimento total de 15 cm. A parte estirada serve para ser conectada à torneira de vácuo por meio de um tubo de borracha. Na outra extremidade adapta-se um tubo de contenção, de modo que a parte protegida pelo organdi (parte fechada) fique em contato com a abertura maior do tubo de coleta. A fixação do tubo de contenção ao de coleta faz-se por meio de uma fita de es-



Fro. 24 Mesa de proteção.

paradrapo. Na parte aberta do tubo de contenção já fixado ao aparelho — que normalmente é fechada com a rolha de cortiça — coloca-se uma rolha de borracha perfurada e atravessada por um tubo de vidro ligeiramente estreitado na sua extremidade distal e com abertura suficiente para deixar passar com facilidade uma larva bem cheia.

Um tubo com esta abertura servirá para coletar neolarvas ou metalarvas, bem como neoninías. No caso de metaninías ou ninías já alimentadas usa-se um tubo de abertura maior, que pode servir também para manipular adultos não alimentados.

Abrindo-se a torneira de vácuo, o aparelho de coleta está pronto para ser utilizado. Aproxima-se a parte aberta do tubo aos Ixodidas, que são então aspirados para o interior do tubo de contenção, onde ficam retidos pela proteção da tela de organdí.

Quando os tubos estão suficientemente cheios (em média 150 larvas cheias) e desligado o vácuo, retira-se a rolha de borracha do aparelho, substituindo-a novamente pela de cortiça. Destacando-se o esparadrapo, os tubos de contenção cheios de Ixodidas estão prontos para serem acondicionados nos tubos de proteção, numerados e colocados nas caixas que permanecem nos armários à temperatura ambiente do laboratório ou nas estufas até se verificar a ecdise.

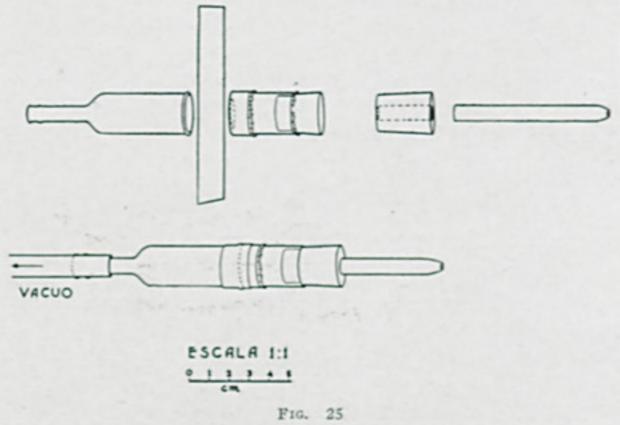


Fig. 25
Tubo de coleta de carrapatos.

O vácuo utilizado para a manobra da colheita dos Ixodidas deverá ser ajustado, de modo a facilitar a entrada de larvas ou de ninfas, vazias ou cheias, no tubo de contenção, sem provocar correntes violentas, que podem lesar os Ixodidas, ocasionando perdas na criação, perdas estas que são, via de regra, tanto maiores, quanto maior for o tamanho do carrapato. Na fase ninfal, por exemplo, a ausência destas precauções pode ser altamente prejudicial, acarretando a morte de grande parte dos exemplares, principalmente quando se trabalha com metaninfas ou ninfas já alimentadas.

Alimentação e colheita das larvas alimentadas

Os coelhos, nos quais foram colocadas as larvas, permanecem nos compartimentos isolados do biotério durante vários dias, geralmente 8 a 10. Na realidade, a alimentação de uma larva, isoladamente, do momento da fixação ao hospedeiro à queda espontânea, não demora tanto tempo, podendo ser feita de maneira completa em 3 a 4 dias. A desigualdade do momento de fixação das larvas se explica pela idade variável das neolarvas. A desova das fêmeas fazse por período de tempo que se prolonga por vezes até 26 dias, tendo as neolarvas resultantes também idades variáveis. Quando, portanto, colocamos uma mesma geração de larvas a se alimentar, teremos variações muito grandes quan-

to ao momento propício à picada. Não convem dilatar o prazo de 8 a 10 dias, porque a alimentação das larvas só é util na fase de circulação sangüínea do virus; essa fase coincide com aquêle espaço de tempo.

Tendo-se em conta as precauções acima citadas, obtêm-se após êsse prazo: larvas totalmente alimentadas e já destacadas do hospedeiro, larvas em alimentação, ainda fixadas, e larvas não alimentadas e não fixadas. Estas, contudo, nem sempre são em larga percentagem, o que torna o processo útil para fins práticos.

Quando os coelhos são de pequeno porte ou a quantidade de larvas muito elevada, pode acontecer que aquêles venham a morrer antes de decorridos os dias necessários à alimentação das larvas. Neste caso, aquelas que forem encontradas cheias serão imeliatamente retiradas e aproveitadas. Quando o coelho permanece vivo, a colheita é feita após sacrifício do animal por meio de

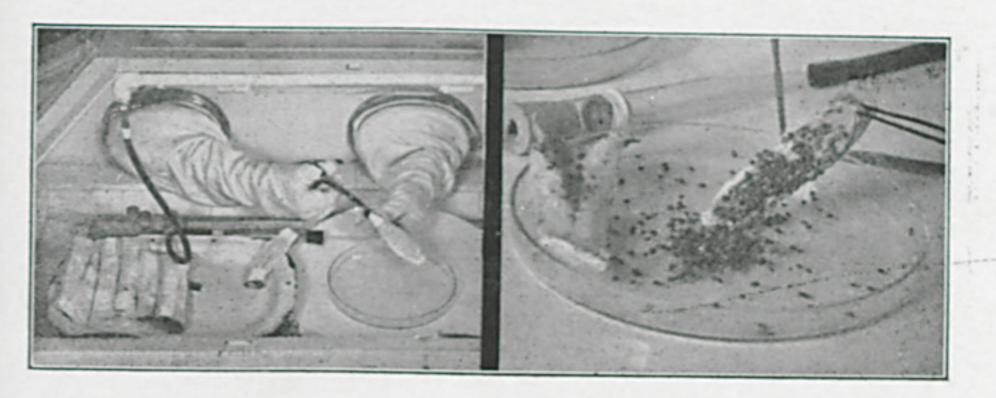


Fig. 26

Abertura dos saquinhos contendo as orelhas de coelhos repletas de ixodidas já alimentados.

pancada na cabeça. As orelhas, protegidas pelos saquinhos, são em seguida cortadas na base com tesouras abaixo do ponto de fixação do saquinho de organdi, depois de retirado o aparelho protetor de couro. As orelhas, ainda envoltas pelo saquinho de organdi, são colocadas em bandejas numeradas que são conduzidas à mesa de proteção. Os coelhos são imediatamente levados ao forno crematório.

Os saquinhos são abertos um a um com tesoura sôbre folhas circulares de papel branco ou sôbre grandes cristalizadores. As larvas cheias estão quase sempre soltas, enquanto que aquelas ainda fixadas são retiradas, cuidadosamente, por meio de pequena espátula. Feita esta coleta, orelhas e pano de organdí são mergulhados na solução carrapaticida, que circunda a bacia da mesa de manipulação já descrita.

As larvas cheias e coletadas são passadas em tamizes lavadores, que constam de três cilindros, cuja base de tela de malhas progressivamente menores permite a retirada de detritos, como sejam pêlos, larvas mortas não alimentadas, etc. Um jacto dágua facilita esta limpeza e ao mesmo tempo retira os detritos orgânicos, que, conforme temos verificado, podem permitir não só a colagem das larvas umas às outras, como também servem de meio para o crescimento de certos parasitas durante a permanência das metalarvas na estufa, à espera da ecdise.

Uma vez bem lavadas, as larvas cheias são colhidas por um aparelho especial de coleta, que, por meio de vácuo, permite reuní-las diretamente nos nossos tubos de contenção.

Para facilitar a secagem, pode-se expor as larvas à corrente de ar de um ventilador ou deixá-las durante algum tempo na estufa a 37°C.

Lavadas e secas, as larvas cheias são distribuidas nos tubos de contenção e guardadas nos tubos de proteção, onde à temperatura ambiente ou na estufa para carrapatos, permanecem até ocorrer a primeira metamorfose com a ecdise das neoninfas.

4. Fase ninfal - 2.ª alimentação infetante

1.ª metamorfose. Período prévio à ecdise das neoninfas

Decorridos alguns dias, as metalarvas ou larvas alimentadas transformamse em neoninfas, efetuando-se, desta forma, a primeira metamorfose, isto é, a passagem da fase larval ou hexápoda para a fase ninfal ou octópoda. O periodo de tempo compreendido entre a colheita das larvas alimentadas e a saída das primeiras neoninfas denominamos período prévio à ecdise das neoninfas.

