

## PRESERVAÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS POR PROCESSOS SIMPLES, COM ESPECIAL REFERÊNCIA AOS ESTREPTOCOCOS

Carlos SOLÉ-VERNIN (1)

### RESUMO

A manutenção das culturas microbianas requer que haja a preservação de características originais das amostras e não apenas de sua viabilidade. Em microbiologia médica são sobretudo importantes aquelas características que dizem respeito à identificação da amostra e as que estão ligadas aos fatores de patogenicidade. Para muitas espécies microbianas, a liofilização é o melhor processo de preservação, entretanto não é acessível a todos os técnicos que dela poderiam necessitar.

Nesta investigação foram observados três processos de conservação cuja característica básica é a sua acessibilidade técnica: Culturas ou suspensões microbianas — 1) em sangue fluido desfibrinado estéril de coelho normal; 2) em soro inativado de coelho normal, acrescido, ou não, de carvão (sobretudo para os vírus); 3) em soro inativado de coelho normal, acrescido, em partes iguais, de gema de ovo diluída em salina, também em partes iguais (principalmente para o gênero *Mycobacterium*.

As culturas foram conservadas em ampolas de 1 ml fechadas à chama, guardadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Foram observadas 423 amostras de micróbios pertencentes a muitas famílias, gêneros e espécies. Nesse total contam-se 367 bactérias (das quais 222 são estreptococos), 6 vírus, 48 cogumelos, 1 alga verde e 1 protozoário.

O maior prazo contínuo de observação foi de 29 meses (para o estreptococo). As características microbianas de importância taxonômica e as que se referem aos fatores de patogenicidade foram todas mantidas durante o prazo em que se manteve a viabilidade; além disso, em alguns casos observou-se reaquisição de características como costuma acontecer por meio de inoculações *in vivo*.

### INTRODUÇÃO

Nos processos de manutenção de culturas, a conservação da viabilidade ainda que obviamente essencial, não constitui todo o problema; ligada a ela de modo inseparável está a questão da preservação das propriedades culturais que o microbiologista considera importantes (WEISS<sup>7</sup>). Em microbiologia médica há interesse em preservar, além das características de significação taxonômica, aquelas fatores de algum modo ligados à

patogenicidade da espécie e que condicionam o grau de virulência da amostra.

Entre os numerosos processos propostos para a conservação de culturas microbianas aqueles que mais garantida e prolongadamente preservam intactas as características originais são os de dessecação (ENGLEY Jr.<sup>1</sup>). No entretanto, estes processos estão na dependência de aparelhagem custosa e de rea-

Inst. Med. Tropical de São Paulo — Depart. de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P. (Prof. C. S. Lacaz) e Instituto de Microbiologia da Universidade do Brasil (Prof. P. de Góes).

(1) Assistente de Microbiol. e Imunol.

lização técnica relativamente complicada, tornando-os inacessíveis aos laboratórios interessados quando se localizam nas amplas áreas geográficas em que o progresso técnico não atingiu certo nível.

Para a maioria dos laboratórios de microbiologia de nosso país, o seu valioso trabalho consiste no isolamento dos agentes etiológicos, e identificação mais ou menos sumária, seguida da perda das amostras. Esta perda de amostras limita a sua capacidade de realização científica, quer sob o ponto de vista clínico, quer microbiológico, epidemiológico ou mesmo de pura investigação. Os próprios centros de ensino, na ocasião das aulas de demonstração sobre determinados micróbios, muitas vezes se limitam a projetar diapositivos de questões essencialmente técnicas, por falta dos micróbios adequados, no tempo oportuno.

O objetivo imediato das presentes investigações consistiu em verificar se certos processos de conservação de culturas, que fossem rigorosamente acessíveis ao mais modesto laboratório de microbiologia, não seriam capazes de preservar algumas características consideradas importantes durante lapso de tempo suficientemente longo.

#### AMOSTRAS MICROBIANAS OBSERVADAS

Foram observadas 423 amostras de micróbios pertencentes a muitas Famílias, Gêneros e Espécies. Nesse total contam-se 367 bactérias (das quais 222 são estreptococos), 6 vírus, 48 cogumelos, 1 alga verde e 1 protozoário. Na relação que se segue, depois da denominação de cada micróbios, consta, entre parênteses, o número de amostras que dele foram observadas.

Bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* (1); *Flavobacterium meningosepticum* (2); *Escherichia coli*, dos sorotipos patogênicos: 025:11 L (1), 026:B6 (1), 055:B5 (1), 086:B7 (1), 0111:B4 (1), 0127:B8 (1), 0128:B12 (1); *Klebsiella* sp. (1); *Serratia marcescens* (1); *Salmonella typhi* (com "V") (1); *Shigella dysenteriae*, A2 (1), A3 (1), A4 (1), A5 (1), A6 (1), A8 (1); *Shigella flexneri*, B 1b (1), B 2a (1), B 2b (1), B 3 (1), B 4a (1), B 4b (1), B 5 (1), B 6 (1); *Shigella boydii*, C 1 (1), C 2 (1), C 4 (1), C 5 (1), C 6 (1), C 7 (1), C 8

(1), C 9 (1), C 10 (1); *Shigella sonnei* (1); *Bordetella pertussis* (1); *Brucella abortus* (1); *Brucella suis* (1); *Brucella melitensis* (2); *Haemophilus* sp. (2); *Staphylococcus aureus* (45); outros cocos Gram positivos em cachos, coagulase negativos (14); *Neisseria gonorrhoeae* (6); *Diplococcus pneumoniae* (5); *Streptococcus*, beta-hemolíticos, dos grupos: não determinado (26); Grupo A (*Streptococcus pyogenes*) dos tipos: não determinado ou não tipável (14), tipo 11 (1), tipo 12 (1), tipo 14 (1), tipo 47 (1); grupo B (*Streptococcus agalactiae*) (4); grupo C, dos tipos, humano (11), *Streptococcus equisimilis* (1), *Str. equi* (1); grupo D, espécie não determinada (2); grupo E (1); grupo F (1); grupo G (12); grupo K (1); grupo L (1); grupo O (4); *Streptococcus viridescens*, espécies não determinadas (56); *Streptococcus salivarius* (7); *Streptococcus sanguis*, tipos não determinados (22), tipo I-II (1); *Str. sp. dextran-positivo* (1); *Str. acidominimus* (14); *Str. mitis* (22); *Str. equinus* (2); *Str. uberis* (1); *Str. bovis* (1); *Str. dysgalactiae* (grupo C) (1); Enterococos, espécies não determinadas (5); *Str. faecalis* (3); *Str. liquefaciens* (2); Grupo láctico, *Str. lactis* (1). *Corynebacterium* sp., saprófitas (2); *C. diphtheriae*, virulentas (inclusive amostra Park-8) (9); *Listeria monocytogenes*, dos tipos sorológicos, 1 (1), 2 (1), 3 (1), 4 A (1), 4 B (1); *Bacillus subtilis*, var. *niger* (1); *Clostridium perfringens* (2), *Cl. tetani* (1); *Mycobacterium tuberculosis* (1), *Myc. bovis* (amostra BCG) (1); *Actinomyces brasiliensis* (8); *Leptospira icterohaemorrhagiae* (1).

Vírus: Vírus da poliomielite, dos tipos sorológicos 1 (1), 2 (1), 3 (1). Adenovírus, dos tipos sorológicos 3 (1), 4 (1), 7 (1).

Cogumelos: *Candida* sp. (1); *C. albicans* (1); *C. brumptii* (1); *C. parapsilosis* (1); *Torulopsis utilis*, var. *thermogenesis* (1); *Geotrichum asteroides* (1); *Rhodotorula* sp. (2); *Sporotrichum schenckii* (10); *Trichophyton rubrum* (2); *T. schoenleinii* (2); *T. violaceum* (2); *Microsporum canis* (2); *Pullularia pullulans* (10); *P. schawi* (1); *P. bergeri* (1); *Hormodendrum* sp. (1); *H. fontoyonti* (1); *Madurella grisea* (1); *M. mycetomi* (1); *Piedraia hortai* (1); *Paracoccidioides brasiliensis* (5).

Algas: *Chlorella vulgaris* (1).

Protozoários: *Trypanosoma cruzi* (1).

As observações neste trabalho registradas se estenderam por 33 meses, sendo que o maior prazo contínuo de observação foi de 29 meses (para estreptococos).

#### PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO

Numa publicação anterior (SOLÉ-VERNIN<sup>5</sup>) foram discutidos detalhadamente os fundamentos técnicos dos processos de conservação adotados neste estudo.

