614:616.013

ENSAIOS SÔBRE IMUNIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA

POR

HASSIB ASHCAR

DIVISÃO DO ASSUNTO

BREVE HISTÓRICO

I — IMUNIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA NATURAL NOS MAMÍFEROS:

a) nos símios;
b) nos perissodáctilos;
c) nos artiodáctilos;
d) nos carnívoros;
e) nos roedores: estudo experimental em coelhos.

II — IMUNIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA NATURAL NO HOMEM:

a) dosagem da antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo;
b) relação entre a imunidade antitóxica materna e fetal;
c) desenvolvimento da imunidade antitóxica em indivíduos normais.

III — IMUNIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA ADQUIRIDA:

a) Teor antitóxico nos indivíduos que tiveram estafilococia e não tratados pela anatoxina estafilocócica;
b) teor antitóxico (nos indivíduos tratados com anatoxina estafilocócica. Resultados clínicos e sorológicos: 1) em indivíduos normais; 2) em indivíduos com estafilococia.

IV — RESUMO. BIBLIOGRAFIA.

BREVE HISTÓRICO

A existência da imunidade antitóxica naturalmente adquirida é conhecida desde muito tempo.

Em 1894, R. Abel, citado por Ramon (1), revelou no sôro de indivíduos normais, a presença de substâncias antidiftéricas. Êsse autor, examinando o sôro de 6 indivíduos adultos, verificou que o mesmo protegia cobaios contra uma dose de cultura de bacilos diftéricos mortal para os animais testemunhas.

Denys e Vandevelde, citados por Nélis (2), desde 1895 demonstraram a existência de antitoxina estafilocócica formada em animal sob ação da toxina e capaz de neutralizá-la tanto "in vitro" como "in vivo". Êsses autores, imunizando coelhos com doses crescentes de toxina, observaram nesses animais uma certa resistência à infeção estafilocócica experimental.

Nicolle e Césari, em 1914, analisando um sôro antiestafilocócico de cavalo, já preparado por Borrel e Bridé, verificaram que o mesmo possue propriedades antitóxicas, embora desprovido de poder antimicrobiano.

Desde 1929, a toxina estafilocócica começou a ser melhor estudada; nessa data, Burnet empregou a toxina formolada (anatoxina) para imunização de coelhos.

Dolman, em 1932, verificou, confirmando as pesquisas de Gengou, que, imunizando animais com anatoxina estafilocócica se determina o aparecimento de antitoxina específica, com suas propriedades antihemolítica, antidermotóxica e antiletal.

No ano seguinte, Travassos (3) demonstra que o sôro antiestafilocócico neutraliza a ação da toxina sôbre o sistema nervoso central.

Finalmente, Ramon e seus colaboradores, em longas e sistemáticas pesquisas, muito contribuiram para o conhecimento da imunidade antiestafilocócica, estabelecendo métodos práticos de imunização humana pela anatoxina estafilocócica.

I — Imunidade natural antiestafilocócica nos mamíferos

A) nos símios;
B) nos perissodáctilos;
C) nos artiodáctilos;
D) nos carnívoros;
E) nos roedores: estudo experimental em coelhos.

A imunidade naturalmente adquirida por diversas espécies, entre os mamíferos, contra a toxina estafilocócica tem sido objeto de estudo e pesquisa de numerosos autores.

Essa imunidade antiestafilocócica é revelada pela presença de antitoxina estafilocócica nos humores, principalmente no sôro sanguíneo.

a) Símios

Ramon e seus colaboradores, pesquisando a antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo de 55 macacos (cinocéfalos), verificaram a existência da mesma em todos êles. Nesses animais, o título antitóxico encontrado é relativamente elevado, atingindo várias unidades antitóxicas internacionais por cc. de sôro, ultrapassando, muitas vêzes, 5 e mesmo 10 unidades (12).

b) Perissodáctilos

Glenny e Stevens (4) verificaram que os cavalos, entre os equídios, apresentam, em grande maioria, uma quantidade por vêzes considerável de antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo.

c) Artiodáctilos

1) *Suinos*: Em colaboração com Richou e Descazeaux, Ramon (5) verificou em todos os sôros de porco dosados um teor de antitoxina estafilocócica frequentemente elevado, mesmo em animais com menos de 2 anos de idade.

2) *Ruminantes*: Os bois também possuem antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo, porém, em título menor do que os cavalos.

Nos carneiros, a imunidade antiestafilocócica natural, segundo Ramon, parece aumentar com a idade do animal.

d) Carnívoros

As pesquisas de Ramon, feitas em cães, cujas idades variavam de 5 meses a 12 anos, demonstraram ser a quantidade de antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo pouco elevada.

e) Roedores

Bonnet, Thieffry e Montefiore (6) verificaram que a antitoxina estafilocócica natural pode existir nos ratos brancos de idade avançada. Sua presença nesses animais não é constante, varia segundo os lotes e segundo as condições de criação. Nos ratos jovens a antitoxina parece, praticamente, não existir.

Dolman e Kitching, (7) ao mesmo tempo que Ramon, verificaram no sôro sanguíneo de coelhos e de cobaias jovens a existência de antitoxina estafilocócica em quantidade apreciável. Em certas cobaias, o último autor encontrou títulos elevados como 10 unidades e demonstrou que, em coelhos como em cobaias, colocados em condições favoráveis, o título antitóxico do sôro aumenta com a idade.

Ramon, em colaboração com Richou e Djourichitch, estabeleceu que o teor de antitoxina estafilocócica nesses animais é independente da raça, porém varia com a procedência dos mesmos e com o modo de vida.

De nossa parte, tivemos oportunidade de dosar, na Secção de Sôros Antitóxicos do Instituto Butantan, a antitoxina estafilocócica em 35 coelhos adultos com idades aproximadamente iguais e modo de vida semelhante.

Para essas dosagens usámos o método hemolítico, cuja técnica será adiante descrita. Os resultados expressos em unidades antitóxicas internacionais (U. A. I.) por centímetro cúbico de sôro sanguíneo, se resumem no Quadro No. 1:

QUADRO No. 1

ANTITOXINA ESTAFILOCÓCICA EM COELHOS ADULTOS

U. I. por cc. de sôro	*Frequência*	*Raça*
0,1	10	Russa
> 0,2 < 0,5	1	Russa
0,1	9	Chinchila
> 1 < 2	1	Chinchila
0,1	6	Azul de Viena
> 0,1 < 0,2	1	Azul de Viena
> 0,5 < 1	1	Azul de Viena
> 1 < 2	1	Azul de Viena
0,1	4	Mestiça
> 2 < 3	1	Mestiça

Desses resultados se depreende que o título antitóxico, como observára Ramon, não depende da raça do animal.

Dos 35 coelhos analisados, em 21 dêles ou seja em 60%, o título antitóxico permanecia abaixo de 0,1 unidade, parecendo-nos que os mesmos não possuiam qualquer traço de antitoxina estafilocócica naturalmente adquirida.

II — Imunidade antiestafilocócica natural no homem

A) Dosagem da antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo;
B) Relação entre a imunidade antitóxica materna e fetal;
C) Desenvolvimento da imunidade antitóxica em indivíduos normais.

