

**AUMENTO DA PATOGENICIDADE DA *SALMONELLA*
TYPHI PARA CAMUNDONGOS PELA AÇÃO DO
AGENTE UMECTANTE "DECERESOL OT"
(DI-OCTIL-SODIO-SULFO-SUCCINATO) ***

DÁCIO DE ALMEIDA CHRISTOVÃO *

INTRODUÇÃO

Na produção da infecção experimental de animais de laboratório — base insubstituível da pesquisa prática e eficiente de agentes imunizantes ativos e passivos, e meio, muitas vezes único, de estudos epidemiológicos — uma grande variedade de processos têm sido imaginados e utilizados. Além da escolha da espécie animal mais sensível, ou (dentro da mesma espécie) da linhagem genética mais suscetível à ação de determinado agente infeccioso (métodos que ainda poderiam ser chamados de naturais), os investigadores têm lançado mão, também, de inúmeros artifícios, para obter ou intensificar a ação patogênica de vírus, bactérias ou seus produtos.

Exemplos antigos encontraríamos nas clássicas experiências de Pasteur², mantendo rãs na estufa ou conservando galinhas com as patas imersas em água fria, e conseguindo assim torná-las sensíveis à toxina tetânica e ao *Bacillus anthracis*. Tecidos contendo bactérias foram empregados por Novy²⁷ com o intuito de facilitar o estabelecimento de uma infecção. A injeção simultânea de agar nutritivo para conseguir a implantação e multiplicação de estreptococos em animal não suscetível foi, em 1925, utilizada por Dochez⁵, então na Universidade de Columbia. Zinsser, da Universidade de Harvard, e Grinell⁴² lançaram mão de coágulos sanguíneos. Terrel e Robertson⁴⁰, em 1930, conseguiram obter pneumonia lobar em cães introduzindo-lhes pela traquéia uma suspensão do inóculo em caldo viscoso de amido.

Em 1931, Sawyer e Lloyd³⁸, da Fundação Rockefeller, desenvolveram a sua famosa prova de proteção em camundongos para o estudo da imunidade contra a febre amarela, graças ao artifício do emprêgo das injeções simultâneas do vírus, por via intraperitoneal, e de suspensão de ami-

Recebido para publicação em 31-10-1955.

* Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Lucas de Assumpção) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

* Assistente da Cadeira.

do, intracerebralmente. O efeito do amido era provocar a localização do vírus no encéfalo, graças ao ligeiro trauma produzido. A enorme repercussão desta prova nos estudos da epidemiologia e profilaxia da febre amarela, evidentemente, não precisaria ser lembrada.

Em 1932, Nungester, Wolf e Jourdonais³⁰, da Universidade de Northwestern de Chicago, através de “uma observação casual foram levados à descoberta de que a virulência de bactérias podia ser grandemente aumentada se os organismos fossem suspensos em mucina gástrica esterilizada para a inoculação”²⁸. Estes investigadores observaram a exaltação da patogenicidade de pneumococos do tipo II e de estreptococos hemolíticos injetados intraperitonealmente em camundongos, quando suspensos em solução de mucina. No caso dos pneumococos, o efeito da mucina na mortalidade só apareceu nas doses menores, enquanto que, no tempo de sobrevida o seu efeito fez-se sentir em tôdas as doses. No caso dos estreptococos, foram influenciados pela mucina em tôdas as doses, tanto o tempo de sobrevida como a mortalidade, tendo havido sempre diminuição do primeiro e aumento da última. Os mesmos pesquisadores não puderam notar nenhum aumento de “virulência” de estafilococos dourados recentemente isolados de lesão humana, quando inoculados com mucina. Atribuíram o fato à inabilidade dêsse agente “de emprestar virulência a culturas avirulentas”.

Em 1933, Miller²³, da Universidade de Chicago, verificou o grande poder da mucina de exaltar a infeciosidade dos meningococos para os camundongos, ainda quando inoculados pela via intraperitoneal, e pôde, assim, torná-los ótimos animais experimentais, transformando-lhes a relativa resistência em franca suscetibilidade.

Em 1935, Nungester e Jourdonais²⁸ investigaram o papel da mucina na pneumonia experimental em ratos inoculados intratraquealmente. De 49 ratos inoculados com pneumococos do tipo III, suspensos em solução de mucina, 43 morreram com lesões semelhantes às dos vários estádios da pneumonia lobar, exceto o de resolução. Doses iguais, suspensas em solução salina, foram inoculadas em 35 ratos, dos quais apenas 3 morreram. De 31 ratos inoculados somente com mucina, 1 morreu. Os autores concluíram que a mucina, no trato respiratório, pode representar papel importante na patogênese da pneumonia lobar. Acharam que a mucina atuava de maneira igual à do amido, usado por Terrell e Robertson⁴⁰, na pneumonia experimental do cão, e que em ambos os casos havia interferência mecânica com os agentes de defesa normal do organismo, provavelmente com a fagocitose.

Miller²⁴, em 1935, modificou ligeiramente a sua técnica de infecção experimental meningocócica, pela mudança do método de preparo da mucina; estudou o curso da infecção²⁵ e o efeito da aplicação de soro imune antibacteriano²⁶, concluindo que o uso da prova de proteção em camundongo era método mais adequado que os então empregados na padronização dos soros terapêuticos antimeningocócicos.

