

ESTUDOS SOBRE O TRATAMENTO DA INFECÇÃO TÍFICA EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

I. Comportamento "in vitro" e "in vivo" de várias substâncias

POR E. BIOCCA & J. P. AMARAL

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

A febre tifóide é uma infecção contra a qual ainda não parece existir uma terapêutica específica verdadeiramente eficaz.

Algumas tentativas feitas com ácido mandélico no tratamento da infecção tífica experimental (1) deram resultados duvidosos.

Relativamente escassos são os estudos realizados com compostos orgânicos do enxofre nesta infecção.

Em 1937, Buttle & col. (2) mostraram que a sulfanilamida protege os camundongos contra algumas doses mínimas letais de bacilos tíficos, mas que estes resultados são bem inferiores aos obtidos, nas mesmas condições, contra infecções devidas ao estreptococo hemolítico ou ao meningococo.

Derivados da sulfanilamida foram igualmente ensaiados. Fisk (3) observou que a sulfapiridina e o sulfametiltiazol são um pouco mais eficazes do que a sulfanilamida na infecção experimental do camundongo; de outro lado, Kolmer & Rule (4) obtiveram melhores resultados com sulfanilamida que com sulfapiridina ou sulfatiazol na infecção experimental crônica do coelho produzida pelo b. tífico.

Libby & Joiner (5) assinalaram "in vitro" uma ação bacteriostática do sulfatiazol mais elevada que da sulfanilamida e da sulfapiridina.

Os trabalhos clínicos sobre a ação das sulfas nos doentes e nos portadores de bacilos tíficos são um pouco contraditórios e insuficientes para dar uma idéia precisa do valor destas drogas.

A maioria dos autores teria observado uma ação benéfica de muitas sulfas no tratamento da infecção tífica (6, 7). As observações bastante extensas de Hall (8) teriam mostrado, porém, que a sulfaguanidina seria absolutamente inativa.

Os resultados relatados em 1943 por Hoagland (9) sobre a ineficácia do sulfatiazol no tratamento da infecção tífica não podem ser aceitos sem restrições porque as quantidades de sulfatiazol usadas foram relativamente baixas e administradas durante prazo insuficiente.

Entre as substâncias antimicrobianas de origem biológica usadas no tratamento da infecção tífica, merecem ser lembrados, o soro, o bacteriófago anti-tílicos e, recentemente, a estreptomina.

Felix & Pitt (10) demonstraram nos camundongos que os sôros que continham anticorpos O e Vi possuíam dois diferentes efeitos sobre a infecção tífica. Um efeito protetor contra a rápida multiplicação dos germes virulentos era produzido pelo anticorpo Vi; um efeito anti-endotóxico, neutralizante das endotoxinas era produzido pelo anticorpo O.

Felix (11) e logo depois McSweeney (12) obtiveram resultados encorajadores no tratamento de casos humanos de febre tifóide com sôros ricos nestes anticorpos. Cookson e Facey (13) estudaram o soro de Felix em 73 doentes e puderam confirmar a ação evidente deste soro sobre os sintomas tóxicos, observando muitas vezes encurtamento do período febril: a letalidade global, porém, não pareceu particularmente beneficiada pelo tratamento.

Resultados satisfatórios foram também obtidos por Yu e outros (14) na febre tifóide tratada com soro específico.

Discordantes são os resultados de Hoagland (9), mas os sôros terapêuticos usados por este A. eram sôros de indivíduos vacinados, dos quais não foi feito um estudo sistemático.

De particular interesse são as observações sobre o tratamento da infecção tífica experimental do camundongo com bacteriófago específico.

Asheshov, Wilson & Topley (15) demonstraram que o fago antifílico e sobretudo o fago específico contra o antígeno Vi protege os camundongos infectados com muitas doses mortais de bacilos tíficos, ainda que administrado algumas horas depois da infecção.

O bacteriófago exibe esta atividade mesmo quando inoculado por via parenteral, em virtude do fato de não ser bloqueado no seu poder protetor nem pelo sangue, nem pelos tecidos.

