

NOTAS SÔBRE O CULTIVO DO MENINGOCOCO

I — Cultura sob atmosfera de dióxido de carbono. (*)

JOSÉ CARLOS RIBAS

Biologista do Departamento de Produção Animal.

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

HISTÓRICO

Depois que Bang e Stribolt² em 1897, descreveram o agente causal do abôrto epizoótico da vaca e verificaram que o mesmo germinava melhor em uma atmosfera parcialmente isenta de oxigênio, tal particularidade tem sido objeto de estudo por parte de inúmeros pesquisadores.

Para os germes que necessitam de relativa anaerobiose foi criado por Chudjkow¹¹ em 1896 a denominação de “microaerófilo”.

A técnica original de Bang, consistia na semeadura do material suspeito em ágar-sôro-gelatina. O desenvolvimento das colônias começava de uma certa distância da superfície do meio para o fundo do tubo, enquanto que na superfície do mesmo, o crescimento era mínimo ou nulo. A técnica de Bang como era de esperar-se, nem sempre fornecia bons resultados devido às constantes contaminações, por germes estranhos.

Em 1908, Nowak¹⁹ estuda a biologia da *Brucella abortus*, concluindo pela exigência para seu desenvolvimento de uma pressão de oxigênio nem muito forte, nem muito fraca e por isso introduz uma nova técnica para o seu cultivo.

O método sugerido por Nowak consistia em semear o material a examinar em vários tubos ou placas, contendo meios especiais, que conjuntamente com outros tubos de ágar-simples previamente semeados com *Bacillus subtilis*, eram colocados em um frasco hermeticamente fechado; devido à rarefação do oxigênio provocada

(*) Trabalho apresentado na 2.^a Reunião Quinzenal do Instituto Adolfo Lutz, em 20 de Fevereiro de 1946.

pela ativa germinação do citado bacilo, obtinha-se uma atmosfera propícia ao desenvolvimento da *Brucella abortus*.

Wherry e Olivier³² em 1916, foram os primeiros a empregar a rudimentar técnica de Nowak no isolamento de uma Neisseria, conseguindo isolar a *Neisseria gonorrhoea* de três casos difíceis: de um menino de 4 anos, uma menina de 11 anos e de um homem de 26 anos.

Chapin⁷ que, em 1918, sugeriu a cultura inicial do gonococo em meios contendo proteínas não aquecidas incubando-os em atmosfera de dióxido de carbono, usou um processo simples, mas não muito preciso, que consistia em colocarem-se os tubos ou placas em uma jarra e dentro dela um pedaço de vela, acesa. Esta técnica que dá somente 3% de CO₂, foi recomendada por Parker e Hudson²¹ ainda em 1926.

Ruediger²³ em 1919, demonstra a vantagem da exclusão do ar nas culturas do gonococo.

Em 1919, Kohman¹⁷ trabalhando somente com duas amostras de meningococos, estuda a importância da reação dos meios de cultura em relação à atmosfera de dióxido de carbono, demonstrando que o crescimento se realiza em diversos pontos da escala de Sørensen nos incubados em CO₂, não se dando o mesmo apenas a 37°C.

Swartz²⁷ em 1920, descreve um método para reduzir a tensão de oxigênio.

Cohen e Markle⁸ 1916, Cohen⁹ 1918, e Cohen e Fleming¹⁰ 1918, publicaram uma série de artigos demonstrando a vantagem do emprêgo da redução da tensão de oxigênio no isolamento do meningococo. No primeiro recomendam a técnica do *B. subtiles* por êles modificada. Aham que o meningococo é um microaerófilo, necessitando para seu desenvolvimento de uma atmosfera composta aproximadamente de 10% de CO₂, e 90% de ar.

Com relação à *Brucella abortus* outro germe microaerófilo, esta peculiaridade cultural foi perfeitamente estudada por Huddleson¹⁶ em 1921 e por Theobald Smith²⁶ em 1924, que demonstraram ser a concentração de dióxido de carbono um importante fator de estímulo no crescimento daquela bactéria.

