

MEIOS DE CULTURA ECONÔMICOS PREPARADOS PELA DIGESTÃO TRÍPTICA DA CARNE, SEGUNDO HOTTINGER

ETTORE RUGAI

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Péré, em 1892, demonstrou o valor da caseína digerida pela tripsina, como meio de cultura para a produção de indol pelo bacilo coli.

Peckham, em 1893, usando carne em vez de caseína, confirmou os trabalhos de Péré.

Entretanto, foi Hottinger que, em 1912, após estudos mais amplos, divulgou o uso do produto total da digestão tríptica da carne, em diluição conveniente, para substituir o caldo comum. Por isso, esse meio é conhecido hoje, como Caldo pancreático de Hottinger.

Posteriormente, vários autores preparavam meios semelhantes: Dalimier, 1913; Douglas, 1914; Cole e Onslow, 1916; Cunningham, 1918; Norris, 1918-19-20; Angerer, 1921; Hermann, 1934.

Angerer que recebera de Heim a incumbência de preparar um meio de cultura econômico, em face das dificuldades por que passava a Alemanha após a guerra de 1914, encontrou no meio de Hottinger a solução plena do problema. Verificou, ainda, que a carne de peixe pode substituir a de vaca.

Hermann usou testículos do touro para provas de fermentação, por serem pobres em açúcar e produzirem um meio incolor que permite observar, com facilidade, a viragem do indicador.

Os autores citados descreveram meios visando a cultura de germes pouco exigentes; em geral do grupo coli-tifo-paratífico. São meios mais ou menos especializados. Não se pode, por esse motivo, sem outros estudos, lançar mão deles para usos gerais de laboratório. Exceção feita, todavia, dos trabalhos de Angerer que incluiu germes mais delicados — estreptococos, pneumococos, diftéricos. E isto é muito importante porque, os meios à base de digestos trípticos são ricos em aminoácidos que constituem arma de dois gumes. Fonte preciosa de nitrogênio e de assimilação fácil, estimulam a mul-

tiplicação dos germes; mas ultrapassados certos limites de concentração, tornam-se tóxicos, principalmente para os germes mais sensíveis acima citados. É o que demonstraram Wyon e McLeod em 1923 e Gordon em 1923-26. É surpreendente, dizem aqueles autores, que os que propõe digestos trípticos para meios de cultura não se refiram ao poder inibiente dos aminoácidos.

O momento oportuno para se interromper a digestão não foi muito considerado. É porem indispensável; seja para garantir o crescimento de maior número possível de espécies bacterianas, seja para estandarização do meio.

Hottinger acompanha o andamento da digestão pela pesquisa do triptófano com água bromada. Manda digerir até determinada intensidade da reação, conforme o fim que se tem em vista. Esta reação tem valor como qualitativa e não pode, portanto, indicar com precisão o grau de digestão. Resulta deste fato que as diversas partidas de meios podem apresentar muita diferença entre si.

Angerer, baseando-se no poder tampão dos aminoácidos, avalia o grau de digestão pela quantidade de solução N/10 de HCl necessária para baixar o pH do ponto de viragem da fenolftaleína ao ponto de viragem do vermelho de metila. Não indica, porém, o momento ótimo para cortar a digestão.

Mais preciso é o método de dosagem dos aminoácidos por meio do formol, segundo Sörensen. É o método que adotamos no presente trabalho.

A digestão tríptica da carne também foi empregada para produção de toxina diftérica, com bons resultados, por: Hartley, 1922; Watson e Wallace, 1923; Watson e Langslaff, 1927; Gibs e Rettger, 1927; Pope e Smith, 1932; Pope e Healey, 1933; Pope e Linggood, 1939; Linggood, 1939-41.

Considerando as vantagens técnico-econômicas que o meio de Hottinger oferece, empreendemos estudos no sentido de verificar si é possível o seu emprego em substituição ao caldo e agar comuns. Após inúmeras provas e algumas modificações, conseguimos o nosso desideratum.

O meio é de grande interesse porque dispensa as peptonas comerciais e reduz grandemente a quantidade de carne que seria necessária para preparar igual quantidade de caldo ou agar comuns.

