

PREPARO DE ANTÍGENOS BACTERIANOS PELA TÉCNICA DE CULTIVO COM AREJAMENTO DE SUPERFÍCIE

Rolando CURY *

RFMVA-5

CURY, R. — *Preparo de antígenos bacterianos pela técnica de cultivo com arejamento de superfície. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 9:63-72, 1972.*

RESUMO — *A presença de elevada porcentagem de formas lisas de bactérias (formas S) nas culturas, constitui um dos fatores importantes de eficiência dos antígenos.*

É possível obter culturas nessas condições, pela técnica de cultivo em meio sólido com arejamento de superfície, mesmo partindo de um inóculo onde o número percentual de formas lisas seja reduzido.

Essa técnica de cultivo, sendo indicada para a semeadura final, poderá ser usada isoladamente, ou, melhor ainda, em associação com algum dos métodos já citados na literatura que visaram obter inóculos isentos, ou quase isentos, de formas rugosas e semi-rugosas de bactérias.

UNITERMOS: *Arejamento, superfície*; Antígenos bacterianos*; Cultivo*;*

É importante, no preparo de antígenos bacterianos para trabalhos de sorologia, mormente no caso de antígenos somáticos, usar somente germes de colônias lisas (S)³⁶, excluindo, tanto quanto possível, os germes de colônias rugosas (R) ou parcialmente rugosas (SR).

A instabilidade em soluções salinas^{3, 4, 5}, e as alterações da especificidade antigênica, associadas a outras mudanças das características do germe^{9, 11, 29, 30, 40, 53}, fazem com que seja indesejável a presença de formas R ou SR de bactérias num antígeno, uma vez

que a presença dessas formas induziria a erros de interpretação numa reação antígeno-anticorpo^{22, 23, 24, 32, 37}.

Vários artifícios têm sido propostos para evitar, ou pelo menos diminuir, a presença dessas formas R e SR, entre as quais: seleção mecânica, com alça de platina (e repique), de colônias lisas de culturas em meio sólido, em placas de Petri submetidas a transluminação adequada^{15, 35}; crescimento em presença de soro anti-R^{27, 28, 44}; cultura em soro fresco ou plasma normal de espécie suscetível ao germe em questão^{6, 8, 11, 16}; cultura em ágar-amido¹⁷; filtração diferencial por meio do tubo de PIJPER⁴⁵ ou do tubo em U de BRAUN & HOWELL, inoculação das espécies patogênicas em animais de laboratório suscetíveis, e reisolamento do agente^{7, 54}; adição do pirofosfato de sódio ao meio de cultura^{25, 28}, etc.

CURY & TROISE^{18, 19} (1957), verificaram que era possível obter excelentes vacinas contra salmoneloses pela técnica de semeadura dos germes em meios de cultura líquidos, submetidos a borbulhamento contínuo de ar atmosférico. Procurando explicar o alto poder protetor da vacina os autores observaram nas culturas submetidas ao borbulhamento, entre outros fatores, a baixa porcentagem de colônias rugosas quando comparadas com culturas nas mesmas condições, sem o borbulhamento.

Baseados nesses resultados, ocorreu-nos usar o equipamento dos referidos autores,

* Professor Assistente Doutor.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

fazendo todavia as necessárias modificações para adaptá-lo ao arejamento em superfície.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de culturas destinadas ao preparo de antígenos bacterianos para trabalhos de sorologia onde se evitasse, ou se reduzisse ao mínimo, o número de formas rugosas e semi-rugosas das bactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Germes usados: empregamos três amostras de *Salmonella dublin* de n.ºs 7375, 7657 e 8883, todas recebidas da coleção do Instituto Biológico de São Paulo.

As culturas foram mantidas em ágar chocolate inclinado, em tubos. Bimensalmente eram inoculadas em camundongos, para a manutenção da virulência, e os germes reisolados e reidentificados.

Inóculo: consistiu de culturas de 24 h, em pequenos baldes com 50 ml de caldo simples cada um, das três amostras citadas.

Cultivo — efetuado em garrafas de Roux com ágar simples. Cinco ml de inóculo foram bem espalhados na superfície de cada garrafa de ágar por intermédio de um pequeno rolê de vidro estéril.

Para as culturas sem arejamento, as garrafas de Roux, fechadas com tampão de gaze, eram incubadas em estufa nas condições habituais.

