

NOTAS SÔBRE O CULTIVO DO MENINGOCOCO

II — Emprêgo do ácido paraminobenzóico.

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

JOSÉ CARLOS RIBAS

Biologista do Departamento de Produção Animal.

As exigências para cultivo do Meningococo, em relação aos meios de cultura empregados para tal fim, são conhecidas desde 1887, quando então Weichselbaum conseguiu isolá-lo em cultura pura, de seis casos de meningite cerebrospinal¹. São elas facilmente compreensíveis, bastando para isso passarem-se em revista os inúmeros meios propostos, com essa finalidade.

Com o aparecimento das sulfamidas e seus compostos, com o seu emprêgo corrente e precoce na terapêutica das doenças infecciosas, ultimamente temos tido sérias dificuldades para obter culturas positivas de meningococo, em pacientes sob tratamento. Do ponto de vista bacteriológico, êste fato nos priva da única base segura para o diagnóstico etiológico da infecção, que seria o isolamento e identificação do germe. Do ponto de vista clínico, impede o facultativo de tomar as medidas terapêuticas e profiláticas necessárias para cada caso.

Investigações de alguns pesquisadores põem em evidência que “as culturas negativas” em certos casos em que *compostos* sulfonâmicos foram empregados, são “falsos resultados”². Por outro lado, trabalhos relativamente recentes de Stamp³ e Green⁴ na Inglaterra, de MacLoad⁵ e de Woods⁶ nos Estados Unidos da América, mostraram que existem certas substâncias inibidoras, capazes de nulificar a ação bacteriostática das sulfamidas.

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

Uma dessas substâncias, que hoje está perfeitamente identificada, é o ácido paraminobenzóico, droga relativamente de baixo custo e fácil obtenção.

Segundo Harris e Thimann⁸ deve-se a Woods a descoberta da ação anti-sulfonamida do ácido paraminobenzóico; êle demonstrou que um fator inerente às leveduras e com propriedades químicas semelhantes às do ácido paraminobenzóico é que impede a ação bacteriostática da sulfanilamida e da sulfapiridina.

Esta observação estendeu-se posteriormente "in vitro"^{3,4,5} e "in vivo"^{6,7} a todos os tipos de sulfonamidas.

Em vista destes trabalhos e dos resultados satisfatórios encontrados nos estudos de Charles Janeway, é que nos propusemos a experimentar a adição dessa substância num dos meios de cultura empregados na rotina da secção de Meningite deste Instituto, substância esta tida por vários autôres como inibidora das sulfamidas, podendo, além disso, agir como um *fator de crescimento*⁹ das culturas.

O autor acima citado usou sangue retirado de dois pacientes com endocardite bacteriana subaguda, os quais estiveram sob tratamento com sulfapiridina por mais de um mês. Semeou-os em meios de cultura com e sem ácido paraminobenzóico, verificando o crescimento mais rápido e abundante nos primeiros, isto é, nos meios que continham o ácido-paraminobenzóico. O germe cultivado foi isolado e identificado como *Streptococcus viridans*.

MATERIAL E TÉCNICA

Trabalhamos exclusivamente com líquidos cefalorraquidianos provenientes de pacientes do Hospital Emílio Ribas e, dentre êles, só com os suspeitos de meningite cerebrospinal epidêmica. Passávamos, então, por uma fase de uma das maiores epidemias desta entidade mórbida, registradas nestes últimos tempos, segundo nos declarou o Dr. Luiz Pereira Barreto Neto, ilustre facultativo daquele Hospital de Isolamento. Ainda, segundo o mesmo, os doentes em geral chegavam ao Hospital já sob a terapêutica das sulfonamidas. Nos "líquors" estudados, infelizmente não nos foi possível dosar as

sulfonamidas possivelmente presente em taxas relativamente altas. Tratando-se de pleno surto epidêmico, foi-nos fácil conseguir 185 amostras de líquidos no decorrer dos meses de agosto a dezembro de 1945, provenientes de 185 doentes, daquele Hospital, e tentar com os mesmos obter culturas positivas nos meios em estudo contendo ácido paraminobenzóico. Procedemos dessa maneira mesmo nos casos em que os exames bacterioscôpicos deram resultado negativo, após a coloração de *Gram* e de *Gabbett*, a fim de afastar outras possíveis meningites bacterianas então fora de nosso estudo.