Simultaneamente, Rake³², do Instituto Rockefeller, também aplicou a infecção experimental meningocócica de Miller à pesquisa da atividade protetora de soros, estudando soros de portadores de *Neisseria meningitidis* e de indivíduos normais. Propoz, logo em seguida³³, um método para a titulação da ação protetora dos soros antimeningocócicos.

Ainda no mesmo ano, Rake³⁴, lembrando que o trabalho experimental sobre a febre tifóide sempre estivera prejudicado pela inexistência de um pequeno animal de laboratório suscetível — como já o fizera Miller²³ com relação às infecções meningocócicas —, estudou a ação da mucina sobre a patogenicidade dos bacilos tifóidicos para o camundongo. Os resultados obtidos foram os melhores possíveis e esse investigador pôde estabelecer um método para exaltar a ação patogênica da *Salmonella typhi* para esse animal, o qual ofereceu um processo de seleção de cepas para o preparo de vacinas e — através das provas de proteção — um método delicado de medida de anticorpos em soros humanos.

Nessa mesma ocasião, realizava a Escola Médica do Exército Americano, sob a supervisão geral de Siler e a orientação imediata de Luippold, suas extensíssimas pesquisas sobre a imunização contra a febre tifóide, que consumiram 70.000 camundongos e se estenderam de 1934 a 1940, e cujos resultados foram publicados em longa monografia em 1941³⁵. Os investigadores mencionados repetiram as experiências de Rake e desenvolveram a sua técnica. A grande repercussão que tiveram êstes trabalhos firmou definitivamente na escola americana o emprêgo da mucina no estudo experimental da febre tifóide, no que se refere à profilaxia específica e a vários aspectos relacionados à sua epidemiologia.

Em 1936, Nungester, Jourdonais e Wolf²⁹ verificaram a exaltação pela mucina da “virulência”, para o camundongo, de uma variante do bacilo de Friedländer e, para ratos brancos, o aumento da patogenicidade do *Bacillus anthracis*.

Fothergill, Dingle e Chandler¹⁴, em 1937, dedicaram a sua atenção à infecção experimental pelo *Hemophilus influenzae*. A falta de animal de laboratório adequado, onde a infecção por essa bactéria ocorresse realmente, prejudicava consideravelmente as investigações dos problemas imunológicos relacionados. Empregando suspensões do bacilo de Pfeiffer, em mucina, conseguiram êstes pesquisadores da Universidade de Harvard verificar grande exaltação de sua “virulência” para camundongos e a ocorrência de uma verdadeira infecção, caracterizada pela multiplicação do microorganismo *in vivo*, o que foi por êles imediatamente aplicado no estudo da imunização ativa e passiva, comparação da “virulência” de cepas lisas e rugosas, etc.

Experiências no Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, revelaram a vantagem da junção de mucina à dose infectante de *Vibrio comma*, empregada na aferição das vacinas contra a cólera. O ensaio em camundongo com o auxílio da mucina passou então a fazer parte da prova oficial

americana de antigenicidade desse produto¹², como já havia sido decidido em relação à vacina contra as febres tifóide e paratifóides¹³.

A mucina tem sido, assim, o agente mais usado na exaltação da patogenicidade de bactérias para animais de laboratório. O seu mecanismo de ação, no entanto, permanece obscuro, dispondo-se até hoje, praticamente, apenas de hipóteses para explicá-lo, como a do revestimento das bactérias inibindo a fagocitose, apresentada por Tunnicliff⁴¹, em 1940, ou a da capacidade de aumentar a permeabilidade capilar, proposta por Sandage e Stark³⁷, em 1949.

Por outro lado, em 1928, Duran-Reynals^{6, 7}, da Universidade de Yale, relatara que a infecção vacínica do coelho era consideravelmente aumentada quando o vírus era injetado na pele, juntamente com extratos aquosos de testículos de coelho, cobaia e rato. Esse pesquisador pudera mostrar que o efeito se exercia sobre os tecidos do hospedeiro e não sobre o agente infeccioso. Essas observações foram ampliadas por ele mesmo¹¹ e outros investigadores, como Hoffman¹⁵ e Pijoan³¹, e estendidas a outros agentes infecciosos, em várias espécies de animais.

Na Inglaterra, McClean¹⁸ repetiu as primeiras experiências de Duran-Reynals e pôde descobrir, independentemente e ao mesmo tempo que Hoffman e Duran-Reynals^{16, 17}, o poder difusor dos extratos de testículos, ou seja, o poder de aumentar a permeabilidade tecidual. Mais tarde, em 1933, Duran-Reynals descreveu fatores de difusão de bactérias invasoras⁸ e, em 1939, de insetos venenosos e venenos de cobras⁹.

