

Influência da Glicose no cultivo do pneumococo

por

Estacio Monteiro

Em 1939, quando fomos designado para preparar sôro antipneumocócico, no Instituto Oswaldo Cruz, tivemos nossa atenção despertada para a influência da glicose no crescimento do pneumococo. Nesta ocasião, em que necessitávamos grande quantidade de germes para a imunização dos cavalos, tivemos oportunidade de verificar que os meios de cultura glicosados mostravam melhores resultados, sendo o crescimento, em 24 horas, muito abundante.

Desde os primeiros estudos sôbre êste germe, diversos pesquisadores têm acrescentado glicose aos meios de cultura como fator de enriquecimento, mesmo aos meios já muito nutritivos, contendo proteínas, como fizeram CARNOT e FOURNIER (2) e outros.

Em 1904, TURRO (13) empregou, com grande êxito, meio de caldo peptonado com glicose para isolamento do germe do escarro. A concentração da glicose foi de 8%, considerando o A. esta porcentagem como ótima para o pneumococo.

HISS, em 1905 (9), descreveu um método para obter cultura em massa, para fins de inoculação e reações de aglutinação, que consiste em cultivar o germe (pneumococo ou estreptococo) em caldo de carne peptonado com 4 a 5% de glicose e carbonato de cálcio a 1% para neutralizar a acidez produzida pelo metabolismo da bacteria.

Outros AA. têm se dedicado a estudos neste sentido, levando em especial consideração a questão da concentração iônica, tanto a inicial como a resultante do crescimento do germe. Assim, CULLEN e CHESNEY (4) em 1918, mostraram que o crescimento do pneumococo acarreta produção de ácido e que esta acidez é paralela à curva do crescimento, sendo um fator importante na morte e lise do germe.

Com relação à concentração iônica ótima para o bom desenvolvimento, DENRBY e AVERY (5) mostraram ser de pH 7,8. Também, AVERY e CULLEN (1) em 1919, verificaram que em meio glicosado a 1% o pH favorável é idêntico.

* Recebido para publicação a 17 de novembro de 1944 e dada à publicidade em fevereiro de 1945.

LORD e NYE (11), estudando em 1919 a relação entre o pH e a morte e lise das bactérias, mostram que em meio glicosado a 1% o pH final é 5,1, sendo esta acidez o fator bactericida mais importante. Em 1922 (12), em novas pesquisas verificaram que quanto mais ácido o meio, mais rapidamente morre o pneumococo.

FELTON e DOUGHERTY (6) em 1924, num estudo sobre as diferentes condições relacionadas com a concentração iônica e os diversos ingredientes do meio de cultura, relatam que a glicose a 1%, quando adicionada ao meio (caldo simples com pH 7,3-7,7), neutraliza a ação desfavorável da produção de ácido como também faz com que a perda da virulência seja mais lenta.

Tendo em vista a virulência, são de grande relêvo os trabalhos de VELIKANOFF e MIKAILOVA (14, 15), que relatam ser as amostras virulentas pouco ativas em sua ação sobre a glicose. As experiências foram feitas com agar-ascite com 1% de glicose. Neste meio as amostras de isolamento recente crescem mal, porém, depois que perdem a virulência se desenvolvem abundantemente, dando um aspecto esbranquiçado ao meio.

COTONI, TRUCHE e RAPHAEL (3), no importante trabalho sobre pneumococos, de 1922, aconselham meio com peptona de Chapoteaut a 4 %, cloreto de sódio a 0,5% e glicose a 0,2%. Relatam que com menor quantidade de glicose (0,1 %) o crescimento não é tão abundante e com maiores porcentagens o meio torna-se muito ácido, sendo os germes atingidos em sua vitalidade.

Em 1929, WRIGHT (17) em um estudo sobre os diversos fatores que influenciam o crescimento do pneumococo, conclui, quanto à glicose, que é indispensável a 0,2%, para um desenvolvimento luxuriante, sendo o excesso prejudicial, pois determina forte acidez e consecutiva autólise.