Dos três processos simples investigados, o mais extensamente foi aquele que adota como preservador o sangue fluido desfibrinado estéril de coelho normal; a cultura, ou a suspensão do germe em sangue é guardada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, em ampolas de 1 ml fechadas à chama; a sua transferência se faz por meio de pipetas Pasteur.

Foram também investigadas as possibilidades preservadoras do soro inativado de coelho normal, acrescido de carvão\* na proporção aproximada de 0,03 g/ml (principalmente para os vírus), ou acrescido, em partes iguais, de gema de ovo diluída em salina, também em partes iguais (principalmente para o gênero *Mycobacterium*).

Nestas investigações o poder microbicida do sangue e do soro, cuja capacidade é obviamente limitada, foi controlado de diversas maneiras: pela inativação do complemento durante a prova de esterilidade do sangue ou do soro (permanência na estufa a 37°C durante 24 horas), pelo afastamento da hemoglobina (uso do soro) quando houver provas de sensibilidade do germe em questão ao seu poder antimicrobiano, pela pasteurização do soro (60°C, 10 horas), pela inativação do soro (75°C, 30 minutos), pela inativação de fatores tóxicos do soro por meio de carvão e pelo plantio, quer no sangue, quer no soro, de grandes inoculos.

\* "Carbon, Decolorizing (Norit F.Q.P.), Practical for chemical purposes, not for drug use, Eastman Kodack Co., Rochester 3, N.Y., U.S.A."

#### RESULTADOS

Referências minuciosas aos resultados foram feitas numa publicação anterior (SOLÉ-VERNIN<sup>5</sup>); aqui faremos uma apreciação sumária.

As enterobactérias (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella* e *Shigella*) e outros bastonetes Gram negativos (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Brucella*) preservaram-se muito bem em sangue durante todo o período de observação (88 a 236 dias, pelo menos), mantendo as suas características originais de identificação.

Entre as enterobactérias, que sempre mantiveram a sua capacidade de serem aglutinadas pelos soros específicos, observaram-se adicionalmente, dois fatos interessantes. Em primeiro lugar, a amostra de *E. coli* do sorotipo patogênico 055, que se tinha mostrado, antes do período de conservação, repetidamente termo-estável a ponto de a abandonarmos como antígeno para produção de anti-soro aglutinante, após 176 dias de conservação em sangue, passou a termo-estável.

O segundo fato se refere à aquisição ou desenvolvimento de antígeno K, do tipo B (termolábil) em amostras de *Shigella dysenteriae* A2 e A3 (mas não houve em A4, A5 e A6). Aquelas amostras, antes da conservação em sangue, vinham sendo conservadas em ágar-simples e não necessitavam ser fervidas para aglutinarem no seu soro específico O; após 143 dias de conservação em sangue, porém, não aglutinaram no mesmo soro específico O, a não ser após a fervura.

*Bordetella*, *Haemophilus* e *Neisseria* parece preservarem-se bem em sangue até 1 mês. *Bordetella* sobreviveu, numa oportunidade que talvez deva ser considerada ocasional, a 118 dias em sangue; no fim desse período mostrou aglutinação específica, morfologia cocóide e o mesmo grau de virulência (dermonecrose em coelhos e morte de camundongos inoculados por via intracerebral) de antes da conservação. Parece que a conservação em gema + soro pode prolongar a viabilidade de *Bordetella* e *Neisseria* pouco além de 1 mês. Para *Bordetella* a preservação em sangue foi melhor que em soro + carvão; neste último caso a viabilidade não foi além de poucos dias.

*Staphylococcus*, e outros cocos Gram-positivos em cachos, coagulase-negativos (a prova da coagulase foi sempre feita em plasma humano). Estas bactérias se conservaram muito bem em sangue durante todo o período de observação (64 a 211 dias, pelo menos). Limitado número de amostras conservadas também em sôro + carvão não demonstrou menor viabilidade nem alterações quanto à positividade da estafilococagulase. Dentre as 15 amostras inicialmente coagulase-negativas\*, 5, inclusive a amostra "Wood", passaram a positivas (33%). Mas não observamos nenhuma (0%) dentre as 44 originariamente coagulase-positivas, que houvesse passado a coagulase-negativa.