A imunidade antitóxica natural, segundo Ramon, é a imunidade que o homem e os animais podem possuir independente de qualquer imunização artificial e que é caraterizada pela presença de antitoxina nos humores.

O conhecimento da imunidade natural é de capital importância quando se pretende fazer a profilaxia de qualquer infeção, visto que a profilaxia é a arma mais moderna e mais segura no campo da terapêutica.

Não só nos mamíferos, mas também no homem foi demonstrada a existência da imunidade antiestafilocócica natural revelada pela presença da antitoxina correspondente no sôro sanguíneo (Vandevelde, em 1894, Neisser e Wechsberg, em 1901).

Pesquisando em 115 indivíduos, de 21 a 80 anos, a taxa de antitoxina sérica, de origem natural, Ramon e seus colaboradores (8) verificaram apresentar esta variações entre 0,1 e 10 unidades, como demonstra o Quadro No. 2:

QUADRO No. 2

0,1 — 0,2	0,2 — 0,5	0,5 — 1	1 — 2	2 — 3	3 — 5	5 — 7	7 — 10	10 unid.
5 casos	46 casos	28 casos	18 casos	12 casos	2 casos	2 casos	1 caso	1 caso
(68,7 %)			(15,6 %)	(10,4 %)	(5,2 %)			

Como se vê, uma pequena percentagem de indivíduos normais (5,2%) pode possuir, no sôro, um título antitóxico relativamente elevado (3 a 10 unidades) dependente da imunidade natural.

O nosso trabalho experimental sôbre a imunidade antiestafilocócica natural consistiu essencialmente na dosagem da antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo de 361 indivíduos, dos quais foram selecionados 163 normais. (Normais, neste sentido, que não tiveram qualquer infeção estafilocócica clinicamente evidente).

a) Dosagem da antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo

A titulagem de um sôro antiestafilocócico (7), assim como a determinação de grau de imunidade antiestafilocócica de um animal, pode ser feita por um dos processos seguintes:

a) "In vitro" — *Método hemolítico* (hematias de coelho).

— *Método intradérmico* (cobaia).
b) "In vivo" — *Método intravenoso* (camondongo).
— *Método intraperitonial* (camondongo).

Ramon assim como Nélis (9) afirmam que êsses métodos dão o mesmo resultado quanto ao teor de um sôro em antitoxina, podendo-se empregar indiferentemente qualquer um deles.

Preferimos para a dosagem da antitoxina estafilocócica (α anti-hemolisina) empregar o método hemolítico que é exato, rápido e econômico.

Os resultados são expressos em unidades antitóxicas internacionais (U. A. I.) por centímetro cúbico.

Unidade antitóxica padrão internacional

Recentemente, o "Comité" de Higiene da Sociedade das Nações aceitou como unidade internacional padrão (9) a unidade proposta pelo "Medical Research Council" e adotada na reunião da Comissão Permanente de Estandardização Biológica. "Esta unidade antitóxica é a atividade específica neutralizante em presença da toxina estafilocócica contida em 0,5 mgs. da preparação estandard do "National Institute for Medical Research" de Hampstead, Inglaterra.

MÉTODO HEMOLÍTICO — TÉCNICA

Princípio: determinação da menor quantidade de sôro capaz de impedir a atividade hemolítica de uma quantidade definida de toxina estafilocócica, previamente titulada por meio de um sôro padrão.

Técnica adotada: A diluições crescentes de sôro sanguíneo, feitas com solução fisiológica de cloreto de sódio, colocadas em tubos de hemólise, juntámos quantidade de toxina igual em todos os tubos. Essa quantidade de toxina representava um limite hemolítico (L. H.) correspondendo, portanto, a uma unidade.

A mistura era agitada e em seguida deixada em repouso, durante 15 minutos, à temperatura do laboratório.

Adicionávamos, então, a cada tubo, uma gota (1/20 cc.) de hematias de coelho lavadas e diluidas ao décimo em solução fisiológica.

Todos os tubos eram agitados, tamponados e levados ao banho-maria a 37°C, onde permaneciam por uma hora. Após essa incubação, os mesmos ficavam em

repouso na temperatura ambiente, durante 1 hora, para então ser feita a leitura dos resultados.

Procediamos à leitura no tubo ou no intervalo de dois tubos onde deveria haver hemólise a 50%, conforme aconselha Burnet.

Os resultados eram então obtidos, multiplicando-se o título da toxina pelo grau de diluição do sôro analisado.

Obs.: 1) Para todas as dosagens utilizámos sempre hematias de um mesmo coelho; e fizemos sempre tubos testemunhas (salina e toxina): 2) Todo material utilizado: sôro, solução salina, toxina e material de vidro, era esteril.

b) Relação entre a imunidade antiestafilocócica materna e fetal

Em 1892, Ehrlich, citado por Bradford Hill, (10) já havia feito experiências sôbre a transferência de imunidade passiva de pais a filhos. Alimentando ratos com as toxalbuminas: abrina, ricina e robina, Ehrlich demonstrou que os filhotes de mães imunes adquiriam uma imunidade própria. Pelo contrário, machos imunizados, quando cruzavam com fêmeas não imunizadas, não transmitiam aos descendentes qualquer poder de resistência contra essas toxinas.

Baseando-se nessas e noutras experiências, Ehrlich concluiu que "a proteção conferida aos filhos é uma *imunidade passiva*, pela passagem ao feto de anticorpos específicos que circulam no sangue materno e, através do colostro, para os recém-nascidos".

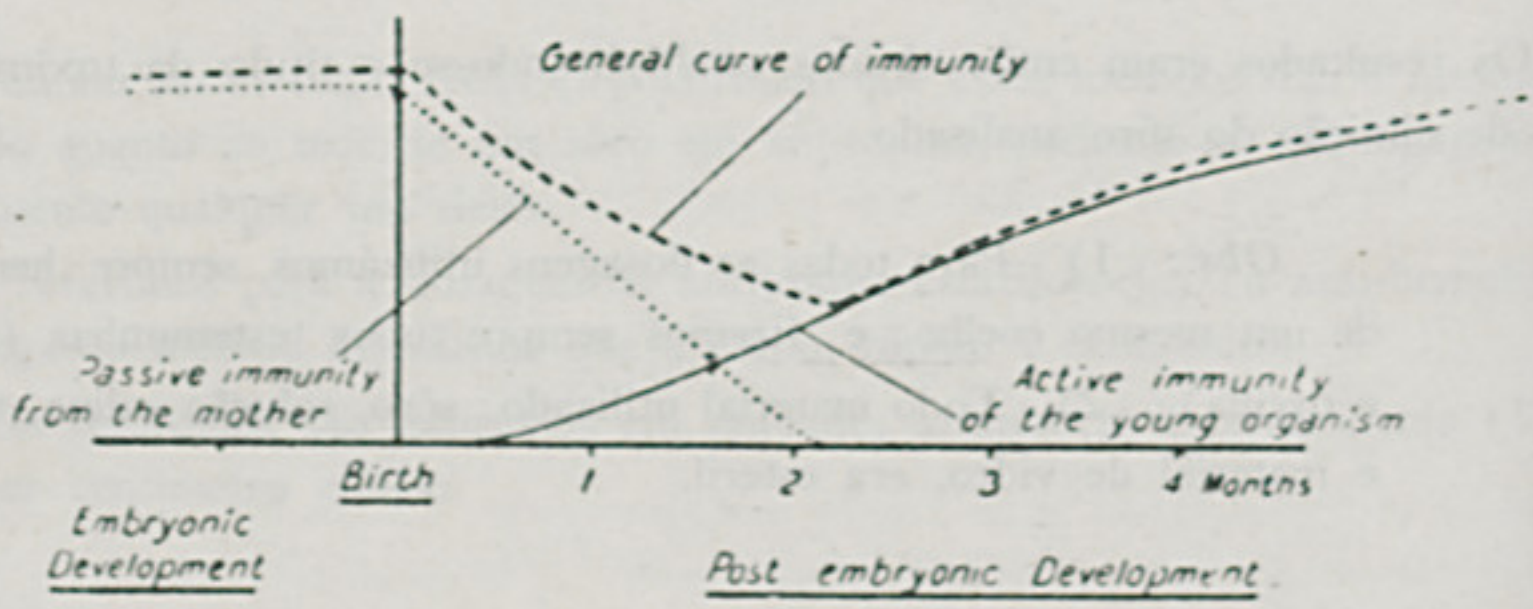
Em 1907, Theobald Smith verificou que, quando se injeta no organismo materno u'a mistura de toxina-antitoxina diftérica, se desenvolve uma imunidade transmissível, ao menos em parte, aos filhos. Essa imunidade passiva transferida é, entretanto, de duração relativamente curta e desaparece dentro de 2 ou 3 mêses após o nascimento (Smith, 1907, Südmersen e Glenny, 1911) citados por Bradford Hill).

