

INFLUENCIA DOS ESTAPHYLOCOCCOS
SOBRE A ACTIVIDADE DO VIRUS VACCINICO

POR

J. TRAVASSOS E R. GODINHO

QUADRO N.º 1

LEGENDA: O = ouro
of = ouro forte
B = branco
L = cor de linho
A = ácido

AC = acido e coagulação do meio
+ = fracamente acido
K = alcalino
P = proteolyse
— = nenhuma alteração do meio

PESQUISA DO VIRUS VACCINICO NA CELLULA ESTAPHYLOCOCCICA

QUADRO N.º 2

			2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	10 dias	Prova de immunid. (Virus puro dilui- do a 1/10)
POLPA 4687	Staphyl. aureus (Cobaia 50)	Emulsão pura	—	—	—	—	—	++
		Dil. 1/1 %	—	—	—	—	—	++
	Staphyl. albus (Cobaia 108)	Emulsão pura	++	—	—	—	—	++
		Dil. a 1 %	+	—	—	—	—	++
POLPA 4649	Staphyl. aureus (Cobaia 26)	Emulsão pura	+++	++	+	+	+	++++
		Dil. a 1 %	+++	+	—	—	—	+++
	Staphyl. albus (Cobaia 37)	Emulsão pura	+	—	—	—	—	—
		Dil. a 1 %	+	—	—	—	—	+++
POLPA 4667	Staphyl. aureus (Cobaia 43)	Emulsão pura	+++	+	+	—	—	++++
		Dil. a 1 %	—	—	—	—	—	—
	Staphyl. albus (Cobaia 112)	Emulsão pura	+	—	—	—	—	++
		Dil. a 1 %	—	—	—	—	—	+
TESTEMUNHAS								
Staphyl. albus (saprophyta pelle) (Cobaia 36)	Emulsão pura	+	—	—	—	—	++	
	Dil. a 1 %	—	—	—	—	—	+	
Staphyl. aureus (pathogen.) (Cobaia 884)	Emulsão pura	++	+++	++	+	+	++	
	Dil. a 1 %	—	—	—	—	—	+	

— a ++++ = diferentes grãos de reacção

Adsorção do Virus Vaccinico pela Cellula Estaphylococcica

QUADRO N.º 3

CELLULAS VIVAS			2 HORAS DE CONTACTO 16°						PROVA DE IMMUNIDADE						2 HORAS DE CONTACTO 37°						PROVA DE IMMUNIDADE									
DIAS			2	3	5	7	8	10	15	2	3	5	7	8	10	15	2	3	5	7	8	10	15	2	3	5	7	8	10	15
1 cc. virus + 1 cc. Est. aureus da Polpa 4687	L. S.	1/100	+	+	++	+++	++	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	+	+	-	-	-	-	-	++	++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST.	EST.	1/100	+	++	+++	++++	++++	++++	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+	+	-	-	-	-	-	No 5.º dia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 cc. virus + 1 cc. Est. albus da Polpa 4649	L. S.	1/100	+	+	++	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1/1.000	+	+	+	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST.	EST.	1/100	+	+	++	+++	+++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1 cc. virus + 1 cc. Est. albus Saprophyta da pelle	L. S.	1/100	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+	+	-	-
		1/1.000	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
EST.	EST.	1/100	+	+	+	+++	+++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-	-
		1/1.000	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1 cc. virus + 1 cc. Est.	L. S.	1/100	-	-	+++	++++	++++	+++	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+	+	-
		1/1.000	-	-	++	+++	+++	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
EST.	EST.	1/100	+	+	+	+	++	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	++++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
CELLULAS MORTAS																														
1 cc. virus + 1 cc. Est. aureus da Polpa 4687	L. S.	1/100	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST.	EST.	1/100	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
1 cc. virus + 1 cc. Est. albus da Polpa 4649	L. S.	1/100	+	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EST.	EST.	1/100	+	+	+++	+++	+++	+	-	+	+	+	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	++	-	+	+	+	-	-	-	-
		1/1.000	-	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+	-	+	+	-	-	-	-	-
1 cc. virus + 1 cc. Est. albus Saprophyta da pelle	L. S.	1/100	+	+	+++	+++	+++	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	+++	++	+	-	+	++	++	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
EST.	EST.	1/100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	+++	++	+	-	-	+	+	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	++	+	-
1 cc. virus + 1 cc. Est.	L. S.	1/100	+	+	+++	+++	++	+	-	+	+	+	-	-	-	-	++	++	+++	+	+	-	-	+	++	+	+	-	-	-
		1/1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++	+	-	-
EST.	EST.	1/100	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	-	-	-	-	-
		1/1.000	-	-	++	-	-	-	-	-	+	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Testemunha		1/100	++	+++	+++	+++	+++	+++	-		+	+	+	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-		+	+	-	-	-	-
Actividade do virus		1/1.000	+	++	+++	+++	+++	++	-		+	+	+	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	-		+	+	-	-	-	-
Testemunha		Puro	+	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	++	+	-														
Acção pathog. do estaphylococco		1/100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-														
Testemunha		Puro	++	+++	+++	++	+	-	-	+	++	+++	+++	++	-	-														
Acção pathog. do estaphylococco		1/100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-														
Testemunha		Puro	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-														
Acção pathog. do estaphylococco		1/100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-														
Testemunha		Puro	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-														
Acção pathog. do estaphylococco		1/100	+	+	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+	-	-														