No quadro seguinte vêm-se os resultados globais de experiências feitas com 7.600 metalarvas, corresponlendo à observação de 152 lotes diferentes, mantidos em estufa com temperatura entre 30 e 32°C.

Os lotes de metalarvas foram obtidos do seguinte modo:

Entre as larvas cheias e espontaneamente desprendidas de orelhas de coelhos, foram selecionados 100 exemplares, que, após lavagem e secagem prévias, foram divididos em dois lotes de 50 e mantidos durante a experiência nos tubos padrão de contenção protegida. Um dos lotes foi incubado em estufa regulada entre 30 e 32ºC e o outro serviu para as experiências feitas à temperatura ambiente do laboratório relatadas adiante. À medida que se processou a ecdise das neoninfas, estas foram retiradas diariamente de junto das metalarvas e colocadas em outro tubo de dupla proteção, mantido à temperatura ambiente do laboratório.

Os resultados aqui apresentados devem servir somente como índice prático de orientação, pois não se referem à evolução unitária. Com efeito, partindo de grande número de larvas alimentadas, não é praticável a anotação do momento exato do final da alimentação de cada unidade isoladamente e da consequente queda espontânea do respectivo hospedeiro. As larvas permanecem 8 a 10 dias nas orelhas dos coelhos, podendo-se fixar, alimentar e desprender em prazos diferentes.

Estes resultados, portanto, se referem ao número de dias decorridos desde a colheita dos lotes de larvas até o dia em que se verifica a presença da primeira neoninfa nos tubos contendo 50 exemplares.

A ecdise das primeiras metalarvas se verificou entre 5 e 15 dias após a colheita das metalarvas, à temperatura de 30 — 32°C. Na maioria dos lotes (91.4%) esta teve início entre o 7.º e 13.º dia.

	e: Período prés s. Temperatura	
Dia's	N.º de lotes	%
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15	5 2 21 21 17 24 30 16 10 4 2	3.3 1.3 13.8 1.1 15.7 19.7 10.5 6.5 2.6 1.8
Total de lotes	152	Ringli oth

A outra experiência com os lotes de larvas da mesma procedência que a dos utilizados na prova anterior, foi feita à temperatura variável do ambiente do laboratório.

Tratando-se de Ixodidas alimentados em meses diferentes, os resultandos são dados separadamente, pois a temperatura ambiente do laboratório variou de alguns graus em cada período: totação do mo-

one e da conse-

		vio à ecdise das te do laboratóri	
Dias	Colheita 19-4-43	11-5-43	22-6-43
7 8 9 1) 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 20 30 31 32 33 34 35	1 1 2 4 4 6 4 6 4 5 3 -	2 0 6 8 7 10	5 1 2 6 2 7 5 9 3 8 1
Total de lotes	40	33	49

Iniciada a experiência com 152 lotes de metalarvas, somente em 122 foi verificado início de eclosão. Nos demais 30 lotes as metalarvas não evoluiram, não sendo, porisso tomados em consideração.

São particularmente significativos os resultados desta observação. Larvas alimentadas em meses diferentes, durante os quais a temperatura ambiente do laboratório baixou progressivamente, mostraram um período prévio à eclosão das ninfas relacionado a essas variações de temperatura. Nos meses mais frios, junho e julho, foi maior o número de dias decorridos até se verificar o início da eclosão das neoninfas. Nas colheitas feitas no mês de abril, o período prévio à primeira metamorfose foi de 7 dias para a metalarva de evolução mais rápida e de 17 dias para as de evolução mais retardada. Nos lotes colhidos a 11 de maio, o período prévio variou entre 19 e 24 dias, enquanto que para

os lotes de Ixodidas colhidos a 22 de junho foram necessários 25 dias para se verificar a primeira eclosão de neoninfas nos diferentes lotes, sendo que em um dos tubos somente após 35 dias foram encontradas as primeiras neoninfas.

Em São Paulo, as temperaturas mais baixas do ano correspondem aos meses de junho, julho, atingindo a média das mínimas 9-10°C e a das máximas 21 — 22°C. Em maio e abril as médias são mais elevadas, havendo quase sempre uma diferença de mais ou menos 2°C entre um mês e outro. No interior do laboratório as médias das mínimas mostram-se sempre mais elevadas, 16°C para junho e julho, e as oscilações entre a máxima e a mínima nesse período não ultrapassaram 2°C. Essas oscilações, entretanto, foram maiores nos meses de maio e sobretudo de abril.

1.ª metamorfose - Período próprio à ecdise das neoninfas

O tempo decorrido entre a ecdise da primeira neoninfa e a ecdise da última viável de cada lote, denominamos "período próprio à ecdise das neoninfas".

A temperatura de 30 — 32°C foram obtidos os seguintes resultados:

1.ª Metamorfose -	- Periodo	próprio :	à ecdise	das neoninfas.	Temperatura	30 - 32°C
-------------------	-----------	-----------	----------	----------------	-------------	-----------

Dias	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Total de lotes
1a. Exp. 2a. Exp.	1 1 1	2	1 13 20	12 7 9	13	4 10	1 12	3 -	1	52 50 50
3a. Exp.	7	8	34	28	34	14	15	9	1	152
0/0	4.6	6.5	22.3	18.4	22.3	9.2	9.8	5.9	0.6	tura de 30º

O tempo de ecdise oscilou, no conjunto de lotes observados nas três experiências, entre 6 e 14 dias. Levando-se em conta os resultados totais, pode-se considerar como mais frequente a demora de 8 a 12 dias para a ecdise completa das neoninfas viáveis.

As verificações feitas para a determinação do período próprio à ecdise das neoninfas à temperatura ambiente nos meses de junho e julho (médias das temperaturas máximas inferior a 18°C), evidenciaram precariedade de evolução, dando lugar à obtenção de ecdise satisfatória somente em pequeno número de lotes. Assim é que, partindo de 172 lotes de metalarvas que iniciaram ecdise, obtivemos apenas 23 lotes com evolução normal. Esses 23 lotes tiveram um período próprio de 12 a 18 dias, sendo que mais freqüentemente de 17 dias.

Tomando em consideração o período necessário para ser obtida a 1a. metamorfose, isto é, desde o momento da colheita das metalarvas até a ecdise de todos os elementos viáveis, os resultados observados à temperatura de 30 — 32°C foram os seguintes:

Dias	1.ª Exp.	1.a Exp. 2.a Exp. 3.a Exp.		Total	%	
15 16 17 18 19 20 21 22 23 24	4 6 25 10 - 7	2 3 4 23 16 2	2 	4 6 27 12 25 12 39 18 8 1	2.6 3.9 17.8 7.8 16.4 7.8 25.6 11.8 5.2 0.6	
Total	52	50	50	152		

Verifica-se, então, que nos diferentes lotes a ecdise completa variou de 15 a 24 dias.

Rendimento

No que diz respeito ao rendimento, já mostramos como foi pequeno quando os Ixodidas foram mantidos à temperatura ambiente nos meses mais frios do ano. Ao contrário, foi particularmente elevado na criação feita à temperatura de 30°C; desta sorte, dos 152 lotes estudados observamos:

36 lotes com 100% de ecdises
41 " " mais de 80 e menos de 100% de ecdises
15 " " 60 " 80% "
27 " " 40 " 60% "
23 " " 20 " 40% "
10 " com menos de 20% de ecdises.

Os resultados destas experiências demonstram que durante os meses frios, que coincidem com a la metamorfose dos Ixodidas criados no loboratório, as temperaturas são desfavoráveis à evolução dos Ixodidas e que, pelo contrário, à temperatura de 30°C a evolução decorre de maneira satisfatória na quase to-

talidade dos lotes de metalarvas. Aconselhamos, entretanto, para criação em larga escala do *Amblyomma cajennense* na fase larvo-ninfal, utilizar temperaturas entre 22 — 28°C no máximo. A permanência a temperaturas mais elevadas não é aconselhável, pois é grande a mortalidade verificada entre os exemplares que sofrem a metamorfose nos primeiros dias e permanecem à espera da evolução das metalarvas restantes.

A criação de Ixodidas em nosso Laboratório é rotineiramente feita entre 24 e 26°C, sempre que se deseja apressar a evolução da fase de larva para a de ninfa. Recomendamos, entretanto, manter constante observação, para não prolongar desnecessariamente a permanência na estufa. E' mesmo indispensável levar os lotes de carrapatos logo após a ecdise da maioria das neoninfas para temperaturas mais baixas até o momento da alimentação ou proceder à retirada diária das neoninfas ecloidas de junto das metalarvas mantendo-as a seguir a temperatura mais baixa (20°C ±). Esta separação facilmente se consegue mediante o uso do aparelho adaptado para trabalhos com grandes quantidades de metalarvas.