Antes de entrarmos na parte técnica julgamos de interesse comentar os seguintes tópicos:

1) Fermento digestivo: à pancreatina comercial, de atividade variável e as vezes negativa, preferimos usar a mistura de diver-

os pâncreas de porco, cuja atividade é sempre garantida e mais uniforme. Cunningham usa o pâncreas de carneiro e cabra.

Não se deve usar o pâncreas muito fresco porque, encerrando a tripsina ainda sob a forma de tripsinogênio, é de pouca atividade. A conservação em geladeira durante alguns dias aumenta muito sua atividade pela libertação do enzima proteolítico.

2) Momento oportuno para interromper a digestão: a ação do fermento tríptico é acompanhada pela dosagem dos aminoácidos pelo método do formol, de Sörensen. O resultado é expresso em centímetros cúbicos de solução normal de soda ou em miligramas de nitrogênio amínico por cento. Quando a concentração dos aminoácidos atingir ao valor correspondente a 25-28 cc. de soda normal ou a 0,350 a 0,392 mlgr. de nitrogênio por cento, deve-se interromper a digestão. (Estes dados têm valor para a relação de 1 quilo de carne e 1.500 cc. de água conforme a técnica adiante descrita).

E' necessário observar este limite para garantir o crescimento de estreptococos, pneumococos e diftéricos, germes estes sensíveis à concentrações muito elevadas de aminoácidos.

Os germes do grupo coli-tifo-paratifo-disentérico, desenvolvem-se abundantemente mesmo quando aquele limite atingir a 40 ou mais cc. de soda normal.

Menção especial merece o bacilo tífico, para o qual o meio de digestão bem avançada é de grande valor.

3) Interrupção da digestão: O aquecimento para interromper a digestão deve ser feito em banho Maria ou em autoclave a vapor corrente. (O aquecimento direto altera as propriedades nutritivas do meio), e em pH 6.0. Neste pH além de ser mais fácil a filtração e clarificação da solução, são libertados os ácidos gordurosos insolúveis, dos sabões alcalinos solúveis que se formaram da gordura do pâncreas e da carne com o álcali. A filtração deve ser feita em papel molhado e após completo resfriamento do líquido para eliminação mais fácil desses ácidos.

A alta toxidez dos sais sódidos dos ácidos olêico, linolêico e linolinêico, para os pneumococos, conforme foi demonstrado por Lamar, 1911 e Falk e Yang, 1926, e as nossas próprias observações, justificam plenamente a técnica que indicamos.

4) Estandartização: Não é possível em duas operações de digestão, mesmo quando executadas em condições aparentemente idênticas, chegar-se a um resultado perfeitamente igual. Daí a

necessidade de estandarização para que as diversas partidas de meio sejam, quanto possível, uniformes. Para esse fim, adotamos o método proposto por Ashenshow que, pela simplicidade, está ao alcance de qualquer laboratório.

E' baseado na dosagem da matéria orgânica pelo permanganato de potássio. O resultado é expresso em gramas de oxigênio por cento.

Quanto maior fôr a quantidade de albumina digerida, maior quantidade de oxigênio será absorvida. Este valor nos indicará em que diluição será usada a solução mãe, para se obter um meio que encerre sempre a mesma riqueza em matéria orgânica.

Para casos especiais — pesquisa de indol, pesquisa de pigmentos — a diluição da solução mãe pode ser até de 1 para 50 ou mais, com relação ao peso da carne digerida.

Para o nosso caso porém, que deve conciliar vários problemas, a diluição varia entre 1:12 e 1:15, conforme correu a digestão. Estabelecemos para o caldo e para o agar a concentração de 0,8% em matéria orgânica computada em oxigênio.

Por parte dos compostos resultantes da clivagem das albuminas — albumoses, peptonas, polipeptídios e aminoácidos, — a diluição poderia ser bem mais elevada sem prejudicar as qualidades nutritivas do meio. O mesmo não acontece porém, com as substâncias extrativas da carne — Xantina, hipoxantina, carnina, carnosina, creatina, arginina, guanidina, metil-guanidina, glicose, inosita, vitaminas, compostos orgânicos de fósforo, etc., que não aumentam pelo processo digestivo, atingindo logo os limites mínimos de concentração, importante sob o duplo aspecto: fisiológico, pelo valor nutritivo que apresentam alguns elementos, como demonstraram Armand-Delille e outros, 1912; Meyer e Schoeffer, 1919; e Mueller, 1922; e fisico-químico, pela ação da tamponagem.