Parece, portanto, que o sangue mantém boa a viabilidade do estafilococo simultaneamente com a sua capacidade de produzir coagulase e, mais ainda, devolve a positividade desta prova às amostras que a haviam perdido.

Os *pneumococos* preservaram-se bem (bile-solubilidade e patogenicidade para o camundongo) até 80-90 dias e para isso a hemoglobina pareceu necessária, uma vez que o sôro apenas não ofereceu a mesma proteção. Até o final daquele período de observação não se notou diferença entre as duas temperaturas de conservação experimentadas: (1) ambiente, inverno e (2) estufa contínua a 32°C.

Uma das amostras de pneumococo, após 8 meses de conservação, mostrou-se uniformemente viável (4 vezes em 4 experiências) quando conservada em sôro + carvão, em ambas as temperaturas adotadas; quando conservada em sôro apenas, ou em sangue, a viabilidade positiva foi observada em cada caso apenas 1 vez em 4 experiências. Em qualquer circunstância a amostra viável se mostrou sempre bile-solúvel e patogênica para o camundongo.

*Streptococcus* — Ao fim de 12 meses observou-se perda de mais de 20% das amostras de estreptococos viridescetes conserva-

das e, dos 12 aos 29 meses de conservação, a viabilidade das amostras decresceu rapidamente, de modo a observarmos, no fim desse período, perda de mais de 80% das amostras conservadas. Entretanto, devemos notar que os enterococos viridescetes, por exceção, conservam-se muito bem durante o mesmo período.

Com relação ao tipo de hemólise viridescete, às provas bioquímicas e à prova de resistência a que esse grupo de bactérias é submetido para fins de classificação, observamos certa freqüência de variação de comportamento, que, evidentemente, faz supor, certa instabilidade de comportamento do grupo viridescete.

Os estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, entretanto, conservaram-se muito bem em sangue até 28 meses pelo menos, com exceção de amostras dos grupos sorológicos A e F que, a partir dos 12 meses, começam a demonstrar menor viabilidade. Em qualquer época em que os  $\beta$ -hemolíticos se mostraram viáveis não perderam nem a capacidade característica  $\beta$ -hemolítica e nem a sua antigenicidade com relação aos antígenos "C" (polissacarídeo) e "M" (proteína) que lhes dão individualização respectivamente de grupo e de tipo dentro do grupo A, sendo os resultados da classificação sorológica, depois do período de conservação, idênticos aos de antes desse período (UPDYKE<sup>6</sup>).

Amostras saprofíticas do gênero *Corynebacterium* conservaram-se muito bem até 203 dias, pelo menos. Quanto ao bacilo diftérico virulento, a capacidade de preservar-se em sangue parece depender muito da amostra, pois, se em alguns casos a sobrevivência atingiu 23 meses pelo menos, amostra houve em que não resistiu a 7 meses; a virulência (inoculações intradérmicas em coelho, subcutânea em cobaio e toxigenicidade *in vitro*) sempre se manteve com a viabilidade.

*Listeria monocytogenes* preservou-se muito bem até 137 dias, pelo menos. Dos tipos sorológicos observados, 4 mantiveram a prova de ANTON positiva. O 5.º tipo sorológico

\* Entre as quais uma amostra "Wood", conservada ininterruptamente em ágar-sangue em pé, coberta com óleo mineral estéril, por mais de 2 anos e que era coagulase positiva antes dessa conservação.

\* Segundo UPDYKE<sup>6</sup>, presentemente estão sendo feitas no "C.D.C." observações com elevado número de amostras para mais extensa comprovação da manutenção de "M" pelo processo.

co observado (4A) mostrou virulência aparentemente exaltada após o período de conservação.

O bacilo tetânico mostrou-se mais sensível à hemoglobina do que o *Cl. perfringens* e do que o *Bacillus subtilis*. O simples meio de HITCHENS em ampolas não se mostrou suficiente para preservar a viabilidade de *Cl. perfringens* até 90 dias. A mistura sôro + carvão conservou muito satisfatória a viabilidade do bacilo tetânico durante um período (80 dias) em que o sangue tinha esterilizado a amostra.

O bacilo da tuberculose humana e o BCG conservaram-se muito bem até 101 dias, pelo menos, na mistura gema + sôro; o bacilo da tuberculose humana não demonstrou perda de virulência, sendo capaz de produzir tuberculose generalizada em cobaias, depois do período de conservação, tal como produzia antes. A mistura sôro + carvão, porém, foi incapaz de manter a viabilidade pouco além de uns dias.