Modificações dos aparelhos para trabalhos com grande quantidade de metalarvas

Para grandes quantidades de larvas cheias utilizamos por vezes um dispositivo, que pode conter 40.000 larvas ou mais. Este aparelho, confeccionado sob os mesmos princípios de dupla proteção, permite colher as neoninfas diretamente

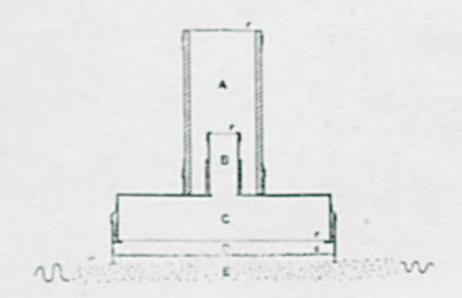


FIG. 27

Esquema do aparelho para criação de ninfas e adultos em grande quantidade. A = Tubo de proteção; B = Tubo de contenção removível; C = Câmara para o depósito de Ixodidas; D = Caixa para a dupla proteção inferior; E = Areia umidecida; F = Tecido de organdi à prova de carrapatos; G = Tela de arame fino.

em tubos de contenção à medida que se processa a ecdise. Evitamos, desta sorte, o uso do aparelho de vácuo, que, quando não manobrado com cuidado, pode trazer prejuizo aos carrapatos em consequência do violento movimento a que são sub-

metidos. As neoninfas logo após a ecdise, orientadas pelo fototropismo positivo, passam do interior do aparelho, que permanece ao abrigo da luz, para os tubinhos de contenção, situados na parte externa, sendo assim coletadas espontaneamente nos tubinhos, que são substituidos à medida que contenham um número razoável de exemplares. A montagem do aparelho permite a fácil substituição dos tubos de contenção.

Nas melhores condições, a retirada dos tubos de contenção é feita cada 24 horas depois de iniciar a ecdise dos primeiros exemplares. Os tubos de contenção que contêm as neoninfas coletadas espontaneamente, isentas de pêlos ou outros detritos, são fechados, numerados e colocados nos tubos de proteção comuns, sob a camada de areia umidecida, onde então permanecem à espera do momento propício à alimentação.



Fig. 28

Aparelhos para criação de ninfas e adultos em grande quantidade.

A fotografia e o desenho mostram melhor do que qualquer descrição a montagem e funcionamento deste aparelho. A circulação de ar umidecido se faz perfeitamente à custa de evaporação da água que embebe a areia na grande bandeja, onde são depositados os aparelhos. O tecido de organdi ou tela fina de arame que protege o fundo de cada aparelho permite a livre circulação de ar necessário ao desenvolvimento dos Ixodidas, ao mesmo tempo que veda a passagem dêstes para o exterior.

Para trabalhos a temperaturas mais elevadas, quando se deseja apressar a evolução dos Ixodidas, êste dispositivo tem particular aplicação. À medida que se colecionam as neoninfas nos tubos de contenção, estas podem imediatamente ser transportadas para temperaturas mais baixas à espera do momento adequado par se proceder a 2.ª alimentação infetante.

Descrição da ninfa

Corpo — Oval largo. Comprimento (antes de sugar) 1.38, largura 1.14. Capitulo - Comprimento 0.42, largura da base 0.3. Base subquadrada, margens laterais convexas, cornua inconspicuas ou ausentes, margem posterior côncava ou quase reta. Superfície lisa, sem pontuação. Palpos longos e com alguns pêlos finos. Comprimento total dos artículos II e III, 0.24. Hipostôma - Espatulado, de comprimento médio, levemente fendido no ápice. Dentição 2/2. Comprimento cerca de 0.24. Escudo — Comprimento 0.66; largura 0.84. Cordiforme largo, mais largo do que longo, largura máxima mais ou menos no meio, com escápulos arredondados. Sulcos cervicais fundos e longos, atingindo as proximidades das margens póstero laterais. Olhos grandes, pálidos, meio convexos. Com número médio de pontuações pequenas, apagadas, vistas melhor à luz refletida. Patas - Sem espinhos ventrais na extremidade distal dos tarsos. Comprimento do tarso I, 0.42; do metatarso, 0.24. Comprimento do tarso IV, 0.30; do metatarso, 0.21. Coxas — Coxa I com dois espinhos distintos, o interno menor. Coxas II, III e IV cada uma com um só espinho. Todos os espinhos curtos e os das coxas II, III e IV chatos e relativamente mais estreitos do que em americanum. Placa espiracular - Larga, quase plana, porém aprofundada na abertura respiratória. Comprimento 0.21, largura 0.14. (Cooley, R. A. & Kohls, G. M.) (31).

Alimentação infetante das ninfas

Período de espera. — Como vimos anteriormente, as neoninfas são colecionadas em número adequado nos tubinhos de contenção e mantidas em geral à temperatura do laboratório até decorrer o tempo de espera necessário à alimentação. Ainda aqui, do mesmo modo que para o caso das larvas, a quitinização das patas das neoninfas, avaliada pela côr pardacenta que apresentam, é, sem dúvida, um bom índice para avaliar o momento adequado à alimentação das ninfas. Quando a quitinização é verificada em cêrca de 100% das neoninfas, elas são colocadas nos coelhos. Além disso, devemos tomar como ponto de referência a menor repleição das neoninfas que decorre do jejum a que são submetidas e que pode ser avaliada pelo seu menor diâmetro (as neoninfas se mostram mais chatas) e maior transparência. À temperatura do laboratório pode-se calcular em 30 — 40 dias êsse período de espera, sendo preferível, quando se visa criação em larga escala, pecar pela discreta dilatação dêsse período, a diminuí-lo, pois os resultados percentuais de rendimento são ligeiramente maiores.

Técnica de alimentação. — A técnica empregada para alimentar ninfas é, na rotina, a mesma usada para alimentação de larvas, isto é, são colocadas em orelhas de coelhos infetados e estas envoltas pelos saquinhos de organdí protegidos contra dilacerações pelo protetor de couro.

Também outras técnicas podem ser empregadas, mas sem maiores vantagens sôbre as acima assinaladas. Assim, podem-se utilizar, por exemplo, coelhos depilados no tronco e abdomem, protegidos com uma camisa de organdí fixada nas extremidades com esparadrapo e, por cima desta uma tela de arame fino

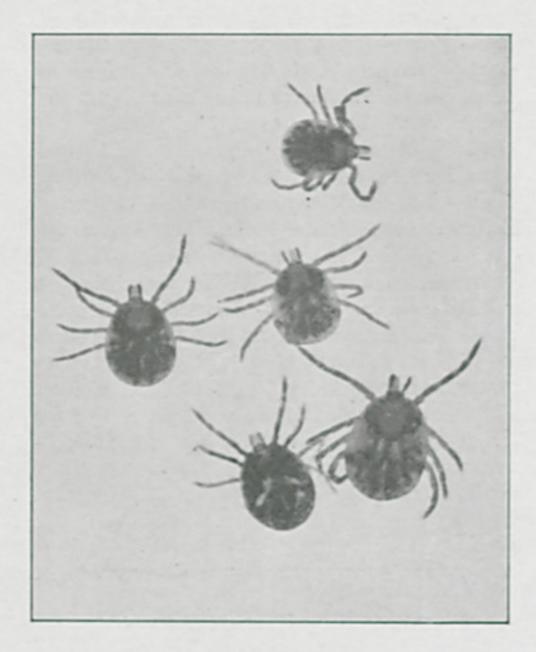


Fig. 29 Ninfas de Amblyomma cajennense.

ajustada ao corpo do animal. Esse processo tem a vantagem de oferecer maior superfície à alimentação dos Ixodidas, que não se aglomeram tão intensamente como acontece quando são colocados nas orelhas. Este método, entretanto, afasta-se da técnica standard, necessita da confecção de novos aparelhos e, sobretudo, exige manipulação fóra da mesa de proteção, não sendo, porisso, adotado entre nós.

Outro dispositivo que pode ser empregado é o usado para a alimentação de adultos (vide "Técnica de alimentação de adultos").

A manipulação das ninfas requer maiores cuidados do que a de larvas. Tratando-se de Ixodidas já infetados na fase larval, podem transmitir a infecção ao homem. Porisso, toda e qualquer manipulação deverá ser feita sempre nas mesas de proteção, com os auxiliares protegidos pelas luvas adequadas, obedecendo rigorosamente à técnica standard.

Os coelhos utilizados para alimentação das ninfas são mantidos nos compartimentos isolados do biotério pelo espaço de 8-10 dias, até a colheita das metaninfas.