TÉCNICA PARA PREPARAÇÃO DO MEIO

1) Digestão da carne:

1. carne	1.000,0 gr.
2. água destilada	1.500,0 ml.
3. carbonato de sódio anidro	8,0 gr.
4. pâncreas de porco	150,0 gr.

Cortar a carne em pedaços do tamanho de um dedo. Mergulhá-la, aos poucos, nos 1.500 ml. de água fervente. Esperar a

fervura romper suavemente, mantendo-a 5 minutos, para destruir os fermentos antitripticos. Separar a carne picá-la à máquina. Misturar com água de fervura e colocar tudo em um balão de 2 litros. Arrefecer. Ajuntar o carbonato de sódio e o pâncreas livre de gordura o mais possível e reduzido a polpa. Ajuntar 15 cc. de clorofórmio e 10 cc. de toluol. Agitar energicamente. Encubar a 37°C.. Agitar frequentemente, durante a digestão.

O tamanho dos pedaços de carne vai diminuindo conforme avança a ação do fermento.

Atingida a concentração desejada em aminoácidos, forma-se um líquido amarelado sobre-nadando um resíduo pulverulento, constituído por substâncias indigeríveis.

Decorridas 20 horas de digestão, faz-se a dosagem dos aminoácidos pelo método de Sørensen, como segue:

Tomar 25 ml. de líquido e acidificar com uma gota de ácido acético glacial, colocar em um tubo 18x180, aquecer em banho Maria 10 minutos, Filtrar em papel. Em um balão de Erlenmeyer, colocar:

1. líquido filtrado	10,0 ml.
2. água destilada	15,0 ml.
3. Fenoltaleína, sol. alcoólica a 1% ..	3 gotas

Neutralizar com solução normal de soda até coloração levemente rósea e ajuntar 10 ml. da diluição em partes iguais de formalina e água destilada (solução de formol do comércio que encerra de 36-38% de HCOH), também neutralizada com solução normal de soda em presença de fenoltaleína até coloração rósea.

Feita a mistura, a cor rósea desaparece em face da acidez que se desenvolve pela combinação entre o aldeído e os grupos amínicos dos aminoácidos, destruindo-lhes a função "básica" característica com subsequente exaltação da função "ácido".

Por meio de uma bureta graduada ajunta-se agora uma solução N/10 de soda, até voltar a cor rósea primitiva. Anotar o nº de cc. de reativo empregado. Si o valor for inferior a 25, continua-se a digestão e si estiver entre 25-28, deve-se interrompê-la.

2) Interrupção da digestão:

Acidificar a mistura com solução normal de HCl até ao pH 6.0. Aquecer em banho maria ou em autoclave a vapor fluente 15 minutos. Esfriar completamente. Filtrar em papel previamente molha-

do. Filtra um líquido amarelo-esverdeado, pronto para dosagem da matéria orgânica e que constitue a solução mãe para os meios de cultura.

3) Dosagem da matéria orgânica:

Em balão de Erlenmeyer de 250 ml. colocar:

1. Solução mãe diluída a 10%	1,0 ml.
2. Água destilada	50,0 ml.
3. Sol. de ácido sulfúrico a 25%	10,0 ml.
4. Sol. N/10 de permanganato de potássio	15,0 ml.

Aquecer em banho maria fervente 30 minutos. Retirar do banho e ajuntar 15,0 ml. de solução N/10 de ácido oxálico. A cor aroxeadada da solução desaparece. Aquecer a 70-80°C. e por meio de uma bureta graduada gotejar solução N/10 de permanganato de potássio até aparecimento de cor rósea persistente. O número de centímetros cúbicos de permanganato empregados multiplicado por 0,8, dará a matéria orgânica por cento expressa em oxigênio.

Damos em seguida as propriedades de uma das partidas de solução mãe que preparamos partindo de 1 Kl. de carne:

Volume	1.800 cc.
Cor — amarelo-esverdeado.	
Cheiro — agradável.	
Aspécto — límpido quando recentemente preparado (com o tempo turva-se pela cristalização da tirosina).	
Densidade — 1038.	
Reação do triptófano — positiva (forte).	
Meia saturação com sulfato de amônio — turvação.	
Saturação completa com sulfato de amônio — pequeno precipitado.	
Aminoácidos em cc. de solução de soda normal — 26%.	
Matéria orgânica em gramas de oxigênio — 5,33%.	
Extrato seco a 100°C. 2 horas — 9,5%.	