*Actinomyces brasiliensis* não se conservou de modo satisfatório, já que das 8 amostras submetidas à conservação em sangue, apenas 2 sobreviveram ao período verificado (67 a 139 dias).

*Leptospira icterohaemorrhagiae* não sobreviveu ao período verificado (123 dias).

*Vírus* — Parece: a) que o aquecimento a 60°C durante 10 horas (pasteurização) torna as qualidades preservadoras do sôro, frente ao vírus observado, inferiores às do aquecimento a 75°C durante 30 minutos; b) que a adição de carvão ao sôro contribui para aumentar as suas propriedades preservadoras; c) que a mistura sôro + carvão tem capacidade preservadora comparável à do líquido de Hanks, nas condições da experiência. Confirmou-se, mais uma vez, que as temperaturas elevadas (32°C contínuos) são mais eficientes na inativação dos vírus que as menos elevadas (temperatura ambiente de inverno em São Paulo, dentro do laboratório sem aquecimento especial) e que os adenovírus são mais resistentes que os vírus da poliomielite às condições a que foram submetidos.

Na experiência em que se empregou sôro (não hemolisado, aquecido a 75°C, 30 minutos) + carvão, verificou-se, ao fim de 96 dias (temperatura ambiente) viabilidade de alto nível para todos os vírus observados, de acordo com o efeito citopatogênico, em comparação com os vírus conservados no líquido de Hanks (em “deep-freezer”).

*Cogumelos* — Os resultados pareceram especialmente bons para as leveduras, sobretudo as do gênero *Candida*, que se conservaram muito bem até 160 dias, pelo menos. Talvez possam ser considerados bons para *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporotrichum schencki* até 160 dias; para muitos bolôres, entretanto, o processo não foi satisfatório. Sempre que houve sobrevivência, mantiveram-se inalterados os caracteres morfológicos típicos das culturas.

*Chlorella vulgaris* — As observações feitas parecem suficientes para indicar a ação deletéria que exercem sobre *Chlorella*: 1) a privação da luz; 2) a privação de contato renovado com o ar; 3) a ação da hemoglobulina. Dentro dos prazos de observação verificados, quando um só desses fatores exerceu sua ação, foi possível a sobrevivência, ainda que com menor número de unidades viáveis, mas quando 2 ou 3 desses fatores agiram simultaneamente, foi impossível recuperar a cultura. Ao contrário, resultados semelhantes aos obtidos em apenas 48 horas de conservação (crescimento profuso) foram verificados após 65 dias de conservação, quando *Chlorella* foi conservada simultaneamente sem contato com hemoglobina (em sôro + carvão), exposta à luz difusa do dia e em contato renovado com o ar, pela abertura periódica da mesma ampola para as sucessivas verificações semanais de viabilidade.

*Trypanosoma cruzi* — Foi observada sobrevivência de 43 dias para este protozoário em sangue, mas não em sôro; entretanto, aos 62 dias de conservação, já não foi mais possível obter cultura positiva.

Habitualmente as culturas de tripanosomas, em meio de MUNIZ & FREITAS, perdem a virulência através de repiques sucessivos por vários meses, como foi o caso da cultura

com que trabalhamos, mas, infelizmente, não foi feita prova de virulência antes de submeter a amostra ao processo de conservação. De qualquer modo, pode-se dizer, diante dos altos níveis de parasitemia em camundongos jovens que a amostra causou, depois de conservada em sangue durante 19 dias, pelo menos, que o processo preserva a virulência; determinações mais minuciosas de graus de virulência para tripanosomas, antes e durante o prazo de conservação, parecem oportunas.

#### COMENTARIOS

Numa publicação anterior (SOLÉ-VERNIN<sup>5</sup>) fizemos revisão bibliográfica sobre o emprêgo do sangue como meio de cultura e conservador de micróbios.

Devemos sobretudo a PERCHER<sup>3</sup> as observações mais sistemáticas de que se dispõe sobre a conservação de bactérias em geral por êsse processo. Suas observações tiveram o mérito de atingir prazos de 5, 10 e mais anos, mas o número de espécies e de amostras incluído foi muito limitado, quase sempre enterobactérias, e delas não foram fornecidas informações que os novos conhecimentos exigem. Uma reconsideração do processo à luz dos atuais conhecimentos, cobrindo ampla variedade de gêneros e de espécies, pareceu-nos justificável, e mesmo necessária, dada a acessibilidade de técnica.