L. S. = Liquido sobrenadante
 Est. = Estaphylococco
 - = Negativo
 + a ++++ = Varias intensidades de lesões

INFLUENCIA DOS ESTAPHYLOCOCCOS SOBRE A ACTIVIDADE DO VIRUS VACCINICO

POR

J. TRAVASSOS E R. GODINHO

O papel do estaphylococco na formação da pustula vaccinica tem sido objecto de numerosas pesquisas e discussões scientificas. Primitivamente responsabilizado pela etiologia do *cow-pox*, esse germe passou, sobretudo depois dos estudos sobre a filtrabilidade do virus, a ser encarado como elemento de infecção secundaria; depois, das pesquisas de Ponndorf (1) nasceu a idéa de uma symbiose, emprestando-se ao estaphylococco o papel principal de portador do virus, na localização ulterior deste nos tecidos; e, ainda recentemente, Rivière e Patocka (2), baseados em estudos realizados sobre o assumpto, estabeleceram a seguinte formula: "Les staphylocoques ayant une action plus rapide (même lorsqu'ils sont très peu pathogènes) determinant des lesions des cellules cutanées sur lesquelles se fixent alors les plus petites traces de virus, qui ne seraient pas elles-mêmes capables de determiner une reaction typique et intense".

Visando a interpretação de certos pontos deste problema, que, encarado na formula acima estabelecida por Rivière e Patocka, vem, em parte, de encontro ás verificações já feitas neste Instituto com o emprego do virus em estado de pureza (3), encetámos uma serie de experiencias, por signal grandemente facilitadas pelo uso do virus vaccinico puro (filtrado), material esse que, mais do que nenhum outro, offerece condições adequadas a essa ordem de pesquisas.

Na primeira parte do nosso trabalho, estudámos bacteriologicamente varios estaphylococcos isolados da polpa vaccinica, comparativamente com amostras de estaphylococcos pathogenicos e estaphylococcos isolados da pelle de pessoas sãs normaes; na segunda parte, procurámos verificar as possiveis relações existentes entre a cellula estaphylococcica e o virus vaccinico, no que diz respeito á formação da pustula vaccinica.

Caracteristicos dos estaphylococcos isolados da polpa vaccinica e da pelle de pessoas normaes, estudados comparativamente aos de estaphylococcos pathogenicos. — A differenciação dos estaphylococcos, baseada nos caracteres biologicos

ou no grau de pathogenicidade, é assumpto que demanda estudo acurado. Ainda não ha um methodo rigoroso baseado no qual se possam distribuir os varios estaphylococcus por grupos definidos; o conjuncto de caracteristicos que separa os estaphylococcus saprophytas dos pathogenicos apresenta numerosas excepções, nem sempre sendo possivel filial-os acertadamente. Não sendo aqui apropriada a discussão dessas falhas, limitamo-nos a assignalar os caracteristicos biologicos que approximam ou afastam entre si os estaphylococcus da polpa vaccinica e os pathogenicos para o homem, visando principalmente verificar a possivel pathogenicidade dos mesmos.

