VOLUME 3 1962 N.° 2

REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Publicada pela
SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
Caixa Postal 6 - ZC-02 — Botafogo
RIO DE JANEIRO — BRASIL

REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

GENÉSIO PACHECO
Instituto Oswaldo Cruz
(Diretor)

RUDOLF LOUIS HAUSMANN
Instituto de Microbiologia da U. B.
(Editor)

Comissão Técnica

A. CHAVES BATISTA
Instituto de Micologia
Universidade do Recife
Recife, Pernambuco

AMILCAR VIANA MARTINS
Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro, GB

JOAQUIM TRAVASSOS
Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro, GB

METRY BACILLA
Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas
Curitiba, Paraná

MILTON G. GUERREIRO
Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"
Pôrto Alegre, R. G. do Sul

NEWTON NEVES DA SILVA
Instituto de Pesquisas Biológicas
Pôrto Alegre, R. G. do Sul

PAULO CORDEIRO DE AZEVEDO
Faculdade de Medicina
Belém, Pará

PAULO DE GÓES
Instituto de Microbiologia da Universidade do Brasil
Rio de Janeiro, GB

RAYMUNDO MONIZ DE ARAGÃO
Escola Nacional de Química
Universidade do Brasil
Rio de Janeiro, GB

RODOLPHO DE CAMARGO
Instituto Zimotecnico
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Piracicaba, S. P.

VOLUME 3 1962 N.º 2

REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

ÍNDICE

Págs.

Occurrence of trehalose 6-phosphatase in baker's yeast — ANITA PANEK & NORMA OLIVEIRA DE SOUZA ..... 31 - 32

Estudo de dois casos de orquite brucélica em suinos (*A study on two cases of brucelose orquitis in hogs*) — FRIDOLIM SCHLÖGEL ..... 33 - 36

Estudos sôbre a esporulação no gênero *Clostridium* (*Studies on sporulation in the genus "Clostridium"*) — J. A. ROSEMBERG & F. P. DE FRANÇA ..... 37 - 40

Avaliação de uma prova para a L-amino ácido oxidase no diagnóstico de bactérias intestinais (*An evaluation of the L-amino acid oxidase test on routine of identification of enteric organisms*) — IVONE ROCCO SUASSUNA & ITALO SUASSUNA ..... 41 - 46

Determinação de um cíclo vital do virus da doença de Newcastle (NDV) em cultura de células HeLa e fibroblasto de embrião de pinto (*Determination of one growth cyclus of Newcastle disease virus (NDV) in cultures of HeLa cells and chicken embryo fibroblasts*) — JOSÉ MILTON ANDRIGUETTO ..... 47 - 56

Crônica 57

Noticiário ..... 58 - 62

Rev. Bras. Microb., 1962, 3 (2): 31-32

OCCURRENCE OF TREHALOSE 6-PHOSPHATASE IN BAKER'S YEAST

ANITA PANEK AND NORMA OLIVEIRA DE SOUZA *
Department of Microbiology — National School of Chemistry
Rio de Janeiro — Brazil

Accepted, March 18, 1963

The mechanism of trehalose synthesis in brewer's yeast has been studied by Cabib and Leloir (1958) who found that it is formed through a condensation of uridinephosphate glucose with glucose 6-phosphate forming an intermediate trehalose-phosphate which is then hydrolyzed to yield trehalose and inorganic phosphate. In a previous paper, Panek (1962) has reported a similar mechanism for baker's yeast, having, however, observed that under the same experimental conditions as Cabib (1958), no trehalose 6-phosphate could be detected. The existence of a very active trehalose 6-phosphatase could be responsible for these results. The confirmation of this postulate is the subject of this communication. A similar activity in insects has been reported by Friedman (1960).

The microorganism used was a strain of **Saccharomyces cerevisiae** BII diploid. Cell free extracts were prepared by shaking for 10 min in a Mickle shaker with No. 12 ballotini beads. Protein was determined by Stickland's method (1951). Trehalose 6-phosphate was a sample of synthetic material prepared and kindly furnished as the barium salt by Dr. D. MacDonald of the National Institute of Health, Bethesda, Maryland, and was converted to the sodium salt before use.

(*) Supported by the National Research Council of Brazil

The reaction products were separated by paper electrophoresis on Whatman No. 1 paper and run on a Kelab apparatus (Sweden) in 0.2M borate buffer, pH 9,0 at 200v for 5 hours. Trehalose was detected on paper by Trevelyan's method (1950).

The reaction mixture contained: trehalose 6-phosphate (Na^+, 0.02M) 0.1ml; $MgCl_2$ (0.1M) 0.05ml; Tris-HCl (pH 6.0, 0.2M) 0.3ml; yeast cell free extract (10mg/ml protein) 0.5ml; water up to 1.5ml. Incubation at 25°C for 30min. The blanks were prepared without trehalose 6-phosphate as well as with a cell free extract inactivated by boiling. At regular intervals inorganic phosphate was determined by the Bereblum and Chain method (1938). The inorganic phosphate content of the extrac ws deduced.

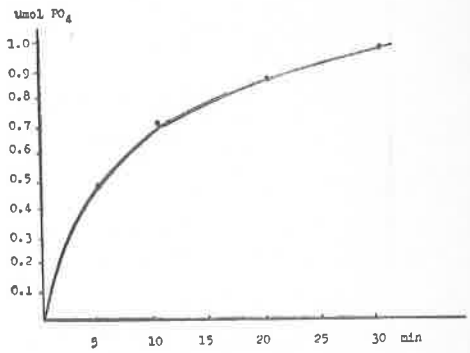


Fig. 1 — Liberation of inorganic phosphate from trehalose 6-phosphate by baker's yeast cell free extract.