Colheita das metaninfas. — As metaninfas (ninfas alimentadas) são colhidas das orelhas dos coelhos de idêntico modo ao das larvas alimentadas. Os animais sacrificados por pancada na cabeça, são mantidos no biotério pelo espaço de 3-4 horas até se verificar a coagulação do sangue no animal.

Cortam-se as orelhas pela base por meio de tesouras e, uma vez numeradas, são levadas em bandejas para a mesa de proteção, onde são manipuladas. Abertos os saquinhos de organdí, as ninfas são colecionadas em tamises lavadores. As que ainda estiveram fixadas às orelhas são despregadas por meio de manobras delicadas com uma espátula.

Após cuidadosa lavagem sob jacto dágua corrente, são levadas a secar em estufa a 37°C ou mesmo com auxílio de ventiladores. Terminada esta fase, procede-se à distribuição nos tubos de proteção (50 a 70 para os pequenos e 2500 a 2000 nos grandes). Os recipientes de dupla proteção contendo as metaninfas são levados à estufa, onde são retidos até se verificar a 2a. metamorfose com a ecdise dos adultos.

5. Fase adulta — Alimentação estimulante

Período prévio à ecdise de adultos

Este período é o que precede a segunda metamorfose, isto é, a passagem da fase de ninfa para a de adulto. Compreende o tempo que decorre entre o fim da alimentação das ninfas (metaninfas) até verificar-se em um lote a saída dos primeiros exemplares adultos.

Os resultados obtidos nas verificações feitas com 50 lotes de metaninfas estão resumidos no quadro abaixo. Foram estudados 2.500 exemplares, pois cada lote de metaninfas contou com 50 unidades.

O período prévio à ecdise variou entre 9 e 12 dias apenas. Na maioria dos lotes o início da ecdise ocorreu no 11.º dia, quando em aproximadamente 44% dos lotes se observou saída dos primeiros exemplares adultos.

Período próprio à ecdise de adultos Temperatura 30 — 32°C		
N.º de dias	N.º de lotes	%
dasgmeta-	nisdleg a si	16
10	17	34
11	22	44
20 12 shah	omits 3	esh 6 obo
Total	50	são mantidos o sangue no :

Periodo prévio à ecdise de adultos Temperatura 30 — 32°C		
N.º de dias	N.º de lotes	rigorogamente
5	13	26
6	23	46
7 2	9	18
8	4	8
9	1	2
Total	50	de del horas a Cortam-s

Período próprio à 2.ª metamorfose

Nas observações feitas com os mesmos lotes da experiência anterior pôde-se concluir que o período próprio à ecdise de adultos mantidos em temperatura entre 30 e 32°C oscilou entre 5 e 9 dias. Em 23 lotes de Ixodidas (46%) a saída dos adultos se processou durante 6 dias.

2.ª metamorfose

Si computarmos todo o período de tempo necessário à verificação da 2a. metamorfose, isto é, o tempo decorrido entre a alimentação das metaninfas e a ecdise de todos os exemplares contidos em cada lote, verificamos que para a obtenção da 2a. metamorfose são necessários de 14 a 19 dias, a maioria necessitando 16 e 17 dias para completa evolução, como se verifica no quadro abaixo. Na prática, portanto, os lotes de metaninfas devem permanecer 20 dias na estufa regulada entre 30 a 32°C para se obter a ecdise de Amblyomma cajennense adultos.

2.ª Metamorfose — Temperatura 30 — 32°C		
N.º de dias	N.º de lotes	rias Ametan
14	1	2
15	6	12
16	21	42
17	12	24
18	0 m5 m	10
19	5 11 0	10
Total	50	A SOD WALL

Rendimento

Os rendimentos encontrados neste lotes de Ixodidas foram bastante satisfatórios sob o ponto de vista prático, quando se utilizaram temperaturas variáveis entre 30 e 32°C.

Precisamos, no entanto, novamente frizar aqui, que a estas temperaturas necessário se torna ir retirando os adultos de junto das outras ninfas ou detritos, pois não é conveniente mantê-los a estas temperaturas.

A utilização dos aparelhos que permitem a separação natural dos exemplares que se vão libertando dos detritos, permite obter de maneira simples esta separação diária.

Em mais de 60% dos Ixodidas observados nos diferentes lotes, o rendimento variou entre 80 e 90%, o que consideramos bastante satisfatório.

Resumimos no quadro seguinte as percentagens obtidas quanto ao rendimento:

		N.º de lotes	%
Entre	30 e 50	3	6
39	50 e 60	2	4
29	60 e 70	5	10
>	70 e 80	7	14
39	80 e 90	29	58
30	90 e 100	4	8
		50	100

A evolução de Amblyomma cajennense no transcorrer da 2a, metamorfose pode ser muito mais demorada quando as metaninfas permanecem à temperatura ambiente do laboratório até a ecdise dos adultos. Em observações feitas com lotes de metaninfas colhidas na mesma ocasião das utilizadas na experiência anterior e procedentes dos mesmos coelhos, verificou-se um rendimento praticamente nulo, sendo mínima a quantidade de adultos obtidos e a perda superior a 80%. Durante os meses mais frios do ano (junho, julho) observou-se um período prévio à ecdise dos adultos variável entre 23 e 60 dias, com grande irregularidade entre os diferentes lotes, sendo que na maioria os primeiros exemplares adultos foram vistos entre o 35 e o 45 dias após a colhe ta das metaninfas.

Uma segunda experiência foi levada a têrmo com outros 50 lotes de metalarvas colhidas a 11 de outubro e observadas durante outubro e novembro. Foram os seguintes os resultados obtidos:

Periodo prévio à ecdise de adultos. Temperatura ambiente (Meses: outubro e novembro)		
N.º de dias	N.º de lotes	*
23	17	34
24	17	34
25	5	10
26	6 mm	12
27	isfati or io.	al sheet letter
28	2	4
29	1	2
30	1	2
Total	50	

Período próprio à ecdise — Temperatura ambiente (Meses: outubro e novembro)		
N.º de dias	N.º de lotes	%
10	on of one	2
11	3	6
12	8	16
13	oh 3040 oh	8
14	9	18
15	6	12
16	2	4
17	2	4
18	5	10
19	6	12
20	4	8
Total	50	Maria de 192

Comparando êstes resultados com os obtidos nas experiências feitas à temperatura de 30 — 32°C, verifica-se grande diferença no número de dias necessários para a 2a. metamorfose. À temperatura constante de 30 — 32°C, o período prévio à ecdise de adultos oscilou entre 9 e 12 dias, enquanto que nos lotes mantidos à temperatura ambiente do laboratório nos meses de outubro e novembro, o início da ecdise só foi verificado a partir do 23 dias da colheita das ninfas alimentadas. Para o período próprio à ecdise o mesmo se observa. A 30 — 32°C, a mudança da pele se faz nos diversos lotes durante 5 a 9 dias, ao passo que nesta última experiência, entre 10 e 20 dias. Nos meses de outubro e novembro a média das temperaturas máximas no laboratório foi de 25°C e a média das temperaturas mínimas de 15°C.

Conservação dos adultos destinados ao preparo da vacina

À medida que os exemplares adultos de Amblyomma cajennense se libertam do envoltório externo da fase anterior de ninfa, devem ser coletados e conservados convenientemente até o momento de ser utilizado no preparo da vacina. Os Ixodidas adultos são colocados em número variando entre 150 e 200 em pequenas caixas circulares de cartolina com 5 cm de diâmetro e 1 1/2 cm de altura. As caixinhas são fechadas por uma fita de esparadrapo e colocadas em número de 10 em bolsas de organdí. Estas bolsas fechadas nas extremidades com um pedaço circular de esparadrapo servem de proteção contra eventuais acidentes. Assim acondicionadas, as caixinhas contendo os carrapatos são guardadas em caixas metálicas capazes de conter 21 bolsas. Cada caixa pode, portanto, guardar em média 4.000 Ixodidas, machos e fêmeas, infetados.

No fundo destas caixas há uma camada de algodão, que é mantida umedecida e que fica separada das bolsas por uma placa metálica perfurada, de modo a permitir um grau de umidade apropriado em todo ambiente interior da caixa sem umedecer por contato as caixinhas de cartolina.



Fig. 30

Conservação de Amblyomma cajennense, 💍 e Q, infestados para o preparo da vacina.