A acidez produzida pela ação do pneumococo sobre a glicose, segundo trabalho de HEWITT (8) de 1932, é devida ao ácido láctico, que é encontrado como produto final. Mostrou, em seu trabalho, que 78% da glicose transforma-se em ácido láctico.

Atualmente é de prática comum o emprêgo de meios glicosados, contendo proteínas ou não, no manejo geral com pneumococo, tanto para a manutenção de amostras como para isolamento, etc., dependendo a porcentagem da glicose bem como os outros ingredientes da predileção e experiência dos diversos técnicos. LACORTE e SANTOS (10), por exemplo, preconizam para o isolamento o uso de meio proteico e glicosado.

Com o fim de verificar a quantidade de glicose mais favorável para o desenvolvimento do pneumococo, fizemos uma série de experiências cujo material e técnicas relatamos a seguir.

Material e métodos — As amostras usadas foram em número de oito, sendo sete de procedência americana, recebidas de "Division of Laboratory and Research, Albany" com as seguintes indicações: amostra Neufeld, 1 do tipo I; amostra D. 53 do tipo II; amostra 5-A2 do tipo III; amostra Swintell 34348 do tipo IV; amostra Ambrose 36129 do tipo V; amostra Fiorelli 34350 do tipo VI-a e amostra Burke 34354 do tipo IX. A oitava amostra, do tipo I, foi recebida do Instituto Butantan, altamente virulenta para o camondongo.

O meio de cultura empregado foi o caldo simples, preparado com caldo de carne, peptona a 1% e cloreto de sódio a 0,5%, ao qual adicionamos glicose, quimicamente pura, nas quantidades de 0.25, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, e 20 por cento. O pH foi ajustado para 7,6 a 8,0. Usamos tubos de ensaio comuns com 10cc de meio em cada.

Para obtermos o material para as sementeiras cultivamos as diversas amostras em caldo simples com 1% de glicose. Usamos sempre culturas de 24 horas incubadas a 37°C., que diluímos em partes iguais com caldo simples. Estas culturas diluídas foram transplantadas para o meio com as diversas concentrações de glicose, na quantidade de 1cc para cada tubo. Usamos praticar sempre em duplicata as sementeiras, para evitar um acidente que pudesse prejudicar os resultados. Como controle fizemos também as sementeiras em caldo simples, sem glicose, para podermos avaliar as diferenças resultantes. Os diversos tubos foram incubados a 37°C e no fim de 24 e 48 horas praticamos a contagem dos germes bem como verificamos o pH.

A verificação do pH, após o desenvolvimento dos germes, foi feita por método colorimétrico, com o emprêgo do Comparador de Hellige e Indicador Universal Merck. Este aparelho fornece uma escala para leitura de pH 4,5 a 9,0, com intervalos de 0,5, que nos pareceu suficiente para têmos uma impressão do grau de acidez resultante do metabolismo do pneumococo.

Para a contagem das bactérias empregamos o método de FRIES (7) descrito em 1921, que é uma modificação do processo clássico de WRIGHT (16). O processo de FRIES adota como elemento de comparação uma emulsão de lêvedos (*Saccharomyces*) ao invés das células do sangue como o de WRIGHT. Usamos uma suspensão a 5% de fermento Fleishmann em água fisiológica, com 0,5% de formol. Esta suspensão pode ser conservada a uma temperatura de 4 a 5°C durante alguns dias, sem alteração. Para a contagem do número de células por centímetro cúbico preferimos empregar a pipeta de leucócitos, fazendo a contagem na câmara de THOMAS. Nesta determinação, para evitar grandes erros, fizemos sempre 5 contagens e tomamos o valor médio, admitindo nos cálculos um erro de 10^4 . Em geral, a solução a 5% dá 5 a 6 milhões de células por centímetro cúbico. De acordo com a técnica ori-

ginal de FRIES a emulsão deve ter de 25 a 30 milhões de células por centímetro cúbico, porém conseguimos facilmente fazer a comparação com quantidade cinco vezes menor.