After 30min 10% trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged. The supernatant solution, after elimination of the acid, was spotted on paper electrophoresis. One single carbohydrate spot corresponding to trehalose was detected and identified by chromatography.

We have, therefore, confirmed Panek's (1962) previous observation of the abscence of trehalose 6-phosphate after a 30 min incubation time. The presence of a trehalose 6-phosphatase activity is evident, since the liberation of inorganic phosphate reaches, in the first 10 min, 89 % of the total liberation during a 30 min incubation.

RESUMO

A existência transitória de trealose-6-fosfato nas células de levedura de panificação foi confirmada pela presença de uma ação ativa de trealose fosfatase nestas mesmas células. A liberação de fosfato inorgânico atinge, nos dez primeiros minutos de incubação, a 89 % da liberação total durante o prazo de 30 minutos da experiência. Uma única mancha de glicídio, correspondendo à trealose, foi identificada por eletroforese após tratamento de trealose-6-fosfato por homogeneizados livres de células de levedura de panificação.

REFERENCES

BERENBLUM I. and CHAIN E. — Biochem. J. 1938, **32**: 295.

CABIB E. and LELOIR L. F. — J. Biol. Chem. 1958, **208**: 395.

FRIEDMAN S. — Arch. Biochem. Biophys. 1960, **88**: 339.

PANEK A. — Arch. Biochem. Biophys. 1962, **98**: 349.

STICKLLAND L. H. — J. Gen. Microbiol. 1951, **5**: 698.

TREVELYAN W. E. — Nature, 1950, **166**: 444.

Rev. Bras. Microb., 1962, 3 (2): 33-36

ESTUDO DE DOIS CASOS DE ORQUITE BRUCÉLICA EM SUÍNOS *

FRIDOLIM SCHLÖGEL

Da Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade do Paraná
Do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná

Recebido para publicação em 10 de junho de 1963

A brucelose suína, doença que se reveste de importância econômico-social, situa-se, no Estado do Paraná, em lugar de destaque, considerando-se que seu índice de freqüência gira aproximadamente em tôrno de 25 % de reagentes à prova de sôro-aglutinação, freqüência esta muito próxima da que ocorre em nosso país, segundo revisão de PACHECO e MELLO (1955).

No que se refere à brucelose humana por **Brucella suis**, no Brasil, tendo em vista o restrito número de amostras isoladas dos casos e sua sistematização, verifica-se que sua ocorrência é significativa, se comparada aos causados por **Brucella abortus**, bastando para tanto consultar o aludido trabalho de PACHECO e MELLO (1955); entre outras considerações, deixam entrever a grande importância que representam suínos infectados no contágio humano.

Em suínos, parece pertencer a HIPÓLITO e cols. (1958) a primeira constatação e tipagem em nosso país, de amostras de **Brucella suis** isoladas de casos de orquite brucélica, animais êsses reagentes à sôro-aglutinação.

As pesquisas de HUDDLESON (1943), BENDTSEN e cols. (1954), SPINK (1956), MITH (1957), HIPÓLITO e cols. (1958) e outros, demonstraram a predileção das brucelas pela genitália de reprodutores suínos; no presente trabalho descrevemos dois casos de orquite unilateral com isolamento do agente etiológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os casos se referiam a reprodutores suínos, sendo um Wessex Suddleback e outro da raça Landrace, ambos estéreis.

Os animais apresentavam acentuada tumefacção testicular unilateral (figuras 1, 2, 3 e 4); um dêles, devido ao grande aumento do testículo, locomovia-se com certa dificuldade.

A prova de sôro-aglutinação lenta em tubos, dos dois animais, com antígeno de **Brucella abortus**, foi positiva nos títulos de 1:1.280 e 1:2.560.

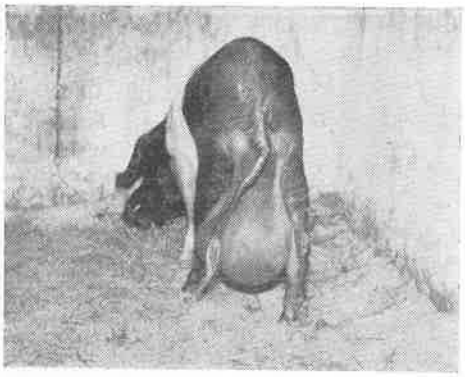
Após o sacrifício de um dos suínos e castração do outro, os tesículos comprometidos pesaram cêrca de 10 kg e 3,5 kg respectivamente, ambos hipertrofiados (figura 5), com comprometimento do epidídimo e cordão funicular (epididimite e funiculite) em um dos casos. Seu conteúdo, colhido mediante punção, foi semeado em caldo tripticase soja, adicionado de cristal violeta, na concentração final de 1:700.000, com a finalidade de impedir crescimento de agentes contaminantes, segundo recomendação de MELLO e SILVA (1954) para hemoculturas; em

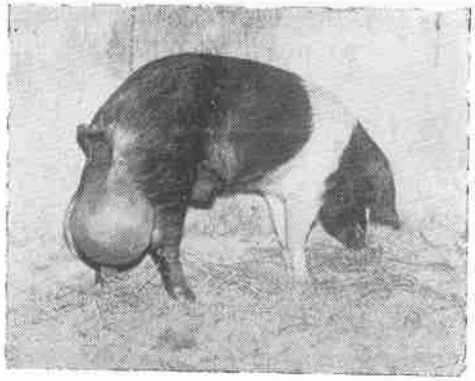
(*) Agradecemos ao Prof. Orizel Curial pela descrição histopatológica de um dos casos e aos Drs. Mozart Villaca e Egon Merkle pela gentileza de nos destinarem os animais.

