

ISOLAMENTO DO *BALANTIDIUM COLI* EM CULTURA E ESTUDO DA VELOCIDADE DE AÇÃO DA NITRIMIDAZINA E DO METRONIDAZOL

IVO DE CARNERI (1)

RESUMO

Estimulados pelos bons resultados obtidos no México, com o tratamento de três casos de balantidíase humana, forma disentérica, com a Nitrimidazina, resolvemos determinar *in vitro*, num meio monofásico com 20% de sêro de cavalo, a velocidade da ação desta droga sobre três cepas de *Balantidium coli*, em comparação com o metronidazol. A atividade na Nitrimidazina começa a manifestar-se dentro da 2.^a hora de contato em duas das três cepas e, após quatro horas também na 3.^a cepa. O Metronidazol começa a agir dentro da 6.^a hora. Conseqüentemente a Nitrimidazina é, como termo médio e estatisticamente significativa, seis vezes mais ativa na 6.^a hora, quatro e três vezes depois de 8 horas e duas e três vezes depois de 24 horas. O isolamento em cultura destes protozoários são facilitados pelo emprego de meios de cultura com alta percentagem do sêro de cavalo (20%). Quando empregamos apenas 5% de sêro como aconselha a bibliografia, só cresceram duas das três cepas, e apenas uma teve desenvolvimento exuberante que permitisse a realização da prova *in vitro* para determinação da atividade da droga.

INTRODUÇÃO

Pesquisadores japoneses (NAKAMURA¹³; HORIE⁸; DESPOIS⁷) descreveram o nitro-2-imidazol e CUCKLER & col.³ o aminitrozol, substâncias essas que constituíram uma primeira geração de nitroderivados heterocíclicos com propriedades antiprotozoárias, cujo representante mais interessante foi o metronidazol (COSAR & col.²).

Nos anos seguintes, as pesquisas efetuadas em vários laboratórios do mundo, proporcionaram a descoberta de uma segunda geração de nitrimidazóis, que já constitui uma inteira classe de fármacos ativos de intensidade diferente sobre clostrídios, espiroquetas, mastigóforos, rizópodes e até nematóides. O simples exame dos numerosos resumos aparecidos sobre o tema no Tropical Diseases Bulletin em 1971, documenta este fato. Alguns deles diferenciam-se do metronidazol

pelas características farmacocinéticas, pelo espectro, pela intensidade de ação e, porque conservam uma certa atividade mesmo sobre cepas de protozoários tornadas resistentes ao metronidazol no laboratório (de CARNERI⁵).

BROCCALI & col.¹ demonstraram que a velocidade de ação trichomonocida de uma destas substâncias, a nitrimidazina, é notavelmente superior à do metronidazol, pois *in vitro* após 4 horas de contato, a diferença é de quase quatro vezes. Depois de conhecida a atividade da Nitrimidazina no tratamento da trichomoníase (MOFFETT & col.¹²); da giardíase (HUGGINS⁹), da amebíase (CUE & col.⁴) e da angina de Vicent (LOZDAN & col.¹⁰), ela foi utilizada recentemente e com sucesso, no México por DELGADO⁶, no tratamento de três casos humanos de balantidíase intestinal aguda, com a dose de 25 mg/kg de peso por dia, durante 5 dias (*).

(*) Nitrimidazina (R) Carlo Erba S.A.

(1) Cadeira de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Pavia, Itália

Este trabalho, têm por finalidade determinar comparativamente a velocidade de ação do metronidazol e da nitrimidazina sobre três cepas de *Balantidium coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas três cepas de *Balantidium coli* de origem suína, uma das quais é mantida há muito tempo na London School of Tropical Medicine (cepa Londres) e as outras duas foram isoladas na Itália, no verão de 1971 (cepa Milão e cepa Lombardia).

O isolamento em cultura, que por outras técnicas têm falhado com freqüência, foi conseguido pela sementeira dos protozoários num meio monofásico de cultura, com elevado teor de sôro de cavalo (20%).