Meyer, Dubos e Smyth^{19, 20}, Meyer, Smyth e Gallardo²² e Meyer, Smyth e Dawson²¹ mostraram, em série de trabalhos publicados de 1936 a 1939, que uma enzima presente em autolisatos de pneumococos, extratos da iris de coelhos, corpo ciliar e baço, hidrolizava o ácido hialurônico obtido a partir do humor vítreo, líquido sinovial, cordão umbelical e estreptococos. Em 1940, Robertson, Ropes e Bauer³⁶ demonstraram o mesmo com preparados obtidos a partir de *Clostridium welchii* agindo sobre líquido sinovial. Chain e Duthie^{3, 4}, em 1939, em Oxford, foram os primeiros a identificar alguns dos fatores de difusão com enzimas mucolíticas, ou hialuronidases, e descreveram o fenômeno de difusão em tecidos animais como efeito enzimático sobre o ácido hialurônico do tecido conectivo, o que foi logo confirmado por muitos pesquisadores na Europa e Estados Unidos.

Assim, abriu-se um novo campo de pesquisas relativas ao problema hospedeiro-parasita, pelos estudos originais de Duran-Reynals, o que foi magistralmente revisto e discutido por ele mesmo, em 1942¹⁰.

Considerando o papel das hialuronidases em infecções naturais ou experimentais — favorecimento da invasão do organismo hospedeiro por agentes infecciosos, através da ação lítica sobre o ácido hialurônico intercelular — pareceu-nos interessante verificar se os chamados agentes umectantes (wetting-agents) não poderiam também exercer ação análoga. Esses com-

postos, relativamente modernos, são atualmente de grande aplicação industrial, devido a forte umectação que provocam, resultado, naturalmente, da intensa depressão da tensão superficial que acarretam. Esta propriedade faz com que, por exemplo, encontrem aplicação obrigatória nas operações de tingidura de tecidos, nas quais a sua adição à solução dos corantes facilita extraordinariamente a penetração destes na intimidade das fibras. Poderia ser possível efetuarem ação semelhante nos tecidos animais, em relação a agentes infecciosos, senão diretamente, uma vez que se trata de partículas em suspensão, pelo menos indiretamente, fazendo penetrar as suas enzimas ou outros produtos metabólicos de ação favorecedora da implantação.

TÉCNICAS

Agente umectante — Foi objeto da presente verificação o composto conhecido sob o nome de Deceresol OT *, o qual, segundo a literatura¹ fornecida, trata-se de um ester de um ácido sulfo-dicarboxílico, o di-octil-sódio-sulfo-succinato, dotado de consideráveis propriedades umectantes, penetrantes e dispersantes. O seu pH varia de 6,5 a 7,0, em geral mais próximo do primeiro. A solubilidade a 20°C é de 1,5 g por litro, a 30°C, de 1,8 e a 40°C, de 2.3. Para dissolver, é necessário deixá-lo embebendo-se em água por várias horas.

O seu efeito sobre a tensão superficial da água é particularmente digno de nota. Medida em dines por cm, pelo tensiômetro de Du Nouy, ela cai de 72,0 a 38,1 e a 26,8 nas suas soluções a 1:10.000 e 1:1.000, respectivamente.

Agente infeccioso — Foi escolhida a *Salmonella typhi*, bactéria de virulência relativamente pequena para os animais comuns de laboratório, tendo sido empregadas as cepas padrões "Ty 2" e "Panamá 58".

Tratava-se, entretanto, de cepas mantidas há longo tempo em passagens constantes em meios de cultura e de virulência consideravelmente atenuada para camundongos. Foram ambas submetidas a inúmeras passagens nestes animais, por via intraperitoneal, sem no entanto conseguirem-se elevar o seu título mortal 50%, o qual permaneceu variando em torno de 500 milhões.

A obtenção de cepas mais virulentas não foi possível nas fontes ao nosso alcance.

Animal experimental — Usaram-se unicamente camundongos brancos "Suissois", jovens, de peso variável, segundo será relatado.

Método — Para verificar a ação do Deceresol OT sobre a patogenicidade da *Salmonella typhi* para camundongos, comparou-se a mortalidade

* Marca registrada, American Cyanamid Company, Textile Resin Department, Bound Brook, New Jersey, representada por Indústrias Químicas do Brasil.

provocada pela inoculação intraperitoneal de suspensões em solução salina e em solução salina adicionada do umectante. O volume inoculado foi sempre o mesmo, 0,5 ml. A concentração da suspensão inicial, com a qual tôdas as outras foram preparadas, foi determinada nefelométricamente, pela escala de Mac Farland. Expressiu-se a mortalidade em DM50, calculada pelo método de Reed e Muench³⁵.

Primeiramente, porém, a ação do Deceresol OT sôbre o camundongo e a *Salmonella typhi* foi investigada.

Lotes de camundongos de 16 a 20 g receberam injeções intraperitoneais de 0,5 ml da solução do agente umectante a 1:250, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000. Os animais foram observados por mais de uma semana. Sômente houve mortes entre os animais inoculados com a dose 1:250. Os camundongos que receberam as doses de 1:2.000 e 1:1.000 não evidenciaram a menor anormalidade. Entre aqueles injetados com a dose 1:500, alguns revelaram alterações do aspecto normal da pelagem, não tendo aparecido qualquer outro sinal anormal.

Sôbre a *Salmonella typhi*, a ação do Deceresol OT foi verificada em diferentes tempos de contacto, pelo método da contagem em placas. A experiência realizada, embora elementar, é indicativa, dado o tempo que durou, e suficiente para os efeitos que pesam na questão a ser estudada. O quadro I apresenta os resultados. Como se pode ver, mesmo após 60 minutos de contacto, o número de salmonelas revelado na suspensão em solução salina com Deceresol a 1:500 pareceu ser igual ao da suspensão testemunha.