alguns frascos introduzimos reduzido jato de CO_2, na suposição remota de se tratar de **Brucella abortus.**

RESULTADOS

As subculturas em meio de agar tripticase soja resultaram no desenvolvimento de colônias julgadas típicas de brucelas, mescladas com colônias contaminantes (figuras 6 e 7); esfregaços das colônias típicas, corados pelo método de Gram, permitiram a observação de germes com morfologia e coloração compatíveis com brucelas.





Figuras 1 e 2 — Orquite brucélica em suíno Wessex Suddleback, notando-se a acentuada tumefacção do testículo direito

Figuras 3 e 4 — Orquite brucélica em suíno Landrace mostrando tumefacção do testículo esquerdo

A identificação definitiva de **Brucella suis** nos dois casos aqui referidos, foi possível após as seguintes provas:

a) — verificação da atividade ureásica segundo recomendação de PACHECO e MELLO (1950), RENOUX e QUATREFAGES (1951) e CEDRO (1953), realizadas com solução de Fergusson e Hook;

b) — cromobacteriostase pela técnica de CRUICKSHANK (1948) mediante impregnação da tionina, fucsina básica, violeta de metila e pironina em papel de filtro;

c) — determinação da capacidade sulfidrígena testada com papel de filtro embebido em solução de acetato de chumbo a 10 %, segundo HUDDLESON (1943);

d) — comportamento das amostras submetidas à ação do dietiliditiocarbamato de sódio (DEDTC) como prova de diferenciação na opinião de RENOUX (1952).

Os resultados dessas provas, aliados à não exigência de CO2 para o isolamento inicial, permitiram-nos concluir se tratar de **Brucella suis.**

A tentativa de isolamento do referido germe mediante inoculação do material original em cobaio, deixa de ser referido e comentado, em virtude de morte acidental dos animais.

Exame histopatológico de um dos casos: o testículo direito apresentou-se macroscòpicamente muito aumentado de volume e pesando cêrca de 10 kg. As túnicas vaginal própria e vaginal comum, muito espessadas, mostravam-se aderidas. Ao corte, revelou formação de cisto cujas paredes mediam 1, 2 a 3 cm de espessura, com aspecto rugoso interno e contendo líquido turvo amarelado.

Ao exame microscópico, presença de aderências fibrinosas entre a vaginal própria e a vaginal comum, parcialmente organizadas por fibroblastos e capilares neoformados. A parede do cisto era formada principalmente de tecido fibroso com infiltrações focais de células plasmolinfocitárias, observando-se ainda macrófagos contendo hemosiderina. Internamente, uma camada de células epitelióides de espessura variável, cuja porção mais interna parcialmente necrosada, apresentava fócos de infiltração plasmolinfocitárias. Nesta mesma camada observou-se ainda células gigantes e fócos de calcificação.

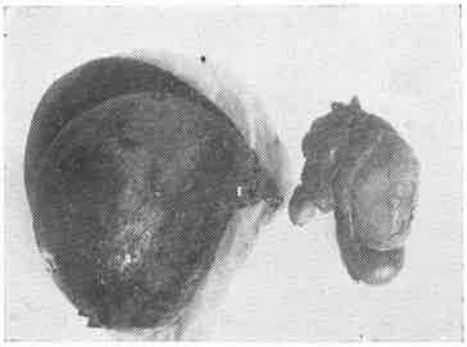
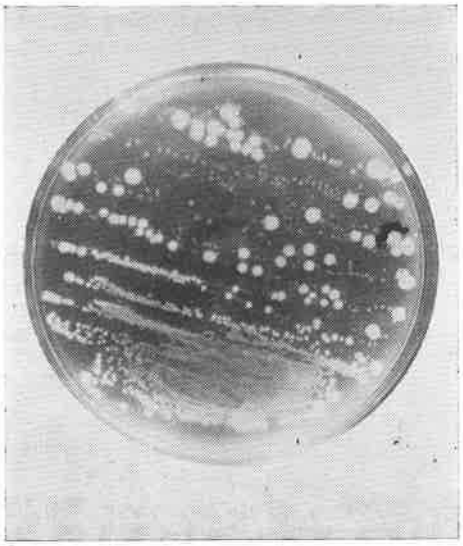
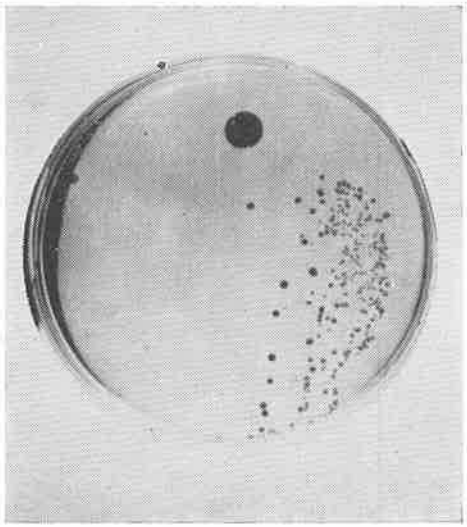


Figura 5 — À esquerda, testículo com intensa hipertrofia, comparado com o normal, à direita

O testículo esquerdo apresentou aspecto normal aos exames macro e microscópico.

