

Imunidade Antiestafilocócica

Homero Jobim
Do Laboratório Geyer

Um dos capítulos mais interessantes da Imunologia é, sem dúvida, o da imunidade contra o estafilococo, que tem sido objeto de estudos aprofundados e, acompanhando as doutrinas sobre a imunidade em geral, tem sofrido interpretações várias.

A descoberta de Richet e Hericourt, em 1888, de que o soro dos animais inoculados com estafilococo possui propriedades imunizantes, iniciou esses estudos e orientou a interpretação no sentido exclusivamente humoral. Vários experimentadores se dedicaram a repetir e a observar as pesquisas de Richet e Hericourt, mas, apesar de encontrarem no soro dos animais inoculados propriedades bactericidas, não lhes foi possível confirmar integralmente as observações destes. Os anticorpos, antileucocidina e antihemolisina, encontrados nesses soros, sempre em título muito baixo, não conseguiam conferir a imunidade passiva, em franco contraste com o que se observava com a antitoxina difterica e tetânica, altamente preventivas.

A imunidade antiestafilocócica parecia ser de natureza diferente da tetânica ou difterica. Outro fator, possivelmente de grande preponderância, devia acompanhar ou substituir o humoral.

A doutrina celular idealizada por Metchnikoff veio imprimir novo rumo à interpretação dos fatos. De início exclusivamente celular, dando a fagocitose a chave do problema imunológico, essa doutrina evoluiu, admitindo-se posteriormente uma associação celular e humoral na explicação da imunidade.

Wright, em 1902, inoculou no homem suspensões de estafilococos mortos pelo calor, com a esperança de, reforçando a fagocitose, conseguir a imunização e a cura das infecções estafilocócicas. Surge, então, o método opsonico, isto é, a observação da propriedade conferida ao soro em facilitar e intensificar a fagocitose.

Iniciou-se o tratamento das estafilococias pelas vacinas de Wright, em doses crescentes e suficientemente espaçadas, para evitar a fase negativa, tão nitidamente evidenciada pelo índice opsonico. A dificuldade de verificação desse índice — necessário, segundo Wright, para uma vacinação eficiente — fez com que o intervalo das doses fosse indicado pelas reações locais e gerais, e os bons resultados obtidos provocaram o esquecimento, e quiçá, o seu descredito.

A imunidade contra o estafilococo passou, então, a ser vista como um fenômeno puro de fagocitose: era a supremacia da doutrina celular sobre a humoral.

Herelle propõe uma nova e sugestiva interpretação. Observa e

demonstra a existência nos focos de supuração, produzida pelo estafilococo e já em via de cura, de um princípio lítico que destrói esse germe — o bacteriófago. As substâncias resultantes da dissolução das bactérias determinam no organismo a imunidade. Essa descoberta de Herelle passou rapidamente das experiências de laboratório à aplicação prática, sendo brilhantes os resultados obtidos algumas vezes. Infelizmente, e com alguma frequência, formam-se no organismo anticorpos, antibacteriófagos, que impedem a ação terapêutica, neutralizando completamente o princípio lítico.

Em 1922, Besredka publica seus trabalhos sobre a imunidade local e propõe o tratamento das estafilococias pelos caldos-vacinas, obtidos por filtração de culturas de estafilococo e impróprios ao desenvolvimento do germe, pelo aparecimento do antivírus. Para Besredka, a imunidade é um fenômeno exclusivamente local, processando-se nos tecidos sensíveis, atingidos pelo agente infetante.

Eram essas as idéias dominantes, cada uma com seus defensores ardorosos, mas que não explicavam completamente a imunidade contra o estafilococo, quando, em Janeiro de 1928, em Bundaberg, Queensland, um acidente doloroso veio alterar o que se conhecia sobre a infecção estafilocócica. A contaminação por estafilococo de uma mistura toxina-antitoxina diftérica, usada na vacinação, determinou a morte de 12 entre 21 crianças inoculadas, com um quadro septicêmico que salientava o elevado poder tóxico do germe.