Em 1929, E. Grasset (11), estudando experimentalmente a imunidade antitóxica passiva e ativa no ciclo vital do coelho, chegou a interessantes conclusões que estão claramente representadas no Gráfico I:

GRÁFICO I

(*Antitoxic Immunity in the Rabbit*)

Relation between the Passive and Active Immunity in the Vital Cycle.



. . . . . Passive immunity (maternal origin).

———————— Active immunity.

- - - - - - - - General curve of immunity indicating the real protection of the young organism resulting from the sum of the passive and active immunity.

Relativamente ao estudo comparativo entre o teor de alfa antihemolisina estafilocócica do sôro de sangue materno e do fetal (funicular), encontrámos, na literatura apenas o trabalho de Brice e Burnet (12), publicado em 1932.

Êsses autores dosaram a antitoxina estafilocócica no sangue de 89 mães e no sangue funicular de seus respectivos filhos.

Os resultados obtidos demonstraram que em 41 vêzes houve íntima correspondência entre a antitoxina contida no sangue materno e no fetal, havendo uma diferença de menos de 20% a favor do feto.

Entre os restantes 48, em 41 (87,5%) o título fetal era consideravelmente mais alto do que o materno, sendo a diferença comumente de cêrca de 100%. Nos 6 casos restantes, em que o título fetal era mais baixo do que o materno, a diferença era de menos de 100%.

Tivemos oportunidade de analisar comparativamente a imunidade antiestafilocócica materna e fetal em 45 casos da Clínica Obstétrica (Serviço do Prof. R. Briquet). Nesse número havia 31 de mães que não tiveram qualquer infeção estafilocócica clinicamente evidente, e os restantes 14 eram de mães que, ha muito tempo, tiveram possivelmente estafilococias frustas.

A idade variava de 15 a 42 anos e 40 eram brasileiras.

Os 44 fetos estudados nasceram a termo, em parto normal; o caso 45 era de feto prematuro.

Tanto nos casos maternos como nos correspondentes fetais dosámos a alfa antihemolisina estaficocócica no sôro sanguíneo.

Empregámos o método hemolítico e exprimimos os resultados em unidades antitóxicas internacionais por centímetro cúbico.

O Quadro No. 3 resume os resultados obtidos.

QUADRO No. 3

Caso No.	*Nome*	*Idade em anos*	*Registo Cl. Obst.*	*T. A. Materno*	*T. A. fetal*
1	E. G.	22	15.552	0,75	1,50
2	M. B.	27	15.558	0,35	0,75
3	M. D.	17	15.560	1,50	1,50
4	A. B.	28	15.618	1,50	0,75
5	M. P.	25	15.575	0,75	0,75
6	G. M. C.	21	16.639	0.75	1,50
7	A. F. L.	21	15.614	2,50	1,50
8	C. Z.	34	15.616	0,35	0,35
9	J. P.	39	15.636	0,75	1,50
10	M. B.	27	——	0,75	0,75
11	R. B.	24	16.541	2,50	4,00
12	D. R.	18	15.671	0,05	0,35
13	A. B.	24	15.840	0,05	1,50
14	C. S.	33	15.732	0,75	1,50
15	A. G. B.	26	15.865	0,05	4,00
16	B. F.	23	15.863	0,75	0,75
17	M. G.	28	15.924	2,50	4,00
18	L. G.	15	15.925	1,50	0,75
19	F. L.	25	15.937	0,75	0,75
20	A. L.	28	15.932	0,75	0,75
21	G. D.	32	15.933	1,50	0,75
22	M. A.	23	16.213	0,35	1,50
23	M. L. R.	36	16.210	0,05	0,35
24	A. B. R.	23	16.211	0,15	0,35
25	B. F. E.	20	16.214	0,75	1,50
26	T. R.	22	16.250	1,50	1,50
27	T. K.	24	16.225	1,50	2,50
28	M. A. L. C.	18	16.224	0,35	0,75
29	A. D.	32	16.321	0,75	2,00
30	C. S. R.	26	16.433	6,25	2,50
31	M. C. F.	21	16.427	1,50	0,75
32	A. A.	26	16.407	2,50	2,00
33	A. M. T.	39	16.413	2,50	2,50
34	M. L. N.	30	16.411	2,50	0,75

Caso No.	*Nome*	*Idade em anos*	*Registo Cl. Obst.*	*T. A. Materno*	*T. A. fetal*
35	C. P.	21	16.412	2,00	2,00
36	R. C. S.	34	16.436	2,50	7,50
37	C. F.	30	16.435	2,50	1,00
38	M. C.	19	16.432	2,00	1,50
39	O. M.	31	16.415	2,50	1,00
40	L. P.	26	16.355	5,00	3,00
41	J. A.	17	16.428	0,75	4,00
42	M. L. L.	27	16.406	1,50	2,50
43	A. P. S.	—	16.427	1,00	0,35
44	M. O. B.	42	16.420	2,50	5,00
45	A. N.	36	16.394	2,50	1,00

Dos 45 casos analisados, verificámos que em 10 (22,2%) houve identidade de títulos antitóxicos maternos com seus correspondentes fetais.

Noutros 10 casos (22,2%) verificámos que o poder antitóxico dos sôros funiculares era mais elevado do que os respectivos maternos, com diferença até de 100%.

Em 11 casos (24,4%) a diferença era de mais de 100% a favor dos títulos fetais.

Nos 14 casos restantes, observámos que em 8 (17,7%) os títulos maternos excediam os correspondentes fetais de 25 a 100%; enquanto que nos outros 6 casos (13,5%) a diferença era de mais de 100%.