Nas culturas arejadas, as garrafas de Roux foram ligadas asseticamente ao aparelho de arejamento (fig. 1) dentro da estufa.

Aparelho para arejamento: o sistema de trabalho consistiu em fazer passar continuamente o ar atmosférico filtrado sobre a superfície do meio de cultura.

O ar é aspirado por intermédio de uma trompa de vácuo (trompa de água).

Observando-se a figura 1, verifica-se que o ar aspirado penetra primeiramente num filtro de algodão cardado (A); daí vai a um frasco lavrador e umidificador (B); segue, passando por um segundo filtro (C);

penetra, por intermédio de um tubo, na garrafa de Roux (E), onde se espalha na superfície do meio de cultura, porquanto o tubo de entrada tem um crivo terminal. Continuando a circular por aspiração, o ar sai da garrafa de Roux através de outro tubo, vai a um frasco de Kitasato, cuja função é uniformizar o ar aspirado, evitando que este circule por jatos e evitando também que um refluxo d'água possa atingir o meio de cultura; a seguir o ar vai sair, de mistura com a água, na trompa aspirante (H) presa a uma torneira. Os "garfos" de distribuição (D e F) permitem ligar várias garrafas de Roux a um mesmo sistema.

Prova das culturas: a presença, ou não, de formas rugosas ou parcialmente rugosas nas culturas bacterianas tem sido estudada por vários autores e algumas técnicas foram propostas para evidenciá-la: semeadura em placa de Petri, examinada no microscópio, com baixo aumento e transluminação, com ângulo de 40°^{15, 35}; prova da aglutinação em solução salina^{3, 4}; prova da fucsina de DI AICHELBERG²¹ (1934); prova opsonocitofágica³⁹; prova da adição do cloreto de trifeniltetrazolio ao meio de cultura³⁴; prova da termoaglutinação^{13, 14}; aglutinabilidade pela solução de peptona^{22, 49, 50}; uso do reativo de Millon^{38, 51}; prova da solução de estreptomicina²⁰; prova do cristal violeta⁵²; prova da triplaflavina, etc.

Escolhemos a prova de aglutinação pela triplaflavina devido à facilidade de sua execução e a seus resultados, a nosso ver superiores aos de outras técnicas.

Esta prova foi descoberta por ALESSANDRINI & SABATUCCI^{1, 2} (1931) e estudada por PAMPANA^{42, 43} (1931, 1933), HIRSCH³¹ (1937), HUDDLESON³³ (1943), SERTIC & BOULGAKOV^{46, 47, 48} (1936), RIRSCH³¹ (1937), HUDDLESON³³ (1943), 1931) e BRAUN & BONESTELL¹¹ (1947), PAMPANA^{42, 43}, SERTIC & BOULGAKOV^{46, 47, 48}.

Usamos a técnica descrita por Pampana e modificada por Sertic & Boulgakov para evitar as reações falso positivas.