Ao contrário de certos meios de cultura para os quais algum ingrediente poderia ser de obtenção limitada (peptonas de tipo especial, por exemplo), o sangue de coelho é de fácil obtenção, tem pH "já acertado" em "nível fisiológico" e apresenta acentuada uniformidade de composição. Sob o ponto de vista nutritivo pode ser considerado relativamente completo. Trata-se de tecido líquido cujas vantagens como elemento adicional a meios de cultura são clássicos em bacteriologia, sobretudo para germes patogênicos exigentes, promovendo o desenvolvimento microbiano.

Nas sucessivas provas de viabilidade de determinada cultura realizadas neste trabalho, o restante do conteúdo da ampola foi reaproveitado, transferindo-o para nova ampola. Seria interessante verificar a influência da aeração periódica da cultura em san-

gue decorrente desse reaproveitamento, à semelhança do que foi feito com *Chlorella*.

\*  
\* \*

Convém referir à parte um aspecto uniforme desses achados experimentais, referente à preservação, e mesmo reaquisição de fatores de patogenicidade.

Em todos os casos investigados, que incluem a quase totalidade das observações, registrou-se a manutenção, sem falhas, do grau de virulência ou dos fatores de patogenicidade: proteína "M" dos estreptococos  $\beta$ -hemolíticos do grupo A, prova de ANTON positiva para *Listeria*; prova de WELCH & NUTTAL para *Clostridium perfringens*, cápsula e virulência do pneumococo para o camundongo, estrutura antigênica de fase lisa nas enterobactérias patogênicas, antígeno "Vi" na *Salmonella typhi*, a fase I de LESLIE & GARDNER na *Bordetella pertussis*, a coagulase dos estafilococos, as provas de virulência do bacilo diftérico, a capacidade de produzir tuberculose generalizada em coabaia pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a capacidade do *Trypanosoma cruzi* de produzir altos níveis de parasitemia em camundongos. Mais ainda do que essa manutenção, verificamos, também, a reaquisição de antígeno K (do tipo B, termolábil) em amostras de *Shigella dysenteriae* A2 e A3, a devolução à termo-estabilidade de suspensões de *Escherichia coli* 055, a devolução à positividade da prova de coagulase para *Staphylococcus* e provavelmente, a exaltação de virulência de *Listeria monocytogenes* 4A à prova de ANTON.

Essas observações parecem indicar a possível utilidade do sangue como preservador dos fatores de patogenicidade, o que seria, sem dúvida, digno de observações mais detalhadas.

Com efeito, em microbiologia médica, a mais recente tendência de investigação preconiza (SMITH<sup>4</sup>) a necessidade de estudar os fatores de patogenicidade e a medida dos graus de virulência em micróbios "cultivados *in vivo*", estando claras as restrições dos resultados obtidos com populações microbianas desenvolvidas nos meios comuns de cultura.

O processo de conservação de micróbios no sangue (que é um tecido líquido animal, sem defesas *in vitro*, ou de defesas rapidamente em declínio) parece ser o modelo experimental que mais aproximadamente repeteria as condições do hospedeiro vivo, privado de defesa, na facilidade de uma cultura *in vitro*. Foi desse modo que HARRIS-SMITH, SMITH & KEPPIE<sup>2</sup> conseguiram demonstrar a produção de toxina pelo *Bacillus anthracis* que previamente só tinha podido ser reconhecido *in vivo*. Os nossos achados experimentais sugerem mais ampla significação desse gênero de pesquisa sobre fatores de patogenicidade e virulência microbianas.

\*  
\* \*

*Em síntese*, é possível conservar a viabilidade de amostras de diversas espécies microbianas por processos simples, de grande acessibilidade técnica, durante prazos superiores aos que habitualmente se estabeleceram como necessários (WEISS<sup>7</sup>) aos repiques periódicos em meios especiais de cultura. Os processos recomendados demonstraram preservar características microbianas importantes como as que se referem ao diagnóstico microbiológico preciso da espécie e a seus fatores de patogenicidade. Ainda tomando como termo de comparação os repiques periódicos nos meios especiais de cultura, verificamos que os processos estudados estão pouco sujeitos a contaminações (conclusão baseada em perto de 800 verificações de viabilidade), requerem muito pequeno espaço de armazenagem à temperatura ambiente e prestam-se melhor ao transporte de culturas, desde que sejam tomadas as medidas habituais recomendadas ao envio de micróbios pelo correio.