Para a determinação do número de germes misturamos 1cc da suspensão de lêvedos com 1cc de meio de cultura e fizemos esfregaços em lâminas, bem limpas e desengorduradas. A fase mais delicada do método de FRIES é justamente o preparo do esfregaço, pois os lêvedos têm tendência a se aglutinarem, não dando uma distensão uniforme. Depois de feito o esfregaço com o máximo cuidado, usamos o calor para a fixação e a seguir solução ao décimo de Fucsina de Ziehl, durante 1 minuto, mais ou menos, para a coloração. A contagem foi feita ao microscópico com um aumento de aproximadamente 900 diâmetros, tendo-se colocado na altura do diafragma da ocular um pequeno pedaço de cartão preto com um orifício, calculado de maneira a obter mais ou menos um terço do campo total do microscópio. Nestas condições contamos, de cada lâmina, no mínimo 10 campos e com os dados obtidos determinamos o número de germes por centímetro cúbico.

A quantidade de germes semeados foi previamente determinada tendo em vista o número de germes por centímetros cúbico nos diversos tubos de cultura. O quadro I mostra os resultados encontrados, tendo-se na primeira coluna os valores das culturas diluídas ao meio e na segunda coluna os valores nos tubos em experiência, levando-se em conta os 10cc de meio e mais 1cc da sementeira.

QUADRO I

	N.º DE GERMES SEMEADOS (em 1cc.)	N.º DE GERMES NOS TUBOS EM EXPERIÊNCIA (em 1cc.)
Amer. Tipo I.....	6.390.000	580.000
Amer. Tipo II.....	14.860.000	1.350.000
Amer. Tipo III.....	13.850.000	1.260.000
Amer. Tipo IV.....	15.940.000	1.450.000
Amer. Tipo V.....	22.000.000	2.000.000
Amer. Tipo VIa.....	17.400.000	1.580.000
Amer. Tipo IX.....	16.200.000	1.470.000
But. Tipo I.....	17.750.000	1.610.000
VALOR MÉDIO.....	15.550.000	1.410.000

Resultados — Os resultados obtidos mostraram claramente, de acôrdo com os dados do quadro II, que a glicose, dentro de certos limites, tem uma ação acentuada sobre o crescimento do penumococo. A concentração que se mostrou mais favorável foi a de 1%, em relação ao número de germes obti-