Este ponto de vista foi amplamente confirmado por Vallery e Rettger³⁰ em 1927, Walker³¹ em 1932 e mais recentemente por Gladstone, Fildes e Richardson¹⁵ em 1935.

Últimamente, novos trabalhos se sucedem, tendo Thompson²³ em 1935, descrito um método para obtenção de dióxido de carbono; Nye e Lamb²⁰ 1936, proposto a denominação de "mephitibic" para as bactérias microaerófilas; Carpenter²⁰ e outros 1941, estudado processos para o isolamento das mesmas; Folley¹⁴ 1941, descrito uma maneira de cultivá-las em placa de Petri; Rose²² 1942, apresentado uma estufa especial destinada exclusivamente ao seu cultivo; Sharzman e Bierman²⁵ 1942, aconselhado a agitação constante das culturas; Levine e Liedentopf¹⁸ 1942, ideado um aparelho para nelas introduzir quantidades certas de gás carbônico e Brewer⁵ 1942, descrito uma técnica de cultivo em placas.

Opiniões valiosas, no entanto, como as de Torrey e Buckell²⁹ 1921, Cook & Sttafford¹² 1921, Erickson & Albert¹³ 1922 e entre nós Arlindo de Assis 1925, negam a influência da atmosfera de dióxido de carbono como fator de crescimento nas Neisserias.

Em 1940 e 1941 Sara Brahan⁴ publicou duas monografias sobre meningococos e não tocou no assunto em questão.

Schanb & Foley²⁴ (1943) acham desnecessária a redução da tensão do oxigênio para o isolamento original do meningococo, mas aconselham para a manutenção da coleção de culturas, a incubação nas jarras com CO₂.

MATERIAL E TÉCNICA

Tendo havido, nesta capital um considerável surto de meningite célebro-espinhal epidêmica, no decorrer do ano de 1945 e princípios de 1946, procuramos aproveitar o abundante material enviado ao Instituto Adolfo Lutz pelo Hospital Emílio Ribas para exame bacteriológico, material êsse colhido em ótimas condições e semeados quase sempre poucas horas após. (*)

Sabemos que entre as várias bactérias que podem provocar a inflamação das meninges, o meningococo (*Neisseria intracellularis*) é sem dúvida a de maior importância.

(*) Posteriormente tivemos oportunidade de estudar casos do interior do Estado: um líquido remetido pelo Centro de Saúde de Sorocaba e outro pelo de Moçoca. Em ambos, apesar da distância e número de horas de viagem conseguimos isolar e identificar a *Neisseria intracellularis*, graças ao emprêgo da atmosfera de dióxido de carbono, não se havendo verificado vegetação pelo processo comum. Em casos anteriores, os líquidos enviados do interior, semeados somente a 37°C, quase sempre forneciam resultados negativos.

E por ser o meningococo bastante exigente em relação à cultura, não vegetando em meios pobres de proteínas nativas e em alguns casos não vegetando de modo algum, apesar do exame direto revelar inúmeros diplococos Gram negativos, procuramos verificar o seu desenvolvimento semeando os líquidos céfalo-raquidianos, em meios apropriados, que eram sempre incubados, comparativamente, em estufa a 37°C e em jarras contendo aproximadamente 10% de dióxido de carbono, igualmente colocados a 37°C.

Sobre a influência da atmosfera de CO₂, como fator de estímulo no crescimento das *Neisserias*, como já frisamos, na parte histórica, as opiniões se dividem, sendo algumas favoráveis, outras contrárias, havendo até contraditórias.

As semeaduras foram sempre realizadas em meio de ágar-ovo, por nós escolhido pelo seu ótimo comportamento na rotina.

A fim de obter uma atmosfera de dióxido de carbono, em lugar de usar recipientes apropriados de elevado custo, adotamos com bons resultados, jarras de vidro, com capacidade de dois litros, fabricadas nos Estados Unidos, da marca "Ideal All Glass Jar", empregadas usualmente para conservas e compotas de frutas.