O pigmento côr de ouro, a liquefacção da gelatina, a reduccão dos nitratos, a coagulação do leite, a acidificação de certos assucares, a producção de uma hemolysina e da estaphylocoagulase, são caracteristicos que se encontram quasi sempre nos estaphylococcus pathogenicos. Esses caracteristicos foram por nós estudados nas amostras de estaphylococcus que isolámos da polpa e da pelle de pessoas normaes, comparativamente com varias amostras de estaphylococcus pathogenicos para o homem, da nossa collecção de culturas.

O Quadro n.º 1 resume os resultados obtidos. Como se poderá ver, esses resultados foram mais constantes na pesquisa da estaphylocoagulase (prova de Much), positiva na serie de estaphylococcus pathogenicos e negativa na serie de saprophytas, mostrando os estaphylococcus isolados da polpa fraco poder coagulador do plasma. Com algumas dessas amostras procedémos á prova de pathogenicidade, para o que recorrémos á technica de Dold (4), por mais se approximar do fim que visavamos. As inoculações foram feitas em coelhos por via intradermica e na dose de 0,05 c. c. de uma cultura em caldo de 24 horas.

De uma maneira geral, a pathogenicidade para o coelho correu a par com a prova da estaphylocoagulase. Na cornea do coelho e cobaia, os resultados foram identicos.

Os estaphylococcus da polpa mostraram-se mais fortes reductores dos nitratos.

No que diz respeito ao comportamento dos meios assucarados, verifica-se que, por parte dos pathogenicos, ha uma certa regularidade no comportamento em maltose, glycose, saccharose, levulose e lactose que acidificam, e em raffinose, salicina e inulina que não atacam. Em mannita ha uma acidificação tardia e em glycerina e raffinose não ha regularidade na acidificação.

Os estaphylococcus isolados da polpa vaccinica são acidificadores de maior numero de assucares nos primeiros dias de incubação, mas segue-se logo a alcalinização em varios delles. A irregularidade é accentuada em maltose e lactose. Podem ser diferenciados dos pathogenicos pela acidificação da raffinose e sobretudo da inulina, o que é mais constante.

Os estaphylococcus isolados da pelle de pessoas normaes são de fraco poder acidificador. A saccharose, bem como a mannita, só é atacada tardiamente.

Diferenciam-se mais accentuadamente dos pathogenicos pelo comportamento em lactose, que a maioria das amostras não ataca.

Si não fossem as muitas excepções que apresentam, seria talvez possível uma tentativa de seu agrupamento do seguinte modo:

A — Pathogenicos — Acidificam abundantemente, e já nas 24 horas, maltose, glycose, saccharose, levulose e lactose. A acção acidificadora é menos pronunciada em mannita e ainda mais em glycerina. Não têm acção sobre raffinose, salicina e inulina. São fortes productores de estaphylocoagulase, têm fraco poder reductor sobre os nitratos e frequentemente produzem uma hemolysina.

B — Epidermidis — Maus acidificadores. Atacam com mais regularidade maltose, glycose, levulose e, tardiamente, saccharose e mannita. Não têm acção sobre lactose, raffinose, salicina e inulina. Acidificam irregularmente a glycerina. Não coagulam o plasma e têm fraco poder reductor sobre os nitratos.

C — Da polpa — Acidificam, com certa regularidade, maltose, glycose, saccharose, levulose, lactose, inulina, raffinose e glycerina, mas terminam por alcalinizar os meios, sobretudo nos com maltose, raffinose e inulina. Agem irregularmente em mannita e acidificam ligeiramente salicina. São fracos productores de estaphylocoagulase e fortes reductores dos nitratos.

Do estudo que acabámos de fazer pode-se presumir, no limite do possível, que: a) na pelle de pessoas normaes, commummente, não existem estaphylococcus com característicos totalmente comparaveis aos dos pathogenicos; b) os estaphylococcus isolados da polpa vaccínica apresentam característicos que os approximam mais dos pathogenicos do que dos estaphylococcus commummente encontrados na pelle.

Qual o papel desses estaphylococcus da polpa na formação da pustula vaccínica?

Para o estudo desse problema tentámos varias experiencias, visando verificar o seu papel como vehiculadores do virus, para o que principiámos por indagar si os estaphylococcus isolados da polpa vaccínica contêm o virus.