A média fetal (My) sendo 1,73 (U.A.I.) revelou-se superior à média materna (Mx) igual a 1,48.

Pela análise dos casos, verifica-se uma grande variabilidade dos resultados devida, cremos, a fatores individuais. Vejamos:

Desvio padrão materno (σx) = 1,24
Desvio padrão fetal (σy) = 1,43
Coeficiente de variação materna (Vx) = 83,78%
Coeficiente de variação fetal (Vy) = 82,66%

Com os dados obtidos, embora em número bastante reduzido de observações, o coeficiente de Bravais Pearson, atingindo a cifra de + 0,37, com um êrro padrão de ± 0,13, supondo verificadas as condições de amostra simples, percebe-se uma tendência de correlação positiva entre as taxas materna e fetal.

Da equação que nos interessa, temos:

(Coeficiente de regressão) $y = b_2x$

$b_2 = 0{,}43$ donde $y = 0{,}43x$

Isto significa que a um desvio de 1 unidade da taxa média materna corresponde, em média, um desvio de 0,43 da média fetal.

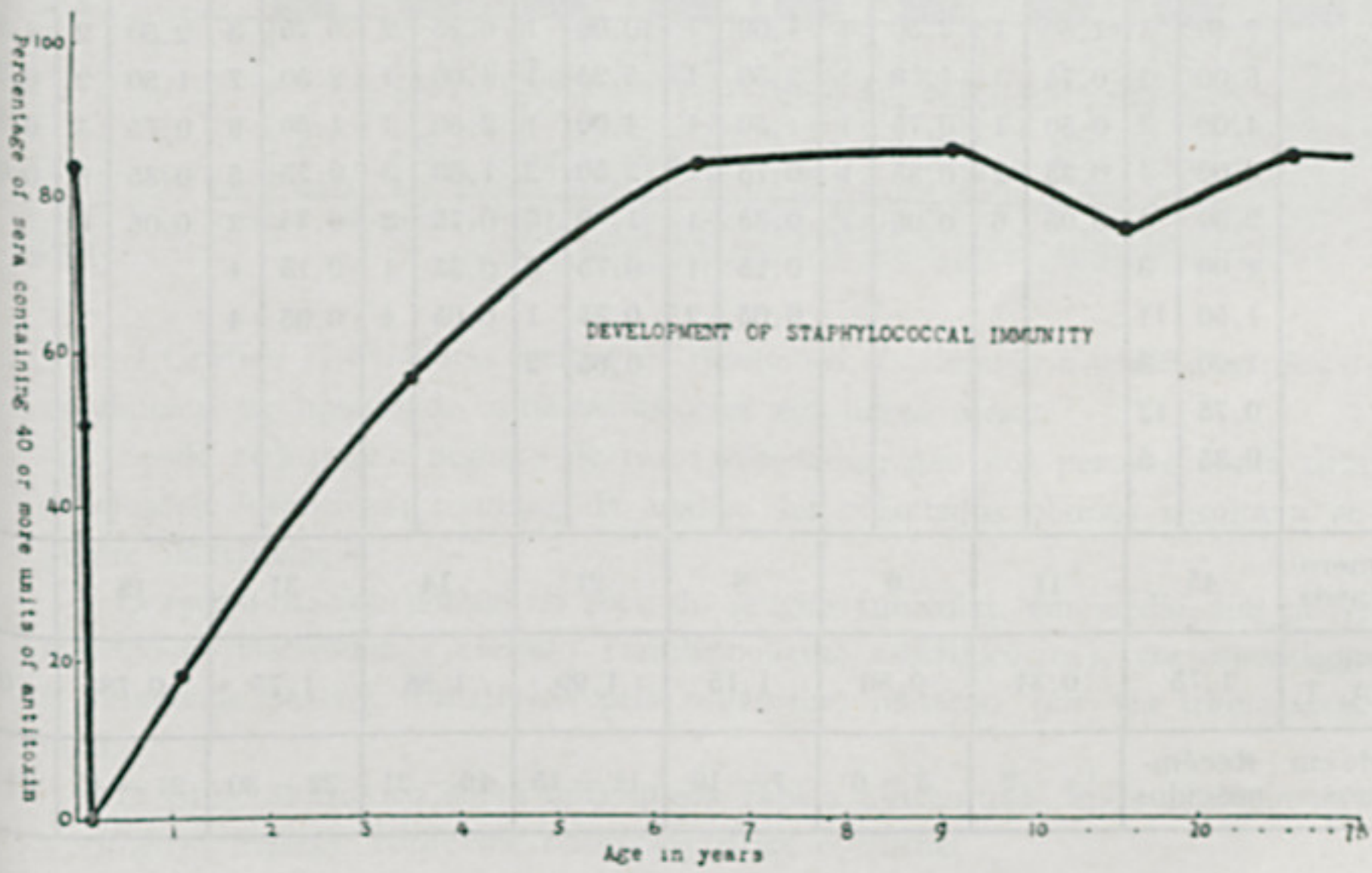
c) **Desenvolvimento da imunidade antiestafilocócica em indivíduos normais**

A importância do conhecimento da imunidade natural evidencia-se, não só pelo interesse puramente doutrinário, como também pelo valor prático indubitável, fornecendo os elementos básicos que orientam a pesquisa e o estabelecimento de métodos adequados de imunização.

Cuidando do assunto, Brice e Burnet fizeram um estudo experimental sôbre o teor de antitoxina estafilocócica de numerosos indivíduos de várias idades desde o nascimento até os 78 anos.

Com os resultados obtidos, êsses autores estabeleceram uma curva das médias do teor antitóxico normal por idades.

CURVA DE BRICE E BURNET



Em estudo experimental sôbre a imunidade antiestafilocócica, em nosso meio, dosámos a antitoxina estafilocócica no sôro sanguíneo de 361 indivíduos, dos quais selecionámos 163 normais. (Normais, neste sentido, que não tiveram qualquer infeção estafilocócica clinicamente evidente).

As dosagens foram feitas pelo método hemolítico, cuja técnica já descrevemos, e os resultados expressos em unidade antitóxicas internacionais por centímetro cúbico.

Os 163 casos normais compreendem indivíduos de ambos os sexos, sendo a maior parte constituida por brasileiros, de côr branca.

As idades dos mesmos variavam de 0 anos (recém-nascidos) a 74 anos.

No Quadro No. 4, os casos foram distribuidos em grupos por idade e os resultados constituidos pela frequência e média dos títulos antitóxicos correspondentes a cada grupo de idade.