A comissão encarregada pelo governo inglês de pesquisar e elucidar a causa do acidente, tendo à frente o sábio australiano F. M. Burnet, isolou amostras de estafilococo que, perfeitamente observadas e melhor estudadas, levaram à demonstração da existência de uma toxina estafilocócica na verdadeira expressão da palavra.

Burnet obteve esta toxina cultivando o germe em gelose semi-líquida em uma atmosfera de CO².

A descoberta de Burnet deu origem a uma grande série de trabalhos, mostrando alguns as propriedades da toxina, e salientando outros novos aspectos no estudo da imunidade estafilocócica.

Deter-nos-emos, embora pela maneira mais rápida possível, no estudo da toxina estafilocócica, do toxoide obtido pela sua formolização, e na interpretação da imunidade que determina.

TOXINA ESTAFILOCOCICA

Para se conseguir uma boa toxina são necessários, como para as toxinas em geral, vários fatores: amostra bem toxigênica, meio de cultura favorável, temperatura e tempo de incubação ótimos, e atmosfera adequada.

AMOSTRA. — A seleção de uma amostra bem toxigênica não é tarefa das mais fáceis. Inicialmente temos a dificuldade de que nem todas as amostras são toxigênicas, o que se consegue apenas em 10% das examinadas.

Entre as selecionadas são muito raras as que formam toxina

de título elevado, e entre estas algumas perdem rapidamente o poder toxínogênico. Temos trabalhado com muitas amostras, isoladas por nós e recebidas de outros laboratórios. As que mais se têm prestado são: a 126, isolada por nós, a 134, recebida do Instituto Butantan, por intermédio do Dr. Travassos da Rosa, e a 141, amostra Wood, de Burnet, gentilmente cedida pelo prof. Sordelli, do Instituto Bacteriológico de Buenos Aires.

MEIO DE CULTURA. — O meio de cultura, que tem fornecido melhor toxina, é o meio líquido de Walbun, modificado por Burnet:

A um litro de água de carne preparada com coração de boi (250,0 para 1 litro de água), acrescentam-se 5,0 de peptona de Witte, 2,0 de fosfato de potássio e 0,3 de sulfato de magnésio; dissolver, filtrar e ajustar o pH entre 6,0 e 7,0; distribuir em frascos de 50 cc. e esterilizar a 120°, durante 20 minutos.

Experimentámos produzir a toxina em meio de Ramon, mas o título que obtivemos foi muito inferior ao que conseguimos regularmente com o de Walbun.

TEMPERATURA E TEMPO E INCUBAÇÃO. — A temperatura ótima é de 37°. O tempo de incubação que temos empregado é de 6 dias, não tendo obtido melhora na toxina, aumentando ou diminuindo o prazo de incubação.

ATMOSFERA DE CO². — Usamos sempre, e com ótimo resultado, a cultura em ambiente com 20% de CO², conforme aconselha Burnet, renovando a atmosfera no 4.º dia de incubação.

PROPRIEDADES DA TOXINA ESTAFILOCOCCICA. — A toxina estafilococcica é caracterizadamente uma exotoxina, e apresenta algumas particularidades interessantes em seu modo de agir:

1) Ação eritrocitolítica. — A toxina tem o poder de lisar, de uma maneira mais ou menos intensa, os globulos vermelhos dos diferentes animais. Esse poder de lise é facilmente destruído pelo calor, pelo formol e sob a ação dos ácidos. A inoculação da toxina em animais determina o aparecimento de um anticorpo, que neutraliza essa ação lítica.

O poder eritrocitolítico de uma toxina é facilmente titulável, e serve de padrão para avaliar o seu poder toxico. Para isto coloca-se a toxina em concentrações várias, em uma série de tubos, em contato com uma emulsão de globulos de coelho ou de carneiro, lavados e diluídos a 1/5. Faz-se uma incubação a 37°, meia hora, e leva-se a temperatura baixa, durante 12 horas. Verifica-se, então, de acordo com Burnet, qual o tubo que contém, pelo menos, 50% de globulos hemolisados. A diluição que corresponde a este tubo é a D. M. H. (dóse minima hemolítica), equivalente, digamos, a D. M. M. (dóse minima mortal) da toxina diftérica.

