

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
Diretor: Prof. Dr. Paulo M. G. de Lacerda Jr.

O EMPRÊGO DO NITROGENETO DE SÓDIO EM MEIOS SELETIVOS PARA ESTREPTOCOCOS

THE USE OF SODIUM AZIDE IN SELECTIVE MEDIA FOR STREPTOCOCCI.

PAULO M. G. DE LACERDA JR.

D. C. DE FREITAS
Assistente

O diagnóstico bacteriológico pelo isolamento dos agentes etiológicos é, em bacteriologia veterinária, dificultado em numerosas ocasiões pela natural contaminação oriunda das condições higiênicas dos animais examinados.

O isolamento de germes de processos piogênicos enquadra-se nessas condições, sendo dificultado pelas exigências culturais desses germes que requerem, como é sabido, meios enriquecidos.

Procurando eliminar a flora de contaminação, representada por bactérias Gram negativas, entre elas principalmente o bacilo *proteus*, LICHSTEIN & SNYDER, em 1941, propuzeram um meio de cultura à base de nitrogeneto de sódio (sodium azide), dotado de alto poder seletivo para estreptococos, conforme observação inicial de HARTMAN, em estudos sobre mastites.

Na realização de uma pesquisa que visava evidenciar a presença de portadores de garrotinho, tivemos nossa atenção voltada para o meio com nitrogeneto de sódio em virtude de sérias dificuldades encontradas no isolamento do *Streptococcus equi* pelas técnicas habituais.

Uma ligeira modificação foi introduzida na composição do meio original com a finalidade de adaptá-lo às condições do trabalho.

PARTE EXPERIMENTAL

Colheita do material:

Para a colheita do material da mucosa nasal de cavalos, utilizamo-nos de estiletos com algodão numa extremidade; a outra era provida de tampão, com o qual se fechava a boca de um tubo de ensaio, servindo êste como proteção, antes e após a utilização do conjunto. Assim preparado o material era esterilizado em forno Pasteur, a 180°C durante 3 horas. Na ocasião da colheita, o estilete era introduzido 18 a 20 cms. na fossa nasal e o algodão friccionado na mucosa.

Semeadura do material e isolamento das amostras:

A semeadura em meio de cultura adicionado de nitrogeneto de sódio, foi, como já vimos, recomendada por LICHSTEIN & SNYDER. Posteriormente uma modificação foi proposta por PACKER, que introduziu também na fórmula do meio, o cristal violeta, com a finalidade de torná-lo ainda mais seletivo. Ambos recomendaram seus meios para o isolamento de estreptococos do leite, em casos suspeitos de mamite.

Em nosso caso, sendo o material que escolhemos retirado da mucosa nasal de cavalos, e colhido em estiletos providos de algodão, a semeadura direta em placa não era recomendada porque não havia homogeneização prévia do material a ser semeado.

As semeaduras feitas diretamente em placas de agar-sangue-nitrogeneto de sódio apresentaram resultados tão irregulares, que verificamos logo de início a impossibilidade de seguir tal processo.

Idealizamos então a semeadura em meio líquido, adicionado de nitrogeneto de sódio e cristal violeta. Após incubação nesse meio, o material já livre de contaminação, era semeado em placas de agar-sangue para isolamento dos estreptococos existentes.

O meio de cultura que utilizamos era assim constituído:

Caldo simples	1000 cm ³
Glicose	10 g
Nitrogeneto de sódio (NaN ₃) (*)	0,5 g
Solução aquosa a 0,1% de cristal violeta	2 cm ³

O meio era ajustado a pH 7,0, filtrado, acrescido do cristal violeta e esterilizado a 115°C durante 20 minutos.

Fazíamos a semeadura nesse meio, diretamente com o estilete e após incubação durante 24 horas a 37°C a cultura era semeada em placa de agar-sangue.

(*) O nitrogeneto de sódio (sodium azide), NaN₃, foi preparado no Departamento de Química Orgânica e Biológica da Faculdade de Medicina Veterinária, pelo Dr. Virgílio Bonoldi, — a quem agradecemos a gentileza, que nos forneceu os seguintes dados: é preparado ainda hoje a partir da hidrazina e da mesma maneira que o fez Curtius em 1890, descobrir de tal substância. Sua obtenção faz-se também pelo aquecimento, em tubo, de uma corrente de amônia atuando sobre sódio: forma-se amideto de sódio (NH₂Na) (NH₃ + Na — NH₂ Na + H). Sobre o amideto formado faz-se então atuar o óxido nítrico (N₂O) (NH₂Na + ON₂ — N₃Na + OH₂). O nitrogeneto de sódio assim obtido dissolve-se em água e purifica-se por sucessivas recristalizações.

O resultado da sementeira prévia em caldo glicosado-cristal violeta-nitrogeneto de sódio foi inteiramente favorável e, nas placas de agar-sangue, a flora de contaminação era reduzida ou ausente.

Para estudo comparativo fizemos sementeira do mesmo material em caldo glicosado e em caldo glicosado-nitrogeneto de sódio-cristal violeta. O estilete era mergulhado inicialmente nos tubos com caldo glicosado e a seguir no segundo meio. Os tubos eram incubados em estufa a 37°C durante 24 horas e deles retirávamos uma alça que era semeada em placa de agar-sangue de cavalo.