QUADRO I

AÇÃO DO DECERESOL OT SÔBRE A *S. TYPHI* "TY 2" EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTACTO

Contagem em placas semeadas com 1 ml das diluições discriminadas

Tempo de contacto (minutos)	LÍQUIDO SUSPENSOR	Diluições da suspensão de 160 milhões de bactérias por ml				
		1:1 000	1:10 000	1:100 000 *	1:1 000 000	1:10 000 000
0	Deceresol 1:500	—	—	1 700	101	15
	Solução salina	—	—	1 900	210	15
15	Deceresol 1:500	—	—	1 700	198	17
	Solução salina	—	—	1 400	176	18
30	Deceresol 1:500	—	incontável	1 800	155	—
	Solução salina	—	incontável	1 900	178	—
60	Deceresol 1:500	incontável	incontável	2 000	181	—
	Solução salina	incontável	incontável	1 800	170	—

* Números arredondados a centenas.

QUADRO II
 AÇÃO DO DECERESOL OT SOBRE A PATOGENICIDADE DA *S. TYPHI* "TY 2"
Inoculação intraperitoneal em camundongos — Experimento 1

NÚMERO DE BACILOS INOCULADOS E LÍQUIDO SUSPENSOR (Volume total: 0,5 ml)	CAMUNDONGOS												Mor- tos	
	1		2		3		4							
	24 *	48 *	24 *	72 *	24 *	72 *	24 *	72 *	24 *	72 *	24 *	72 *		
200 000 000 — solução salina	D	+	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	1
150 000 000 — solução salina	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0
100 000 000 — solução salina	D	+	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	1
200 000 000 — solução salina + Deceresol 1:1000	+		+		+									4
150 000 000 — solução salina + Deceresol 1:1000	+		+		+									4
100 000 000 — solução salina + Deceresol 1:1000	+		+		D		+					D	D	3
50 000 000 — solução salina + Deceresol 1:1000	D	+	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	1
Solução salina + Deceresol 1:1000	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0

* Após 24, 48 e 72 horas de observação: + = morto; D = doente; B = bom.

QUADRO III
 AÇÃO DO DECERESOL OT SOBRE A PATOGENICIDADE DA S. TYPHI "TY 2"
Inoculação intraperitoneal em camundongos — Experiência 2

NÚMERO DE BACIOS INOCULADOS E LÍQUIDO SUSPENSOR (Volume total: 0,5 ml)	CAMUNDONGOS												Mor- tos	
	1			2			3			4				
	24 *	48 *	72 *	24	48	72	24	48	72	24	48	72		
1 280 000 000 — solução salina	+			+			D	D	B	D	B	B	B	2
640 000 000 — solução salina	+			D	+		B	D	B	B	D	B	B	2
320 000 000 — solução salina	B	D	B	B	D	B	B	D	B	B	B	B	B	0
160 000 000 — solução salina	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0
160 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+			+				4
80 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+			+				4
40 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			D			D		+		4
20 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			D	+		D	+		D	+	+		4
10 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			D	+		D	+		D	+	D	D	3
Solução salina + Deceresol 1:500	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0

* Após 24, 48 e 72 horas de observação: + = morto; D = doente; B = bom.

Assim, pôde-se concluir, dentro dos limites de precisão das duas experiências, da inocuidade do Deceresol OT a 1:500 para a *Salmonella typhi* e das suas soluções até a concentração de 1:500, injetadas intraperitonealmente, no volume de 0,5 ml, em camundongos.

RESULTADOS

I — Ação do Deceresol OT sobre a patogenicidade da *Salmonella typhi*, cepa "Ty 2".

Experiência 1 — Numa primeira experiência exploradora foram empregados bacilos da cepa "Ty 2", de culturas de 20 horas em agar Martin. Fez-se, inicialmente, uma única suspensão, que foi padronizada pelo nefelômetro. A partir desta suspensão prepararam-se tôdas as outras: as de 200, 150 e 100 milhões de bactérias por 0,5 ml de solução salina simples, destinadas a testemunhas; e as de 200, 150, 100 e 50 milhões por 0,5 ml de solução salina com Deceresol OT a 1:1.000. Cada suspensão foi inoculada em 4 camundongos jovens, os quais foram observados durante as habituais 72 horas da infecção tifóidica experimental. O quadro II apresenta os resultados.

Esta primeira experiência revelou nítido aumento da mortalidade entre os camundongos inoculados com *Salmonella typhi* mais o agente umectante. As concentrações de microrganismos empregadas não permitiram, porém, estimar a magnitude do aumento. Aliás, o pequeno número de animais em jogo e a pequena amplitude das doses empregadas também não permitiriam, evidentemente, afirmar a realidade desse aumento.