O número de D. M. H., que contém cada partida, é variável com as condições acima estabelecidas, assim como para uma mesma amostra e nas mesmas condições sofre oscilações de uma partida para

outra. Temos obtido, em média, de 1.600 a 3.200 D. M. H. por cc., conseguindo, não raro, toxinas com 6.400 D. M. H. por cc.

Esse poder hemolítico da toxina estafilocócica diminui rapidamente já nos primeiros dias de preparação, desaparecendo completamente ao fim de algumas semanas, quando a toxina é conservada na temperatura ambiente, conseguindo-se conservar mais tempo, embora com uma desvalorização de 50%, quando é congelada. Temos toxinas congeladas há 5 ou 6 meses, que nos dão um título médio de 800 D. M. H.

2) Estreitamente ligada a esse poder hemolítico, observa-se uma ação lítica notável sobre os leucócitos e outras células do organismo. Aliás, essa ação sobre os leucócitos já tinha sido evidenciada em 1895, por Denys e Vandeveld, que a denominaram leucocidina.

3) A toxina possui um poder letal, que se verifica facilmente no coelho, por ser o animal mais sensível, ocasionando a morte por via subcutânea ou intravenosa.

A inoculação de dose relativamente fraca de toxina (1/4, 1/10 de cc.), por via intravenosa, determina a morte imediata do animal, por síncope cardíaca e respiratória, precedidas de uma queda brusca e imediata da pressão arterial.

Pode-se determinar e estabelecer a D. M. L. (dose mínima letal), que alguns autores usaram para suas observações.

4) A toxina estafilocócica, quando inoculada por via intradérmica, determina a formação de grandes placas de necrose: é o que se denomina ação dermo-necrótica.

A dose mínima necrótica (D. M. N.), por ser muito variável, não se presta para a padronização de toxinas.

5) Travassos da Rosa, em São Paulo, evidenciou em 1936, uma ação tetânicante, que se revela rapidamente após a inoculação intracerebral por uma síndrome caracterizada por contraturas generalizadas, rigidez da musculatura da rachis, opistótono, tachycardia e tachypnéa iniciais e sensibilidade exagerada, morrendo, o animal algum tempo mais tarde.

Como esta síndrome é variável em intensidade, Travassos da Rosa estabeleceu uma dose mínima tetânicante letal (D. M. T. L.), que representa a menor dose de toxina capaz de produzir sistematicamente a síndrome nos 30 primeiros minutos após a inoculação e a morte em 24 horas em todas as cobaias inoculadas.

6) De todas estas ações, a que revela maior interesse prático, é o elevado poder antigênico da toxina, provocando o aparecimento rápido de antitoxina no soro dos animais inoculados.

ANATOXINA ESTAFILOCÓCICA. — Burnet, após ter estudado e observado as diversas propriedades da toxina estafilocócica, conseguiu a sua transformação por meio do formol, nos moldes da transformação da anatoxina diftérica e tetânica, obtida por Ramon. Após uma permanência de 10 dias na estufa a 37° com uma dose de formol a 40/100, a toxina perde completamente as suas propriedades, conservando, entretanto, o poder antigênico. Perfeitamente inócua, a anatoxi-

na estafilocócica presta-se admiravelmente para provocar a imunização ativa, quer no homem, quer nos animais, facilitando assim a produção de antitoxina para a imunização passiva.

Ramon e Boivin conseguiram, ultimamente, precipitar a anatoxina do caldo de cultura, levando o pH a 3,5 com ácido tricloracético ou sulfúrico e dissolvendo o precipitado em sol. de fosfato de potássio ou carbonato de sódio. Obtiveram, desta maneira, um produto purificado e concentrável, que permite uma imunização muito mais rápida e ativa.