As caixas metálicas, contendo os carrapatos na sua última fase evolutiva, permanecem na geladeira à temperatura regulada entre 10 e 15°C. A esta temperatura os Ixodidas podem ser conservados vivos durante longo período de tempo, até o momento da alimentação estimuladora. Os pesquisadores americanos, que trabalharam com Dermacentor andersoni, demonstraram a conveniência de prolongar este estágio por um período mais ou menos longo, quase sempre durante um ano. Desta sorte, os carrapatos correspondentes à criação de um ano, só são utilizados no ano seguinte. Esta espera, segundo aqueles experimentadores, teria importância para a obtenção de melhores resultados após a alimentação estimulante, dando maiores quantidades de riquétsias e vacinas mais eficientes.

Sempre que possível, prolongamos o período de tempo em que os Amblyomma cajennense são mantidos com metabolismo diminuido em consequência da temperatura em que são conservados, porém em média após seis meses e às vezes menos já os empregamos para o preparo da vacina, premidos pela necessidade de atender aos urgentes pedidos do produto, obtendo, entretanto, quase sempre vacinas altamente satisfatórias sob o ponto de vista protetor.

Alimentação estimulante

Nos Ixodidas adultos infetados e conservados por longo tempo em baixas temperaturas, as riquétsias reproduzidas no interior das células dos órgãos internos encontram-se em uma fase de atenuação de sua virulência. Suspensões dos órgãos internos dêsses Ixodidas, obtidas por trituração e separação da parte quitinosa, inoculadas em cobaias de prova, em geral só fornecem pequena percentagem de infecções benignas. Si 10 a 15 dias depois reinocularmos êsses animais com virus de passagens, êles se mostram na maioria protegidos contra a febre maculosa, o que põe indiretamente em evidência a presença nos carrapatos dos princípios antigênicos — as riquétsias.

Spencer e Parker provaram em experiências com o Dermacentor andersoni, que bastava manter os adultos à temperatura de 37°C durante 24 horas, para que fosse obtida u'a maior percentagem de infeções nos animais inoculados e mais ainda, que, si êstes carrapatos se alimentassem parcialmente em cobaias e fossem a seguir mantidos durante algum tempo à temperatura do laboratório, poder-se-ia obter de um só Ixodida um grande número de doses infetantes.

Foi com o uso de emulsões fenoladas a 0.5%, obtidas de triturados de Ixodidas adultos infetados, conservados em baixas temperaturas durante alguns meses e parcialmente alimentados por ocasião da trituração, que Spencer e Parker conseguiram provar a possibilidade de preparar vacinas capazes de, quando inoculadas em cobaias, conferir sólida imunidade perante a inoculação de prova feita com a injeção peritonial de 1 cm³ de sangue de cobaia infetada.

Trabalhos feitos em nosso laboratório mostraram que os mesmos fatos se verificam com o Amblyomma cajennense, isto é, as riquétsias se reproduzem abundantemente nos Ixodidas após a prévia alimentação estimuladora, antes de serem utilizados para o preparo das emulsões destinadas ao fabrico das vacinas.

Foi possível, igualmente, comprovar que êste resultado pode ser obtido, quer utilizando cobaias, quer coelhos, para a alimentação final estimuladora. Ultimamente, temos dado preferência ao uso de coelhos, pela possibilidade de alimentar um número maior de exemplares.

Técnica para a alimentação estimulante

Preparo dos aparelhos. — Como dispositivo utilizado para a última alimentação dos adultos, empregamos artificio semelhante ao descrito por PARKEZ, constituido de pequenas bolsas protetoras, adaptáveis às partes laterais do animal préviamente depilado.

As bolsas ou receptáculos dos carrapatos são moldados em tela de arame fino, por meio de fôrmas de dimensões variáveis, de acôrdo com o tamanho do animal.

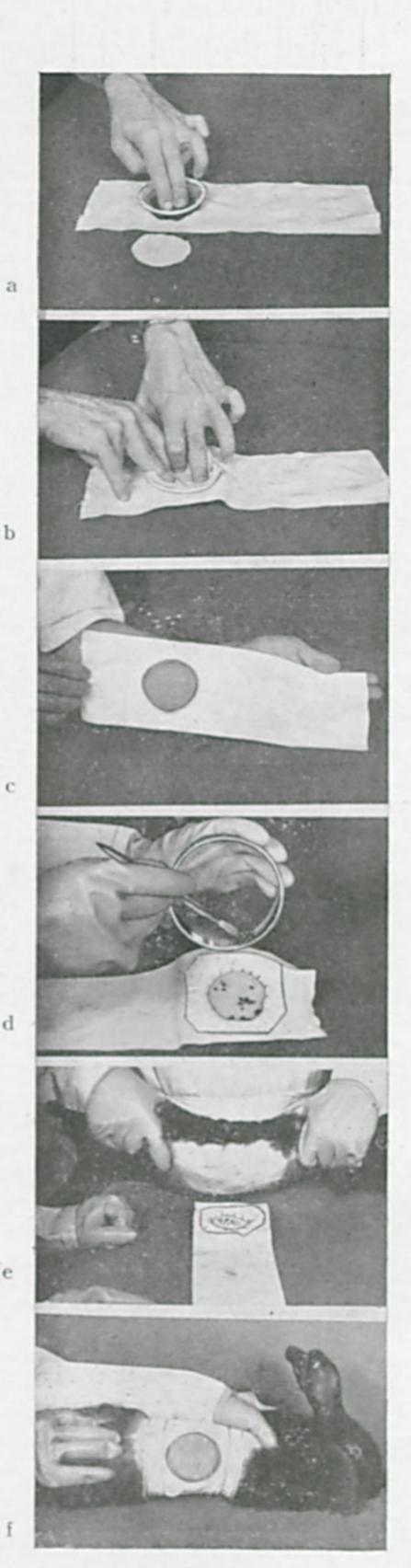
Em uma faixa de tecido adesivo - de 10 cm de largura, si for destinado a coelhos, e de 6 a 8 cm cm, si for para cobaias - faz-se uma abertura circular de dimensões idênticas à parte saliente da bolsa ou receptáculo moldado na tela de arame, mantendo-se a parte adesiva do esparadrapo voltada para cima. Ajusta-se e encaixa-se a armação de arame da maneira indicada na Fig. 31, a; a seguir, recobre-se com tecido de organdi fino a parte interna do receptáculo, fixando-se com esparadrapo nos bordos internos (Fig. 31, b). Pode-se com este dispositivo manter uma ventilação satisfatória no interior das bolsas e, ao mesmo tempo, uma bóa proteção contra a saida dos Ixodidas. Podem-se preparar faixas contendo 1 ou 2 bolsas, devendo-se neste último caso fazer coincidir cada uma com a parte lateral depilada do coelho.

Colocação dos carrapatos adultos. - Coelhos cu cobaias devem ser previamente depilados na parte mediana, atingindo tanto o dorso, como o ventre. Os carrapatos retirados da geladeira são mantidos durante 24 horas na estufa à temperatura de 37°C. Por ocasião da colocação nos animais podem ser resfriados durante alguns minutos, para facilitar a colocação nos receptáculos. Mantem-se a faixa em cima de uma mesa e colocam-se no interior da bolsa u'a média de 250 Ixodidas (Fig. 31, c) (*); logo a seguir, o coelho seguro pelas patas anteriores e posteriores, é levado de encontro à faixa, de modo que a bolsa fique situada lateralmente, na parte depilada do coelho (Fig. 31, d). A faixa é então ajustada ao corpo do animal, fazendo-a aderir à pele. Tiras estreitas de esparadrapo completam a fixação nos limites externos da faixa (Fib. 31, e, f).

Com este dispositivo pode-se manter uma suficiente proteção contra as tentativas do coelho no sentido de procurar retirar o mesmo. Pode-se, como precaução, manter as patas posteriores amarradas, porém temos dispensado essa medida por serem raros os acidentes.

Os coelhos assim preparados, são levados aos compartimentos isolados do biotério, utilizados para esta fase de alimentação. A parte dianteira das gaiolas, contendo os animais, é protegida por uma cortina de borracha, de modo a evitar que, no caso de desprender algum aparelho, os carrapatos transponham as barreiras constituidas pelas bacias de solução carrapaticida.

^(*) Utilizar coelhos com pêso acima de 2 quilos ou cobaias com mais de 500 g. Quando se empregam cobaias, deve-se colocar de 75 a 100 adultos.



Fro. 31

Tempo da alimentação estimuladora. — A alimentação estimuladora deve fornecer ao carrapato uma quantidade de sangue justamente suficiente para reativar a reprodução e a virulência das riquétsias que se encontram nos tecidos dos órgãos internos do Ixodida.

Há longo tempo sem alimentação e depois de permanecer 24 horas à temperatura de 37°C, os adultos se fixam facilmente nos animais.

Rotineiramente, retiramos os carrapatos dos coelhos ou cobaias depois de 4 a 6 dias. Este prazo é regulado de acôrdo com o tempo e a temperatura a que foram submetidos os Ixodidas. Quanto maior a demora e mais alta a temperatura, tanto menor o número de dias necessários para se processar a alimentação estimuladora.