Experiência 2 — Repetiu-se a experiência, tendo-se desta vez preparado suspensões mais concentradas para os animais testemunhas e indo a diluições mais altas para a aplicação das suspensões com agente umectante. Este foi empregado em concentração dupla, a 1:500, na concentração máxima ainda solúvel à temperatura do camundongo. Os resultados acham-se no quadro III, onde se vê o grande aumento de mortalidade havido entre os animais inoculados com as suspensões de bacilos em solução de Deceresol. Infelizmente, as concentrações escolhidas não foram totalmente satisfatórias outra vez, pois não tornaram possível o cálculo da DM50 dos microrganismos suspensos na solução do agente umectante. Contudo, pode-se ver que é de menos de 10 milhões, enquanto que para os mesmos bacilos suspensos em solução fisiológica simples, achar-se-ia em 903 milhões. Assim, o aumento observado na experiência I repetiu-se, e com intensidade muito maior.

Experiência 3 — O resultado da experiência 2, grande aumento da patogenicidade da *S. typhi* através do Deceresol OT, dificilmente seria explicável pelo acaso. Não obstante, resolveu-se repetir a experiência, e, para torná-la mais segura, empregou-se número maior de camundongos, passan-

QUADRO IV
 AÇÃO DO DECERESOL OT SOBRE A PATOGENICIDADE DA S. TYPHI "TY 2"
Inoculação intraperitoneal em camundongos — Experiência 3

NÚMERO DE BACIOS INOCULADOS E LÍQUIDO SUSPENSOR (Volume total: 0,5 ml)	CAMUNDONGOS												Mor- tos			
	1		2		3		4		5		Mor- tos					
	24 *	48 *	72 *	24	48	72	24	48	72	24		48		72		
1 600 000 000 — solução salina	+			D	+	D	D	+	D	D	D	D	+	D	+	5
800 000 000 — solução salina	D	+		D	+	D	D	+	D	D	D	D	+	D	+	5
400 000 000 — solução salina	D	+		D	+	D	D	+	D	D	D	D	+	D	+	5
200 000 000 — solução salina	D	+		D	D	+	D	D	D	D	D	D	D	D	D	3
100 000 000 — solução salina	B	D	+	B	D	D	B	D	D	D	D	D	D	D	D	1
400 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+		+	+		+		+	+		+		5
200 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+		+	+		+		+	+		+		5
100 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+		+	+		+		+	+		+		5
50 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+		+	+		+		+	+		+		5
25 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+		+	+		+		+	+		+		5
12 500 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			D	+	D	D	+	D	D	D	D	+	D	B	4
Solução salina + Deceresol 1:500	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0

* Após 24, 48 e 72 horas de observação: + = morto; D = doente; B = bom.

do-se a usar lotes de 5 para cada dose. Partindo novamente de uma suspensão única, dosada nefelométricamente, prepararam-se concentrações de 1.600 a 100 milhões de bacilos por 0,5 ml, em solução salina, e de 400 a 12,5 milhões por 0,5 ml, em solução salina com Deceresol a 1:500, as quais foram inoculadas. Os resultados obtidos são encontrados no quadro IV.

Vê-se que o aumento da patogenicidade pela ação do agente umectante foi perfeitamente comprovado. Novamente, porém, a determinação da DM50 da *Salmonella typhi*, suspensa na solução de Deceresol, tornou-se impossível, ficando patente apenas ser menor que 12,5 milhões, enquanto a da suspensão testemunha foi de 160,4 milhões.

Experiência 4 — Após novas passagens em camundongos, na tentativa renovada de exaltar a virulência da cepa “Ty 2” empregada, e diante da impossibilidade de consegui-lo, decidiu-se substituí-la. Outra cepa “Ty 2” foi obtida (do Instituto Butantan) e, depois de algumas passagens em camundongos, julgando-se-a mais virulenta que a anterior, realizou-se nova experiência, nas mesmas condições da precedente, inclusive no relativo ao número de animais, 5 para cada dose. Os resultados estão expostos no quadro V.

Observou-se, novamente, grande aumento da mortalidade entre os camundongos inoculados com os bacilos suspensos na solução salina de Deceresol. A DM50 calculada foi de 2,91 milhões, enquanto entre os testemunhas, foi de 270 milhões, ou seja, um número de bacilos 93 vezes maior.

II — Ação do Deceresol OT sôbre a patogenicidade da *Salmonella typhi*, cepa “Panamá 89”.

Experiência 5 — Ainda tentando verificar a ação do agente umectante sôbre a patogenicidade para camundongos de bacilos da febre tifóide realmente virulentos, obteve-se (do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) a cepa “Panamá 58”. Após algumas passagens em camundongos, viu-se, entretanto, que se tratava também de bacilos já atenuados. Assim mesmo, outra experiência foi realizada, em condições iguais às da última, excetuando o tamanho dos animais. Nas experiências anteriores tinham sido usados camundongos de 15 a 20 g de pêso, enquanto desta vez pesavam sômente 11 a 15 g. Os resultados encontram-se no quadro VI.

A DM50 calculada foi de 1.430 milhões entre os testemunhas e de sômente 690 mil entre os animais inoculados com as bactérias suspensas em Deceresol. O aumento da dose mortal 50%, que aqui atingiu a 2.073 vezes, foi muito mais acentuado que nas experiências anteriores.