O meio de cultura escolhido foi o ágar-ôvo inclinado pois tem sido o que nos tem dado melhores resultados nos trabalhos de rotina deste laboratório.

Usamos o que passamos a chamar de *ágar-ôvo simples* e o *ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico* entrando essa substância na concentração, tida como ótima, de 5mg. por 100 cc de meio.

A técnica de preparo foi a seguinte: ágar com albumina de ovo 500,0 cm³; amido solúvel, 1,6 grs; solução a 0,5% de ácido paraminobenzóico 5,0 cm³. Dissolvido o amido em 20 cm³ de água, aquecer em banho-maria. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

À parte, esterilizar a solução de ácido paraminobenzóico. Juntar as duas soluções no ágar fundido. Distribuir em tubos de 16x160. Inclinare depois de solidificado, controlar a esterilidade.

Tôdas as amostras de "líquor" foram semeadas nestes dois meios com a mesma pipeta na quantidade de mais ou menos 0,5 c.c. e postas na estufa a 37°C., permanecendo aí em observação por 72 horas. Quando ausentes de qualquer crescimento eram dados como casos negativos. Nos casos em que verificamos crescimento em ambos os meios observando que, em geral êsse crescimento era mais abundante no meio que continha ácido paraminobenzóico. Em outros casos verificamos que em 24 horas havia vegetação no meio com o referido ácido e não no de ágar ôvo simples, onde a vegetação só vinha a positivar-se dentro de 48 horas de estufa. Em outros, ainda, notamos que, havendo vegetação entre 24-48 horas no meio com ácido, só a observávamos no ágar ôvo simples após 72 horas de estufa, e, o que é mais importante realçar, houve casos em que só obtivemos culturas positivas no ágar ôvo com ácido paraminobenzóico, restando negativas as culturas no ágar ôvo simples, após as 72 horas de estufa. Estas últimas verificações vinham provar a existência de sulfa-

midas no "líquor", em concentrações tais que impediam a vegetação total ou parcial do meningococo nos meios comumente usados na rotina.

Os quadros abaixo dão idéia mais nítida dos nossos resultados. No quadro número I mostramos um estudo dos resultados e proporções entre os exames bacterioscópicos ou diretos e as culturas. No quadro número II, temos a comparação dos resultados das culturas positivas nos meios de ágar-ôvo simples e ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico.

QUADRO I

CASOS EXPERIMENTADOS: 185. ESTUDO DOS RESULTADOS E PROPORÇÕES ENTRE OS EXAMES DIREITOS E CULTURAS.

	Exames diretos positivos	Total	Exames diretos negativos
Culturas positivas	[77,11] 64 (75,30)	[45,95] 85 (100,00)	[20,59] 21 (24,71)
Culturas negativas	[22,89] 19 (19,00)	[54,05] 100 (100,00)	[79,41] 81 (71,00)
Total	[100,00] 83 (44,86)	[100,00] 185 (100,00)	[100,00] 102 (55,14)

Os números entre parentesis representam a percentagem sôbre o total das linhas correspondentes; e os entre colchetes representam a percentagem sôbre o total das colunas correspondentes.

QUADRO II

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE CULTURAS EM ÁGAR-ÔVOS COM ÁCIDO PARAMINOBENZÓICO E ÁGAR-ÔVO SEM ÁCIDO PARAMINOBENZÓICO NOS 85 CASOS POSITIVOS

<i>Comparação</i>	<i>N.º de Casos</i>	<i>Percentagem sobre o total dos Casos</i>
Exclusividade de crescimento em ágar-ôvo com ac. paraminobenzóico	18	21,18
Antecedência de crescimento de 48 hs. em ágar-ôvo com ac. paraminobenzóico	2	2,35
Antecedência de crescimento de 48 hs. em ágar-ôvo c/ ac. paraminobenzóico	10	11,76
Comcomitância de crescimento	54	63,53
Exclusividade de crescimento no ágar-ôvo simples	1	1,18
Total	85	100,00

CONCLUSÕES

1. Pelos resultados expostos nos quadros acima, verificamos o seguinte: o ágar ôvo com ácido paraminobenzóico foi-nos francamente favorável na obtenção de culturas positivas para os meningococos em 18 casos, dando-nos, portanto, uma percentagem de

positividade superior ao seu testemunha, de 21,18%; em 2 casos obtivemos culturas positivas com antecedência de 48 horas, o que nos dá vantagem, quanto ao diagnóstico precoce, de 1,35%; em 10 casos tivemos antecedência de crescimento de 24 horas, isto é, 11,76% de vantagem do meio com ácido sobre o de ágar-ôvo simples; apenas em 1 caso verificamos o crescimento da cultura no ágar-ôvo simples, ao lado de resultado negativo no ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico.