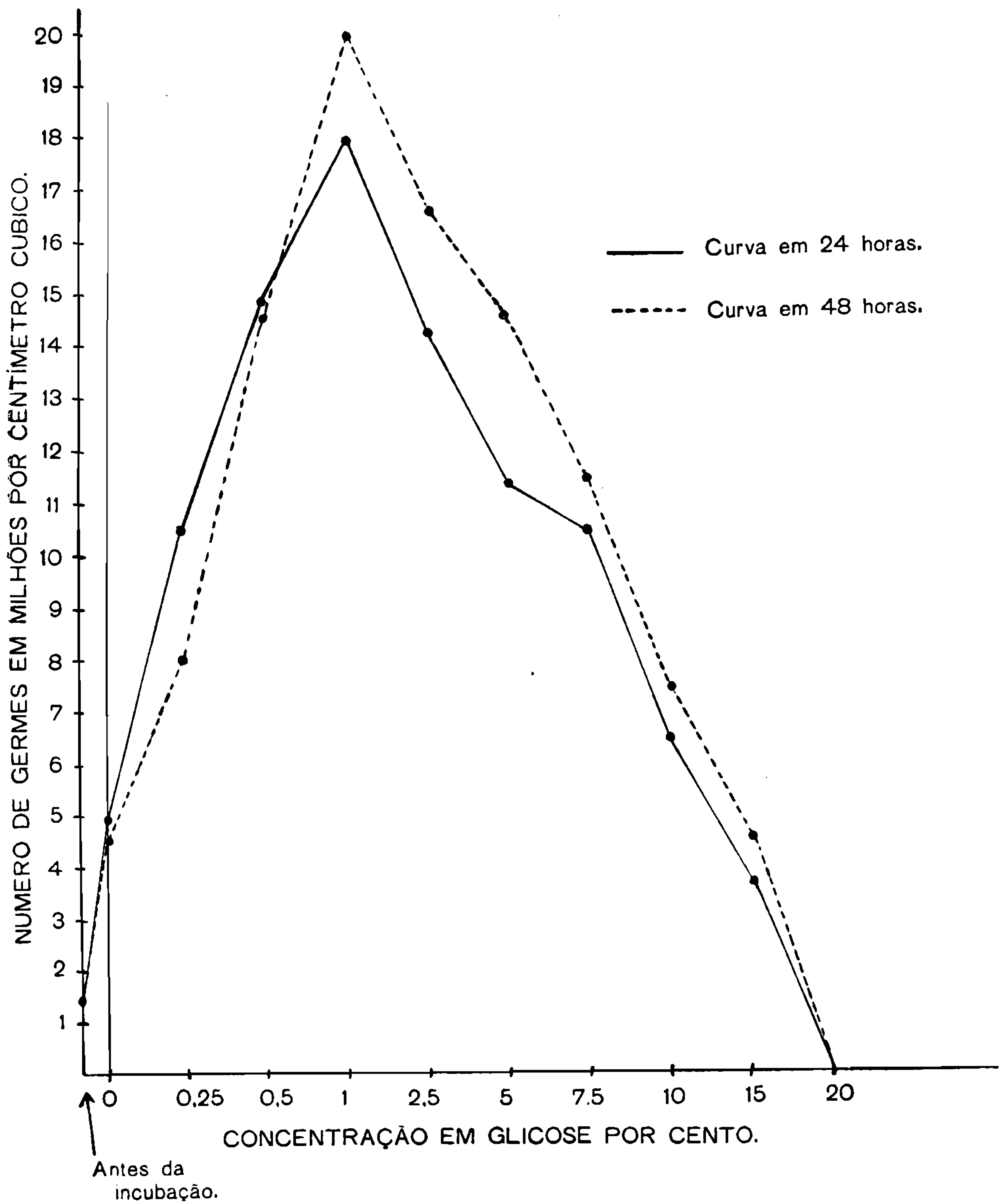
QUADRO II

Quadro com os valores das contagens dos germes nas várias concentrações de glicose, expressando os resultados por centímetro cúbico