QUADRO V
AÇÃO DO DECERESOL OT SOBRE A PATOGENICIDADE DA *S. TYPHI* "TY 2"
Inoculação intraperitoneal em camundongos — Experiência 4

NÚMERO DE BACIOS INOCULADOS E LÍQUIDO SUSPENSOR (Volume total: 0,5 ml)		CAMUNDONGOS																Mor- tos	
		1		2		3		4		5									
24 *	48 *	72 *	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72		
2 400 000 000 — solução salina			+															D	4
1 200 000 000 — solução salina			+	+														D	3
600 000 000 — solução salina			+	D	+													+	5
300 000 000 — solução salina	D	+	B	B	+													B	3
150 000 000 — solução salina	B	+	B	B	D													B	1
75 000 000 — solução salina	B	+	B	B	+													B	2
37 500 000 — solução salina	B	D	B	B	D													B	0
75 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500			+	+															5
37 500 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+		D	D															5
18 800 000 — solução salina + Deceresol 1:500	D	+	B	D	+													D	3
9 400 000 — solução salina + Deceresol 1:500	D	+	D	+														D	3
4 700 000 — solução salina + Deceresol 1:500	D	+	D	+														+	5
2 400 000 — solução salina + Deceresol 1:500	D	+	D	D	+													B	2
1 200 000 — solução salina + Deceresol 1:500	B	D	B	B	D													B	1
600 000 — solução salina + Deceresol 1:500	D	D	D	B	+													B	2
300 000 — solução salina + Deceresol 1:500	B	D	D	B	B													B	0
Solução salina + Deceresol 1:500	B	B	B	B	B													B	0

* Após 24, 48 e 72 horas de observação: + = morto; D = doente; B = bom.

QUADRO VI
AÇÃO DO DECERESOL SOBRE A PATOGENICIDADE DA S. TYPHI "PANAMA 58"
Inoculação intraperitoneal em camundongos — Experiência 5

NÚMERO DE BACIOS INOCULADOS E LÍQUIDO SUSPENSOR (Volume total: 0,5 ml)	CAMUNDONGOS																					Mor- tos	
	1			2			3			4			5										
	24 *	48 *	72 *	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72								
2 400 000 000 — solução salina	+																						4
1 200 000 000 — solução salina	D	+		D	D																		1
600 000 000 — solução salina	+			D	D	B	D	D	D	B	B	D	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	2
300 000 000 — solução salina	D		B	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0
150 000 000 — solução salina	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0
75 000 000 — solução salina	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0
37 500 000 — solução salina	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0
75 000 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+																5
37 500 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+																5
18 800 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+																5
9 400 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+																4
4 700 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+																5
2 400 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			D																4
1 200 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			+																4
600 000 — solução salina + Deceresol 1:500	+			+			D																3
300 000 — solução salina + Deceresol 1:500	B	D	+	D	D		D	D	D														1
Solução salina + Deceresol 1:500	D	B	B	D	D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0

* Após 24, 48 e 72 horas de observação: + = morto; D = doente; B = bom.

DISCUSSÃO

A hipótese de que agentes umectantes pudessem aumentar a ação patogênica de bactérias em infecções experimentais foi comprovada, pelo menos no que se refere ao Deceresol OT e à mortalidade provocada pela *Salmonella typhi* inoculada por via intraperitoneal em camundongos. Resta verificar se tal efeito se repetirá com outras bactérias e outros compostos dotados do mesmo poder de umectação.

O maior aumento de mortalidade observado, o de 2.073 vezes para a cepa "Panamá 58" (Experiência 4), não foi da mesma magnitude que os maiores referidos por vários autores como efeito da mucina. No entanto, ter-se-ia, primeiramente, de repetir estas mesmas experiências com cepas altamente virulentas, antes de se poder fazer tal comparação. As cepas empregadas neste trabalho certamente seriam melhor classificadas como avirulentas e não se pode saber o efeito que a toxidez da carga inoculada exerce no fenômeno, uma vez que ainda não é conhecido o mecanismo certo, nem mesmo o provável modo de ação do agente umectante. Seria possível que a ação aumentadora de mortalidade do Deceresol OT fôsse mais intensa para bacilos da febre tifóide verdadeiramente virulentos, como no caso da mucina, segundo verificaram Rake³⁴ e Siler³⁹.

Siler³⁹ (p. 80) refere textualmente: "Nossas experiências relativas à virulência (Secção IV) tinham mostrado que se linhagens virulentas de *Eberthella typhosa* fossem suspensas em solução de Ringer, podia ser antecipado que concentrações de 25 a 100 milhões de *Eberthella typhosa* vivas seriam necessárias para matar aproximadamente 50% (D. M. Média) de grupos de camundongos brancos, comuns, pesando cêrca de 16 a 18 g. Se concentrações de *Eberthella typhosa*, virulentas e vivas, fossem suspensas em mucina a 5% e inoculadas intraperitonealmente no mesmo tipo de camundongos, de pêso comparável, todos os camundongos constituindo tais grupos seriam mortos por concentrações de microorganismos variando de 25 a 50 mil (D. M. Mínima). Quando as experiências foram repetidas nas mesmas condições, substituindo-se a linhagem comum de camundongos brancos por uma linhagem especial de camundongos pretos (Pretos C-57) pesando 16 a 18 g, encontramos que todos os grupos de camundongos sucumbiam regularmente, se inoculados com concentrações de 100 a 1.000 *Eberthella typhosa*, vivas e virulentas, suspensas em mucina a 5%, e que, ocasionalmente, cêrca de 10 microorganismos produziam resultado semelhante.