Prudentemente observaram os autores, porém, que a infecção tífica experimental do camundongo é uma infecção muito rápida e violenta, sendo, portanto, perigoso tirar destas observações conclusões para outros tipos de infecções tíficas como as que se realizam no homem. É fóra de dúvida, entretanto, que os fagos anti-Vi possuem atividade não somente "in vitro", como "in vivo", mesmo quando o encontro com os germes se realiza ao nível dos tecidos.

Êstes resultados sobre a ação do fago na infecção tífica experimental do camundongo foram obtidos e ampliados em 1938 por Fisk (16).

Escassos ainda são os trabalhos sistemáticos sobre a atividade do bacteriófago na infecção tífica humana.

Uma revisão completa dos trabalhos sobre a atividade do bacteriófago nas infecções intestinais foi recentemente feita por Morton & Engley (17).

Em recente publicação, Reiman e col. (18) salientam o valor terapêutico de uma substância antibiótica de origem microbiana, a estreptomicina, na infecção tífica humana.

* * *

Como contribuição ao estudo da terapêutica específica da infecção tífica, realizamos uma série de pesquisas "in vitro" e "in vivo" sobre a atividade anti-tífica de numerosas substâncias, incluindo derivados do ácido benzóico, compostos orgânicos do antimônio, compostos aromáticos halogenados, azocompostos, compostos orgânicos do enxofre e precisamente sulfetos, disulfetos, sulfonas e sulfamidas aromáticas. Foram igualmente estudados "in vitro" e "in vivo" o ácido mandélico e o estovarsol.

Entre as substâncias antimicrobianas de origem biológica foram ensaiadas, "in vivo", a piocianina e a penicilina.

Técnica — Todas as drogas foram estudadas em sua atividade bacteriostática "in vitro" diluindo a substância no agar na proporção de 1:500, de maneira a assegurar uma difusão homogênea do produto. Solidificado o agar, era feita a semeadura com uma quantidade uniforme de uma suspensão de bacilos tíficos (amostra Ty 2). Depois de 24 horas procedia-se à leitura dos resultados marcando com +++ a inibição completa do crescimento; com ++ inibição fraca e + inibição mínima.

As provas "in vivo" foram todas realizadas (com exceção das com piocianina e penicilina), suspendendo as substâncias em óleo de amendoim na proporção de 2,5% e injetando lotes de 10 camundongos com 0,5 ml da suspensão, por via subcutânea. Logo após a inoculação da suspensão oleosa da droga, os camundongos recebiam no peritônio um número de bacilos tíficos correspondente a 5 doses mínimas letais.

Devemos observar que a D.M.L. da cultura foi sempre standardizada e usada sem mucina, não podendo portanto nossos índices de proteção serem comparados aos testes feitos com mucina. (*)

Foram considerados protegidos os animais que sobreviveram além de 4 dias depois da infecção.

As provas com penicilina e piocianina foram executadas usando a mesma técnica já descrita no nosso precedente trabalho sobre quimioterapia da infecção meningocócica (19). Foram realizadas experiências com quantidades crescentes das respectivas drogas: a quantidade máxima de penicilina, inoculada em uma experiência, correspondeu a 4 doses de 100 U. O. injetadas contemporaneamente, 2, 4 e 6 horas após a infecção: a quantidade máxima de piocianina correspondeu a 3 doses de 0,5 mg do produto, dissolvido em solução fisiológica e injetado contemporaneamente, 2 e 4 horas após a infecção. O número de bacilos tíficos

(*) Um de nós (Amaral) em colaboração com Lacerda, verificou recentemente a relação entre os índices de proteção da vacina tífica em camundongos infectados mediante a inoculação intraperitoneal da amostra Ty2, com ou sem mucina: calculado o número de D.M.L. a partir da série controle injetada com a suspensão em mucina, conclui-se por uma proteção no mínimo 100 vezes maior do que no caso em que a aferição do número de D.M.L. do *inoculum* é feita em série de camundongos inoculados com suspensão de germes em solução salina, sem mucina.

inoculados nos camundongos correspondeu, também nestas experiências, a 5 doses mínimas letais, em solução fisiológica sem mucina.