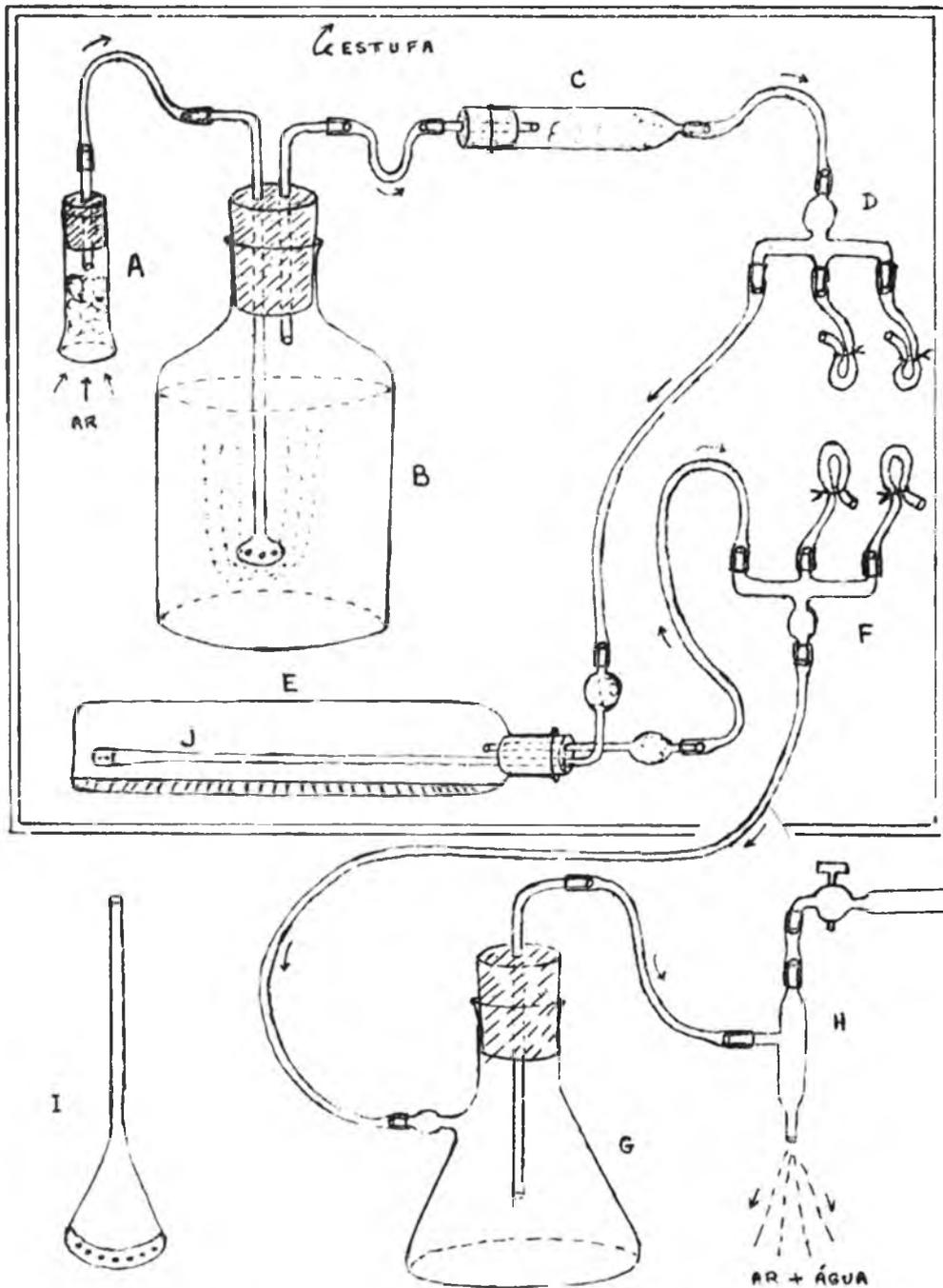


Fig. 1 — Esquema do aparelho de arejamento para culturas em meio sólido: A e C — filtros de algodão cardado; B — frasco lavador e umidificador; E — frasco com meio de cultura; J — tubo arejador; G — frasco de Kitasato; H — trompa d'água (trompa de vácuo); D e F — "garfos" de distribuição, permitindo ligar vários frascos de cultura ao mesmo sistema; I — detalhe do tubo arejador (com crivo).

Para a execução dessa técnica o inóculo e suspensões de culturas (arejadas e não arejadas) foram semeados em placas de Petri com ágar simples. Após a incubação de 24 h a 37°C, e verificada a pureza, foram escolhidas ao acaso 100 colônias para cada um dos tipos de cultura e feita a prova de aglutinação individual de colônias.

Fizemos três repetições de cada exame a fim de estabelecer valores médios.

PARTE EXPERIMENTAL

Usando um inóculo de cada amostra das salmonelas citadas, foram semeados três grupos de garrafas de Roux. Uma parte de cada grupo foi incubada nas condições habituais e a outra submetida a um arejamento contínuo dentro da estufa. Todas as culturas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Contamos o número de colônias S, SR e R dos inóculos e das culturas com e sem arejamento, de cada amostra, conforme técnicas já citadas. Os resultados figuram na Tabela 1.

Um exame dessa tabela, embora mostrasse diferenças, não nos permitiu uma conclusão sobre a importância dessas diferenças.

Ordenamos então os elementos obtidos para uma análise estatística. Aplicamos o

método do Qui quadrado para os resultados em conjunto e para cada amostra em separado.

A disposição dos dados figura na Tabela 2. Registramos a seguir os resultados dos cálculos efetuados.