Esta solução pode ser guardada em frascos estéreis, em presença de clorofórmio e em sítio fresco, anotando-se o volume e o título, para ser usada conforme a necessidade.

Para preparar um meio com determinada porcentagem de matéria orgânica, podemos lançar mão da fórmula geral:

$$V \div \frac{T}{t} = x$$

onde V é o volume do meio desejado, T o título da solução mãe em matéria orgânica, t é o título desejado para o meio e x é o volume a se tomar. Portanto, com a solução acima mencionada teremos:

$$1000 \div \frac{5.33}{0,8} = 150 \text{ ml. de solução, para um litro e}$$

meio com 0,8% em matéria orgânica.

Com um quilo de carne que nos deu 1.800 ml. de solução, podemos preparar:

$$\frac{5.33 \times 1.800}{0,8} = 11.992 \text{ ml. de caldo ou agar.}$$

PREPARAÇÃO DOS MEIOS

C A L D O

1. Solução mãe q.s.p.	0,8% em mat. org.
2. Fosfato dipotássico	1,0 gr.
3. Cloreto de sódio	7,0 gr.
4. Água destilada q.s.p.	1000,0 ml.

pH 7.6. — Esterilização 25' a 115°C.

- Tomar a quantidade de solução mãe calculada pela fórmula acima mencionada.
- Completar 1.000 ml. com água destilada.
- Ferver 10 minutos para eliminar o clorofórmio.
- Ajuntar o cloreto e o fosfato di-potássico.
- Ajustar ao pH 7.6.
- Ferver 5 minutos.
- Filtrar. Completar 1.000 ml.
- Distribuir conforme a necessidade.
- Esterilizar 25 minutos a 115°C.

A G A R

1. Solução mãe q.s.p.	0,8% de mat. org.
2. Fosfato di-potássico	1,0 gr.
3. Cloreto de sódio	7,0 gr.
4. Água destilada q.s.p.	1000,0 ml.
5. Agar	25,0 gr.

pH 7.6. Esterilização 25' a 115°C.

- a) Seguir a técnica da preparação do caldo até o tempo e) inclusive.
- b) Ajuntar o agar.
- c) Autoclavar 25 minutos a 120° C.
- d) Filtrar em algodão. Completar 1.000 ml.
- e) Distribuir conforme a necessidade.
- f) Esterilizar 25 minutos a 115°C.

VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MEIOS

Estes meios foram estudados comparativamente com o caldo e agar comuns, preparados com peptona de carne "Merck", seca. O caldo foi preparado com a infusão da carne residual da infusão concentrada.

CALDO

O crescimento nos meios líquidos foi avaliado por nefelometria com o auxílio da escala de Mac Farland. Incubação de 24 horas a 37°C. com exceção das brucelas que foram incubadas 72 horas. O quadro I expressa os resultados.

QUADRO I

CRESCIMENTO EM CALDO COMUM E CALDO HOTTINGER

ESPÉCIE BACTERIANA	CRESCIMENTO EM CALDO	
	comum	Hottinger
<i>E. typhosa</i> — 4446 — Inst. Lister	7 (1)	8
<i>E. typhosa</i> — 901-H — Inst. Lister	7	8
<i>E. typhosa</i> — 1586 — Isolada de hemocultura neste Instituto	8	8
<i>E. typhosa</i> — 1615 — Isolada de hemocultura neste Instituto	6	7
<i>S. paratyphi</i> — Kauffman	3	4
<i>S. Schottmülleri</i> — Inst. Lister	4	4
<i>S. dysenteriae</i> — amostra Parkar — Inst. Lister	3	4
<i>S. dysenteriae</i> n.º 49 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. dysenteriae</i> n.º 102 — Isolada neste Instituto ..	3	4
<i>S. dysenteriae</i> n.º 103 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. dysenteriae</i> n.º 547 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra Oxford — Inst. Lister	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra Willesden — Inst. Lister	5	6