Nas tabelas são marcadas com

+ = 20 — 30% de protegidos
++ = 40 — 50% de protegidos
+++ = 60 — 70% de protegidos
++++ = 80 — 100% de protegidos

RESULTADOS

TABELA I

COMPOSTO	Atividade	
	in vitro	in vivo
$C_6H_5 \cdot COOH$	+++	—
$p-NH_2 \cdot C_6H_4 \cdot COOH$	+++	—
$p-NH_2 \cdot C_6H_4 \cdot COONa$	+++	—
$p-CCl_3CO \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot COOH$	+++	—
$p-NO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CONH_2$	+++	—
$C_6H_5 \cdot CH(OH) \cdot COOH$	+	—
Estovarsol	+++	—
$p-CCl_3CO \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot I$	—	—
$p-CCl_3CO \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot OCH_3$	+	—
$p-CCl_3CO \cdot NH \cdot C_6H_4 \cdot OC_2H_5$	—	—
$2,4,6-Br_3 \cdot C_6H_2 \cdot NH \cdot COCCl_3$	—	—

TABELA II

AZOCOMPOSTO	Atividade	
	in vitro	in vivo
$p-NH_2 \cdot C_6H_4 \cdot N:N \cdot C_6H_5$	—	—
$C_6H_5 \cdot N:N \cdot NH \cdot C_6H_5$	—	—
$ \begin{array}{c} N:N \cdot C_6H_5 \text{ (1)} \\ \diagdown \\ C_{10}H_8 \\ \diagup \\ NH \cdot COCCl_3 \text{ (2)} \end{array} $	—	—
$ \begin{array}{c} N:N \cdot C_6H_5 \text{ (1)} \\ \diagdown \\ C_{10}H_8 \\ \diagup \\ NH \cdot COCCl_3 \text{ (4)} \end{array} $	—	—

TABELA III

COMPOSTO ANTIMONIAL	Atividade	
	in vitro	in vivo
R.Cl	+++	—
R.S.C ₆ H ₄ .NO ₂ p	+++	—
R.S.S.C ₆ H ₄ .SbO ₂ H ₂ p	+++	—
R.SO ₂ .C ₆ H ₄ .SbO ₂ H ₂ p	+++	—
R.SO ₂ NH ₂	+++	tóxico
R.SO ₂ .NH.C ₆ H ₄ N (comp. 152 M)	++	—
R.SO ₂ .NH.C ₃ H ₂ NS (comp. 153 M)	+++	—
R.SO ₂ .NH.C ₄ H ₂ N ₂ (comp. 154 M)	+++	tóxico
R.SO ₂ .NH.C ₅ H ₂ N ₂ (comp. 155 M)	+++	tóxico
R.SO ₂ .NH.C(:NH)NH ₂ (comp. 156 M)	++	tóxico

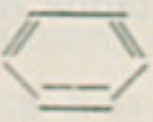
sendo R = —  — SbO₂H₂

TABELA IV

SULFA	Atividade	
	in vitro	in vivo
Sulfanilamida	±	++
N ¹ -acetil-sulfanilamida (Albucid)	+	+
N ⁴ -tricloroacetil-sulfanilamida	+++	+
N ⁴ -nicotinil-sulfanilamida	—	+
N ⁴ -sucinil-sulfanilamida	—	++
Neo-Uliron	—	++
Sulfatiazol	+++	++
4-Metil-sulfatiazol	±	++
N ⁴ -tricloroacetil-sulfatiazol	+++	++
Sulfapiridina	±	+
Sulfadiazina	+++	++
Sulfamerazina	+++	++
Sulfaguanidina	—	++