Simplificando a técnica de Wadsworth²³, colocávamos em um dos ângulos do fundo da referida jarra, meia grama de carbonato de sódio, depositávamos com todo cuidado os tubos já semeados e inclinávamos ligeiramente a jarra, de modo que o carbonato ficasse em situação um pouco mais elevada e com uma pipeta Pasteur, deixávamos cair suavemente cerca de 10 cm³ de ácido sulfúrico a 10%. Fechávamos herméticamente a jarra, tendo o cuidado de untar com vaselina a rolha de borracha. Voltada novamente a jarra, a sua posição normal o ácido punha-se em contacto com o carbonato, havendo desprendimento de gás carbônico e evitando-se, dêsse modo, o incômodo emprêgo do tubinho para o ácido.

Em cada caso, o líquido céfalo-raquidiano era semeado em dois tubos de meio, em quantidades iguais, em média dez gotas para cada um, usando-se a mesma pipeta Pasteur, sendo um dêles colocado na jarra em atmosfera de dióxido de carbono à 37°C e outro testemunha sòmente a 37°C.

É importante notar que nunca semeamos pela segunda vez o líquido do mesmo doente, nem utilizamos outro meio de cultura, o que viria dificultar e mesmo alterar nossas conclusões.

Observávamos sempre o crescimento até 72 horas e anotávamos os casos em que havia maior ou igual vegetação nos meios colocados em atmosfera de dióxido de carbono ou vantagem em tempo isto é, antecedência de 24 ou 48 horas sôbre o crescimento simplesmente a 37°C.

Os quadros a seguir nos dão uma idéia bastante clara. O primeiro resume nos 248 casos ou líquidos estudados, os resultados proporcionais entre os exames diretos — positivos e negativos — e os resultados das culturas — positivas e negativas. O segundo quadro resume o resultado comparativo das culturas positivas incubadas em atmosfera de dióxido de carbono e pelo processo comum, isto é, na estufa à 37°C.

RESULTADO GERAL DOS CASOS OU LÍQUIDOS ESTUDADOS. RESULTADOS DAS DIVERSAS PROPORÇÕES ENTRE OS EXAMES DIREITOS: POSITIVOS E NEGATIVOS E AS CULTURAS: POSITIVAS E NEGATIVAS

	<i>Exame Direto Positivo</i>	<i>Exame Direto Negativo</i>	<i>Total</i>
Cultura positiva	[76,99] 87 (66,41)	[32,59] 44 (33,59)	[52,82] 131 (100,00)
Cultura negativa	[23,01] 26 (22,22)	[67,41] 91 (77,78)	[47,18] 117 (100,00)
Total	[100,00] 113 (45,56)	[100,00] 135 (54,44)	[100,00] 248 (100,00)

As quantidades entre parêntesis representam percentagem sôbre o total das linhas correspondentes.

As quantidades entre colchetes representam percentagem sôbre o total das colunas correspondentes.

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE CULTURAS INCUBADAS EM ATMOSFERA DE CO₂ E PELO PROCESSO COMUM, NOS CASOS POSITIVOS.

<i>Comparação</i>	<i>N.º de Casos</i>	<i>Percentagem sobre o total de casos</i>
Exclusividade de crescimento em atmosfera de CO ₂	15	11,36
Antecedência de 48 horas na vegetação em atmosfera de CO ₂	12	9,09
Antecedência de 24 horas na vegetação em atmosfera de CO ₂	56	42,42
Concomitância de crescimento	49	37,12
Antecedência ou exclusividade de cresc. pelo processo comum.	0	0,00
Total	132	99,99

CONCLUSÕES

1 — Trabalhando com líquidos céfalo-raquidianos correspondentes a 248 doentes, usando como meio de cultura ágar-ovo, incubado a 37°C e em atmosfera de mais ou menos 10% de CO₂, também a 37°C, foi possível, conseguir-se, como demonstram os quadros anexos, exclusividade de vegetação do meningococo em atmosfera de CO₂ em 15 casos (11,36%); antecedência de 48 horas em 12 casos (9,09%); antecedência de 24 horas em 56 casos (42,42%); bem assim como concomitância de crescimento em 49 casos (37,12). Em nenhum caso houve antecedência ou exclusividade de crescimento pelo processo comum, estufa a 37°C (0,00%).