Colheita dos adultos após a alimentação estimuladora. — Os coelhos ou cobaias ainda vivos, contendo os Ixodidas, são fixados nas bandejas situadas no interior das mesas para manipulação protegida, onde se desprendem os aparelhos e, por meio de pinças especiais se procede à colheita tanto nos exemplares machos, como fêmeos.

Os carrapatos adultos ainda não totalmente alimentados, encontram-se fortemente fixados à pele do animal, do qual somente se destacam por tração. Ixodidas eventualmente lesados não podem mais ser usados para a vacina, pois morrem em seguida, entrando em decomposição, razão pela qual têm de ser eliminados.

Os exemplares fêmeos que se encheram demasiadamente, não devem ser utilizados para o preparo da vacina, no entanto podem ser guardados para iniciar a criação do ano seguinte ou então eliminados.

Colhidos um a um, os carraratos são colocados em placas de Petri, agrupados em lotes de 500.

Antes de se iniciar o preparo da vacina pela trituração, êles devem permanecer à temperatura ambiente do laboratório durante 48 a 96 horas. Em geral, o máximo de virulência das emulsões feitas com os órgãos internos dos carrapatos se verifica entre 8 a 10 dias, contados a partir do momento em que os Ixodidas são colocados nos animais para a alimentação estimulante.

Contrôle de infecção com Ixodidas

É sempre conveniente na fase ninfal, verificar si a maioria das metaninfas foi infetada em consequência das duas alimentações anteriores. Para isto retiram-se, ao acaso, 10 exemplares de cada grande lote de metaninfas, 10-12 dias depois da colheita e tritura-se cada carrapato separadamente, de mistura com 2 cm³ de salina. A suspensão obtida é injetada em cobaias pela via subcutânea e observa-se os animais durante 15 dias. Quando se trabalha com a técnica e os cuidados por nós indicados, quase sempre a totalidade das ninfas mostra-se infetada.

Não aconselhamos fazer a prova de infecção após a primeira alimentação na fase larval, porque às vezes pode acontecer que, apesar das precauções tomadas para fazer coincidir a picada dos Ixodidas com a fase de circulação do virus no animal, o período de incubação da infecção se tenha prolongado demasiadamente

ou mesmo, devido a uma resistência individual imprevista, o animal não apresente virus na corrente sanguínea, a não ser por curto período de tempo, insuficiente para infetar todos os carrapatos que foram colocados no coelho. Pequena, evidentemente, será a probabilidade de que estas mesmas condições se reproduzam com o mesmo lote em uma segunda alimentação, na fase ninfal.

Na fase adulta é sempre aconselhável verificar a presença de riquétsias nos esfregaços feitos com os órgãos internos do carrapato, bem como avaliar a virulência que apresentam, o que poderá servir de índice prévio do valor antigênico provável das vacinas a serem preparadas com êsses Ixodidas.

Os esfregaços para a pesquisa de riquétsias deverão ser corados por um dos métodos usuais para a coloração destes microorganismos. Ultimamente temos com vantagem dado preferência ao de Machiavello, que fornece mais fácil - e rapidamente bôas preparações. As riquétsias apresentam-se coradas em vermelho, destacando-se facilmente no interior das células coradas em azul.

Para contrôle de infecciosidade procede-se do seguinte modo: Ixodidas retirados dos lotes de carrapatos adultos, que sofreram a alimentação estimulante e a seguir permaneceram 4 ou 5 dias à temperatura ambiente do laboratório, são dissecados para a retirada do conteúdo dos órgãos internos. Em gral esteril, com o auxílio de areia de quartzo, faz-se uma fina trituração de mistura com solução fisiológica na proporção de 1 cm³ para cada Ixodida utilizado; centrifuga-se por alguns minutos para a retirada do quartzo e detritos celulares não bem desintegrados e utiliza-se o líquido sobrenadante para o preparo de diluições seriadas. Em cobaias de cêrca de 300 g injeta-se, pela via subcutânea, 1 cm³ das diluições acima de 1/1.000, usando-se duas cobaias para cada diluição.

Para o preparo das vacinas deve-se empregar lotes de Ixodidas, que fornecem emulsões de atividade nunca inferior a 1.000 doses infetantes por adulto infetado. A produção de vacinas potentes depende diretamente da concentração do virus nos carrapatos que se utilizam para o seu preparo. Vacinas preparadas com Ixodidas que contenham 5.000 ou mais doses infetantes, são quase sempre altamente protetoras (Spencer e Parker).

O peso médio dos órgãos de um Ixodida isento da parte quitinosa não ultrapassa em geral 0.01 g, podendo-se avaliar, desta sorte, a grande concentração de virus, comparada com o número de doses infetantes existente no sangue de cobaias infetadas, onde raramente vai além de 1.000 por cm³.

G - PREPARO DA VACINA

Terminada a descrição das técnicas utilizadas para criação do Amblyomma cajennense, finalidade principal dêste trabalho, relataremos resumidamente a maneira de preparar a vacina. A técnica é, aliás, idêntica à utilizada pelos inves-

tigadores americanos que trabalam com o Dermacentor andersoni. Aquêles diretamente interessados nos pormenores poderão recorrer aos artigos originais relacionados com o assunto; alguns dos mais informativos estão incluidos nas referências no fim dêste trabalho (32 a 34).

A vacina quase sempre é elaborada em pequenos volumes e à medida que os exemplares adultos infetados vão sendo submetidos à alimentação estimulante. Habitualmente, preparamos partidas de 500 ou 1000 cm³. A maioria das elaborações é feita com volumes de meio litro.

A quantidade de Ixodidas pode variar entre 1 e 2 exemplares adultos para cada centímetro cúbico do produto final. O número de carrapatos a ser usado poderá ser avaliado, quer pelo número de doses infetantes encontradas nas diluições do triturado dos Ixodidas do lote utilizado, quer pelos resultados do valor antigênico das partidas elaboradas, determinando-se, então, por experiências repetidas, qual a concentração mais adequada para obter, com regularidade, resultados satisfatórios.

Como norma orientadora pode-se utilizar um carrapato e um quarto ou um carrapato e meio para cada centímetro cúbico de vacina. É esta a mesma proporção usada nos laboratórios de Hamilton e que tem, igualmente, dado bons resultados e de forma regular, quando se emprega o Amblyomma cajennense.

Para o preparo de uma partida de meio litro, empregamos quase sempre 750 Ixodidas vivos, machos e fêmeas, infetados, isto é, um carrapato e meio para cada centímetro cúbico de vacina.

1. Trituração, desintoxicação e purificação

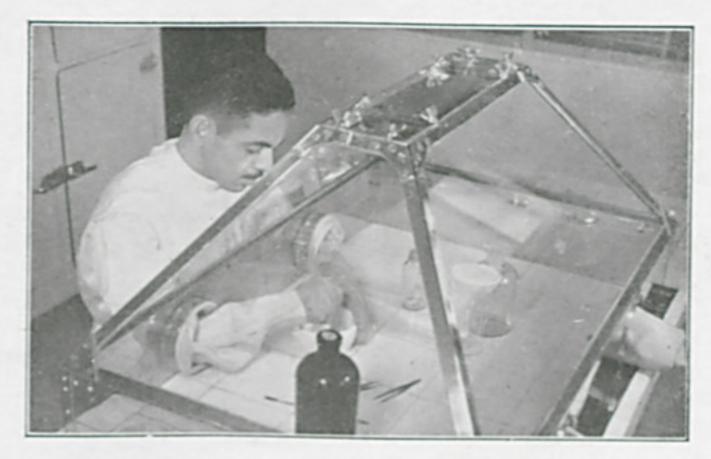
Preparo dos carrapatos, desinfecção. — Selecionados e separados de detritos ou excreções, os carrapatos são colocados em contacto com solução salina formolada a 4%, durante alguns minutos, para desinfeção rápida da parte externa. A seguir são repetidamente lavados em água destilada ou mesmo água corrente e colocados em um provete, cobrindo-os com solução de mertiolato de sódio (1:1.000), em contacto com a qual devem os carrapatos permanecer durante 48 horas à temperatura ambiente. A seguir são lavados 2 ou 3 vezes com solução salina formolada a 0.4% e fenicada a 1.6%, deixando-se escorrer bem todo o líquido, de modo a ficarem apenas úmidos; então, estão prontos para a trituração.