Assim, pode-se concluir pelos bons serviços que os processos estudados neste trabalho prestam em certas circunstâncias tecnológicas:

1) quando o repique muito freqüente não fôr possível, ou quando estiver contra-indicado;

2) quando houver contra-indicações de conservação sob óleo mineral estéril (transporte, etc.);

3) quando não se dispuser de algum processo de dessecação (liofilização, etc.).

#### SUMMARY

*Preservation of microbe cultures by simple techniques, with special regard to streptococci.*

Maintenance of microbe cultures demand preservation of the original features of samples and not only their viability. As regards medical microbiology, great importance is attached to those features that make for identification of a given sample and which are related to the pathogenicity factors. For a great many microbial strains lyophilization is the best preservation technique; nevertheless, it is not accessible to all laboratory technicians who might need it.

Our research involves observation of three preservation techniques whose basic feature is their technical accessibility: Microbial cultures or suspensions, 1) in sterile defibrinated fluid blood of normal rabbits; 2) in inactivated serum of normal rabbits, to which coal has or has not been added (especially for viruses); 3) in inactivated serum of normal rabbits, to which an equal amount of a half-and-half solution of egg yolk in saline has been added (especially for the genus *Mycobacterium*).

The cultures were kept in flame-sealed 1 ml ampules, at room temperature and in the dark.

423 samples of microbes pertaining to a number of families, genres and species have been observed. Among these there were 367 bacteria (streptococci numbering 222), 6 viruses, 48 fungi and yeasts, 1 green alga and 1 protozoan.

The most protracted continuous lapse of observation time has been of 29 months (for streptococci). The microbial features of taxonomic importance and those related to the pathogenicity factors have all of them been preserved during the viability period; besides, there were some cases where re-acquisition of features was observed, as it usually happens through *in vivo* inoculations.

AGRADECIMENTOS

O Autor deseja expressar os seus agradecimentos ao Dr. Laerte de Andrade (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Estado da Guanabara), por ter chamado sua atenção para o processo de conservação em sangue; ao Prof. Carlos da Silva Lacaz (Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P.), pela leitura crítica do trabalho e pelo reconhecimento dos caracteres morfológicos dos cogumelos; à Dra. Elaine L. Updyke ("Communicable Disease Center", Chamblee, Georgia, USA), pela grupalagem e tipagem dos estreptococos; ao Dr. Renato Piza de Souza Carvalho (Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P.), pelas observações do efeito citopatogênico dos vírus; ao Dr. Luiz R. Traubsi (Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P.), pelo auxílio nas aglutinações das enterobactérias; ao Dr. Rosalvo Guidolin (Instituto Pinheiros, São Paulo), pelas verificações de virulência de *Bordetella pertussis*. E, por fim, aos numerosos colegas que generosamente lhe ofereceram amostras de micróbios para observações.

REFERÊNCIAS

1. ENGLELY Jr., F. B. — The persistence (survival) of microorganisms. III. In culture media. Texas Rep. Biol. & Med. 14:114-203, 1956.
2. HARRIS-SMITH, P. W.; SMITH, H. & KEPPIE, J. — Production *in vitro* of the anthrax toxin previously recognized *in vivo*. J. gen. Microbiol. 16:viii, 1957.
3. PERGHER, G. — La conservazione dei microbi asporigeni in sangue. Ann. Igiene 37: 438-445, 1927.
4. SMITH, H. — The use of bacteria grown *in vivo* for studies on the basis of their pathogenicity. Ann. Rev. Microbiol. 12:77-102, 1958.
5. SOLE-VERNIN, C. — Contribuição para o estudo da conservação de culturas microbianas, com especial referência aos estreptococos. São Paulo, 1960. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.
6. UPDYKE, E. L. — Comunicação pessoal, 1959.
7. WEISS, F. A. — Maintenance and preservation of cultures. (In Society of American Bacteriologists — Manual of microbiological methods. New York, McGraw-Hill, 1957. p. 99-119; 106-107).

Recebido para publicação em 20 novembro 1960.