Vemos assim, que somados os casos em que obtivemos exclusividade e antecedência de crescimento de 24-48 horas no meio de ágar-ôvo com ácido paraminobenzóico, obtivemos vantagem global deste meio sobre o ágar ôvo simples de 35,29%, o que não é nada desprezível.

2. Como consequência dessas verificações, parece-nos de utilidade o emprêgo do ácido paraminobenzóico nos meios de cultura de rotina, e particularmente aconselhável quando se trata de material de doentes supostos estarem sob quimioterapia sulfonamídica.

RESUMO

Os A.A. com a finalidade de obter cultura de meningococo nos líquidos cefalorraquidíanos de doentes suspeitos de meningite cerebrospinal epidêmica, sob tratamento pelas sulfonamidas, experimentaram o emprêgo do ácido paraminobenzóico num dos meios de cultura habitualmente empregados usando como testemunha o mesmo meio sem o referido ácido.

Dos 185 casos estudados, 100 resultaram culturas negativas.

Entre os 85 positivos encontraram vantagem de 35,29% do meio adicionado de ácido paraminobenzóico sobre o meio testemunha.

Em vista desses resultados, preconizam o emprêgo dessa substância — tida por muitos como um “fator de crescimento” — nos meios de cultura de rotina para os casos sob tratamento pelas sulfonamidas.

SUMMARY

The A.A. aiming the cultivation of Meningococci from cerebro-spinal meningitis and under treatment by the sulfonamides tried para-aminobenzoic acid in one of culture media employed, while a control, without the acid was employed.

Out of 185 cases investigated, 100 were negative for bacterial growth.

Amongst the 85 positive cases there was an advantage of 35,29% in favour of the media containing para-aminobenzoic acid, over the control.

In view of such results the A.A. advise the use of that substance, considered by many as growth factor, in the routine culture media, in cases of suspected meningococcal cerebrospinal meningitis likely to be under treatment by the sulfamids.

REFERÊNCIAS

- 1 — WEICHELBAUM, A. — 1887 — *Fort. d. Med.*, 5: 373, 620.
- 2 — JANEWAY, C. A., — Method for obtaining rapid bacterial growth in cultures from patients under treatment with sulfonamides;
J. Am. Med. Assoc. — March, 8, 1941 — 116: 941.
- 3 — STAMP, T. C. — Bacteriostatic Action of Sulfanilamid in vitro: Influence of fractions isolated from Hemolytic Streptococci.
Lancet — July 1, 1939 — 2: 10 — 17.
- 4 — GREEN, H. N. — The mode of action of Sulfanilamide with Special Reference to a Bacterial Growth Stimulating Factor (P factor) obtain from *Brucella Abortus* and other Bacteria.
Brit. J. Exper. Path. — Feb., 1940 — 21: 38 — 64.
- 5 — MAC JOAD, C. M. — The inhibition of the Bacteriostatic Action of Sulfonamide Drugs by Substances of Animal and Bacterial Origins.
J. Exper. Med. — Sept., 1940 — 72: 217 — 232.
- 6 — WOODS, D. D. — The relation of p. Aminobenzoic acid to the mechanism of the Action of Sulfanilamide.
Brit. J. Exper. Path. — April, 1940 — 21: 74 — 90.
- 7 — SELBIE, F. R. — The inhibition of Action of Sulfanilamide in mice by p. Aminobenzoic Acid.
Ibid, April, 1940 — 21: 90 — 93.
- 8 — HARRIS, R. S. AND THIMANN, R. V. — *Vitamins and Hormones*, 1944, 2: 215.
- 9 — KOLMER, J. A. — *Clinical diag. by laboratory examination*, 1943, pg. 433.