Os resultados obtidos com cepas avirulentas, sob condições comparáveis, foram os seguintes: quando camundongos brancos, comuns, eram usados e concentrações de microorganismos vivos eram suspensos em solução de Ringer, 300 a 500 milhões de microorganismos eram requeridos para matar aproximadamente 50% do grupo. Quando camundongos brancos, comuns, foram substituídos por camundongos Suíços, ou pela linhagem especial de camundongos pretos (Pretos C-57) e foram usadas suspensões em

mucina, de cepas virulentas e vivas, achou-se uma D. M. Mínima dentro da amplitude de 10 a 100 milhões de microorganismos”.

Comparando êstes resultados de Siler com aquêles encontrados neste trabalho, pareceria ter o Deceresol OT ação de intensidade igual, senão superior, à da mucina, no aumento da patogenicidade da *Salmonella typhi* para camundongos. Êste ponto será esclarecido em trabalho ulterior, quando uma cepa de virulência realmente bem elevada puder ser obtida.

O maior aumento de patogenicidade, através do Deceresol OT, verificado com a linhagem “Panamá 58”, usada nesta investigação, também requer esclarecimento. Uma vez que a virulência desta cepa não foi maior que a das duas “Ty 2” empregadas, poder-se-ia talvez explicar a intensificação do fenômeno pela menor idade dos camundongos com ela inoculados. Se a idade dos animais é capaz de exercer tal influência, também será objeto de verificação posterior.

Investigações análogas a esta, empregando-se todavia, outras vias de inoculação, auxiliariam a interpretação do fenômeno observado. E a repetição destas experiências com outras bactérias, e, principalmente, com outros agentes umectantes se faz imprescindível, pois permitiria demonstrar se o efeito relatado se deve a propriedade comum dêstes agentes ou se trata de alguma peculiaridade do produto experimentado. Sômente após estas verificações poder-se-á tentar explicar o mecanismo de ação do Deceresol OT no aumento da patogenicidade, aqui descrito.

RECONHECIMENTO

O autor manifesta o seu reconhecimento ao trabalho dos técnicos do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Srtas. Maria Augusta dos Santos e Nilce Schmidt Nunes.

SUMARIO

Supondo ser possível a agentes umectantes, devido a suas propriedades de penetração, facilitar a implantação e invasão de agentes infecciosos no organismo hospedeiro, investigou-se o efeito, sôbre a patogenicidade da *Salmonella typhi* para camundongos, do Deceresol OT. Êste produto — éster de um ácido sulfo-dicarboxílico, o di-octil-sódio-sulfo-succinato — foi escolhido pelas suas grandes propriedades de penetração, resultantes do seu forte poder depressor da tensão superficial, e após verificar-se a sua inocuidade para camundongos e para a *Salmonella typhi*.

O efeito sôbre a patogenicidade do bacilo foi medido comparando-se as mortalidades obtidas pela inoculação intraperitoneal de camundongos com suspensões em solução salina e com suspensões em solução salina adicionada do agente umectante a 1:500.

Neste sentido, realizaram-se cinco ensaios com duas cepas "Ty 2" e uma "Panamá 58". Invariavelmente se observou aumento da DM50 pela ação do Deceresol OT, aumento que variou, mais ou menos, de 100 a 2.000 vezes. É de assinalar que se tratava de cepas avirulentas.

Outras investigações serão feitas, na tentativa de explicar o mecanismo do fenômeno observado.

SUMMARY

Assuming the possibility that wetting agents, through their penetrating properties, might facilitate the access to the host's tissues and further invasion of infectious microorganisms, the effect of Deceresol OT on the pathogenicity of *Salmonella typhi* was investigated. This compound — dioctyl-sodium-sulpho-succinate, an ester of a sulpho-dicarboxylic acid — was chosen for its remarkable properties of penetration, due to its strong lowering power on surface tension, and for its innocuity for mice and for *S. typhi*, as observed in this investigation.

The effect on the pathogenicity of the bacilli was verified by comparing the mortalities obtained through the intraperitoneal inoculation of mice with suspensions in saline and suspensions in saline with the wetting-agent in a 1:500 concentration.

Five tests were made, with two strains "Ty 2" and one "Panamá 58". An increase of the LD50 through the action of Deceresol OT was observed consistently. This increase varied from 100 to 2.000 times, approximately. It must be noted that the strains employed were avirulent.

Other investigations will be made, in an attempt to explain the mechanism of action of the phenomenon observed.

REFERÊNCIAS

1. American Cyanamid Co. Textile Resin Department, Bound Brook, New Jersey Deceresol wetting agents. Textile Finishing Bulletin n.º 135.
2. Bier, O.: Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene. 7.ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 1955. p. 174.
3. Chain, E. & Duthie, E. S.: A mucolytic enzyme in testis extracts. Nature, London, **133**:977-978, 1939.
4. —: Identity of hyaluronidase and spreading factor. Brit. J. Exper. Path. **21**:324-338, 1940.
5. Dochez, A. R.: Etiology of scarlet fever. Medicine, **4**:251-274, 1935.
6. Duran-Reynals, F.: Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. Compt. Rend. Soc. Biol. **99**:6-7, 1928.
7. —: The effect of extracts of certain organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus. J. Exper. Med. **50**: 327-340, 1929.