ESPÉCIE BACTERIANA	CRESCIMENTO EM CALDO	
	comum	Hottinger
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra n.º 34 — Isolada neste Instituto	5	5
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra n.º 513 — Isolada neste Instituto	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Y. Hiss) amostra Northampton — Inst. Lister	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Y. Hiss) amostra n.º 70 — Isolada neste Instituto	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Y. Hiss) amostra n.º 24 — Isolada neste Instituto	3	3
<i>S. ambigua</i> — 836 — Depart. Nacional de Saúde Pública	4	4
<i>S. ambigua</i> — 795 — Instituto Biológico	3	4
<i>S. ambigua</i> — n.º 83 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. alcalescen</i> — grupo A — Dr. Arlindo de Assis	3	4
<i>S. alcalescen</i> — grupo B — Dr. Arlindo de Assis	3	4
<i>S. alcalescen</i> — n.º 362 — Isolado neste Instituto	4	5
<i>S. alcalescen</i> — n.º 133 — Isolado neste Instituto	4	4
<i>E. coli</i> — 77 — Isolada de fezes humanas, neste Instituto	6	7
<i>B. melitensis</i> — Isolado por Mazza — Argentina	1	1
<i>B. abortus</i> — recebido do Depart. Industr. Animal	1	1
<i>B. abortus</i> — amostra 456 — Wash. Hig. Laboratory	1	1
<i>B. suis</i> — recebido do Dr. Carini	2	2
<i>P. aviseptica</i> — 151 — Inst. Pasteur, Paris	3	3
<i>P. bovisseptica</i> — 1287 — Inst. Lister	3	3
<i>P. suisseptica</i> — 2417 — Inst. Lister	3	3
<i>P. leipseptica</i> — 2417 — Inst. Lister	3	3
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 23	2	2
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 25	2	2
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 30	2	3
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 16 — Isolado de hemo- cult. neste Inst. (2)	5	5
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 1108 — Isolado de hemo- cult. neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 1109 — Isolado de hemo- cult. neste Inst.	6	6
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 1068 — Isolado de hemo- cult. neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. scarlatinae</i> Dochez — Inst. Lister	3	3
<i>Streptoc. penfigo</i> — 58 — Isolado pelo Dr. B. M. Mourão	5	5
<i>Streptoc. penfigo</i> — 71 — Isolado pelo Dr. B. M. Mourão	3	3

ESPÉCIE BACTERIANA	CRESCIMENTO EM CALDO	
	comum	Hottinger
<i>Streptoc. pyogenes</i> — 4549 — Instituto Lister	3	3
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 1 — Isolado de hemocultura neste Inst.	4	4
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 2 — Isolado de amígdala neste Inst.	6	6
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 3 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 4 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 5 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	4	4
<i>Streptoc. hemolyticus</i> n.º 6 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	5	5
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Tipo I — Dep. of Health City New York	4	4
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Tipo II — Dep. of Health City New York	4	4
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Tipo III — Dep. of Health City New York	4	5
<i>C. diptheriae</i> — Park Willians n.º 8	3	3
<i>C. diptheriae</i> n.º 44 — Isolado neste Instituto	3	3
<i>C. diptheriae</i> n.º 418 — Isolado neste Instituto ..	3	3
<i>C. diptheriae</i> n.º 409 — Isolado neste Instituto ..	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> n.º 183 — Isol. de abcesso neste Instituto	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> n.º 791 — Isol. de hemocult. neste Instituto	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i> n.º 512 — Isol. de meningite neste Instituto	5	4

O caldo de Hottinger revelou-se idêntico ou superior em 96,79% dos casos. Quando o caldo comum apresentou maior crescimento, ainda o desenvolvimento no caldo Hottinger não deixou a desejar.

(1) Os números correspondem aos números dos tubos da escala de McFarland, de sulfato de bário, dos quais mais se aproxima a turvação da cultura.

(2) Para estreptococos e pneumococos foram empregados meios com 1% de glicose, adicionada asseticamente.

PESQUISA DE INDOL

Como ficou demonstrado por Péré, o meio, pela riqueza de triptófano, é ótimo para prova do indol. A comparação foi feita com água peptonada preparada com peptona Park Davis e com triptona Difco. Incubação de 24 horas para os germes indológenos e de 5 dias para os anidológenos. Pesquisa de indol pelo método de Ehrlich.