RESULTADOS

O primeiro resultado indicado para cada uma das comparações *a*, *b* e *c* refere-se à análise do conjunto das três amostras de *Salmonella dublin* n.ºs 7375, 7657 e 8883. Os três resultados seguintes relacionam-se à análise em separado de cada uma das amostras, respectivamente pela ordem 7375, 7657 e 8883. Aos cálculos efetuados foi aplicada a correção de Yates.

a) inóculo e culturas sem arejamento

$\chi^2 = 1,94$ (1 g.l.) P = 0,15
não significativo

$\chi^2 = 3,14$ (1 g.l.) P = 0,07
não significativo

$\chi^2 = 0,55$ (1 g.l.) P = 0,45
não significativo

$\chi^2 = 2,04$ (1 g.l.) P = 0,15
não significativo

b) inóculo e culturas com arejamento

$\chi^2 = 10,00$ (1 g.l.) P < 0,01
altamente significativo

TABELA I

Resultado da contagem de colônias lisas (S), semi-rugosas (S-R) e rugosas (R), após sessas (R), após semeadura em placas de Petri, do inóculo e das suspensões de culturas com e sem arejamento, de três amostras de *Salmonella dublin* n.ºs 7375, 7657 e 8883. A contagem foi feita após a técnica da aglutinação pela triplaflavina.

Amostra n.º	Inóculo - n.º de colônia			Cultura sem arejamento - n.º de colônia			Cultura com arejamento - n.º de colônia.		
	R	S-R	S	R	S-R	S	R	S-R	S
7375	22	7	71	35	7	58	20	4	76
7657	33	5	62	22	10	68	9	7	84
8883	8	7	85	10	14	76	4	5	91

TABELA II

Disposição dos dados da Tabela I, para análise estatística pelo método do Qui quadrado, procurando-se a significância das diferenças entre o número de colônias lisas e o de colônias "não lisas" (soma das colônias rugosas e semi-rugosas). Diferenças obtidas na contagem, feita após semeadura em placa de Petri e uso da técnica da aglutinação pela tripaflavina, entre: a) o inóculo e culturas não arejadas; b) o inóculo e culturas com arejamento; c) culturas não arejadas e culturas com arejamento.

Tipos de colônias	Amostra n.º	Inóculo	Cultura sem arejamento	Cultura com arejamento	Totals		
					Inóculo + cultura sem arejamento	Inóculo + cultura com arejamento	Cultura sem arejamento + cultura com arejamento
n.º de colônias lisas	7375	71	58	76	420	469	453
	7657	62	68	84			
	8883	85	76	91			
n.º de colônias não lisas (soma das colônias rugosas e semi-rugosas)	7375	29	42	24	180	131	147
	7657	38	32	16			
	8883	15	24	9			
Totals		300	300	300	600	600	600

$x^2 = 0,41$ (1 g.l.) $P \approx 0,50$

não significante

$x^2 = 11,19$ (1 g.l.) $P < 0,001$

altamente significante

$x^2 = 1,18$ (1 g.l.) $P \approx 0,25$

não significante

c) culturas sem arejamento e culturas com arejamento

$x^2 = 20,75$ (1 g.l.) $P < 0,001$

altamente significante

$x^2 = 6,53$ (1 g.l.) $P \approx 0,01$

altamente significante

$x^2 = 6,17$ (1 g.l.) $P < 0,02$

significante

$x^2 = 7,11$ (1 g.l.) $P < 0,01$

altamente significante

Os resultados dessas análises mostram as seguintes diferenças nos grupos comparados:

a) inóculo e culturas sem arejamento — as diferenças encontradas não foram significantes para o conjunto das amostras de *Salmonella* usadas nem para a comparação de cada amostra em separado;

b) inóculo e culturas com arejamento — as diferenças foram altamente significantes para o conjunto das amostras usadas, altamente significante para uma das amostras em separado e não significante para as outras duas. Os resultados favoráveis foram para as culturas com arejamento;

c) culturas sem arejamento e culturas com arejamento — diferenças altamente significantes para o conjunto das salmonelas usadas e para duas das amostras examinadas em separado, para a terceira amostra o resultado foi significativo. Todos esses resultados foram favoráveis às culturas arejadas.

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o método não permitiu obter culturas completamente isentas de formas rugosas. O que, aliás, vem concordar com o trabalho de PANDIT & WILSON** (1932) que afirmaram nunca ter conseguido obter culturas que contivessem apenas formas lisas de bactérias, embora empregassem como inóculo colônias lisas, ao que parece, rigorosamente puras.