As lesões histopatológicas do presente caso muito se assemelham às relatadas por HIPÓLITO e cols. (1958).





Figuras 6 e 7 — Colônias típicas (menores) de brucelas, mescaladas com colônias contaminantes em placas com agar tripticase soja

SUMÁRIO

No presente trabalho são descritos dois casos de orquite brucélica unilateral em reprodutores suínos.

O estudo microbiológico do conteúdo testicular permitiu em ambos os casos, isolamento e tipificação de **Brucella suis.**

De um dos casos se faz a descrição histopatológica.

SUMMARY

This paper presents the description of two cases of unilateral brucellotic orchitis found in boars.

Brucella suis was cultivated, in both cases, from the purulent exsudate originated in the testis.

The histopathological picture of one of the cases is described.

BIBLIOGRAFIA

BENDTSEN, H., CHRISTIANSEN, M. e THOMSEN, A. — Brucella enzootics in swine herds in Denmarck. Presumably with hare as source of infection. — Nord. Vet. Med., 1954, **6**: 11-21.

CEDRO, V. C. F. — Diferenciation de la "Brucella suis" por la prueba de la ureasa. — Min. Agric. y Ganad., Publicacion miscelanea n.º 377, 1953. Buenos Aires, 7 pp.

CRUICKSHANK, J. C. — A simple method for testing dye sensitivity of "Brucella" species. — Jour. Path. Bact., 1948, **60**: 328-329.

HIPÓLITO, O., SILVA, J. M. L. e BARBOSA, M. — Sôbre dois casos de orquite brucélica em suínos. — Arq. Esc. Sup. Vet., M. Gerais, 1958, vol. **XI**: 344-349.

HUDDLESON, I. F. — Brucellosis in man and animals. — Rev. ed The Commonwealth Fund. New York, 1943, 379 pp.

MELLO, M. T. e SILVA, N. P. M. — Hemoculturas para brucelas. — Brasil-Médico, 1954, **68** (32-52): 451-464.

PACHECO, G. e MELLO, M. T. — Brucelose — Monografia Inst. O. Cruz, R. de Janeiro, 1955, n.º **7**: 727 pp.

PACHECO, G. e MELLO, M. T. — Prueba de la ureasa para la diferenciación de **Br. suis.** — Jour. Bact., 1950, **59**: 689-691.

RENOUX, G. e QUATREFAGES, H. - L'identification des **Brucella** par leur activité uréasique. Comparaison avec les autres méthodes de différenciation — Ann. Inst. Pasteur, 1951, **80**: 182-188.

RENOUX, G. — Une nouvelle méthode de différenciation des variétés de "Brucella". — Action du diéthyldithiocarbamate de soude. — Ann. Inst. Pasteur, 1952, **82**: 556-562.

SMITH, H. C. — Infectious diseases of swine. — Vet. Med. Publishing Co., 803 Livestock Exchange Bldg., Kansas City 2, Missouri, 1957, 96 pp.

SPINK, W. W. — The nature of brucellosis. — The University of Minnesota Press, Minneapolis, 1956, 464 pp.

Rev. Bras. Microb., 1962, 3 (2): 37-40

ESTUDOS SÔBRE A ESPORULAÇÃO NO GÊNERO CLOSTRIDIUM

J. A. ROSEMBERG * e F. P. DE FRANÇA **

Recebido para publicação em 24 de junho de 1963

1 — INTRODUÇÃO.

Os fatores que ativam e inibem a esporulação na família **Bacillaceae**, não são ainda bem conhecidos. No caso de bactérias anaeróbicas do gênero **Clostridium**, Elnner (1956) propõe um meio de cultura para **Cl. perfringes**; Bisset (1950), para **Cl. tetani**; Wynne (1948) estuda o problema com **Cl. botulinum**. Pesquisadores como Smith e col. (1959), Portellada (1960) e Nakata e col. (1960) têm investigado o aspecto bioquímico da esporulação em face a determinados fatores e Adams e col. (1955) estudaram a adição de culturas de leveduras, visando ativá-la. Observamos que para as espécies de aplicação industrial, poucos dados havia sôbre a esporulação e ainda mais, que era realmente um problema tê-los esporulados, afim de se manterem vivos e serem usados, ativos, nas fermentações.

Reunimos 11 cêpas, pertencentes ao gênero **Clostridium**, patogênicas e saprófitas. Testamos diferentes meios de cultura, fizemos variações qualitativas e quantitativas de substâncias e experimentamos diferentes condições de cultivo, visando sempre a esporulação.

---

* — Engenheiro químico, bolsista do Conselho de Pesquisas da Universidade do Brasil.

** — Farmacêutico químico, bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

2 — MATERIAL E MÉTODOS.

I — Cêpas ensaiadas:

a) **Clostridium butyricum ATCC - 6014**
b) **Clostridium butyricum ENQ - RI-5**
c) **Cl. acetobutylicum ATCC - 824**
d) **Cl. acetobutylicum ATCC - 10132**
e) **Cl. beijerinckii ENQ - RI-2**
f) **Cl. saprogenes ENQ - RI-3**
g) **Cl. sporogenes IOC**
h) **Cl. histolyticum IOC**
i) **Cl. novyi IOC**
j) **Cl. septicum IOC**
h) **Cl. sp. ENQ - RI-6.**

II — Substâncias:

Todos os componentes dos meios de cultura usados foram do Difco Laboratories ou Baltimore Biological Laboratory. Os corantes e sais minerais, dos fabricantes Merck ou NBC. O tioglicolato de sódio, da Eastman Chemistry. Os meios de cultura desidratados usados, foram do Baltimore Biological Laboratory.