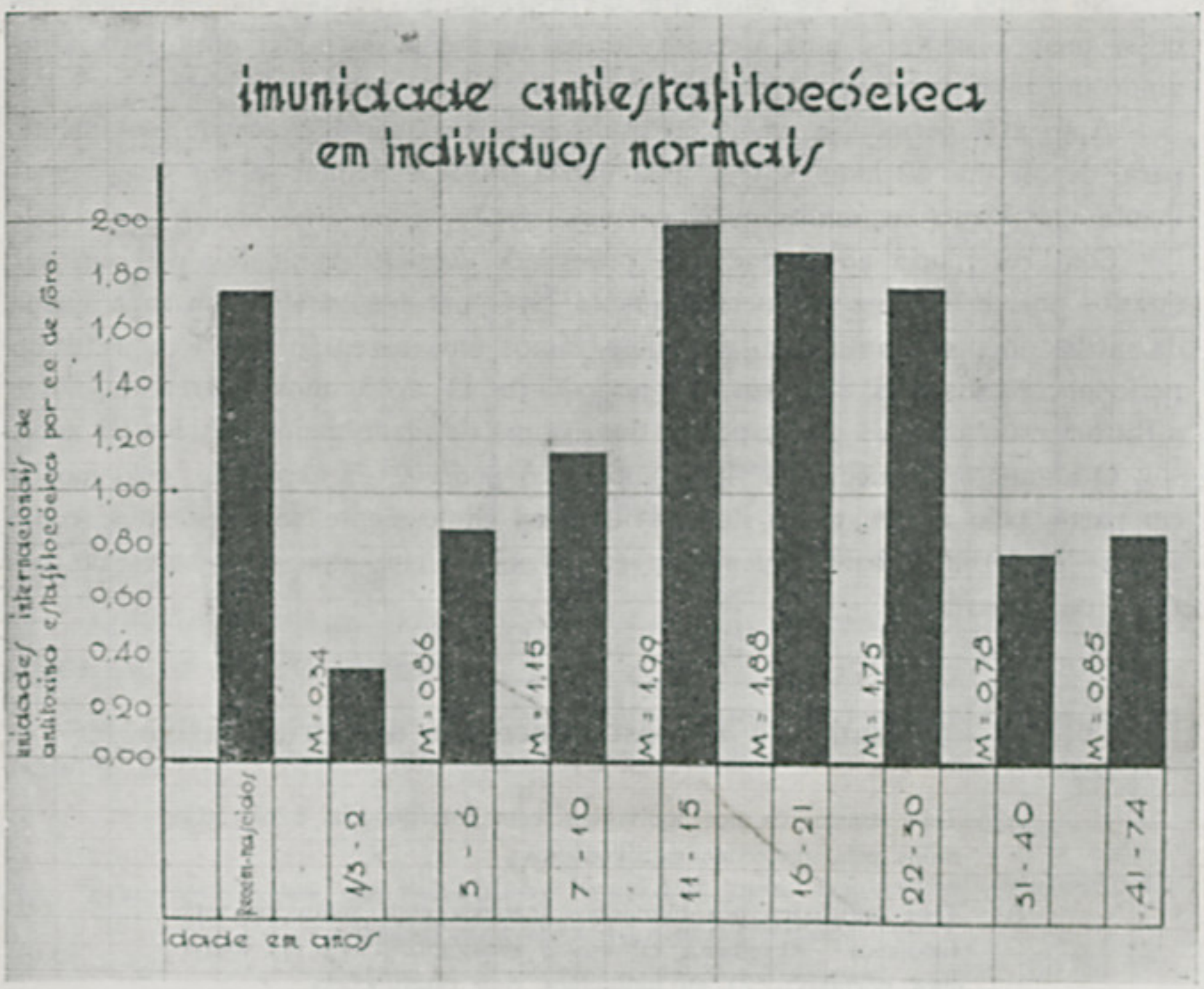
Quadro No. 4

FREQUÊNCIA E MÉDIA DOS TÍTULOS DE ANTITOXINA ESTAFILOCÓCICA EM VÁRIOS GRUPOS DE IDADE DE INDIVÍDUOS NORMAIS

	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F	T. A.	F
	7,50	1	1,50	1	2,50	1	4,00	1	10,00	1	6,25	2	6,25	3	2,50	2	1,50	3
	5,00	1	0,75	1	1,50	1	2,50	1	5,25	1	4,00	1	2.50	7	1,50	2	0,75	4
	4,00	4	0,50	1	0,75	1	1,50	1	4,00	1	2,50	1	1,50	9	0,75	5	0,15	1
	3,00	1	0,35	2	0,35	1	0,75	1	2,50	2	1,50	3	0,75	5	0,35	8	0,05	1
	2,50	4	0,05	6	0,05	2	0,35	1	1,50	10	0,75	2	0,35	2	0,05	6		
	2,00	3					0,15	1	0,75	3	0,35	1	0,15	1				
	1,50	11					0,05	2	0,35	1	0,05	4	0,05	4				
	1,00	3							0,05	2								
	0,75	12																
	0,35	5																
Número de casos	45		11		6		8		21		14		31		18		9	
Média de A. T.	1,75		0,34		0,86		1,15		1,99		1,88		1,75		0,78		0,85	
Idade em anos	Recém-nascidos		1/3 - 2		3 — 6		7 — 10		11 — 15		16 — 21		22 — 30		21 — 40		41 — 74	

Como se vê no Quadro No. 4, os grupos de idade são heterogêneos, o que não nos permite traçar com os resultados um polígno de frequência, mas, sim um gráfico em colunas separadas.

GRÁFICO II



O Gráfico II evidencia melhor os resultados, facilitando a análise do desenvolvimento da imunidade antiestafilocócica em nosso meio.

Sendo reduzido o número de casos estudados, não nos permite ainda tirar conclusões definitivas; contudo, da análise dos resultados obtidos resulta a seguinte interpretação:

O recém-nascido possue no sôro do sangue funicular, em média, um poder antitóxico relativamente elevado (antihemolisina estafilocócica), correspondente à imunidade passiva transferida pelo organismo materno, por via transplacentária.

O título antitóxico sofre uma queda rápida e acentuada após o nascimento (primeiros meses), conforme observam Brice e Burnet.

(Nesse período, segundo Grasset, a proteção do organismo jovem resulta da soma da imunidade passiva e ativa).

Em seguida, com a aquisição da imunidade ativa determinada, possivelmente, por infeções estafilocócicas (mesmo não evidentes sob o ponto de vista clínico), o título antitóxico se eleva progressivamente até o período de 7 a 10 anos.

No grupo de 11 a 15 anos, que corresponde ao período da puberdade em nosso meio, observa-se uma ascensão brusca da média do poder antitóxico, atingindo um nivel superior a todas as médias dos outros grupos de idade.

Após êsse período, a média do título antitóxico vai decrescendo lentamente, para, depois dos 30 anos, sofrer uma queda nítida e manter-se em nivel semelhante nas idades seguintes.

Com referência ao período da puberdade, nossos resultados parecem ser opostos aos de Brice e Burnet; enquanto êsses autores verificaram uma queda da média do poder antitóxico, nós observámos uma ascensão nítida no referido período. Analisámos 21 casos, no período de 11 a 15 anos, entretanto Brice e Burnet estudaram 24 casos, porém num grupo de idade maior de 11 a 20 anos.

O aumento da média do título antitóxico poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo aparecimento de estafilococias clinicamente não evidentes, como sejam: piodermites banais, acnes juvenis frustos, etc., mui frequentes no período da puberdade.

III — Imunidade antiestafilocócica adquirida ativa

A) Teor antitóxico nos indivíduos com estafilococia e não tratados pela anatoxina estafilocócica;

B) Teor antitóxico nos indivíduos tratados com anatoxina estafilocócica. Resultados clínicos e sorológicos: 1) em indivíduos normais; 2) eu indivíduos com estafilococia.

a) Teor antitóxico nos indivíduos que tiveram estafilococia e não tratados pela anatoxina estafilocócica

Dosámos a alfa antihemolisina estafilocócica no sôro sanguíneo de numerosos indivíduos que tiveram afecções estafilocócicas, procurando verificar a diferença entre os títulos antitóxicos destes e dos indivíduos normais já estudados.