Este meio é uma variante daquele de PAVLOVA (1968) e possui a seguinte composição:

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,61 g
K H ₂ PO ₄	0,41 g
Na Cl	7,3 g
Extrato de levedura Difco	1	g
Água destilada	1 litro
pH —		7,2

Coloca-se uma certa quantidade de meio, por exemplo, 4 ml em cada proveta, esteriliza-se durante 30' a uma atmosfera e acrescenta-se neste caso, 1 ml de sôro de cavalo e uma pequena quantidade de amido de arroz esterilizada durante uma hora a 150°C. As provetas semeadas são logo incubadas a 37°; o exame microscópico e os repiques realizam-se cada 24 horas. Procedendo desta maneira, foi possível a partir do conteúdo dos cecos de sete porcos, isolar, estabilizar três cepas de *Balantidium coli*, em cultura com bactérias, sem as leveduras que freqüentemente as contaminam. Em nossos experimentos só foram empregadas duas destas cepas italianas.

A seguir o metronidazol e a nitrimidazina, partindo de uma concentração de 1000 µg/ml, foram diluídos escalarmente na relação de 1:1,5 numa dupla fila de provetas

que continham 3 ml do meio; em cada uma delas foram semeados 3 ml de cultura nos quais estavam presentes 6.000 protozoários obtidos de uma cultura de 24 horas de balantídios (concentração final: 1.000 protozoários/ml e concentração máxima e mínima das drogas 500 e 3,9 µg/ml). Os experimentos com as três cepas de protozoários fizeram-se em paralelo. A leitura dos resultados ao microscópio efetuou-se na mesma câmara de incubação a 37° no tempo 0 e depois de 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas (na cepa Londres fêz-se uma leitura também depois de 12 horas). O exame foi realizado numa pequena parte do sedimento, extraído por capilaridade. Quando se observava a presença de alguns protozoários vivos, passava-se ao exame da concentração imediatamente superior; em caso contrário continuava-se progressivamente o exame a todo o sedimento da proveta em questão e depois se começava outro exame análogo da diluição mais avançada. Considerou-se ativa a concentração mais baixa capaz de provocar a morte de todos os 6.000 protozoários. Como critério de morte adotou-se a cessação de qualquer movimento dos ciclos, método normalmente empregado no estudo dos ciliados. Nas provetas de contrôle os balantídios conservam uma discreta vitalidade mesmo depois de 48 horas e alguns deles ainda vivem depois de três dias. Todos os experimentos foram repetidos três vezes em dias diversos e os resultados foram singularmente homogêneos. Nos gráficos são reproduzidos os valores médios.

RESULTADOS

Os resultados obtidos até a 24.^a hora são reproduzidos na Fig. 1. Na realidade a ação dos fármacos observa-se também depois de 48 e 72 horas, estabilizando-se, porém, nos valores já encontrados depois das 24 horas. Além disso, o progressivo deterioramento dos protozoários nas culturas de contrôle a partir da 24.^a hora de incubação faz com que seja difícil estabelecer se para além deste termo se a morte se deve à droga ou a fenômenos da senescência. Na Fig. 2 é representada a evolução no tempo da média das relações de atividade dos dois fármacos sobre as três cepas.