		CALDO SIMPLES	COM GLICOSE a 0,25 %	a 0,5 %	a 1 %	a 2,5%	a 5%	a 7,5 %	a 10 %	a 15 %	a 20 %	
Resultados após 24 horas de incubação a 37°C.....	Amer.	Tipo I.....	3.360.000	5.310.000	8.350.000	8.200.000	9.540.000	6.980.000	7.420.000	1.800.000	1.670.000	—
		Tipo II.....	2.360.000	8.440.000	11.700.000	14.900.000	10.060.000	5.560.000	5.340.000	4.730.000	1.900.000	—
		Tipo III.....	3.950.000	3.440.000	16.500.000	16.800.000	13.800.000	12.700.000	12.300.000	6.980.000	4.020.000	—
		Tipo IV.....	2.860.000	2.550.000	5.750.000	7.260.000	9.160.000	6.480.000	6.930.000	2.600.000	700.000	—
		Tipo V.....	4.590.000	22.040.000	25.570.000	27.000.000	19.180.000	17.000.000	12.700.000	8.200.000	4.200.000	—
		Tipo VIa.....	9.760.000	14.460.000	14.820.000	19.000.000	18.410.000	16.200.000	13.350.000	10.100.000	6.030.000	—
		Tipo IX.....	9.990.000	19.400.000	24.100.000	32.660.000	18.010.000	13.180.000	13.550.000	8.010.000	6.310.000	—
	But.....	Tipo I.....	2.820.000	8.440.000	13.600.000	19.080.000	16.600.000	13.300.000	12.610.000	9.700.000	5.120.000	—
	VALOR MÉDIO.....		4.970.000	10.510.000	15.050.000	18.110.000	14.350.000	11.430.000	10.520.000	6.510.000	3.740.000	—
	Resultados após 48 horas de incubação a 37°C.	Amer.....	Tipo I.....	2.490.000	3.090.000	6.560.000	10.600.000	7.920.000	5.930.000	8.870.000	2.990.000	2.950.000
Tipo II.....			1.220.000	2.790.000	8.300.000	17.100.000	16.320.000	15.800.000	12.200.000	8.840.000	5.350.000	—
Tipo III.....			2.450.000	2.820.000	17.800.000	17.510.000	14.790.000	14.100.000	7.930.000	2.630.000	2.550.000	—
Tipo IV.....			1.610.000	920.000	6.100.000	7.480.000	6.720.000	5.590.000	5.810.000	5.630.000	1.410.000	—
Tipo V.....			7.580.000	10.700.000	22.510.000	27.090.000	21.110.000	18.060.000	13.130.000	8.900.000	5.320.000	—
Tipo VIa.....			9.980.000	16.300.000	19.150.000	25.620.000	20.660.000	17.870.000	12.790.000	9.610.000	5.800.000	—
Tipo IX.....			9.200.000	19.160.000	21.700.000	29.810.000	20.830.000	17.900.000	12.750.000	10.050.000	7.220.000	—
But.....		Tipo I.....	3.130.000	7.870.000	16.020.000	26.910.000	25.090.000	21.900.000	18.400.000	11.800.000	5.380.000	—
VALOR MÉDIO.....		4.710.000	7.960.000	14.770.000	20.260.000	16.680.000	14.650.000	11.490.000	7.560.000	4.500.000	—	

NOTA — Todos os cálculos foram realizados com aproximação, admitindo-se um erro de 10⁴.

CURVA DOS VALORES MÉDIOS OBTIDOS NAS CONTAGENS
APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37° C.



dos. Pudemos verificar que nesta concentração o número de germes por centímetro cúbico alcançou em média 18 milhões em 24 horas e 20 milhões em 48 horas. Em tôdas as outras concentrações o número de germes encontrados foi bem menor, havendo uma diferença apreciável principalmente em comparação com o meio sem glicose alguma. O gráfico representando os valores médios em 24 e 48 horas mostra rapidamente a curva obtida. De um modo geral houve um pequeno aumento no número de germes em 48 horas, porém o aspecto morfológico das bactérias mostrou certa alteração, principalmente quanto às dimensões dos cocos, que se apresentaram muito aumentados, dando impressão de degeneração. Estas observações foram anotadas com tôdas as concentrações de glicose e também com caldo simples, o que faz crer não esteja o referido aspecto morfológico em relação direta com a glicose, mas sim com o esgotamento do meio e o grau de acidez. Fato curioso foi o observado nos tubos com 20% de glicose, nos quais não houve crescimento algum e os germes semeados desapareceram completamente em 24 horas.

Concomitantemente fizemos as determinações de pH e verificamos que entre as concentrações de 0,5 a 7,5% de glicose a acidez é muito pronunciada dentro de 24 horas indo o pH para 5,0 a 4,5. No caldo simples a acidez foi pouco acentuada, com um pH de 7,0 aproximadamente. Nas outras concentrações de glicose, à exceção do tubo com 20% de glicose no qual não houve crescimento nem alteração de pH, tivemos ocasião de verificar que o grau de concentração iônica se mostrou mais ou menos entre 6,0 e 5,5. Tanto em 24 como em 48 horas os resultados foram idênticos, não havendo, portanto, um aumento de acidez em relação com o aumento de tempo de incubação, depois das primeiras 24 horas.

Conclusões — I — O pneumococo desenvolve-se com maior atividade em meio contendo 1% de glicose.