Analisando 15 casos de furunculose antiga de indivíduos, cujas idades variavam de 9 a 52 anos, encontrámos títulos antitóxicos que variavam de — 0,1 a 4,00 unidades internacionais por cc., sendo o valor médio igual a 1,36.

Em 6 casos de furunculose em evolução, encontrámos títulos antitóxicos que variavam de 0,75 a 6,25 unidades, com valor médio igual a 2,50.

Por curiosidade, dosámos a alfa antihemolisina estafilocócica em 16 doentes da 4.ª M.H. da Santa Casa (Serviço do Prof. Lindenberg), portadores de úlceras leishmanióticas e que, ha muito tempo, tiveram furunculose. Os resultados obtidos oscilavam entre 0,35 e 8,75, tendo como valor médio 2,42 unidades.

Do mesmo Serviço, analisámos 5 casos de pênfigo foliáceo e com passado de furunculose. Os resultados encontrados foram os seguintes:

CASOS DE PÊNFIGO FOLIÁCEO COM PASSADO DE FURUNCULOSE

Caso No.	*Nome*	*Idade*	*Sexo*	*Tit. Antitóxico (U. I.)*
40	F. S.	45 anos	masc.	1,50
41	A. M.	26 anos	masc.	6,25
47	B. A. L.	38 anos	masc.	+ 10,00
49	M. M. A.	49 anos	masc.	8,75
64	A. L.	21 anos	masc.	6,25

Analisámos 3 casos de acne juvenil, nos quais os títulos antitóxicos não ultrapassavam de 1,50 unidades.

Finalmente, em 11 casos de piodermite frusta, encontrámos taxas que variavam de 0,35 a 2,50, tendo por média 1,23 unidades.

b) Teor antitóxico em indivíduos tratados pela anatoxina estafilocócica. Resultados clínicos e sorológicos:

1) em indivíduos normais; 2) em indivíduos com estafilococia.

A terapêutica das afecções estafilocócicas tem atravessado, nesses últimos anos, uma fase de notável progresso, graças, principalmente, às experiências sistemáticas de Ramon e seus colaboradores sôbre o emprêgo da anatoxina estafilocócica.

Segundo o conceito de Ramon, a anatoxina estafilocócica, assim como a tetânica e a diftérica, age especificamente, determinando no organismo a formação da antitoxina correspondente.

Pensou-se no início, e alguns autores ainda julgam, que a anatoxina estafilocócica age como medicação de choque.

Entretanto, Ramon, em longos trabalhos experimentais, empregando, em particular, a anatoxina purificada, demonstrou que a anatoxiterapia age especificamente.

Por outro lado, Tzank, Debré, Bonnet e Thieffry não acreditam que as relações entre o desenvolvimento da imunidade e a cura sejam paralelas. Tzank cita casos de furunculose com alta dosagem de antitoxina com reincidência e, inversamente, casos de cura com fraca elevação do título antitóxico.

Ramon, Richou e Djourichitch (14), estudando o mecanismo da imunidade conferida pela anatoxina estafilocócica, com relação à infeção por estafilococo virulento, admitiram a seguinte interpretação: a antitoxina, por seu poder neutralizante, opõe uma barreira à ação necrosante da toxina estafilocócica; ela impede também a vegetação do estafilococo, que encontra nos tecidos mortificados os elementos necessários ao seu crescimento e à sua multiplicação.

Por outro lado, a defesa celular, a fagocitose, que no organismo não vacinado seriam paralisadas pela ação da toxina, se exercem livremente nos indivíduos imunizados.

Muitos clínicos têm sido surpreendidos pela rapidez com que uma parte dos doentes com afecções estafilocócicas reage após a injeção de anatoxina. Essa reação se traduz por u'a melhora rápida e evidente do estado geral e das lesões locais.

Combiesco e Covaceanu (14), em trabalho experimental, procuraram estabelecer, aproximadamente, o momento em que o título antitóxico do sôro sanguíneo começa a se elevar após a primeira injeção de anatoxina estafilocócica.

Os resultados obtidos por êsses autores mostraram que:

1.º — Nos indivíduos normais, tendo recebido uma só injeção de anatoxina estafilocócica, o título antitóxico do seu sôro não variou durante a experiência (6 dias). (As dosagens foram feitas em 5 indivíduos normais antes da injeção; em seguida a esta dosaram após 1 hora, 4 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 6 dias). Uma só testemunha apresentou ao 4.º dia, um ligeiro aumento deste título.

2.º — Nos indivíduos atingidos de afecções cutâneas estafilocócicas, o título antitóxico do sôro aumenta muito rapidamente após a 1.ª injeção de anatoxina estafilocócica. Algumas vêzes, mesmo 4 horas após a injeção de anatoxina, observa-se um aumento deste título. 24 horas após a injeção da anatoxina o título antitóxico do sôro (10 doentes analisados) apresenta valores duplo, triplo e mesmo quadruplicado, em comparação ao título antitóxico do sôro recolhido antes da injeção da anatoxina.

Os mesmos autores acreditam que a essa reação específica se pode atribuir, em grande parte, a melhora rápida do estado geral e das lesões locais apresentadas pelos doentes.

Finalizando êsse capítulo, apresentaremos sucintamente os resultados sorológicos e clínicos que obtivémos em 15 indivíduos vacinados com anatoxina estafilocócica.

Desses indivíduos, 6 são normais (que não tiveram qualquer estafilococia clinicamente evidente), 9 apresentando, provavelmente, afecções estafilocócicas diferentes.

Empregámos a anatoxina estafilocócica do Instituto Butantan, derivada de uma toxina cujo título era igual a 400 unidades hemolíticas por cc..

Técnica de vacinação: Em resumo, a vacinação constou em administrar a dose total de 1,85 ccs. de anatoxina estafilocócica, por via subcutânea, de preferência na região supra-espinhosa.

Êsse volume total foi dividido em 4 doses crescentes, repetidas com intervalo de 4 dias.

1.ª injeção (prova)	0,1 cc. no 1.° dia
2.ª dose	0,25 cc. no 4.° dia
3.ª dose	0,50 cc. no 8.° dia
4.ª dose	1,00 cc. no 12.° dia

Nota: Ramon recomenda mais uma dose de 2 ccs., a qual pode ser repetida, portanto um total de 3,85 ccs., em média.

Fizemos o estudo sorológico dos indivíduos por nós vacinados, dosando a alfa antihemolisina estafilocócica no sôro sanguíneo.

Empregámos o método hemolítico e exprimimos os resultados em unidades antitóxicas internacionais por cc.. As titulagens foram feitas do seguinte modo:

1.°) dosagem antes da imunização.

2.°) dosagem 8 dias após a 1.ª injeção de anatoxina.

3.°) dosagem 8 dias após a última injeção.

4.°) dosagem 2 meses após o início da imunização.