Trituração. — A trituração é feita em gral mecânico ou manual, no interior de uma mesa de câmara de proteção (*), com auxílio de quartzo esteril ou,

^(*) A mesa para trituração é utilizada não só para o preparo da vacina, como ainda para manipular qualquer material, carrapatos ou órgãos de animais infetados, destinados às inoculações rotineiras.

simplesmente, congelando previamente os carrapatos, mantendo-os durante a noite no frigorífico à temperatura de — 15°C.

A mesa para trituração é um modelo simplificado da mesa de proteção já descrita (p. 59); apenas não possui tanque para solução carrapaticida. A câmara protetora tem guarnições de metal e é envidraçada de modo a permitir ampla visibilidade; os auxiliares trabalham ao abrigo de contaminações, protegidos com longas luvas de borracha, adaptáveis às aberturas laterais. Dentro da mesa, antes



F1G. 32 Mesa para trituração de carrapatos e manipulação de material infetado em geral.

de iniciar o trabalho, colocam-se: grais com os carrapatos a triturar; frascos com solução salina formolada a 0.4% e fenicada a 1.6%; copos e provetas graduadas; funis montados com gase esteril; frascos estereis de 500 cm³ de capacidade com rolhas de vidro esmerilhado, etc.

Fechadas as aberturas, pode-se iniciar a trituração dos Ixodidas: inicialmente, sem acréscimo de líquido e a seguir, juntando-se lentamente a cada gral pequenos volumes de solução formolada-fenicada, até que os carrapatos estejam perfeitamente desfeitos. Terminada a trituração, faz-se uma espécie de rinsagem do conteúdo do gral, utilizando nas diversas lavagens solução de fenol-formol até completar o volume de 125 cm³, ao mesmo tempo que se vai fazendo o transvasamento do líquido para um frasco de 500 cm³ de capacidade, contendo pérolas de porcelana. A manobra de extravasamento poderá ser feita por meio de funil montado com gaze, com a finalidade de reter as carapaças dos Ixodidas ou detritos mais grosseiros. Os frascos contendo a suspensão bruta são então fechados e rotulados com o número da partida em elaboração.

Todo o material utilizado para a trituração permanece dentro da câmara, exposto a vapores de formol até o dia seguinte, para o que se derrama, em cada gral utilizado, algumas gotas de solução de formol a 40%. No dia seguinte, abre-se a câmara e se retiram os frascos; todo o material usado é levado à Seção de esterilização.

Desintoxicação. — Os frascos contendo o produto da trituração dos carrapatos são guardados na geladeira (8 a 10°C-), onde permanecem durante 10 dias; diariamente, são agitados durante 15 a 20 minutos com auxílio de um agitador mecânico.

Decorrido êsse prazo, completa-se o volume de 500 cm³, adicionando 375cm³ de solução fisiológica esteril. O produto final a ser purificado contem, pois, 0.1% de formol e 0.4% de fenol.

Purificação. — A purificação visa eliminar todos os detritos da trituração dos Ixodidas, bem como uma parte grosseira do produto que foi precipitado pela ação do formol e do fenol.

Após 10 dias de desintoxicação, a suspensão é centrifugada a uma velocidade de 1.600 rotações por minuto durante 30 minutos. O líquido sobrenadante constitui a vacina purificada. Decanta-se, para retirar o sobrenadante e guarda-se o produto em frascos apropriados, tendo-se o cuidado de retirar u'a amostra (20cm³) para contrôle de esterilidade, inocuidade e verificação da capacidade antigênica da vacina.

A centrifugação do produto bruto não precisa ser feita logo após decorridos os 10 dias necessários para a esintoxicação. Mantida na geladeira à temperatura não inferior a 5°C, a suspensão pode ser conservada, sem inconveniente, durante algum tempo, à espera do momento mais apropriado para se proceder à purificação e distribuição.

Distribuição. — A distribuição do produto é feita em vidros com rolha de borracha perfurável para vacinação individual (6 cm³) ou coletiva (30 cm³). Retiram-se de cada partida algumas unidades para o segundo contrôle de esterilidade. O produto final deve ser conservado à temperatura entre 12 e 15°C.

2. Prova de esterilidade, inocuidade e capacidade antigênica

A prova de esterilidade é feita com o fim de afastar a possibilidade da presença de contaminações por germes aeróbios e anaeróbios, utilisando-se as técnicas empregadas no Instituto Butantan para produtos biológicos em geral.

A prova de inocuidade e a determinação do valor vacinante das diferentes partidas é feita em cobaias de cêrca de 300 g de peso. Seis animais de prova são inoculados com 1 cm³ de vacina pela via subcutânea e a seguir observados durante

12 dias. Não devem diminuir de peso, apresentar reações no local de inoculação ou mostrar elevação térmica acima de 39.6°C.

Decorridos os 12 dias, as cobaias de prova, bem como duas testemunhas, são inoculadas pela via peritoneal com 0.5 cm³ de sangue citratado de cobaia infetada, obtido por punção cardíaca no segundo ou terceiro dia de reação febril. Afim de tornar mais uniforme a atividade dos virus usados nas diferentes provas, visto que costumam ser grandes as variações do número de doses infetantes no sangue de diferentes animais infetados e não ser praticável avaliar quantitativamente a atividade do virus em cada prova, procedemos do seguinte modo:

Um mínimo de 5 animais, utilizados para fornecer o material infetante, recebem previamente pela via peritoneal virus de passagem, oriundo de caso humano de febre maculosa ou isolado de Ixodida naturalmente infetado. Todos os animais são sangrados na véspera do dia previsto para a inoculação e o volume de sangue citratado de cada cobaia é mantido na geladeira à temperatura entre 0 e 5°C durante 15 a 18 horas, enquanto se processa a prova de esterilidade para afastar a possibilidade de contaminações devidas a bacterias. No dia seguinte faz-se a mistura do sangue esteril, usando-a para a prova de antigenicidade da vacina.

Procedendo-se dêste modo, é sempre conveniente juntar várias partidas de vacina para fazer a prova na mesma ocasião e com a mesma mistura de virus.

Os animais vacinados e inoculados com virus de passagem continuam a ser observados durante mais 15 dias, registrando-se as temperaturas tomadas duas vezes ao dia: pela manhã e à tarde. Depois dêste prazo, tanto as cobaias de prova, como as testemunhas ainda vivas, são sacrificadas e necropsiadas para observar eventuais lesões macroscópicas.

O comportamento dêstes animais constituirá um índice prático da avaliação do poder vacinante da partida de vacina elaborada, desde que as testemunhas apresentem infecção típica, isto é, período de incubação de 3 a 5 dias, quadro térmico caraterístico, podendo ou não morrer da infecção, mas apresentando sempre, após a morte espontânea ou quando necropsiadas, após serem sacrificadas, as lesões macroscópicas mais freqüentemente encontradas na febre maculosa experimental: esplenomegalia acentuada, exsudação periesplênica e perihepática, congestão das suprarrenais e, por vezes, reação escrotal mais ou menos intensa. A pesquisa de riquétsias poderá ser feita nos animais mortos ou sacrificados, em preparações obtidas de raspados da parede peritoneal, o que é, desnecessário, pois que se trata de virus de passagens em cobaias, bem estudado. Quando as testemunhas não apresentarem um comportamento dêste tipo, a prova deverá ser repetida.

Os resultados são referidos da seguinte maneira, classificando-se as partidas de vacina em quatro graus diferentes:

- Vacina ótima As 6 cobaias são totalmente protegidas: não apresentam reação térmica durante o período de observação e, sacrificadas, não mostram lesões macroscópicas, caraterísticas da febre maculosa;
- Vacina bôa Somente uma cobaia tem reação térmica mais ou menos caraterística, morrendo ou não da infecção. As demais são totalmente protegidas;
- Vacina regular Duas entre as 6 cobaias reagem febrilmente, morrendo ou não da infecção, as restantes não têm elevação térmica, nem quando necropsiadas apresentam lesões evidentes de febre maculosa;
- 4. Vacina sem valor Mais de duas reagem termicamente de forma caraterística, morrendo da infecção ou apresentando à necrópsia lesões caraterísticas.

H - APLICAÇÃO DE VACINA. VACINAÇÃO

1. Doses

As pessoas adultas devem receber três injeções de 2 cm³ pela via subcutânea. Crianças com menos de 10 anos recebem três doses de 1 cm³.

É de todo conveniente repetir as vacinações com relativa frequência, principalmente entre indivíduos residentes em locais onde há constante aparecimento de casos de febre maculosa, em consequência da existência de abundante quantidade de carrapatos infetados. Nestes casos, a revacinação com 1 ou 2 doses deverá ser feita pelo menos anual — ou, melhor ainda, semestralmente.