Somados todos os casos, obtivemos uma vantagem global de 62,87 por cento, com o emprêgo da atmosfera de CO₂, o que não é nada desprezível.

2 — Como consequência destas verificações, parece-nos de grande utilidade o uso corrente da atmosfera de CO₂, no isolamento inicial do meningococo, e das restantes *Neisserias*, nos laboratórios incumbidos de tais exames.

RESUMO

Com a finalidade de obter culturas do meningococo de um modo mais constante e precoce, partindo do líquido céfalo-raquidiano de doentes de meningite cérebro-espinhal epidêmica incubaram-se os meios de cultura semeados, — ágar-ovo — em atmosfera de mais ou menos 10% de dióxido de carbono a 37°C.

Todos os casos experimentados foram testemunhados por tubos contendo o mesmo meio de cultura, semeados de modo idêntico e colocados a 37°C.

Dos 248 casos estudados, 131 resultaram culturas positivas e 117 negativas.

Entre os 131 positivos, houve vantagem para os incubados em atmosfera de CO₂ de 62,87%.

Tendo-se em vista o resultado acima, preconiza-se a incubação em atmosfera de dióxido de carbono no isolamento inicial do meningococo.

SUMMARY

The AA. incubated culture media at an atmosphere of approximately 10% CO₂, for the quick isolation of meningococcus from spinal fluid of patients suspected of cerebrospinal-meningitis.

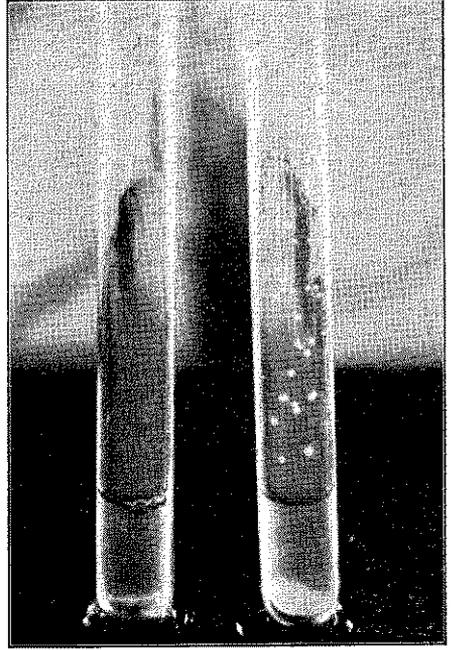
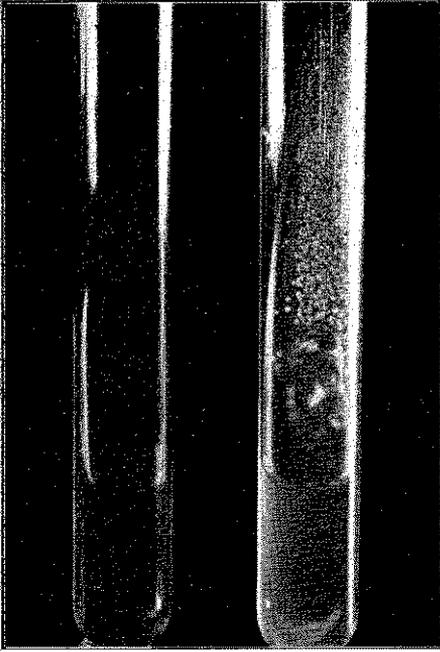
All culture media so incubated were controlled by similar media incubated at 37°C. Positive cultures were obtained in 131 of 248 cases.

The incubation at an atmosphere of 10% CO₂ offered an advantage of 62,87 per cent.