Experiencia I — Uma alça de polpa vaccínica foi espalhada em placa de agar-sangue e collocada na estufa a 37°C, durante 18 horas. As colonias de estaphylococcus desenvolvidas eram então isoladas em tubos de agar e novamente incubadas por 18 horas. Emulsionou-se em salina e pesquisou-se a presença do virus por escarificação da cornea do olho de cobaia. Annotavam-se as lesões obtidas e, no fim de 20 dias, procedeu-se á prova de immuniidade, usando-se o virus puro. Eis os resultados (Quadro n.º 2):

As lesões foram perfeitamente caracteristicas das infecções estaphylococcicas, porquanto nas provas ulteriores de immuniidade da cornea ao virus observámos lesões typicas. Em identicas condições (permanencia na estufa por 36 horas) o virus puro e o da polpa revelaram-se activos para a cornea da cobaia.

Esta experiencia parece mostrar que o virus vaccinico não se cultiva na cellula estaphylococcica. Para corroborar estes resultados, fizemos algumas tentativas de cultivo *in vitro* do virus puro, tanto na cellula estaphylococcica, como na estreptococcica e pneumococcica, usando a technica de Degkwitz (5), sem termos logrado resultados positivos.

Experiencia II — As cellulas estaphylococcicas adsorvem o virus vaccinico?

Usámos para estas experiencias o virus puro n.º 4659, que, diluido a 1 ^o/₁₀₀, provocara opacificação completa da cornea da cobaia.

A uma parte de uma emulsão de estaphylococco (cultura de 18 horas) adicionámos uma parte do virus puro. Agitámos e deixámos em contacto durante 2 horas á temperatura de 10°C e á temperatura de 37°C. Centrifugámos, lavámos em salina 4 vezes e reconstituimos o volume primitivo. Realizámos essas experiencias, tanto com cellulas vivas, como com cellulas aquecidas a 65°C por uma hora. Empregámos estaphylococcos isolados da polpa vaccinica, saprophytas da pelle e um pathogenico. Tanto o liquido sobrenadante, como os estaphylococcos assim lavados, foram diluidos em salina a 1 % e a 1 ^o/₁₀₀ e ensaiados na cornea da cobaia. Testemunhámos com animaes inoculados com estaphylococcos vivos e com o virus puro. Eis os resultados obtidos (Quadro n.º 3):

Tanto com cellulas vivas, como com cellulas mortas, pode-se verificar que os estaphylococcos adsorvem o virus, tal como se tem observado com outras substancias capazes de adsorver particulas colloidaes (carvão animal, caolim, hydroxido de aluminio, etc.). As lesões obtidas apresentaram os caracteres typicos das lesões devidas ao virus vaccinico, bem como provocaram immuniidade ao virus.

Cumpre-nos agora accentuar que, para a resolução da questão em estudo, algumas observações já realizadas e outras por nós conduzidas nos trazem novas contribuições a saber:

a) A inoculação do virus puro (filtrado), por escarificação da pelle, tanto em animaes, como em crianças primo-vaccinadas, produz uma pustula typica, perfeitamente comparavel em seus principaes caracteristicos á pustula obtida nas mesmas condições com a polpa vaccinica, differindo, talvez, por um maior periodo de evolução e, certamente, por uma menor reacção inflammatoria (3).

b) Si de uma pustula provocada pela lympha vaccinica ordinaria e que apresente regular reacção inflammatoria colhermos o material da vesicula com todos os cuidados de asepsia externa e o semearmos em meios communs, obtaremos culturas de estaphylococcos, o que não é possivel com o producto das pustulas produzidas pelo virus filtrado e nas de evolução normal obtidas pelas polpas pobres em germes. Uma dezena de verificações que realizámos permittiu-nos esta conclusão.

c) Além disso, o processo de cicatrização das pustulas vaccinicas, obtidas com o virus puro, evolve de maneira especial, deixando somente uma imperceptivel mancha com tendencia franca ao completo apagamento (3).

d) E, como si não bastassem esses factos principaes para demonstrar a localização do virus no tecido, independentemente da presença de estaphylococco que apresente pelo menos certos caracteristicos dos pathogenicos (os estaphylococcus da pelle de pessoas normaes não revelam os caracteristicos dos pathogenicos e são totalmente desprovidos de acção para o derma e a cornea de coelhos e cobaias), ainda, por varias vezes, obtivemos pustulas typicas em coelhos e em primo-vaccinados, por inoculação intra-dermica do virus puro em diluições diversas, tendo-se observado os maiores cuidados de asepsia externa e controlado todo o material usado. A sementeira posterior do liquido das vesiculas assim obtidas, colhido com todos os cuidados de asepsia, mostrou a sua completa esterilidade.