III — Meios de cultura:

Meios A — Môstos amiláceos e sacaríneos.

a) De mandioca — farinha — 6 %, peptona — 0,2 %, pH = 6,8.

b) De soja — idêntico ao anterior.

c) De cenoura — infuso de cenoura — 100ml, peptona — 0,2 %, pH = 6,8.

d) De melaço — melaço a 8°Bx. — 100ml, peptona — 0,2%, sulfato de amônio — 0,3%, fosfato dipotássico — 0,1%, pH = 6,8.

e) De batata inglêsa — infuso de batata — 100ml, peptona — 0,2%, pH = 6,8.

Esterilização dos môstos a 1 at/20 min.

Meio B — Meio fluido ao Tioglicolato BBL.

Meio C — Idem, adicionado de $CaCl_2$ a 0,5% e 0,05%.

Meio D — Idem, adicionado de $MnCl_2$ a 0,5% e 0,05%.

Meio E — Idem, adicionado de acetato de sódio a 0,5% e 0,05%.

Meio F — Idem, adicionado dos 3 sais, a 0,5 e 0,05%.

Meio G — Idem, com concentrações de glicose, de 1,0 - 1,5 e 2,0%.

Meio H — Idem, com concentrações de agar-agar, de 0,075 - 0,15 - 0,3 e 0,35%.

Meio I — Meio fluido ao Tioglicolato, por nós preparado, completo.

Meio J — Idem, com omissão de Triptícase.

Meio K — Idem, com omissão de l-cistina.

Meio L — Idem, com omissão de glicose.

Meio M — Idem, com omissão de extrato de lêvedo.

Meio N — Idem, com omissão de tioglicolato de sódio.

Meio O — Idem, com omissão de resazurina.

Meio P — Idem, com omissão de agar-agar.

Meio Q — Idem, com omissão de cloreto de sódio.

IV — Condições de cultivo:

Inóculos: Partimos sempre de culturas jovens, em Meio Tioglicolato BBL, obtidas a 37°C. Usamos 0,5ml para cada inoculação.

Condições de cultivo:

Nos meios A — 37°C/96 horas.

No meio B — 37°C, em pH de 5,0 — 6,0 — 7,0 — 8,0 por 96 horas. 25°C, em pH de 5,0 — 6,0 — 7,0 — 8,0 por 96 horas.

Nos demais meios (de C a Q) — idêntico a A.

V — Pesquisa dos esporos e contagem:

Coloração, segundo o método de Wirtz, modificado por Bartholomew e Mittwer (1957). O valor numérico em percentagem, na contagem se refere à relação, em 20 campos, de esporos para células totais.

3 — RESULTADOS.

(Veja quadros)

4 — DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:

Observando-se o quadro I, relativamente à esporulação nos 5 môstos, temos a idéia de que os germes saprófitas tendem mais a esporular nêstes meios naturais do que os patogênicos. Melaço e batata inglêsa são os substratos mais indicados, embora não haja nenhum ideal. Só uma cêpa patogênica, **Cl. septicum** esporulou, e sòmente no meio de soja.

A influência de cálcio, manganês e acetato, quando adicionados ao meio Tioglicolato BBL não monstram acentuada capacidade ativadora da esporulação, em face ao meio sem adições. Em alguns casos, até inibe o processo, como se observa para **Cl. beijerinckii.**

A influência de glicose é marcante. Quando foi retirada do meio Tioglicolato, houve inibição da esporulação para 6 dos 7 germes não patogênicos. Em alguns casos, o aumento da concentração de glicose, parece trazer aumento de esporulação, como se observa para **Cl. butyricum — ENQ — RI-5, Cl. acetobutylicum ATCC — 10132, Cl. saprogenes ENQ — RI-3** e **Cl. sp. ENQ — RI-6.**

Ao lado da influência de glicose, já mencionada, observa-se que de todos os componentes do meio Tioglicolato, cistina e agar-agar têm funções dignas de registro. A primeira, quando retirada, favoreceu a esporulação para 6 cêpas. Sabemos que grupamento **tiol** e **sulfidrila** têm ação importante nos processos de divisão celular; é provável que a ausência de tais grupamentos (no caso, por eliminação da l-cistina), provoque o fenômeno da esporulação e não o