QUADRO II

PESQUISA DE INDOL

	N. de amostras empregadas	Água peptonada c/ Pep. Park Davis	Água peptonada c/ Bacto triptona Difco.	Caldo de Hottinger	Concordância
<i>S. ambigua</i>	35	+	+	+	100%
<i>Pasteurelas</i> diversas — (av. bov. suis. lepis.)	51	+	+	+	100%
<i>E. coli</i>	70	+	+	+	100%
<i>S. alcalescen</i>	6	+	+	+	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Flexner"	4	—	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Flexner"	3	+	+	+	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Y Hiss"	5	—	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Y Hiss"	3	+	+	+	100%
<i>B. abortus melitensis suis</i> .	6	—	—	—	100%
<i>S. dysenteriae</i>	5	—	—	—	100%
<i>P. pseudotuberculosis</i>	4	—	—	—	100%

Houve concordância em 100% dos casos. As reações positivas foram sempre intensas após 24 horas e de intensidade nunca inferior às reações obtidas com a peptona Park Davis e triptona Difco.

PESQUISA DE MOVIMENTO DAS BACTÉRIAS

O movimento foi pesquisado após 24 horas de crescimento em temperatura ambiente.

O quadro III expressa os resultados.

QUADRO III

PESQUISA DE MOVIMENTO

ESPÉCIES BACTERIANAS	N. de amostras	Culturas em caldo		Concordância
		comum	Hottinger	
<i>E. typhosa</i>	50	+	+	100%
Salmonelas diversas	58	+	+	100%
<i>E. coli</i>	30	+	+	100%
Pasteurelas (av. bov. suis lep.)	46	—	—	100%
<i>S. dysenteriae</i>	5	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Flexner"	8	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Y Hiss"	11	—	—	100%
<i>S. ambigua</i>	33	—	—	100%

Os resultados foram completamente satisfatórios e concordantes em 100% dos casos.

Para o agar a comparação foi feita pela técnica da contagem em placas. Semeaduras feitas de diluições convenientes da cultura em caldo comum. Incubação de 24 horas a 37°C. com exceção das brucelas que foram incubadas 72 horas. O quadro IV. expressa os resultados.

QUADRO IV

CONTAGEM EM PLACAS DE AGAR COMUM E DE AGAR DE HOTTINGER

	CONTAGEM EM AGAR	
	comum	Hottinger
<i>E. typhosa</i> — 4446 — Inst. Lister	90	110
<i>E. typhosa</i> — 901-H — Inst. Lister	110	122
<i>E. typhosa</i> — 1576 — Isolado de hemocultura neste Instituto	70	81
<i>E. typhosa</i> — 1515 — Isolado de hemocultura neste Instituto	151	162
<i>S. Paratyphi</i>	72	75
<i>S. Schottmülleri</i>	94	96
<i>S. dysenteriae</i> Parker — Inst. Lister	87	90
<i>S. dysenteriae</i> 49 — Isolado neste Instituto ..	62	70
<i>S. dysenteriae</i> 102 — Isolado neste Instituto ..	203	210
<i>S. dysenteriae</i> 103 — Isolado neste Instituto ..	108	112

	CONTAGEM EM AGAR	
	comum	Hottinger
<i>S. dysenteriae</i> 547 — Isolado neste Instituto ..	120	128
<i>S. pardysenteriae</i> "Fleener" — Oxford — Inst. Lister	123	129
<i>S. paradysenteriae</i> "Fleener" — Willesden — Inst. Lister	110	120
<i>S. paradysenteriae</i> "Fleener" 34 — Isolada neste Instituto	93	97
<i>S. paradysenteriae</i> "Fleener" 513 — Isolada neste Instituto	68	72
<i>S. Paradysenteriae</i> "Y. Hiss" Northampon — Inst. Lister	215	223
<i>S. paradysenteriae</i> "Y. Hiss" 70 — Isolado neste Instituto	140	151
<i>S. paradysenteriae</i> "Y. Hiss" 24 — Isolado neste Instituto	94	93
<i>S. ambigua</i> — 836 — D. N. S. P.	183	147
<i>S. ambigua</i> — 795 — Inst. Biológico	62	71
<i>S. ambigua</i> — 83 — Isolada neste Instituto	72	81
<i>S. alcalescen</i> — grupo A — Dr. Arlindo de Assis	92	98
<i>S. alcalescen</i> — grupo B — Dr. Arlindo de Assis	115	130
<i>S. alcalescen</i> — 362 — Isolada neste Instituto ..	98	110
<i>S. alcalescen</i> — 133 — Isolada neste Instituto ..	140	162
<i>B. abortus</i> — recebido do Depart. de Industr. Animal	117	126
<i>B. abortus</i> — amostra 456 — Wash. Hyg. Lab. ..	72	60
<i>B. melitensis</i> — Isolado por Mazza — Argentina	63	50
<i>B. suis</i> — Recebido do Laboratório do Dr. Carini	110	96
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 23	56	60
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 24	128	136
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 25	117	122
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 30	70	76
<i>Staphylococcus aureus</i> — 791 — Isolado neste Inst. de hemocultura	93	90
<i>Staphylococcus aureus</i> — 183 — Isolado neste Inst. de abscesso	120	130
<i>Staphylococcus aureus</i> — 512 — Isolado neste Inst. de meningite	110	118