O resultado dessas sementeiras acha-se anotado no quadro I.

QUADRO I

<i>Meios de cultura empregados para isolamento</i>	<i>Exames negativos</i>	<i>Exames positivos</i>	<i>Streptococos isolados</i>	
Caldo glicosado 89 amostras	61 68,5%	28 31,5%	Hemolíticos 1 1,1%	Outros tipos 27 30,3%
Caldo glicosado nitreto de sódio 89 amostras	8 9,0%	81 91,0%	Hemolíticos (*) 9 10,1%	Outros tipos (*) 76 85,4%

(*) Em 4 placas foram isoladas amostras beta hemolíticas e *viridans* do mesmo material.

$$\chi^2 = 66,48 \quad P < 0,001$$

Com a finalidade de verificar se o nitrogeneto de sódio age unicamente impedindo o crescimento da flora de contaminação, facilitando a evidenciação dos estreptococos, ou se é uma substância que estimula o crescimento desse germe, realizamos sementeiras de *Streptococcus equi* em caldo glicosado e no meio que estávamos experimentando para verificação do número de germes.

O crescimento do *S. equi* nesses meios foi acompanhado por sementeiras de 0,03 cm³ de diluições a 1/100, feitas em placas de agar-sangue, e realizadas após 3, 5 e 8 horas de incubação a 37°C. As placas de agar-sangue eram incubadas durante 24 horas e procedia-se então à contagem de colônias.

O quadro II apresenta os números médios de colônias verificados em diversas dessas provas e evidencia que o caldo glicosado-nitrogeneto de sódio-cristal violeta, embora seja um meio seletivo para estreptococos, pela eliminação da contaminação, não é um meio estimulante do crescimento.

QUADRO II

Colônias em placas de agar-sangue, após 24 hs. de incubação a 37°C, resultantes da sementeira de 0,03 cm³ de diluições a 1:100 das culturas nos meios abaixo:

<i>Meio de cultura</i>	<i>Repique após 3 hs.</i>	<i>Repique após 5 hs.</i>	<i>Repique após 8 hs.</i>
Caldo glicosado	110	174	421
Caldo glicosado-Nitrogeneto de sódio-Cristal violeta	55	98	256

Os resultados dos quadros I e II confirmam o valor do nitrogeneto de sódio como substância seletiva para o isolamento de estreptococos e evidenciam a vantagem da sementeira inicial em meio líquido com nitrogeneto de sódio, principalmente quando o material a ser examinado exige prévia homogeneização.

S U M A R I O

Procurando isolar estreptococos das fossas nasais de cavalos, os autores utilizam como meio de cultura, o caldo glicosado-nitrogeneto de sódio-cristal violeta, conseguindo praticamente eliminar a flora de contaminação.

Semeando 89 amostras de material contaminado, em caldo glicosado e em caldo glicosado-nitrogeneto de sódio-cristal violeta, obtiveram 31,5% de resultados positivos no primeiro, ao lado de 91% de resultados positivos no segundo.

Por meio de contagem de colônias após 3, 5 e 8 horas de incubação, em caldo glicosado e no meio com nitrogeneto de sódio, demonstram que este meio, embora altamente seletivo não é estimulante do crescimento para estreptococos.

Evidenciam a vantagem da sementeira de material contaminado no meio proposto, para se isolar estreptococos, principalmente quando o material exigir prévia homogeneização.

S U M M A R Y

In order to isolate streptococci from the nasal cavities of horses, the authors used glucose-sodium azide-violet crystal-broth medium, and were thus able to eliminate almost all contaminating flora.

Out of 89 strains of contaminating material inoculated both in glucose broth and gl.sod.az.viol.crys.broth, 31.5% of positive results were obtained in the former medium, while in the latter, results were positive in 91%.

The colonies were counted after 3, 5 and 8 hours of incubation in both media mentioned, evidence being thus obtained that the g.s.a.v.c.broth, although highly selective does not stimulate the multiplication of streptococci.

The advantage of growing contaminated material in the suggested medium for the purpose of streptococcus isolation, specially if the material requires previous homogenization, is emphasized.

BIBLIOGRAFIA

- HARTMAN, G. — 1937 — Ein Beitrag zur Reinzuchtung von Mastitisstreptokokken aus verunreinigen Material. *Milchw. Forsch.*, 18:116-22. Cit. Lichstein. *Jour. Bact.*, 42:653-64
- LICHSTEIN, H. C., SNYDER, M. L. — 1941 — The Inhibition of the Spreading Growth of "Proteus" and Other Bacteria to Permit the Isolation of Associated Streptococci. *Jour. Bact.*, 42:653-64
- PACKER, R. A. — 1942 — The Use of Sodium Azide (NaN₃) and Crystal Violet in a Selective Medium for Streptococci. Master of Science Degree Thesis, Iowa State College. Cit. Merchant, I. A. — *Veterinary Bacteriology and Virology*: 94. 4th. ed. Amer. The Iowa State College Press, 1950