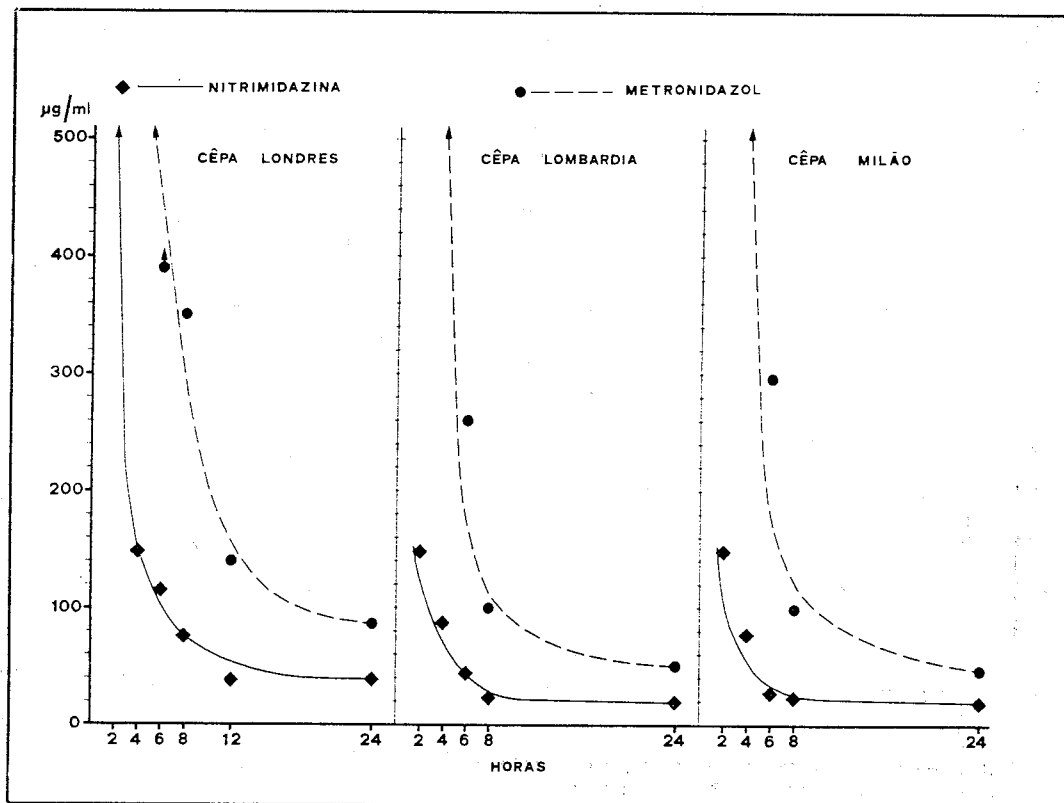


Fig. 1 — Ação da nitrimidazina e do metronidazol sobre três cepas de *Balantidium coli* (1000 protozoários/ml) em meio de cultura monofásico. Médias de 3 determinações.

DISCUSSÃO

As três cepas de *Balantidium coli* — tanto a inglesa como aquelas que foram isoladas na Itália — resultam sensíveis aos dois nitroimidazóis estudados. A atividade sobre o metronidazol é menor do que foi comunicada por ZAMAN¹⁴; este Autor, porém, não foi muito preciso em descrever o critério de avaliação dos seus resultados, deixando pensar que ele tivesse buscando não tanto a atividade protozoocida quanto a atividade protozoostática (“inhibition”), o que lhe permitiu encontrar, numa cepa de origem humana em meio monofásico, uma concentração mínima inibidora de 2 $\mu\text{g/ml}$. Ele cita também informações obtidas privadamente de outro pesquisador, segundo as quais *Balantidium coli* de origem suína fica completamente inibido a 8 $\mu\text{g/ml}$ em meio bifásico. Só depois que provas preliminares

sobre a nossa cepa “Londres” demonstraram uma sensibilidade ao metronidazol muito inferior àquelas assinaladas por ZAMAN é que decidimos isolar e estudar também as duas cepas italianas, com o fim de observar se esta menor atividade podia depender de uma possível inativação da droga (MCFADZEAN¹¹) por parte de floras bacterianas diversas (até agora *Balantidium coli* não se pode cultivar em ausência de bactérias). Mas a atividade encontrada por nós resultou singularmente homogênea nas três cepas. Procuramos determinar a atividade também num meio que continha somente 5% de soro, receando que a ligação com as proteínas pudesse deprimir a atividade das drogas; nestas condições só uma cepa em três (cepa Lombardia) cresce bem, e a sua sensibilidade aos dois fármacos não resultou ser diferente daquela que se obtém na presença de 20% de soro.