Em 86,12% dos casos, o agar de Hotinger foi igual ou superior.

As Brucelas mostraram preferência pelo agar comum mas desenvolveram-se perfeitamente no agar de Hottinger.

A aglutinabilidade do bacilo tífico em presença do soro específico não sofreu alteração pela cultura em agar de Hottinger. A verificação foi feita após 22 passagens, com antígeno vivo e aquecido a vapor fluente 1 hora. Ver quadros V e VI:

QUADRO V

AGLUTINAÇÃO COM ANTÍGENO VIVO

AMOSTRA DE GERMES	TÍTULO DE AGLUTINAÇÃO COM GERMES CULTIVADOS EM AGAR:	
	<i>comum</i>	<i>Hottinger</i>
<i>E. typhosa</i> 901 — Inst. Lister	25.600	25.600
<i>E. typhosa</i> n.º 23 — Isolada neste Inst.	25.600	25.600

QUADRO VI

AGLUTINAÇÃO COM ANTÍGENO AQUECIDO

AMOSTRA DE GERMES	TÍTULO DE AGLUTINAÇÃO COM GERMES CULTIVADOS EM AGAR:	
	<i>comum</i>	<i>Hottinger</i>
<i>E. typhosa</i> 901 — Inst. Lister	6.400	6.400
<i>E. typhosa</i> n.º 23 — Isolada neste Inst.	3.200	3.200

Numerosas provas de crescimento em superfície foram feitas com todos os germes usados nas provas anteriores. O resultado nunca deixou a desejar. Vinte amostras de meningococos (culturas de estoque), desenvolveram-se bem no agar em 24 horas, sem adição de líquidos albuminosos.

Adicionado de 5% de sangue de coelho, o agar produz bom crescimento com estreptococos, pneumococos, gonococos, bacilo pertussis, bacilo de Pfeifer.

As provas de hemólise em placas não são prejudicadas.

CONCLUSÃO

O digesto triptico da carne pode ser empregado, com vantagens, tanto sob a forma líquida como sólida, para usos gerais de laboratório, em substituição ao caldo e agar comuns, desde que sejam observados certos detalhes de técnica que descrevemos na sua preparação.

Para a indústria farmacêutica é de incontestável valor na preparação de vacinas e buco-vacinas, pelo seu alto valor nutritivo e baixo custo.

RESUMO

1) O autor descreve a técnica para preparação do caldo e do agar de Hottinger e estabelece o método para a estandarização dos mesmos.

2) Verificou pela cultura de numerosas espécies bacterianas — *E. typhosa*, *S. paratyphi*, *S. Schottmülleri*, *S. dysenteriae*, *S. ambigua*, *S. paradysenteriae*, *S. alcalescens*, *C. diptheriae*, *B. abortus*, *B. militensis*, *B. suis*, *S. aureus*, *S. hemolyticus*, *S. viridans*, *D. pneumoniae*, *N. intracellularis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *H. pertussis*, — que os meios tem grande valor nutritivo.

3) O meio líquido é ótimo para prova do indol.

4) A aglutinação da *E. typhosa* em presença de soro específico não sofreu alteração após 22 passagens em meio sólido.

5) Estes meios podem substituir com vantagem o caldo e o agar comuns.