QUADRO I

Esporulação em face a diferentes meios de culturas

MEIOS		ESPORULAÇÃO %										
		CÊPAS S						CÊPAS P				
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
Mostos	Mandioca	-	±	75	±	±	50	±	±	-	-	-
	Soja	-	75	±	±	±	±	±	-	-	50	±
	Cenoura	-	75	-	-	50	50	±	-	-	-	-
	Melaço	-	75	75	±	75	-	-	-	-	-	50
	Batata	-	50	50	-	50	50	±	-	-	±	50
Meio Tioglicolato BBL	Normal	±	50	±	-	50	75	-	-	-	-	75
	+ $CaCl_2$ o,5%	±	75	-	-	±	75	-	±	-	-	±
	+ $CaCl_2$ 0,05%	±	±	±	-	±	±	-	-	-	±	50
	+ $MnCl_2$ 0,5%	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	±
	+ $MnCl_2$ 0,05%	-	-	50	-	-	75	-	±	-	-	±
	+ Acet. Na 0,5%	±	50	75	-	±	75	-	-	-	-	±
	+ Acet. Na 0,05%	-	-	75	-	-	50	-	-	-	-	50
	+ 3 sais 0,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+ 3 sais 0,05%	-	75	50	-	75	-	-	-	-	-	75
	+ glicose 1,0%	-	50	75	-	-	-	50	-	-	-	±
	+ glicose 1,5%	-	75	75	-	±	±	±	-	-	-	75
	+ glicose 2,0%	-	100	75	-	±	50	-	-	-	±	75
	+ agar-agar 0,15%	-	75	50	-	±	50	-	-	-	-	75
	+ agar-agar 0,30%	±	75	75	±	50	75	-	-	-	-	75
	+ agar-agar 0,35%	±	75	50	50	75	50	-	-	-	-	75
Meio Tioglicolato preparado	Normal	±	75	75	±	75	-	-	-	-	-	50
	sem Tripticase	-	±	50	-	±	±	-	-	-	-	-
	sem l-cistina	50	100	-	±	100	50	±	-	-	-	100
	sem glicose	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-
	sem extrato lêvedo	-	75	50	-	50	100	-	-	-	-	50
	sem tioglicolato	±	100	±	-	75	-	±	-	-	-	50
	sem resazurina	±	50	75	-	50	-	-	-	-	-	±
	sem agar-agar	-	±	±	-	±	-	-	-	-	-	-
	sem NaCl	±	75	50	-	50	±	-	-	-	-	±

S = saprófitas (±) = raros esporos

P = patogênicas (—) = ausência de esporos

NOTA — As letras designando as cêpas, são as mesmas usadas no item 2.

QUADRO II

Esporulação em face a diferentes condições de cultivo, no meio Tioglicolato BBL, expressa em %

CÊPAS	T°C	pH			
		5,0	6,0	7,0	8,0
a	25	-	-	±	±
	37	-	-	-	50
b	25	75	-	100	-
	37	±	100	75	-
c	25	-	±	50	-
	37	-	-	50	-
d	25	-	-	-	-
	37	-	-	-	±
e	25	-	50	75	-
	37	±	100	50	-
f	25	-	75	50	-
	37	-	75	±	-
g	25	-	-	-	-
	37	-	-	±	±
h	25	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
i	25	-	-	-	-
	037	-	-	-	-
j	25	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
k	25	-	-	100	-
	37	-	-	75	-

da divisão. Para as demais cêpas, sua ausência foi indiferente, com exceção de **Cl. saprogenes.** Agar-agar, quando ausente, acarreta inibição total da esporulação.

5 — CONCLUSÕES:

I — Dentro das condições de nosso trabalho, os germes patogênicos pràticamente não esporulam.

II — Relativamente aos saprófitas:

a) Não é possível generalizar a esporulação, para um determinado meio. O fenômeno é variável, de cêpa a cêpa, dentro dos meios estudados.

b) Glicose e agar-agar têm importante papel na esporulação, quando ausentes, há inibição do processo.

c) l-cistina parece ser inibidor da esporulação.

d) Usando o meio Tioglicolato, as melhores condições são: temperatura de 25°C, em pH de 6,0 a 7,0, cultivo de 96 horas.

e) Os fatores estudados têm que ser considerados isoladamente. Dois setores que levam à esporulação, quando associados podem inibí-la.

f) Sugerimos que seja estudado o problema da esporulação, relativamente ao metabolismo de compostos de enxôfre, pois imaginamos que haja íntima relação entre os dois.

SUMMARY

Sporulation of saprophytic and pathogenic species of the genus **Clostridium** has been studied in different culture media. In our conditions, pathogens practically do not form spores. The saprophytes display no uniform behaviour, each species having different optimum conditions.

6 — BIBLIOGRAFIA

ADAMS AND AYRES — Suplementation of Media with Yeast Culture for Counting Anaerobic Spores — Applied Microbiology, 1955. **3:** 227.

BISSET, K. A. — The sporulation of **Clostridium tetani** — Journal of General Microbiology, 1959. **4:** 1 - 3.

ELNNER, P. D. — A medium promoting rapid quantitative sporulation in **Cl. perfringes** — J. of Bact., 1956. **71:** 495 - 496.

Manuel de Métodos Microbiológicos da S. A. B., 1957, pp. 21.

NAKATA, H. M. and HALVORSON, H. O. — Biochemical changes occurinf during growth and sporulation of **B. cereus** — J. of Bact., 1960. **8:** 801.

PORTELLADA, P. C. L. — Estudos sôbre esporogênese (IV — Inibição da esporulação endotrófica pelo ácido dipicolínico) — Anais de Microbiologia, 1960. **8:** 65.

SMITH AND ELLNER — Cytological observations of the sporulation process of **Cl. perfringes** — J. of Bact.. 1957. **73:** 1 - 7.

WYNNE, E. S. — Physiological studies on spore formation in **Cl. botulinum** — The Journal of Infections Dieases, 1948. **83:** 243.