TABELA V

COMPOSTO	Atividade	
	in vitro	in vivo
$p\text{-NO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.S.C}_6\text{H}_4\text{.NH}_2\text{-p'}$	—	—
$p\text{-NO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.S.C}_6\text{H}_4\text{.NH.COCH}_3\text{-p'}$	—	—
$(p\text{-NH}_2\text{.C}_6\text{H}_4)_2\text{S}$	+++	+
$(p\text{-NO}_2\text{.C}_6\text{H}_4)_2\text{S}_2$	—	+
$(p\text{-Br.C}_6\text{H}_4)_2\text{S}_2$	—	—
$p\text{-NO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.SO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.N:CH.C}_6\text{H}_5$	—	—
$p\text{-NO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.SO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.N:CH.C}_6\text{H}_4\text{.OCH}_3\text{-p'}$	—	—
$p\text{-NO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.SO}_2\text{.C}_6\text{H}_4\text{.N:CH.CH:CH.C}_6\text{H}_5$	—	—
$(p\text{-H.CO.NH.C}_6\text{H}_4)_2\text{SO}_2$	—	—
$(p\text{-CCl}_3\text{CO.NH.C}_6\text{H}_4)_2\text{SO}_2$	—	+
$(p\text{-NaSO}_2\text{CH}_2\text{.NH.C}_6\text{H}_4)_2\text{SO}_2$	—	—

Nas Tabelas 1 a 5 são relatados os resultados das provas “in vitro” e “in vivo” obtidas com as diferentes substâncias.

Das numerosas séries de produtos estudados merecem ser lembrados, pelos seus resultados protetores, todas as sulfas, o dinitrodifenilsulfeto, o diaminodifenilsulfeto e o tricloroacetil derivado da diaminodifenilsulfona (“Diclorona”), produto de particular interesse também para a quimioterapia das infecções produzidas por germes álcool ácido resistentes.

O ácido mandélico e o estovarsol, amplamente usados no tratamento das infecções intestinais, não evidenciaram atividade protetora na infecção tífica experimental do camundongo. Igualmente inativos “in vivo” foram os dois produtos antibióticos de origem microbiana usados, a piocianina e a penicilina.

Parece-nos útil, enfim, salientar a comparação por nós feita entre a atividade bacteriostática “in vitro” e protetora “in vivo” das numerosas substâncias estudadas. O ácido benzóico e seus derivados, assim como os compostos orgânicos do antimônio manifestaram uma forte ação anti-tífica “in vitro”, que não correspondeu a uma igual atividade protetora “in vivo”.

A maioria das sulfas, como já dissemos, protegeu uma pequena porcentagem dos animais infectados e geralmente inibiu o crescimento dos bacilos tíficos nos tubos, porém alguns produtos foram muito mais ativos do que outros “in vitro”, sem que paralelamente exibissem maior atividade protetora.

Nos outros compostos estudados a correspondência entre as duas provas foi relativamente constante. O valor das provas “in vitro”, porém, parece ser somente preliminar e nenhuma dedução pode ser tirada dos resultados, a não ser um indício para os trabalhos “in vivo”.

RESUMO

Foi estudada a atividade bacteriostática antitífica "in vitro" e a atividade protetora "in vivo" (na infecção tífica experimental do camundongo) de várias substâncias químicas (derivados de ácido benzóico, compostos orgânicos antimoniais, azocompostos, compostos aromáticos halogenados, compostos orgânicos de S e precisamente sulfetos, sulfonas e sulfamidas aromáticas) em relação a u'a amostra virulenta de bacilos tíficos (Ty2).

Os derivados do ácido benzóico e os compostos orgânicos do antimônio mostraram evidente ação bacteriostática "in vitro", porém foram desprovidos de valor protetor "in vivo".

Quanto aos derivados orgânicos do enxofre, foram em sua maioria inativos "in vitro" e "in vivo" os sulfetos, disulfetos e as sulfonas aromáticas, com exceção do pp-dinitrodifenilsulfeto, pp-diaminodifenilsulfeto e diclorona; pelo contrário, as sulfas (em número de 13) exibiram quase sempre atividade bacteriostática "in vitro" e fraca mas clara ação protetora na infecção experimental dos camundongos.

O estovarsol e o ácido mandélico foram inativos "in vitro" e "in vivo".

Da mesma forma inativas "in vivo" foram as duas substâncias antibióticas de origem microbiana estudadas, a saber, a piocianina e a penicilina.