SUMMARY

1) The A. described the technic of the preparation of the Hottinger's broth and agar, stablishing the method for their standardization.

2) By the cultivation of numerous species of bacteria he verified the media has high nutrient value.

3) The fluid medium is excellent for the indol test.

4) After 22 successive transfers on the solid medium, in presence of specific immune serun, the agglutination of the *E. typhosa* has not undergone alteration.

5) The media may, with advantage, replace the plain broth and agar.

AGRADECIMENTOS

Não queremos furtar-nos ao dever de agradecer: ao Dr. Bruno Rangel Pestana, pelo apoio que nos deu na execução deste trabalho; à D. Ruth de Lima Correa, pelas dosagens de matéria orgânica; ao Dr. B. M. Mourão pelas amostras de estreptococos que nos enviou por intermédio do Dr. Augusto Taunay; ao Dr. Ariosto Büller Souto, que nos cedeu as amostras de gonococos; e, ao pessoal técnico desta sub-seção de meios de cultura, pelo auxílio técnico que nos prestou.

BIBLIOGRAFIA

- ASHENSHOW, 1941, *Canadian Publ. Health Journ.*, 32, 468.
 COLE, S. W. e ONLOW, H., 1916, *The Lancet*, 2, 9.
 CUNNINGHAM, J., 1918, *Ind. Med. Journ. Res.*, 6, 147.
 DALIMIER, R. e LANCERAUX, E., 1913, *Presse Medic. Par.*, 21, 419.
 DELILLE, Armand, e outros, 1912, *C. Rendus Ac. Sic.*, 154, 537.
 DOUGLAS, S. R., 1914, *The Lancet*, 2, 891.
 FALK, K. S. e YANG, S. Y., 1926, *Jour. Infec. Dis.*, 38, 8.
 GORDON, J., 1924, *Journ. Path. Bact.*, 27, 123.
 GORDON, J., 1926, *Idem*, 29, 14.
 HARTLEY, P., 1922, *Jour. Path. Bact.*, 25, 479.
 HEIM, L., 1922, *Lehrbuch der Bakteriologie*, 114
 HERRMANN, L., 1934, *Zentralblat f. Bakter. Orig.*, 132, 148.
 HOTTINGER, R., 1912, *Zentralblat f. Bakter. Orig.*, 67, 178.
 HOTTINGER, R., 1912, *Rev. Med. de São Paulo*, 232.
 HOTTINGER, R. e PAULA SOUZA, 1916, *Rev. Med. Inst. Oswaldo Cruz*, 17, 10 e 213.
 LAMAR, V. R., 1911, *The Jour. Exper. Med.*, 13, 1.
 LAMAR, V. R., 1911, *Idem*, 13, 380.
 LINGGOOD, R. V., 1939, *Brit. Journ. Exp.*, 20, 502.
 LINGGOOD, R. V., 1941, *Idem*, 22, 255.
 MEYER, A. e SCHOEFFER, G., 1919, *C. Rendus Soc. Biol.*, 82, 113.
 NORRIS, D., 1918, *Ind. Journ. Med. Res.*, 6, 174.
 NORRIS, D., 1918, *Idem*, 6, 569.
 NORRIS, D., 1919, *Idem*, 7, 536.
 NORRIS, D., 1920, *Idem*, 704.
 MUELLER, J. W., 1922, *Journ. Bact.*, 7, 309.
 NOGUCHI, H., 1907, *Bioch. Zeitsch*, 6.
 PECKHAM, A. W., 1893, *Journ. Exp., Med.* 2, 549.
 PÉRÉ, M. A., 1892, *An. Inst. Pasteur*, 6, 512.
 POPE, C. G., e LINGGOOD, F. V., 1933, *Brit. Journ. Expr. Path.*, 14, 77.
 POPE, C. G., e SMITH, M. L., 1932, *Journ. Path. Bact.*, 35, 573.
 POPE, C. G., e HEALEY, M., 1939, *Brit. Journ. Exper. Path.*, 20, 213.
 WATSON, A. F. e WALLACE, V., 1923, *Journ. Path. Bact.*, 26, 447.
 WATSON, A. F., e LANGSLAFF, E., 1927, *Journ. Path. Bact.*, 30, 383.
 WYON, C. A., e MAC LEOD, J. U., 1923, *Journ. Hyg.*, 21, 376.