Rev. Bras. Microb., 1962, 3 (2): 41-46

AVALIAÇÃO DE UMA PROVA PARA A L-AMINO ÁCIDO OXIDASE NO DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS

IVONE ROCCO SUASSUNA * e ITALO SUASSUNA *

Recebido para publicação em 25 de junho de 1963

A formação do ácido fenil-pirúvico em culturas de **Proteus** a partir da fenil-alanina foi demonstrada por Henriksen & Closs (1938) e Closs & Henriksen (198). Posteriormente, Henriksen (1950) aponta o interêsse dessa característica para a definição do gênero **Proteus.**

Interessado em estudar a decomposição de ácidos aminados por bactérias intestinais, Singer (1953), descreveu uma reação do cloreto férrico com produtos derivados do ataque a diversos amino ácidos, o que resultava em colorações características de acôrdo com o ácido aminado considerado. O mesmo autor assinalou também o interêsse da prova para a classificação de enterobactérias (Singer & Bar-Chay, 1954). Demonstrou em seguida que os compostos que reagiam com o cloreto férrico correspondiam aos ácidos cetônicos dos amino ácidos considerados (Singer & Volcani, 1955), e corretamente associou êsse achado com as verificações anteriores de Stumpf & Green (1944) que haviam relatado ação semelhante de **Proteus** sôbre treze diferentes amino ácidos, a saber: nor-leucina, fenil-alanina, leucina, triptofanio, metionina, tirosina, nor-valina, histidina, arginina, iso-leucina e ácido alfa-amino butirico, enunciados na ordem decrescente de suas velocidades de reação.

Quer como o emprêgo da L-fenil-alanina ou com o triptofânio — adotado por Singer & Volcani (1955) — os estudos que se seguiram puseram em evidência a utilidade dessa prova, não só para para a identificação de **Proteus** como também para o grupo «Providence». Êstes fatos são apreciados em numerosos relatos que também introduzem uma variedade de técnicas para a sua execução (Buttlaux & cols., 1954; Buttiaux, Moriamez & Papavassiliou, 1956; Clarke & Shaw, 1954; Shaw & Clarke, 1955; Hamida & Le Minor, 1956; Ewing, Davis & Reavis, 1957; Falkow, 1957; Stewart, 1959; Le Minor, 1959; Bachrach, 1960; Edwards, Fife & Ewing, 1961).

No presente trabalho apresentamos os resultados obtidos com o emprêgo de uma dessas técnicas que nos pareceu particularmente conveniente à identificação de rotina de bactérias intestinais, discutindo alguns aspectos práticos do seu emprêgo. Resultados parciais haviam sido anteriormente apresentados (Suassuna, Suassuna & Diogo-Machado, 1961).

MATERIAL E MÉTODOS

A técnica que adotamos foi a preconizada por Ewing & cols. 1957), a qual descrevemos aseguir.

O meio de cultura básico constitue-se de:

Extrato de levedo	3,0 g
DL-fenil-alanina	2,0 g
Fosfato mono-ácido de sódio	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	12,0 g
Água destilada	1000 ml

* Instituto de Microbiologia da Universidade do Brasil - Rio de Janeiro - Guanabara.

Distribuir em tubos, esterilizar a 120° C durante 10 minutos e deixar solidificar em posição acentuadamente inclinada.

O inóculo foi feito com alça ou agulha a partir dos meios comuns de triagem. Sem ser pròpriamente maciço, o inóculo, tanto quanto possível, foi abundante.

Após período de incubação adequado fazia-se leitura pela adição de algumas gôtas de cloreto férrico em solução a 10 %. Observava-se o aparecimento em alguns segundos de coloração verde progressivamente penetrando a camada de agar sob o crescimento.

Cêrca de 200 das amostras estudadas corresponderam a amostras tipo de «Providence» **Proteus, Salmonella** e **Shigella,** em reexame de seus caracteres bioquímicos durante o período dêste estudo. As demais foram isoladas ou identificadas em o nosso laboratório, a partir de material humano e animal de natureza variada, havendo predomínio de amostras provenientes de fezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tôdas as amostras provadas foram incubadas durante 20 a 24 horas no meio teste. Os resultados obtidos, de acôrdo com a identificação das amostras nos testes bioquímicos usuais, são condensados no Quadro 1. Ressalta dêsses resultados que de 777 amostras de grupos bacterianos definidos como L-amino ácido oxidase-negativos, em nenhuma oportunidade foi encontrado um resultado que se pudesse interpretar como positivo. De modo inverso, entre 879 amostras de proteus e providence apenas 2,4 % corresponderam a resultados duvidosos ou negativos. Essa última porcentagem é pràticamente a mesma obtida por Ewing & cols. 1957), sôbre 764 amostras dos mesmos grupos. Vale acrescentar, no entanto, que as quatro espécies de **Proteus** estavam em geral escassamente representadas nessa última série, devido ao número elevado de amostras de providence.

Considerando ainda os resultados do Quadro 1, pôde ser observado que 41 amostras (5,2 %) correspondentes em sua maioria a **Escherichia, Salmonella** e **Citrofacler,** mostraram leve coloração esverdeada quando o meio teste era adicionado do reagente, resultados que de início interpretamos como duvidosos. Resultado semelhante ocorreu apenas em 5 amostras de **Proteus** ou «Providence». Além dêsses casos, um pequeno número de amostras de **«Providence»** e **Proteus morganii** demonstrou reações mais fracas que as usuais.

Reações duvidosas do tipo apontado já haviam sido referidas por Ewing & cols. (1957), que alertaram sôbre a possibilidade de a extensão do tempo de incubação poder revelar resultados positivos em grupos definidos como negativos. De fato, na maioria dos casos êsses autores adotaram um período de incubação de apenas 4 horas para proteus e providence. Inversamente, com o emprêgo de condições experimentais diversas, observou Uemura (1942) que a formação do ácido fenil-pirúvico por **P. vulgares** era ràpidamente seguida de descarboxilação para ácido fenil-acético. Também com o emprêgo do triptofânio como substrato, foi assinalada por Suassuna (1962) a rápida decomposição do ácido indolpirúvico com acumulo de ácido indol-acético entre outros produtos.