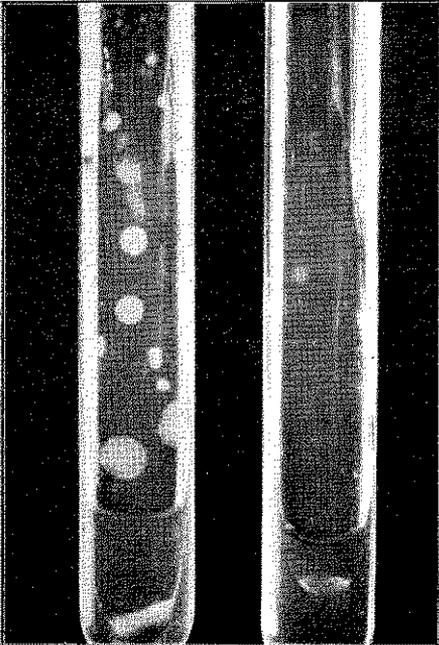
Considering these results the AA. advise the incubation at an atmosphere of 10% CO₂ for the initial isolation of meningococcus.

BIBLIOGRAFIA

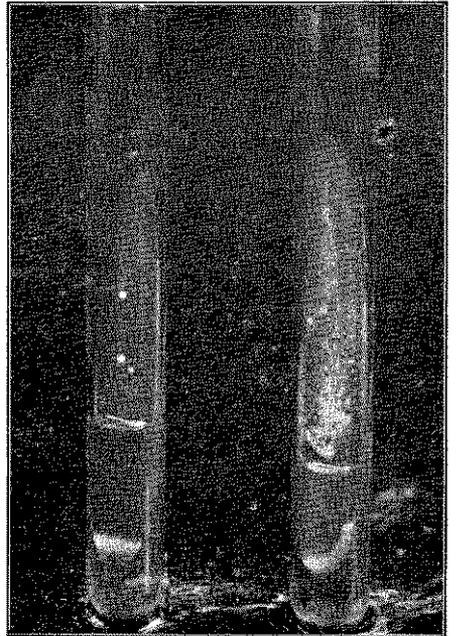
- 1 — ASSIS, A. de — 1925 — Observações sobre o cultivo dos gonococos. *Arch. do Inst. Vital Brasil*, III, fa. 2: 133.
- 2 — BANG — 1897 — Weitere Utersuuchungen über das Ververfeu — *Zeit f. Thiermed.* I, 241.
- 3 — BRAHAN, S. — 1940 — The meningococcus (*Neisseria intracellularis*) — *Bacteriological Reviews*, n.º 2, 59.
- 4 — BRAHAN, S. — 1941 — The meningococcus — Diagnostic Procedures and reagents. — *Am. Publ. Health Ass.* — New-York, 60.
- 5 — BREWEN, J. H. — 1942 — A new Petri dish cover and technique for use in the cultivation of anaerobes and microaerophiles. — *Science*, 95: 587.
- 6 — CARPENTER, C. M. — 1941 — Diagnostic procedures and reagents. — *Am. Pub. Health Ass.* — New-York.
- 7 — CHAPIN, C. W. — 1918 — Carbon dioxid in the primary cultivation of the gonococcus. — *J. infect. Dis.* 23: 342.
- 8 — COHEN, M. B. e MARKLE, B. S. — 1916 — A method which greatly facilitates the culture of the meningococcus. — *Journ. Am. Med. Ass.* 67: 1302.
- 9 — COHEN, M. B. — 1918 — Cultivation of the meningococcus under partial oxygen tension. — *Journ. Am. Med. Ass.* 70: 1999.
- 10 — COHEN, M. B. e FLEMING, G. S. — 1918 — The diagnosis of epidemie meningitis and the control of its treatment by rapid Bacteriologic and sorologic methods. — *J. infect. Dis.* 23: 337.
- 11 — CHUDJKOW — 1898 — Sur Lehre von der Anaerdllose — Teil I, Moshow, 1896; Ref. *Centralbl f. Bact. Abt II* 339.
- 12 — COOK, M. W. e STAFFORD, D. D. — 1921 — A study of the Gonococcus and gonococcal infections. — *Journ. Infec. Dis.* 29: 561.
- 13 — ERICKSON, M. e ALBERT, H. — 1922 — Cultivation of the gonococcus. — *Journ. infect. Dis.* 30: 268.
- 14 — FOLEY, J. E. — 1942 — A method for exposing cultures to carbon dioxide or anaerobic atmosfere in petri dishes. — *The J. of Lab. e Clin. Med.* 27: 1431.
- 15 — GLADSTONE, G. P., FILDES, P. e RICHARDSON, G. M. — 1935 — Carbon dioxide as an assential factor in the growth of bacteria. — *Br. J. Exp. Path.* 16: 335.
- 16 — HUDDLESON, I. F. — 1920-21 — Studies in infections abortion. — *J. Am. Vet. Med. Ass.* 58: 524.
- 17 — KOHMAN, E. F. — 1919 — The so-called reduced oxygen teusion for growing of the meningococcus. — *Jour. Bacteriol.* 4: 571.
- 18 — LEVINE, M. e SIEDENTOPF, H. — 1942 — An apparatus to deliver a measured amount of CO₂ for blood cultures. — *Science*, 95: 130.
- 19 — NOWAK, J. — 1908 — Le bacille de Bang et sa biologie. *Am. de l'Inst. Pasteur*, 22: 541.