8. Duran-Reynals, F.: Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J. Exper. Med.* **58**:161-181, 1933.
9. —: A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. *J. Exper. Med.* **69**:69-81, 1939.
10. —: Tissue permeability and the spreading factors in infection. A contribution to the host: parasite problem. *Bact. Rev.* **6**:197-252, 1942.
11. — & Suner Pi, J.: Exaltation de l'activité du staphylocoque par les extraits testiculaires. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **99**:1908-1911, 1928.
12. Estados Unidos. National Institute of Health: Minimum requirements: cholera vaccine. July 2, 1945.
13. Estados Unidos. National Institute of Health: Minimum requirements: Typhoid vaccine. Dec. 8, 1953.
14. Fothergill, L. D.; Dingle, J. H. & Chandler, Caroline A.: Studies on Haemophilus influenzae. I. Infection of mice with mucin suspensions of the organism. *J. Exper. Med.* **65**:721-734, 1937.
15. Hoffman, D. C.: The effect of testicular extract on filterable viruses. *J. Exper. Med.* **53**:43-50, 1931.
16. — & Duran-Reynals, F.: The mechanism of enhancement of infections by testicle extracts. *Science*, **72**:508, 1930.
17. —: The influence of testicle extract on the intradermal spread of injected fluids and particles. *J. Exper. Med.* **53**:387-398, 1931.
18. Mc Clean, D.: The influence of testicular extract on dermal permeability and the response to vaccine virus. *J. Path. & Bact.* **33**:1045-1070, 1930.
19. Meyer, K.; Dubos, R. & Smith, E. M.: Action of a lytic principle of pneumococcus on certain tissue polysaccharides. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **34**:816-818, 1936.
20. —: The hydrolysis of the polysaccharide acids of vitreous humor, of umbilical cord, and of streptococcus by the autolytic enzyme of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **118**:71-78, 1937.
21. —; Smyth, E. M. & Dawson, M. H.: The isolation of a mucopolysaccharide from synovial fluid. *J. Biol. Chem.* **128**:319-327, 1939.
22. —; Smyth, E. M. & Gallardo, E.: On the nature of ocular fluids. II. The hexosamine content. *Am. J. Opht.* **21**:1083-1090, 1938.
23. Miller C. P.: Experimental meningococcal infection in mice. *Science*, **78**:340-341, 1933.
24. —: A study of experimental meningococcal infection. I. Method. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **32**:1136-1138, 1935.
25. —: A study of experimental meningococcal infection. II. Course of infection. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **32**:1138-1140, 1935.
26. —: A study of experimental meningococcal infection. III. Effect of antibacterial immune serum. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **32**:1140-1142, 1935.
27. Novy, citado por Nungester, W. J.; Jourdonais, L. F. & Wolf, A. A.²⁹

28. Nungester, W. J. & Jourdonais, L. F.: The rôle of mucin in the production of experimental lobar pneumonia in the rat. *J. Bact.* **29**:34, 1935.
29. —; Jourdonais, L. F. & Wolff, A. A.: The effect of mucin on infections by bacteria. *J. Infect. Dis.* **59**:11-21, 1936.
30. —; Wolff, A. A. & Jourdonais, L. F.: Effect to gastric mucin on virulence of bacteria in intraperitoneal infections in the mouse. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **30**:120-121, 1932-33.
31. Pijoan, M.: The action of testicle, kidney, and spleen extracts on the infective power of bacteria. *J. Exper. Med.* **53**:37-42, 1931.
32. Rake, G.: Studies on meningococcus infection. VII. The study of an isolated epidemic. *J. Exper. Med.* **61**:545-558, 1935.
33. —: A method for titrating the protective action of antimeningococcal serum. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **32**:1175-1178, 1935.
34. —: Enhancement of pathogenicity of human typhoid organisms by mucin. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **32**:1523-1524, 1935.
35. Reed, L. J. & Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497, 1938.
36. Robertson, W. B.; Ropes, M. W. & Bauer, W.: Mucinase: a bacterial enzyme which hydrolyses synovial fluid mucin and other mucins. *J. Biol. Chem.* **133**:261-276, 1940.
37. Sandage, C. & Stark, O. K.: A study of the mode of action of substances which enhance bacterial invasiveness. *J. Infect. Dis.* **84**:310-316, 1949.
38. Sawyer, W. A. & Lloyd, W.: Use of mice in tests of immunity against yellow fever. *J. Exper. Med.* **54**:533-555, 1931.
39. Siler, L. F. et al.: Immunization to typhoid fever. Baltimore, The Johns Hopkins Press, 1941. (The American Journal of Hygiene Monographic series, n. 17).
40. Terrell, E. E. & Robertson, O. H.: Production of experimental lobar pneumonia in the dog. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **27**:973-975, 1929-30.
41. Tunncliff, Ruth: Action of gastric and salivary mucin on phagocytosis. *J. Infect. Dis.* **66**:189-191, 1940.
42. Zinsser, H. & Grinnell, F. B.: Blood clot method of immunization with observations on pneumococcus toxemia. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **23**:205-208, 1925-26.