Todavia as culturas submetidas a um arejamento de superfície mostram presença de colônias lisas em número percentual significativamente mais elevado do que o obtido com culturas em idênticas condições, partindo do mesmo inóculo, mas sem arejamento. O arejamento permite, portanto, melhorar a qualidade do antígeno.

Outro aspecto a ser considerado é o da diferença do número de colônias lisas entre as dos inóculos e as das respectivas culturas sem e com arejamento.

A semeadura final cultivada sem arejamento, conforme pudemos constatar, manteve as culturas em condições praticamente semelhantes às do inóculo embora, para algumas amostras haja diminuição do número de colônias lisas em relação às obtidas do inóculo respectivo, todavia as diferenças verificadas não foram significativas.

A cultura final com arejamento de superfície manteve para duas das amostras usadas condições semelhantes às do inóculo, ou, em outros termos, as diferenças encontradas no número de colônias lisas não foram significativas. Todavia, para o conjunto das amostras e para a outra delas as diferenças foram altamente significativas.

Desses fatos pudemos deduzir:

a) para o conjunto das amostras usadas a cultura final com arejamento melhora as condições encontradas no inóculo em relação ao número de colônias lisas;

b) as diferenças de comportamento, considerando-se as amostras bacterianas em separado, mostram um fato já conhecido em bacteriologia e em imunologia — a necessidade e as vantagens de uma seleção

na escolha de amostras para serem usadas numa determinada finalidade.

Todavia, quaisquer que sejam os aspectos discutidos, a técnica de arejamento produziu, tanto quanto nos indicam os resultados, culturas finais melhores que as habitualmente obtidas.

O método pode, portanto, ser usado isoladamente, para aperfeiçoar o antígeno.

Pode também, e preferivelmente, ser associado a um dos métodos de comprovada eficácia na obtenção de bons inóculos, indicados pelos autores já citados.

CONCLUSÕES

1. É possível obter excelentes culturas, para o preparo de antígenos bacterianos com elevada percentagem de formas lisas (S) de bactérias, pela técnica de cultivo, em meio sólido, com arejamento de superfície, mesmo partindo de um inóculo de inferior percentual de formas lisas.

2. A técnica de cultivo, em meio sólido, com arejamento de superfície, na semeadura final para obtenção de antígenos, poderá ser usada isoladamente, permitindo a obtenção de antígenos de boa qualidade; todavia, a qualidade do antígeno torna-se ainda melhor se a técnica do arejamento de superfície for usada em associação com algum dos métodos já citados em literatura, onde se procurou obter inóculos com elevada percentagem de formas lisas.

RFMVA-5

CURY, R. — *Culture surface aeration technique for the production of bacterial antigens.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 9:63-72, 1972.

SUMMARY — *A significant factor for antigens efficiency is the presence, in culture, of high S — bacteria percentages.*

Even though using inoculum with reduced S — bacteria concentration, the above conditions may be obtained through aeration of cultures in solid media.

The use of this antigens preparation technique is recommended for the final

cultivation stage. It may be used by itself, however better results will be reached through its association with one of the methods described in literature, developed to obtain S or SR bacteria — free (or almost free) innoculum.