O Quadro No. 5 resume os resultados sorológicos e clínicos obtidos:

Quadro No. 5

INDIVIDUOS VACINADOS COM ANATOXINA ESTAFILOCÓCICA

Caso	Diagnóstico	Dosagem inicial	Idem 4 dias após 2a. inj.	Idem 4 dias após 4a. inj.	Idem 60 dias após 1a. inj.	2a 1a.	3a/1a.	4a/1a.	3a 2a.	4a/2a.	4a/3a.	Resultado clínico
P 11	Normal	2,50	3,00	16,00	17,50	1,20	6,40	7,00	5,33	5,83	1,09	
P 15	Normal	1,50	4,00	16,00	12,50	2,66	13,33	8,33	3,00	3,12	0,78	
P 29	Normal	0,05	2,50	6,00	5,00	50,00	120,00	100,00	2,40	2,00	0,93	
P 32	Normal	0,05	1,50	6,00	12,50	30,00	1 0,06	250,00	4,00	8,33	2,08	
P 37	Normal	0,15	4,00	10,00		20,66	66,60		2,50			
P 59	Normal	0,05	5,00	5,00		100,00	100,00		1,00			
P 2	Furunculose. . .	2,50	12,50	35,00	20,00	5,00	14,00	8,00	2,80	1,67	0,66	Cura completa
P 13	Sinusite crônica.	0,75	1,50	10,00	17,50	2,00	13,33	24,56	6,66	12,33	1,75	Ligeira melhora
P 16	Acne	1,50	3,00	10,00	10,00	2,00	6,66	6,66	3,33	3,33	1,00	Ligeira melhora
P 17	Piodermite . . .	0,75	0,75	2,00	3,00	1,00	2,66	4,00	2,66	4,00	1,50	Melhora acentuada
P 18	Acne juvenil . .	1,50	5,00	16,00	17,50	3,33	10,66	11,66	3,20	3,50	1,09	Sem modificação
P 23	Piodermite . . .	1,50	1,50	16,00	12,50	1,00	10,66	8,33	10,66	8,33	0,78	Melhora evidente
P 27	Acne juvenil . .	1,50	1,50	6,00	5,00	1,00	4,00	3,33	4,00	3,33	0,83	Melhora evidente
P 28	Furunculose .	0,14	5,00	10,00		33,33	66,66		2,00			Cura completa
P 30	Furunculose . .	0,05	2,50	12,00	12,50	50,00	240,00	250,00	4,80			Melhora acentuada

Analisando os dados do Quadro No. 5, tiramos as conclusões seguintes:

RESULTADOS SOROLÓGICOS

1.º — Em todos os casos normais analisados e em 6 casos de estafilococia houve aumento do poder antitóxico do sôro sanguíneo 8 dias após a 1.ª injeção de anatoxina. Nos 3 casos restantes não houve modificação do título.

2.º — No fim da vacinação houve aumento do título antitóxico em todos os casos.

3.º — Nos indivíduos normais, o coeficiente de acrescimo entre o título antitóxico inicial e o obtido após a imunização variou de 6,4 a 120. Isto quer dizer que a antitoxina estafilocócica, no caso mínimo, aumentou de 6,4 vêzes e no máximo, 120 vêzes.

4.º — Nos indivíduos com as referidas afecções, o coeficiente variou de 1,50 a 240.

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

As reações observadas no decurso da imunização foram as seguintes:

1.º — Na maioria dos casos as reações consistiram apenas em leve dôr local e, às vêzes, eritema ligeiro em torno do ponto de inoculação, sintomas que desapareceram nas primeiras 24 ou 48 horas.

2.º — Apenas em 2 casos houve ligeira indisposição e reação febril discreta, sendo que um desses teve infartamento ganglionar localizado que cedeu espontaneamente após alguns dias.

RESULTADOS CLÍNICOS

Com o reduzido volume total (1,85 ccs.) de anatoxina estafilocócica injetado, os resultados clínicos foram os seguintes:

Dos 3 casos de furunculose, em 2 obtivémos cura completa e no terceiro melhora acentuada (6 meses de observação).

Dos 2 casos de acne juvenil, num houve melhora evidente, noutro não houve modificação.

Nos 2 casos de piodermite houve melhora acentuada.

No único caso de sinusite maxilar crônica houve ligeira melhora.

RESUMO

I — Em coelhos, o grau de imunidade antiestafilocócica parece não depender da raça do animal. Em 60% dos coelhos analisados, o título de anti-

toxina estafilocócica no sôro sanguíneo não atingou 0,1 U.I., parecendo-nos que os mesmos não possuem qualquer traço de imunidade naturalmente adquirida.

II — A média dos títulos de antitoxina estafilocócica que encontrámos no sôro sanguíneo de 45 fetos sendo 1,73 U. I., revelou-se superior à média 1,48 U.I. dos títulos dos sôros sanguíneos maternos correspondentes. Apenas em 22,2% dos casos houve identidade entre as cifras maternas e as correspondentes fetais. Noutros 22,2%, o poder antitóxico dos sôros funiculares era mais elevado do que os respectivos maternos, com diferença até de 100%. Em 24,4% dos casos, a diferença era de mais de 100%, a favor dos títulos fetais. As taxas maternas excediam as correspondentes fetais de 25 a 100% em 17,7% dos casos e de mais de 100% nos restantes 13,5% dos casos.

III — Verificámos que o recém-nascido possue no sôro do sangue funicular, em média, um poder antitóxico (alfa antihemolisina estafilocócica) relativamente elevado (1,73 U.I.), correspondente à imunidade passiva transferida do organismo materno. Nos primeiros mêses de vida extrauterina, a média dos títulos antitóxicos sofre uma queda rápida e acentuada, após a qual, com aquisição de imunidade ativa, a taxa de antitoxina estafilocócica se eleva progressivamente até o período de 7 a 10 anos. No período da puberdade, observámos uma ascensão brusca da média do poder antitóxico, atingindo um nivel superior (1,99 U.I.) a todas as médias dos outros grupos de idade. Após êsse período, observámos que a referida média vai decrescendo lentamente para, depois da idade dos 30 anos, sofrer uma queda nítida (0,78 U.I.) e manter-se em nivel semelhante nas idades seguintes.

IV — Dosando a alfa antihemolisina estafilocócica em indivíduos que tiveram furunculose e não tratados pela anatoxina estafilocócica, encontrámos os seguintes resultados:

a) Em 15 casos de furunculose antiga, os títulos de antitoxina estafilocócica variavam de — 0,1 a 4,00 U. I. por cc. de sôro sanguíneo com valor médio igual a 1,36 unidades.

b) Em 6 casos de furunculose em evolução, os títulos antitóxicos eram superiores aos precedentes, com variação de 0,75 a 6,25 U.I., com valor médio igual a 2,50 unidades.

c) Em 16 casos de úlcera leishmaniótica e com passado de furunculose, as taxas de alfa antihemolisina estafilocócica variavam de 0,75, a 8,25 U.I., com valor médio igual a 2,42 unidades.

d) Em 5 casos de pênfigo foliáceo e também com passado de furunculose, os títulos antitóxicos encontrados eram notavelmente elevados, atingindo num caso mais de 10 unidades.