ABSTRACT

A number of chemical substances (derivatives of the benzoic acid, organic antimony compounds, azo-compounds, halogen aromatic compounds, sulfur compounds and precisely sulfides, sulfones and aromatic sulfamides), as well as two antibiotics (penicillin and pyocyanin) have been tested for their antibacterial activity "in vitro" and "in vivo" (protection tests in mice) against a virulent strain of *E. typhosa* (Ty2).

Derivatives of the benzoic acid and organic antimony compounds demonstrated an evident bacteriostatic action "in vitro", but no protective activity "in vivo".

The organic sulfides, disulfides and the aromatic sulfones studied were mostly inactive "in vitro" and all inactive "in vivo" except pp.dinitrodiphenylsulfide, pp. diaminodiphenylsulfide and diclorone; on the contrary, the sulfas (in the number of 13) had in the majority bacteriostatic activity "in vitro" and light but clear protective action in the experimental infection of mice.

The stovarsol and the mandelic acid were inactive "in vitro" and "in vivo".

The pyocyanin and the penicillin, antibiotic substances, from microbial origin, gave, in the same way, negative results "in vivo".

BIBLIOGRAFIA

1. Kleeberg, S. Influence of mandelic acid on course of typhoid fever, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg.*, 35:191, 1941.
2. Buttle, G. A. H.; Parish, H. J.; McLeod, M. & Stephenson, D. The chemotherapy of typhoid and some other non-streptococcal infections in mice, *The Lancet*, 1:681, 1937.
3. Fisk, R. T. Therapeutic properties of sulfanilamide and related drugs in experimental typhoid infection of mice, *J. Inf. Dis.*, 68:20, 1941.
4. Kolmer, J. A. & Rule, A. M. Sulfonamide compounds in treatment of experimental *B. typhosus* (*E. typhosus*) infections of rabbits, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 48:388, 1941.
5. Libby, R. L. & Joyner, A. L. The action of sulfathiazole on the colon-typhoid-dysenteriae group of organisms, *J. Inf. Dis.*, 67:67, 1940.
6. Harries, E. H. R.; Swyer, R. & Thompson, N. Sulphanilamide in typhoid fever, *The Lancet*, 1:1321, 1939.
7. Weilbaecher, J. O.; Moss, S. E.; Taylor, H. M. & Dupuy, H. The treatment of typhoid fever by the thiazole derivatives of sulfanilamide, *Southern Med. J.*, 33:645, 1940.
8. Hall, W. M. Use of sulfaguanidine in controlled series of typhoid cases, *New Orleans Med. and Surg. J.*, 94:283, 1941.
9. Hoagland, R. J. Specific treatment of typhoid. The ineffectiveness of sulfathiazole and immune serum, *J. Amer. Med. Assn.*, 122:653, 1943.
10. Felix, A. & Pitt, R. M. A new antigen of *B. typhosus*, *The Lancet*, 2:186, 1934.
11. Felix, A. Clinical trials with a new anti-typhoid serum, *The Lancet*, 1:799, 1935.
12. McSweeney, C. J. Clinical trials with a new anti-typhoid serum, *The Lancet*, 1:1095, 1935.
13. Cookson, H. & Facey, R. V. Value of a specific serum in the treatment of typhoid fever, *Brit. Med. J.*, 1:1009, 1937.
14. Yu, H. Further studies on serum treatment of typhoid fever, *Chinese Med. J.*, 56:29, 1939; *resumo in Biological Abstracts*, 1939.
15. Asheshov, I. N.; Wilson, J. & Topley, W. W. The effect of an anti-Vi bacteriophage on typhoid infection in mice, *The Lancet*, 1:319, 1937.
16. Fisk R. T. Protective action of typhoid phage on experimental typhoid infection in mice *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* 38:659 1938.
17. Morton, H. E. & Engley, F. B. Dysentery bacteriophage, *J. Amer. Med. Assn.*, 127:584, 1945.
18. Reimann, H. A.; Elias, W. F. & Price, A. H. Streptomycin for typhoid. A pharmacologic study, *J. Amer. Med. Assn.*, 128:175, 1945.
19. Biocca, E.; Amaral, J. P. & Bier, O. Estudos sobre a quimioterapia da infecção meningocócica, *Mem. Inst. Butantan*, 18:37, 1944-1945.