2. Reações

As reações observadas nas inúmeras pessoas vacinadas com a vacina preparada em nosso laboratório nestes últimos anos são relativamente benignas, só raramente aparecem indivíduos com sensibilidade exagerada ao material vacinante, sem, no entanto, acarretar consequências maiores de molde a dificultar a vacinação generalizada. Elas são de ordem local e geral. A reação local traduz-se por edema e eritema, mais ou menos acentuados. A reação geral acarreta febre, geralmente pouco acentuada, e, raramente, calefrios e dores pelo corpo.

3. Resultados

O julgamento do valor preventivo para o homem, de uma vacina desta natureza, feito em focos, onde os casos aparecem com bastante irregularidade, é sempre difícil, principalmente quando ainda o tempo decorrido desde o início da campanha de vacinação preventiva não permite esclarecer de modo decisivo até onde a vacinação foi eficiente. Os dados obtidos pela aplicação da vacina de Spencer e Parker, nos Estados Unidos e entre nós durante alguns anos são bastante animadores, porém confirmam que proteção satisfatória só se obtem com vacinações repetidas (35,36).

Nos serviços do laboratório desde a ocorrência dos casos fatais nas pessoas do Dr. Lemos Monteiro e seu auxiliar, Sr. Edison Dias, não foram verificados novos acidentes. Acreditamos que realmente a vacinação e revacinação constante dos técnicos tenham concorrido de maneira eficaz para êste fato. São fáceis de compreender as inúmeras ocasiões de infecção em trabalhos desta natureza, por mais rigorosas que sejam as precauções tomadas, em conseqüência da intensidade do trabalho com a constante manipulação de material muito virulento. Todos os funcionários ocupados nos trabalhos de febre maculosa são vacinados pelo menos cada seis meses, recebendo três inoculações de 2 cm³ cada, por ocasião da vacinação semestral.

I - BIBLIOGRAFIA

- Piza, J. de Toledo, Gomes, F. Salles, Gomes, L. Salles, Meyer, J. R., Fleury, J. P., Castro, Oliveira, Rodrigues, C. & Lima, H. de Rocha (1931). Le typhus exanthématique a São Paulo. C. R. Soc. Biol., Paris, 106, 1020-1022.
- Piza, J. de Toledo, Meyer, J. R. & Gomes, L. Salles (1932). Typho exanthematico de São Paulo, 156 p. ilus. São Paulo.
- 3. Lima, H. de Rocha (1918).

 Münch. med. Wschr., 65, 454.
- Weigl, R. (1930). Die Methoden der aktiven Fleckfieber-Immunisierung. Bull. Acad. Polon. sci. med., 25.
- Weigl, R. (1933). Faits d'observation et expériences démontrant l'efficacité du vaccin a rickettsia pour la prévention du typhus. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 22, 315-320.
- Chodsko, W. (1933). Expérience polonaise de la vaccination préventive contre le typhus exanthématique d'après la méthode de Weigl. Off. internat. hyg. publ., 25, 1549-1558.
- 7. Spencer, R. R. & Parker, R. R. (1925). Rocky Mountain spotted fever: vaccination of monkeys and man. Publ. Health Rep., 40, 2159-2167.
- Zinsser, H. & Batchelder, A. P. (1930). Studies on Mexican typhus fever. I. J. exp. Med., 51, 847-858.

- Zinsser, H. & Castañeda, M. R. (1933). Studies on typhus fever. X. Further experiments on active immunisation against typhus fever with killed Rickettsia. J. exp. Med., 57, 291-390.
- Zinsser, H. & Castañeda, M. R. (1931-32). A method of obtaining large amounts of Rickettsia prowazeki by X-ray radiation of rats. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 29, 840-844.
- Zinsser, H. & Macchiavello, A. (1936-37). Enlarged tissue cultures of European typhus rickettsiae for vaccine production. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 35, 84-87.
- 12. Zinsser, H., Wei, H. & Fitzpatrick, F. (1937-38). Agar slant tissue cultures of typhus Rickettsiae (both types). Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 37, 604-606.
- Zinsser, H., Wei, H. & Fritzpatrick, F. (1938). Nouvelles méthodes de culture de Rickettsiae du typhus a propos de la production de vaccins. C. R. Soc. Biol., Paris, 127, 229-232.
- Castañda, M. R. (1939). Experimental pneumonia produced by typhus rickettsiae.
 Amer. J. Path., 15, 467-475.
- Cox, H. R. (1938). Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing Rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever and typhus groups. Publ. Health Rep., 53, 2241-2247.
- Monteiro, J. Lemos (1935-36). A vaccinação preventiva como base da prophylaxia do typho exanthematico de São Paulo. Mem. Inst. Butantan, 10, 1-16.
- Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. (1932). Typho exanthematico de S. Paulo. XI.
 Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos (Boophilus microplus e Amblyomma cajennense). Mem. Inst. Butantan, 7, 33-50.
- Monteiro, J. Lemos, Fonseca, F. & Prado, A. (1932). Typho endemico de São Paulo.
 VI. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus por Ixodidae. Brasil-méd., 46, 49-52.
- Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. (1933-34). Localização da Rickettsia brasiliensis nas cellulas dos diverticulos intestinaes do Amblyomma cajennense. Mem. Inst. Butantan, 8, 49-56.
- Gomes, L. Salles (1933). Typho exanthematico de São Paulo. Brasil-méd., 47, 923-926.
- Travassos, J. (1938). Estudos experimentaes sobre a transmissão do tifo exantematico de São Paulo pelo Amblyomma striatum Косн, 1844. Rev. biol. e hig., 9, 64.
- Travassos, J. (1938). Etudes expérimentales sur la transmission du typhus exanthématique de São Paulo par l'Amblyomma striatum Koch, 1844. C. R. Soc. Biol., Paris, 127, 462-464.
- 23. Travassos, J. (1938). Transmissão experimental do virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas pelo Amblyomma striatum Косн, 1844. Rev. biol. e hig., 9, 69.
- Travassos, J. (1938). Transmission expérimentale du typhus exanthématique de São Paulo par l'Amb!yomma brasiliense ARAGÃO, 1908. C. R. Soc. Biol., Paris, 127, 1375-1376.
- Travassos, J. (1938). La tique Amblyomma striatum Koch, 1844, comme vecteur du typhus exanthématique de São Paulo. Infections naturelles en spécimens recueillis sur des chiens, dans un foyer de la capitale (São Paulo). C. R. Soc. Biol., Paris, 127, 1377-1380.

- 26. Travassos, J. (1938). Possibilidade de infecção dos carrapatos Amblyomma cajennense e Amblyomma striatum, ao sugarem o cão inoculado com o virus do typho exanthematico de S. Paulo. Rev. biol. e hig., 9, 72.
- 27. Travassos, J. (1938). Estudo da infecção ativa ou latente dos carrapatos Amblyomma cajennense e Amblyomma striatum, pelo virus do tifo exantematico de São Paulo Processos de reativação. Rev. biol. e hig., 9, 64.
- 28. Robinson, L. E. (1908-26). The genus Amblyomma. Citado em Nuttall, G. H. F., Warburton, C., Cooper, W. F. & Robinson, L. E. (1908-26). Ticks: a monograph of the Ixodoidea, 6v. ilus. Cambridge, University press.
- 29. Rondelli, M. T. (1937). Ixodoidea. Parte I. Amblyomma ovale Косн, Amblyomma cajennense Fabricius e le specie a loro affini nuove o poco note. Spedizione del Prof. Beccari nella Guyana Inglese. Riv. Parassit., 1, 273-300.
- 30. Rohr, C. J. (1909). Estudos sobre Ixodidas do Brasil, 220 p. 5 planchas. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz.
- Cooley, R. A. & Kohls, G. M. (1944). The genus Amblyomma (Ixodidae) in the United States. J. Parasit., 30, 77-111.
- 32. Dias, E. & Martins, A. V. (1938). A preparação da vaccina de Spencer e Parker contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas, no Rocky Mountain Laboratory, em Hamilton, Montana, Estados Unidos. O Hospital, Rio de Janeiro, 13, 55-70.
- Monteiro, J. Lemos (1933-34). Vaccina contra o typho exanthematico de S. Paulo. Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas. Mem. Inst. Butantan, 8, 9-20.
- 34. Parker, R. R. & Spencer, R. R. (1930). Studies on Rocky Mountain spotted fever.

 Nat. Inst. Health Bull., 154, 1-1116.
- Parker, R. R. (1941). Rocky Mountain spotted fever: results of fifteen years' prophylatic vaccination. Amer. J. trop. Med., 21, 369-383.
- 36. Piza, J. de Toledo (1942). A vacina de Spencer-Parker contra a febre maculosa na prática sanitária. Arq. de cir. clín. e exper., 6, 1329.

(Entregue para publicação em julho de 1944).

Trained States A. Frontier, 20, 27-1115.