DISCUSSÃO

Neste estudo partimos de um virus puro obtido por filtração segundo a technica usada neste Instituto, e dotado de grande actividade para a cornea da cobaia. Com esse material obtivemos pustulas vaccinicas typicas, tanto por via intradermica, como por escarificação do derma. O liquido das vesiculas colhido asepticamente e semeado nos meios communs de laboratorio não deixou desenvolver nenhum germe, o que tambem foi verificado em pustulas vaccinicas de evolução normal, obtidas á custa de polpa vaccinica (material com estaphylococco). No processo cicatricial das pustulas obtidas com o virus puro, notámos certas differenças que se traduziam por uma mancha imperceptivel com tendencia ao completo apagamento.

Na operação vaccinante procurámos evitar a inoculação do estaphylococco que, na opinião de varios auctores, é o elemento inicialmente necessario (Ponndorf), irritativo das cellulas dos tecidos, preparador do terreno para localização do virus, o qual, por si só, não seria capaz de determinar uma reacção typica e intensa (Rivière e Patocka). A par de não termos obtido culturas de estaphylococco do liquido das vesiculas, o que tambem aconteceu em pustula provocada por polpa vaccinica, verificámos preliminarmente que os estaphylococcus encontrados communmente na pelle de pessoas normaes não apresentam caracteristicos dos pathogenicos e, mesmo quando inoculados em quantidade consideravel na cornea da cobaia ou na pelle do coelho (inoculação intradermica), não são capazes de produzir lesão apparente. O contrario foi verificado com os estaphylococcus da polpa que por seus caracteristicos se approximam dos pathogenicos.

O problema é encarado tambem sob o ponto de vista das possiveis relações, na polpa vaccinica, do estaphylococco com o virus. Neste particular, verificámos que a cellula estaphylococcica, tanto viva, como morta (aquecida 65°C), tal como

acontece com o caolim ou carvão animal, é capaz de adsorver intimamente o virus vaccinico, mas parece que não ha reproducção do virus na cellula estaphylococcica.

E' provavel que o estaphylococco da polpa tenha algum papel inicial irritativo das cellulas, desviando talvez a defesa organica e facilitando a localização do virus. Esse facto talvez explique o apparecimento algo tardio da pustula provocada pelo virus puro. Longe, porém, está tudo isso da affirmativa de Rivière e Patocka, de que o virus, por si só, não seria capaz de determinar uma reacção typica e intensa. As lesões vaccinicas, obtidas neste Instituto, quer em animaes e por differentes vias, quer no homem, demonstram farta e claramente que é possivel obter lesões seguramente typicas e intensas por meio do virus puro, na ausencia do estaphylococco da polpa.

CONCLUSÕES

Os estaphylococcos da polpa não têm nenhum papel indispensavel na formação da pustula vaccinica, sendo, entretanto, provavel que exerçam certa irritação sobre as cellulas do tecido, facilitando talvez a localização do virus.

ABSTRACT

The staphylococci found in the vaccine lymph does not play any indispensable rôle in the formation of the vaccine pustule although they are likely to exert a certain irritation on the derma cells so as to facilitate the localization of the virus.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Ponndorf* — Rev. Intern. Vaccin. IV:114.1913.
2. *Rivière, R. D. & Patocka, F.* — C. R. Soc. Biol. CIV:367.1930.
3. *Monteiro, J. Lemos & Godinho, R.* — Mem. Inst. Butantan V:1.1930.
4. *Dold, H.* — Centralbl. f. Bakt. Originale CII:1.1931.
5. *Degkwitz, R.* — J. Inf. Dis. XLI:304.1927.

(Trabalho das Secções de Virus e de Immunologia do
Instituto Butantan, terminado em julho de 1932).