Segundo a técnica preconizada por Ramon, verificámos qual o toxoide mais ativo: se o bruto, isto é, o caldo de cultura desintoxicado pelo formol, ou o precipitado. Inoculámos coelhos com diversas partículas de toxoides e, após um número idêntico de inoculações ($\frac{1}{2}$ cc., 1 cc., 1,5 cc., 2 cc. e 2,75 cc.), com um espaço de tempo igual (uma semana depois da última inoculação), observámos nos animais imunizados com toxoide purificado a neutralização de 2 D. M. H. de toxina até com 0,002, enquanto que, com toxoide bruto, o limite de neutralização era de 0,02.

A anatoxina purificada, segundo Ramon, possui, pois, elevado poder imunizante ao lado de uma inocuidade bastante superior ao toxoide bruto, por se encontrar privada das impurezas do meio de cultura e ser possível a sua concentração na dose necessária e eficiente.

IMUNIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA. — Vejamos agora as observações que determinam essas descobertas de Burnet e qual o reflexo que tiveram na interpretação da imunidade antiestafilocócica..

Ramon e Richou fizeram experiências muito interessantes e sugestivas. Inocularam, num primeiro grupo de coelhos, estafilococos vivos suspensos numa mistura de lanolina e óleo de oliva, e observaram o aparecimento de antitoxinas no curso da imunização, embora em título muito inferior ao que se obtém após imunização pela anatoxina. Num segundo grupo inocularam a mesma quantidade da mistura lanolina-óleo-germes, mas desta vez após matar os germes pelo calor, e não observaram, embora com pesquisas aprofundadas e repetidas, a formação de antitoxinas. Finalmente, um terceiro grupo foi imunizado com anatoxina.

Os grupos acima foram inoculados com 0,5 cc., por via subcutânea, e com 0,2 cc., por via intradérmica, de uma suspensão de estafilococos virulentos (cultura de 24 horas), ao mesmo tempo que outro grupo de animais testemunhas não imunizados.

Nos pontos injetados observou-se: nos testemunhas, um edema grande e posteriormente uma escara muito extensa (com 2 a 3 cm. de diâmetro); nos imunizados por germes mortos incorporados á mistura lanolina-óleo, verificaram um edema um pouco menor, seguindo-se um nódulo inflamatório do tamanho de uma avelã; os coelhos imunizados com germes vivos e que contém um pouco de antitoxina, apresentaram lesões pouco intensas (edema pequeno e um nódulo discreto, que desaparece com o tempo); finalmente, no grupo imunizado pela anatoxina e que tem título elevado de antitoxina, o edema é quasi nulo, e o nódulo, das dimensões de uma lentilha.

Ramon e Richou, entre outras considerações, assim concluem dessas experiencias demonstrativas: "O estafilococo, cuja multiplicação é favorecida no ponto de inoculação pela inflamação devida ao excipiente goduroso, elabora "*in situ*" sua toxina. Esta toxina, graças aos fenomenos inflamatórios locais, é modificada em suas propriedades toxinas, mas não seu poder antigenico. Assim modificada a toxina, passa ao organismo, onde provoca a formação de antitoxina especifica. Essa antitoxina é capaz, como nos animais imunizados com a anatoxina, de proteger o organismo com um exito apreciavel contra a toxinfecção experimental".

Uma outra série de experiencias feitas por Ramon e Richou, e já repetidas e comprovadas por outros experimentadores, como Delaunay, Vitchin, Dowie, etc. demonstram a quasi ineficacia das vacinas com germes mortos. Um grupo de animais imunizados com emulsão de germes mortos e outro com anatoxina são submetidos á inoculação de prova com estafilococos virulentos. Observa-se que os do primeiro grupo, assim como os testemunhas, morrem nos primeiro dias, ao passo que os do segundo grupo morrem no fim de varios dias, ou permanecem vivos, como se nada tivesse havido.

Destas experiencias e dos resultados obtidos com a sôroterapia antitoxica, salienta-se logo o valor preponderante da antitoxina na imunidade antiestafilococica.

Por orientação de Ramon, fez Delaunay, no ano passado, uma série de pesquisas sôbre a histopatologia da infecção estafilococica. Observou em um grande numero de animais as modificações celulares produzidas pela infecção experimental, encontrando o organismo imunizado ou não.

Extraordinariamente interessantes são estas observações, que culminaram em uma hipotese sugestiva e impressionante da imunidade antiestafilococica.