Dois casos de exclusividade de crescimento em atmosfera de CO_2 , fotografias de 24 horas.



Caso de exclusividade de crescimento em atmosfera de CO_2 , mostrando o tamanho enorme das colônias em 48 horas.



Caso de vantagem de 24 horas na vegetação.

- 20 — NYE, R. M. e SAMB, M. E. — 1936 — Sucreased carbon dioxide tension as an aid in the isolation of certain (mephitic) pathogenic bacteria. *J. Am. Med. Ass.* 106: 1075.
- 21 — PARKER, F. Jr., e HUDSON, N. P. — 1926 — The Etiology of Haverhill Fever (Erythema Arthriticum Epidemicum) *Am. J. Path.* 2: 357.
- 22 — ROSE, S. B. — 1942 — Importance of carbon dioxide in diagnostic bacteriology with observations on carbon dioxide (Capneic) incubator. *Am. J. Clin. Path.* 12: 424.
- 23 — RUEDIGER, E. H. — 1919 — Exclusion of air in the cultivation of the gonococcus. *J. infect. Dis.* 24: 377.
- 24 — SCHAUB, J. G. e FOLEY, M. K. — 1943 — Methods for diagnostic bacteriology. — *The C. Mosby Comp. St. Louis*, 151.
- 25 — SHWARTZMAN, G. e BIERMAU, W. — 1942 — A technique for the even distribution of cases through bacterial cultures. — *The J. Lab. e Clin. Med.* 28: 102.
- 26 — SMITH, THEOBALD — 1924 — Some cultured characteristics of bacillus abortus (Bang) with special reference to carbon dioxide requirements. — *J. Exp. Med.*, 40: 219.
- 27 — SWARTZ, E. O. — 1920 — A new culture method for the gonococcus. — *Jour. Urology*, 4: 325,
- 28 — THOMPSON, L. — 1935 — A simple Method of Supplying Carbon Dioxide in Jars for Bacteriologic Culture. — *Am. J. Clin. Path.* 5: 313.
- 29 — TORREY, J. C. e BUCKELL, G. T. — 1922 — Cultural Methods for the Gonococcus. — *J. infect. Dis.* 31: 125.
- 30 — VALLEY, G. e RETTGER, L. F. — 1927 — The influence of carbon dioxide on bacteria. — *J. Bact.* 14: 101.
- 31 — WALKER, H. H. — 1932 — Carbon dioxide as a factor affecting laug in bacterial growth. — *Science*, 76: 602.
- 32 — WHERRY, B. e OLIVIER, W. — 1916 — Adaptation to certain tensions of oxygen as shown by gonococcus and the parasitic and saprophytic bacteria. — *J. infect. Dis.* 19: 288.
- 33 — WADSWORTN, A. B. — 1939 — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research — Baltimore. pag. 7.