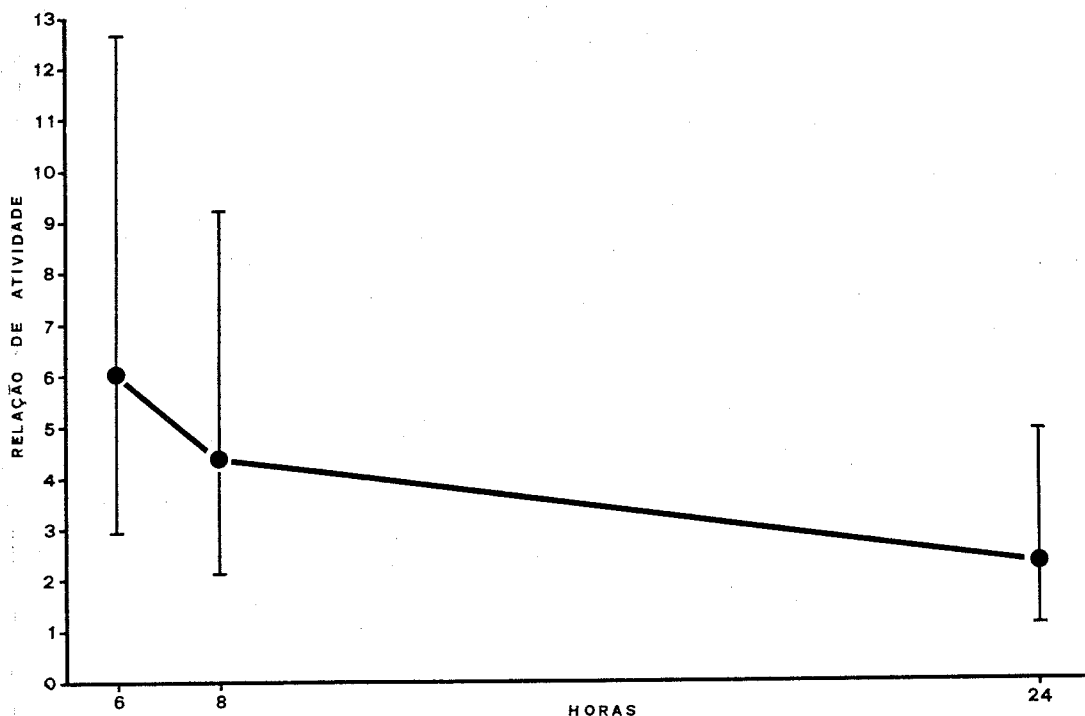


Fig. 2 — Comportamento no tempo, da relação de atividade, nitrimidazina/metronidazol, na média de três cepas de *Balantidium coli*. São reproduzidos os limites de confiança das médias considerando como "standard deviation" aquela da replicação entre cepas.

No que diz respeito à velocidade de ação dos dois fármacos, temos encontrado um quadro análogo àquele já mencionado que encontraram BROCCALI & col.¹ sobre *Trichomonas vaginalis*.

Pela Fig. 1 nota-se que a ação do metronidazol começa a manifestar-se lentamente: segundo nossos estudos a concentração máxima deste fármaco — 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ — resulta inativa nas três cepas depois de duas horas de contato, e em duas das três cepas depois de 4 horas. Pelo contrário, a nitrimidazina é ativa na mesma concentração em duas das três cepas depois de 2 horas; depois de 4 horas é ativa em duas cepas na concentração de 77 e 88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente e na cepa inglesa na concentração de 148 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Como desconhecemos os diversos valores reais de atividade do metronidazol situados sobre a concentração máxima escolhida por nós (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), não podemos proceder à análise de variância baseando-nos em dados recolhidos até a quarta hora; nas

horas seguintes, porém, a sensibilidade aos fármacos das três cepas afigura-se tão homogênea que julgamos possível um cálculo, considerando os nove experimentos como se tivessem sido realizados numa espécie homogênea de protozoários. De fato a análise estatística mostra que entre a 6.^a e a 24.^a hora a variância entre as cepas e a interação, tempo x cepas, não são significativas. Na Fig. 2 é ilustrado o comportamento no tempo da relação de atividade, nitrimidazina/metronidazol, calculado tendo como base a média das três cepas. Na mesma figura são reproduzidos também os limites de confiança das médias ($p = 0,05$), calculados considerando como desvio-padrão σ da replicação entre cepas.