UNITERMS: Aeration, surface*; Antigens; bacterial*.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. Adolpho Martins Penha, do Instituto Biológico de São Paulo, pelo auxílio nas análises estatísticas e a Dra. Elizabeth Oliveira da Costa, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela contribuição nos trabalhos de pesquisa bibliográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALESSANDRINI, A. & SABATUCCI, M. — A proposito della reazione di agglutinazione aspecifica alla tripaflavina. *Ann. Igiene*, 41(12):852-5, 1931.
2. ALESSANDRINI, A. & SABATUCCI, M. — La tripaflavina quale mezzo di differenziazione del microbi del genere *Brucella*. *Ann. Igiene*, 41(1):29-34, 1931.
3. ARKWRIGHT, J. A. — The source and characteristics of certain cultures sensitive to bacteriophage. *Brit. J. exp. Path.*, 5:23-33, 1924.
4. ARKWRIGHT, J. A. — Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *J. Path. Bact.*, 24:36-60, 1921.
5. ARKWRIGHT, J. A. — Variation in bacteria in relation to agglutination by salts and by a specific sera. *J. Path. Bact.*, 23:358-60, 1920.
6. BORDET, J. — *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*. 2eme éd., Paris, Masson, 1939. p. 46-7.
7. BORDET, J. & RENAUX, E. — Races microbiennes et diversité des principes autolytiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 49: 545-57, 1932.
8. BRAUN, W. — Bacterial variation, population dynamics, and selective environments. *J. Bact.*, 51:579-80, 1946.
9. BRAUN, W. — A critical review of a phenomenon of bacterial variation. *Bact. Rev.*, 11:75-114, 1947.
10. BRAUN, W. — The effect of serum upon dissociation in *Brucella abortus*. A demonstration of the role of selective environments in bacterial variation. *J. Bact.*, 52:243-9, 1946.
11. BRAUN, W. & BONESTELL, A. E. — Independent variation of characteristics in *Brucella abortus* variants and their detection. *Amer. J. vet. Res.*, 8:386-90, 1947.
12. BRAUN, W. & HOWELL, E. V. — A simple method for the automatic separation of smooth bacterial types from mixed populations. *J. Bact.*, 60:366-7, 1950.
13. BURNET, Et. — Sur la notion de paramellitensis. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 14(3):247-63, 1925.
14. BURNET, Et. — La thermo-agglutination et l'évolution de l'espèce *Brucella*. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 17:128-46, 1928.
15. CASTANEDA, M. R. — *Brucellosis*. 2.a ed., México, D. F., La Prensa Medica Mexicana, 1954. p. 28; 33-4.
16. COLE, L. J. & BRAUN, W. — Studies on the clinical nature of a normal plasma factor which suppresses variation of *Brucella*. *J. Immunol.*, 64:111-22, 1950.
17. CROSSLEY, V. M. et al. — The use of soluble starch medium in the preparation of smooth "O" *Salmonella an-tigenis*. *J. Bact.*, 52(3):367-71, 1946.
18. CURY, R. & TROISE, C. — Técnica de borbulhamento no preparo de vacinas. I Estudos sobre vacinas contra infecções por *Salmonella dublin*. *Arq. Inst. Biol. (S. Paulo)*, 24(1):1-34, 1957.
19. CURY, R. & TROISE, C. — Técnica de borbulhamento no preparo de vacinas. II — Estudos sobre vacinas contra infecções por *Salmonella abortivo-equina*, *gallinarum*, *choleraesuis* e *kunzendorf*. *Arq. Inst. Biol. (S. Paulo)*, 24(2):35-45, 1957.
20. D'AMORE, A. — Determinazione della fase di ceppi di brucelle con la streptomycin. Nota preliminare. *R. C. Ist. sup. Sanità*, 15:439-47, 1952.

CURY, R. — Preparo de antigenos bacterianos pela técnica de cultivo com arejamento de superfície. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 9:63-72, 1972.