V — a) Nos indivíduos normais imunizados com anatoxina estafilocócica (dose total = 1,85 ccs.) o título antitóxico aumentou, após a imunização, desde 6,4 a 120 vêzes.

b) Nos indivíduos com afecções estafilocócicas e que receberam, nas mesmas condições, igual dose total de anatoxina, o aumento do poder antitóxico variou de 1,50 a 240 vêzes.

c) De 3 casos de furunculose tratados apenas com 1,85 ccs. (dose total) de anatoxina estafilocócica, houve cura completa em 2 deles e no terceiro melhora acentuada (6 meses de observação).

d) Nos 2 casos de acne juvenil que receberam a mesma dose de anatoxina estafilocócica houve num, melhora evidente e noutro, nenhuma modificação.

e) Melhora evidente nos casos de piodermite.

VI — Na maioria dos casos tratados com anatoxina estaficocócica, as reações observadas consistiram apenas em leve dôr local e, às vêzes, eritema ligeiro em torno do ponto de inoculação, sintomas que desapareceram nas primeiras 24 ou 48 horas. Apenas em dois casos houve ligeira indisposição e reação febril discreta, sendo que, em um deles, houve leve infartamento ganglionar localizado, cedendo espontaneamente após alguns dias.

Nota: Relatámos no presente trabalho apenas os casos tratados com anatoxina estafilocócica e que foram estudados sorologicamente, resultando-nos impressão ótima do emprego da anatoxina estafilocócica nas afecções estafilocócicas cutâneas e, de modo particular, nas furunculoses.

ABSTRACT

I — In rabbits the degree of antistaphylococcic immunity does not seem to depend on the animal's race. In 60% of the tested animals the titer of staphylococcic antitoxin in the blood serum did not reach 0,1 I.U.. Therefore, we believe that these animals do not own any trace of naturally acquired immunity.

II — The average of the titers of staphylococcic antitoxin found in the blood serum of 45 fetuses being of 1,73 I.U., proved thus to be higher than the average of the titers of the correspondent maternal blood serum, which was of 1,48 I.U.. Only in 22,2% of the cases, an identity between the maternal average and that of the correspondent fetuses could be checked. In another 22,2% the antitoxic power of funicular sera was higher than that of the respective maternal ones, occurring even a 100% difference. In 24,4% of cases the difference amouted to over 100% in favour of the fetal titers. The ma-

ternal titers exceeded the correspondent fetal ones by 25 to 100%, in 17,7% of cases, and by over 100% in the remaining 13,5% of cases.

III — We were able to state that the newborn usually contains in the funicular blood serum a comparatively high average (1,73 I.U.) of antitoxic power (alpha-staphylococcic antihemolysin), due to the passive immunity transferred by the material organism. In the first months of extra-uterine life, these antitoxic titers undergo a sudden and marked drop, then, obtaining active immunity, the titer of staphylococcic antitoxin increases gradually until the age of 7 to 10 years. In the period of puberty, an abrupt rise of the average of the antitoxic power occurs, attaining a level which is higher (1,99 I.U.) than all the averages of the other groups of age. After this period, we stated that this average decreases slowly until, after the age of 30 years, it suffers a distinct drop (0,78 I.U.), remaining more or less at this level for the following ages.

IV — When gauging the alpha-staphylococcic antihemolysin in individuals who suffered from furunculosis and had not been treated with staphylococcic anatoxin, we obtained the following results:

a) In 15 cases of old furunculosis the titers of staphylococcic antitoxin varied from — 0, 1 to 4,00 I. U. per c.c. of blood serum, with an average value of 1,36 unities.

b) In 6 cases of furunculosis in evolution, the antitoxic titers were higher than the former, varying from 0,75 to 6,25 I. U., with an average value of 2,50 unities.

c) In 16 cases of leishmaniotic ulcer and former furunculosis, the titers ot alpha-staphylococcic antihemolysin varied from 0,75 to 8,25 I.U., with an average value of 2,42 unities.

d) In 5 cases of foliaceous pemphigus also preceded by furunculosis, the antitoxic titers found were remarkably high, surpassing in one case 10 unities.

V — a) In normal individuals immunized with staphylococcic anatoxin (total dose = 1,85 c. c.), the antitoxic titer increased after the immunization from 6,4 to 120 times.

b) In the individuals with staphylococcic affections and to whom under the same conditions were given the same total dose of anatoxin, the increase of antitoxic power varied from 1,50 to 240 times.

c) Of 3 cases of furunculosis treated only with 1,85 c.c. (total dose) of staphylococcic anatoxin, 2 cases were completely cured, the third one showing a marked improvement (6 months of observation).

d) Of 2 cases of adolescents affected by acne, who received the same dose of staphylococcic anatoxin, one recovered evidently, the other one, however, showed no change.

e) Evident improvement in cases of pyodermitis.

VI — In the majority of the cases treated with staphylococcic anatoxin, the observed reactions consisted only of slight local pain, and, sometimes, slight erythema surrounding the local of the injection, symptoms which disappeared after the first 24 or 48 hours. Only in 2 cases a slight ailment and discreet fever reaction were stated, one of them showing a slight ganglionar obstruction, which, however, disappeared after a few days.

Note: In the present paper we reported only the cases treated with staphylococcic anatoxin and which were studied serologically, and we are in a position to assure that we had the best impression as to the treatment with staphylococcic anatoxin in cases of cutaneous staphylococcic affections and particularly of furunculosis.

BIBLIOGRFIA

1. *Ramon, G.* — Revue d'Immunol. **2**:305.1936.
2. *Nélis, P.* — Bull. Trim. Org. Hyg. **4**:76.1935.
3. *Travassos, J.* — Mem. Inst. Butantan **8**:237.1933/34.
4. *Glenny, A. T. & Stevens, M. F.* — J. of Path. & Bact. **40**:201.1935.
5. *Ramon, G.; Richou, R. & Descazeaux, J.* — C. R. Soc. Biol. **119**:1070.1935.
6. *Bonnet, H.; Thieffry, S. & Montefiore* — C. R. Soc. Biol. **123**:781.1936.
7. *Dolman, C. E. & Kitching, J. S.* — J. of Path. & Bact. **41**:137.1935.
8. *Ramon, G.; Gernez, Ch.; Richou, R. & Pannequin, Chr.* — Revue d'Immunol. **2**:566.1036.
9. *Nélis, P.* — Bull. Trim. Org. Hyg. **4**:76.1935.
10. *Bradford Hill, A.* — Medical Research Council **196**:7.1934.
11. *Grasset. E. M. D.* — Publ. South African Inst. for Med. Res. (24) : 171.1929.
12. *Brice, L. M. & Burnet, F. M.* — J. of Path & Bact. **35**:183.1932.
13. *Ramon, G. ;Richou, R. & Djourichitch,* M. — C. R. Soc. Biol. **122**:1164.1036.
14. *Combiesco, D.; Combiesco, N. & Covaceanu,* C. — C. R. Soc. Biol. **124**:485.1937.

* * *

Agradecemos aos drs. J. Travassos e Jandyra P. do Amaral, nossos orientadores, o auxílio inestimável que nos prestaram, facilitando a execução deste trabalho no laboratório da Secção de Imunologia do Instituto Butantan.

(Trabalho apresentado em dezembro de 1940 para concorrer ao prêmio "Oswaldo Cruz" e elaborado na Secção de Imunologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em janeiro de 1942.)