II — Com menores porcentagens de glicose o crescimento não é tão abundante. Com porcentagens acima de 1% o número de germes por centímetro cúbico de meio é tanto menor quanto maior a concentração de glicose, até o limite de 20% no qual não se observa crescimento algum.

III — O pH final, em meio de caldo glicosado a 1%, é de 4,5 a 5,0 aproximadamente.

Summary and conclusions:

I — Pneumococcus develops more actively on media containing 1% of glucose.

II — When smaller percentages of glucose are used, growth is not so abundant. When percentages above 1% are used, the number of germs per cubic centimeter of medium is in a lower proportion, the higher the concentration of glucose is, up to the limit of 20% in which no growth at all is observed.

III — Final pH in 1% glucose broth medium is approximately 4.5 to 5.0.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AVERY, O. T. & CULLEN, G. E.
1919. Hydrogen ion concentration of cultures of pneumococci of the different types in carbohydrate media.
J. Exp. Med. 30, pgs. 359-378.
- 2) CARNOT, P. & FOURNIER, L.
1900. Recherches sur le pneumocoque et ses toxines.
Arch. Med. Exp. & Anat. Path. 12, pgs. 357-378.
- 3) COTONI, L., TRUCHE, C. & RAPHAEL, A.
1922. Pneumocoques et affections pneumococciques.
Monographies de l'Inst. Pasteur. Paris.
- 4) CULLEN, G. E. & CHESNEY, M. A.
1918. A note on the production of acid by pneumococci.
J. Exp. Med. 28, pgs. 289-296.
- 5) DERNBY, G. K. & AVERY, O. T.
1918. The optimum hydrogen ion concentration for the growth of pneumococcus.
J. Exp. Med. 28, pgs. 345-357.
- 6) FELTON, L. & DOUGHERTY, K.
1924. Influence of hydrogen ion concentration and of ingredients of plain broth on the virulence of pneumococci.
J. Exp. Med. 39, pgs. 155-169.
- 7) FRIES, K. A.
1921. Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen.
Centr. f. Bakt. u. Paras. Or. 86, pgs. 90-96.
- 8) HEWITT, L. F.
1932. Bacterial metabolism. Glucose breakdown by pneumococcus variants and the effect of phosphate thereon.
Bioch. J. 26, pgs. 464-471.

-
- 9) HISS, P. H.
1905. A method for obtaining mass cultures of bacteria for inoculation and for agglutination test; with special reference to pneumococci and streptococci.
J. Exp. Med. 7, pgs. 223-227.
- 10) LACORTE, J. G. & SANTOS, M.
1939. O pneumocóco; caracteres biológicos.
Acta Med. 4, pgs. 141-147.
- 11) LORD, F. T. & NYE, R. N.
1919. The relation of the pneumococcus to hydrogen ion concentration, acid death-point and dissolution of the organism.
J. Exp. Med. 30, pgs. 389-399.
- 12) LORD, F. T. & NYE, R. N.
1922. Studies on the pneumococcus. Acid death-point of the pneumococcus.
J. Exp. Med. 35, pgs. 685-687.
- 13) TURRO, R.
1904. Le glyucose dans les cultures du pneumocoque.
J. Phys. & Patn. Gener. 6, pgs. 718-719.
- 14) VELIKANOFF, J. & MIKAILOVA, Z.
1925. La fermentation des hydrates de carbone, comme indice de l'avirulence des pneumocoques.
J. Microb. Path. & Mal. Inf. (en russe) 2, pg. 62. Abst.: Bul. Inst. Past. 24, 355, 1926.
- 15) VELIKANOFF, J. & MIKAILOVA, Z.
1930. La perte de virulence du pneumocoque et ses rapports avec les hydrates de carbone.
C. R. Soc. Biol. 105, pgs. 295-297.
- 16) WRIGHT, A. E.
1902. On some new procedures for the examinations of the blood and of bacterial cultures.
Lancet, 2, pgs. 11-17.
- 17) WRIGHT, H. D.
1929. The effect of certain factors upon the growth of the pneumococcus.
J. Path. & Bact. 32, pgs. 203-227.
-