21. DI AICHELBURG, U. — Agglutination aspecific avec la fuchsine basique dans les microbes du groupe *Brucella*. *Boll. Sez. ital. Soc. int. Microbiol.*, 6:30, 1934.
22. FAVILLI, G. — Serological researches on the *Brucella* group of bacteria (abortus, melitensis and paramelitensis varieties). *Boll. Ist. sieroter. milan*, 6: 341-8, 1927.
23. FAVILLI, G. — Sur quelque agglutinations aspecifices dans les bacteries du groupe abortus melitensis — paramilitensis. Effects produits sur les bacteries memes par le traitement repeté avec du serum immunisé. *Sperimmentale*, 80:395, 1926. apud HUDDLESON et al. ²².
24. FRENDEL, J. & SZYMANOWSKI, Z. — Künstlich erzeugte Paraabortusstämme. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 117:240-7, 1930.
25. GOODLOW, R. J. et al. — The effect of metabolites upon growth and variation of *Brucella abortus*. *J. Bact.*, 60:291-300, 1950.
26. GOODLOW, R. J. et al. — Metabolic resistance and virulence of smooth *Brucella* variants isolated after prolonged cultivation. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 76:786-8, 1951.
27. GRIFFITH, F. — The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Lond.)*, 27 (2):113-59, 1928.
28. GRIFFITH, F. apud WILSON & MILES ²⁴.
29. HENRY, B. S. — Differentiation of bovine and porcine strains of *Brucella abortus* based on dissociation. *J. Infect. Dis.*, 52:403-6, 1933.
30. HENRY, B. S. — Dissociation in the genus *Brucella*. *J. Infect. Dis.*, 52:374-402, 1933.
31. HIRSCH, W. — The agglutinability by tripaflavine of *B. typhosus* and its relation to the VI antigen. *J. Path. Bact.*, 44(2):349-55, 1937.
32. HUDDLESON, I. F. et al. — Studies in *Brucella* infections. Non specific agglutination in the *Brucella* group. *Tech. Bull. Mich. (St. Coll.) agric. Exp. Stn.*, 149:5-20, 1936.
33. HUDDLESON, I. F. — *Brucellosis in man and animals*. Cambridge, Harvard Univ. Press, 1943.
34. HUDDLESON, I. F. & BALTZER, B. — Differentiation of bacterial species and variations within species by means of 2,3,5-triphenyl-tetralium chloride in culture medium. *Science*, 112:651-2, 1950.
35. HUDDLESON, I. F. et al. — Studies in brucellosis. East Lansing, Michigan State College, Agric. Exp. Station, 1951, apud CASTANEDA ²⁵.
36. KAUFFMANN, F. — *Enterobacteriaceae*. 2nd ed. Copenhagen, Ejnar Munksgaard, 1954. p. 72.
37. KOLMER, J. A. et al. — *Métodos de laboratorio*. México, Interamericana, 1960. p. 730.
38. MAZZETTI, G. & TESI, A. — *Sanità pubbl.* 10(5):1195-325, 1949. apud PACHECO & MELLO ²¹.
39. MUNGER, M. & HUDDLESON, I. F. — The detection of antigenic variants of *Brucella* by means of an opsonocytotoxic test. *J. Bact.*, 35:255-60, 1938.
40. NUTT, M. M. — The method of division of the rough and smooth type of colonies among bacilli of the *Salmonella* group. *J. Hyg. (Lond.)*, 26 (1):44-8, 1927.
41. PACHECO, G. & MELLO, M. T. — *Brucelose*. Rio de Janeiro, 1955. p. 727. [Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Monografias, 7].
42. PAMPANA, E. J. — La dissociazione microbica e la tripaflavina come suo reattivo. *Ann. Igiene*, 41(8):537-53, 1931.
43. PAMPANA, E. J. — Microbic dissociation, detection of the "R" variant by means of a specific drop — agglutination. *J. Hyg. (Lond.)*, 38(3):402-3, 1933.
44. PANDIT, S. R. & WILSON, G. S. — The relation between specific and non-specific agglutination in the *Brucella* group. *J. Hyg. (Lond.)*, 32(1): 45-54, 1932.
45. PIJPER, A. — Dimensional differentiation, filtration and separation of bacteria. *J. Path. Bact.*, 64:529-38, 1952.

CURY, R. — Preparo de antígenos bacterianos pela técnica de cultivo com arejamento de superfície. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 9:63-72, 1972.

46. SERTIC, V. & BOUGAKOV, N. A. — Sur la sensibilité des souches d'*Eberthella typhi* au bactériophage, en relation avec les caractères antigéniques. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 122:35-7, 1936.
47. SERTIC, V. & BOULGAKOV, N. A. — L'agglutination par la tryptaflavine des *Salmonella* de structure antigénique flagellaire non-spécifique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 123:951-2, 1936.
48. SERTIC, V. & BOULGAKOV, N. A. — Réversion par acidification de l'agglutination par la tryptaflavine. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 124:217-8, 1937.
49. VIDA, B. L. In: CONGRESO D'IGIENE, 13º, S. Remo, 1949. *Atti. apud PACHECO & MELLO* 11.
50. VIDA, B. L. apud PACHECO & MELLO 11.
51. WHITE, P. B. — Notes on Intestinal bacilli with special reference to smooth and rough races. *J. Path. Bact.*, 32:85-94, 1929.
52. WHITE, P. G. & WILSON, J. B. — Notes-differentiation of smooth and non smooth colonies of *Brucellae*. *J. Bact.*, 61(22):239-40, 1951.
53. WILSON, G. S. — The relationship between morphology, colonial appearance, agglutinability, and virulence to mice of certain variants of *Bacterium aertrycke*. *J. Hyg. (Lond.)*, 30(1):40-54, 1930.
54. WILSON, G. S. & MILES, A. A. — *Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*. 5th ed. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1964. 2v.

Recebido para publicação em 11-8-72

Aprovado para publicação em 3-10-72