Parece evidente que na 6.^a hora a nitrimidazina é, como termo médio, seis vezes mais ativa do que o metronidazol, sendo quatro e três vezes mais ativa depois de oito horas e duas e três vezes mais ativa depois de 24 horas.

SUMMARY

Isolation of Balantidium coli in culture and speed of action of nitrimidazine and metronidazole

Following the good results obtained in Mexico with nitrimidazine in the treatment of three cases of dysentery due to *Balantidium coli*, we used a monophasic culture medium with 20 per cent horse serum to determine in vitro the speed with which this drug and metronidazole killed three strains of this ciliate.

Nitrimidazine started to act on 2 out of the 3 strains within the second hour of contact, and on the third strain within four hours; metronidazole started to act on only 1 out of the 3 strains within the fourth hour and on the other 2 strains within the sixth hour, at which stage nitrimidazine was an average of 6 times more active.

The difference in activity, which was always statistically significant, amounted to 4.3 times after 8 hours, and 2.3 times after 24 hours.

The isolation and maintenance of these protozoa in culture is easier if the medium contains a high percentage (20 per cent) of horse serum.

Only two out of three strains grow in 5 per cent serum; in practice, however, only one strain grows sufficiently to permit anti-protozoan activity test to be carried out.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BROCCALI, G. & de CARNERI, I. — Estudios sobre la velocidad de acción de los fármacos tricomonacidas. *Ginec. Obstet. Méx.* 30:481-490, 1971.
2. COSAR, C. & JULOU, L. — Activité de l'(Hydroxy-2' ethyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole (8.823 R. P.) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 96:238-241, 1959.
3. CUCKLER, A. C.; KUPFERBERG, A. B. & MILLMAN, N. — Chemotherapeutic and tolerance studies on amino-nitro-thiazoles. *Antibiotics & Chemotherapy* 5:540-550, 1955.
4. CUE, A. B. & COVARRUBIAS, J. T. — Uso de nuevos antiambianos en pediatria. *ISSSTE Rev. Med.* 8:289-295, 1969.
5. de CARNERI, I. — Perspectives in the treatment of protozoal diseases resistant to metronidazole. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65:268-270, 1971.
6. DELGADO y GARNICA, R.; BRITO, P. & CLARK, R. — Balantidiasis en la Ciudad de México. *Rev. Invest. Salud Publ.* (No prélo).
7. DESPOIS, R.; PINNERT-SINDICO, S.; NINET, L. & PREUDHOMME, J. — Trois antibiotiques de groupes différents produits par une même souche de *Streptomyces*. *Giorn. Microbiol.* 2:76-90, 1956.
8. HORIE, H. — Anti-trichomonas effect of azomycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 9:168, 1956.
9. HUGGINS, D. — Ensaio clínico com o derivado nitrimidazólico (Naxogin) no tratamento da giardíase. *Hospital (Rio)* 77:2053-2060, 1970.
10. LOZDAN, J.; SHEIHAM, A.; PEARLMAN, B. A.; KEISER, B.; RACHANIS, C. C. & MEYER, R. — The use of nitrimidazine in the treatment of acute ulcerative gingivitis. A doubleblind controlled trial. *Brit. Dent. J.* 130:294-296, 1971.
11. McFADZEAN, J. A. — The interactions of metronidazole and microorganisms. *Abstr. Eighth Internat. Congr. Trop. Med. & Malaria (Teheran)* 1169, 1968.
12. MOFFETT, M.; MCGILL, M.J.; SCHOFIELD, C. B. S. & MASTERTON, G. — Nitrimidazine in the treatment of trichomoniasis. *Brit. J. Vener. Dis.* 47:173-176, 1971.
13. NAKAMURA, S. & UMEZAWA, H. — Structure of azomycin (2-nitroimidazole). *J. Antibiot. (Tokyo)* 8:66, 1955.
14. ZAMAN, V. & NATARAJAN, P. N. — In vitro trials of metronidazole against *Balantidium coli*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63:152, 1969.

Recebido para publicação em 11/10/1971.