Após quinze horas, o exame histológico da lesão permite fazer, no animal imunizado, as constatações seguintes: "Sob uma epiderme absolutamente integra se encontra o tecido conjuntivo muito dilacerado e infiltrado por numerosos polinucleares. Os vasos são inflamados e cercados por leucocitos muito bem conservados. Entre os feixes musculares, em excelente estado, deslizam fusos de globulos brancos. As células conjuntivas não parecem ter atividade própria. Os germes estão presentes".

No animal testemunha a lesão se caracteriza, ao contrário, por uma epiderme fina e descolada da camada conjuntiva subjacente. Os vasos são dilacerados, mas não apresentam as cintas de polinucleares encontradas nos animais imunizados. As fibras conjuntivas são separadas e os nucleos já pouco visiveis. Os feixes musculares estão lesados, dilacerados, e é difficil distinguir suas fibrilas. Nos espagos interfasciculares a infiltração celular é muito pequena. Os estafilococos estão presentes".

Oitenta horas após a inoculação, vê-se nos animais imunizados uma lesão bem localizada, com os seguintes carâteres: — "Epiderme e musculos em perfeito estado. Ao redor de um pequeno abcesso, que

ocupa o centro do córte, encontra-se uma proliferação extremamente notável de tecido conjuntivo de néo-formação, uma verdadeira casca. Histiocitos numerosos. Constata-se o aparecimento de vasos de néo-formação”.

Nos testemunhas, ao contrário, verifica-se o seguinte: — “A epiderme é uma massa mortificada, sem nucleos, com vestígios apenas de folículos pilosos. Um abcesso extenso, com polinucleares mais ou menos alterados, forma o limite inferior da necrose. Sobre a face profunda dêste abcesso uma barreira conjuntiva está em vias de formação. Numerosos polinucleares infiltram êste tecido. Alguns histiocitos. Musculos em degeneração”.

Nessas observações verifica-se que nos testemunhas, após um pequeno afluxo de leucocitos imediatamente depois da inoculação, há um afastamento dêstes globulos de defesa, como se o germe exercesse um tropismo negativo sobre êles; ao passo que nos animais imunizados o numero de leucocitos é muito maior, não desaparecem (pelo contrário: aumentam), fagocitam os agentes invasores, havendo a neutralização do tropismo negativo.

A unica diferença que se observa nêsses grupos de animais é a presença de antitoxina no sôro dos imunizados, devendo ser êste o elemento responsavel pela neutralização do tropismo negativo exercido pelo germe sobre os leucocitos.

Baseado nas observações acima e nas de varios pesquisadores, Ramon e seus colaboradores lançaram a moderna e sugestiva explicação da imunidade antiestafilococica.

A infecção estafilococica se processa pelo afastamento dos elementos celulares de defesa do organismo por meio da toxina elaborada pelos germes, conseguindo êstes se multiplicar e vencer as resistencias organicas.

Quando o organismo está imunizado a antitoxina neutralizando a toxina permite que os germes sejam presa facil dos leucocitos.

A imunidade antiestafilococica é ao mesmo tempo antitoxica e antimicrobiana; antitoxica pela neutralisação da toxina estafilococica por meio da antitoxina correspondente, e antimicrobiana pela fagocitose dos elementos invasores pelos leucocitos.

A imunidade pôde ser natural ou artificialmente adquirida. O organismo adquire naturalmente a imunidade pelo contato frequente com o antígeno, por ser o estafilococo um germe muito espalhado na natureza e hospede constante da pele e das mucosas externas. Nos animais demonstra-se facilmente esta afirmação, provocando o aparecimento de antitoxina pelo simples pincelamento da faringe, sem que se exteriorize a infecção.

Provoca-se artificialmente a imunidade inoculando a anatoxina.

De tudo o que acima ficou exposto, conclue-se que o tratamento das estafilococias deve ser feito pela anatoxina, mesmo quando há necessidade de defesas imediatas, como nas septicemias, em que deve ser associada a sôroterapia antitoxica-estafilococica.