Diante dessas possibilidades de interferência com os resultados do teste, em uma experiência em que se incluiu a maioria das amostras selecionadas por seus resultados fracos ou duvidosos, ao lado de outras de comportamento normal, comparamos os períodos de incubação de 4 e de 20 - 24 horas. O Quadro 2 expressa os resultados alcançados.

Em relação a grupos L-amino ácido oxidase-negativos verifica-se que para ambos os períodos de incubação, com a repetição das provas não foram confirmadas as reações interpretadas como duvidosas nas condições de rotina. Quanto a **P. mirabilis** e **P. vulgaris** observa-se que em relação aos grupos L-amino ácido oxidase positivos são os dotados de maior atividade, vez que com 4 horas os resultados são essencialmente semelhantes aos obtidos com o período mais prolongado de incubação. Situação inversa ocorre em relação a «Providence» e às duas outras espécies de **Proteus,** particularmente **P. morganii.** Êste último, como vimos anteriormente, apresentara um maior número de resultados positivos fracos nas condições de

rotina. Parece claro, diante dêsses dados, que um período curto de incubação, nas condições adotadas oferece desvantagens no que diz respeito à especificidade da prova. Adicionalmente, êsses resultados não parecem sugerir que a degradação do ácido cetônico pesquisado possa ser fator de grande influência nas condições de emprêgo do teste, porque em nenhum caso reações mais fortes foram surpreendidas com 4 horas de inbução se comparadas com as obtidas em 20 - 24 horas.

Ewing & cols. (1957) apontaram a vantagem do meio sólido que usamos sôbre os meios líquidos devido a um maior número de resultados positivos em testes paralelos e, à maior estabilidade da reação corada com o cloreto férrico, muito mais fugaz quando realizada nos meios líquidos. Referem êsses autores que uma das vantagens do emprêgo da fenil-alanina sôbre outros possíveis substratos, como o triptofânio, é o baixo custo da primeira. A metionina também pouco dispendiosa ofereceu resultados

QUADRO 1 — Comportamento de 1656 amostras de bactérias intestinais em relação ao teste da fenil-alanina

GRUPO	N.º Provado	Negativo ou duvidoso		Positivo	
		N.º	%	N.º	%
Salmonella	157	157	100,0	0	—
Salmonella typhi	15	15	100,0	0	—
Citrobacter	82	82	100,0	0	—
Shigella	152	152	100,0	0	—
Escherichia	223	223	100,0	0	—
K.A.H.A. *	107	107	100,0	0	—
Pseudomonas	32	32	100,0	0	—
Achromobacter	9	9	100,0	0	—
Sub-total	777	777	100,0	0	—
Providence	185	13	7,0	172	93,0
Proteus vulgaris	37	0	—	37	100,0
Proteus mirabilis	317	1	0,3	316	99,7
Proteus morganii	226	4	1,8	222	98,2
Proteus rettgeri	114	3	2,6	111	97,4
Sub-total	879	21	2,4	858	97,6

* Klebsiella, Aerobacter, Hafnia ou Serratia.

QUADRO 2 — Resultados do teste da fenil-alanina em dois diferentes períodos de incubação

GRUPOS	N.º Provado	Tempo de incubação (horas)	Ácido fenil-pirúvico			
			—	±	+	++
Proteus vulgaris	10	4				10
		20-24				10
Proteus mirabilis	7	4	1			6
		20-24	1			6
Proteus morganii	25	4	12	1	3	9
		20-24	1	2	1	21
Proteus rettgeri	11	4	5		1	5
		20-24			3	8
Providence	13	4	1	2	1	9
		20-24	1		1	11
Chigella	18	4	18			
		20-24	18			
Escrerichia	19	4	19			
		20-24	19			
S.A.C. *	25	4	25			
		20-24	25			
K.A.H.S. **	14	4	14			
		20-24	14			

— negativo, ± duvidoso, + e ++ positivos
* Salmonella (14) Arizona (5) Citrobacter (6)
** Klebsiella (3) Aerobacter cloacae (3) A. aerogenes (2) A. liquefaciens (2) Hafnia (2) Serratia (2).

menos satisfatórios em sua experiência. Como já apontamos, Stumpf & Green (1944) verificaram que a fenil-alanina era o segundo dos amino ácidos sôbre os quais era mais intensa a desanimação oxidativa em que se inspira a prova. Por outro lado, em relação ao triptofânio, foi demonstrado (Suassuna, 1962) que em condições de elevada concentração de indol, devida à ação da triptofânase, podem resultar reações coradas com o cloreto férrico, introduzindo-se dêsse modo um fator potencial de perturbação no que respeita à interpretação da prova.

Parece-nos assim que a técnica adotada reune condições favoráveis de economia, facilidade de execução e, sôbretudo, de espe-

cificidade. A sua maior utilidade parece corresponder à caracterização do grupo «Providence» e sua diferenciação com **P. morganii** e **P. rettgeri** quando empregada em associação com o teste da urease, ao qual não deve substituir como sugerido por alguns de seus introdutores.

RESUMO

São apresentados resultados obtidos em rotina do diagnóstico de enterobactérias com o emprêgo do teste da fenil-alanina (Ewing & cols., 1957), para a evidenciação da L-amino ácido oxidase. Discute-se as condições de seu emprêgo e as vantagens relativas a outras técnicas descritas para o mesmo propósito.

SUMMARY

The results obtained in actual routine of identification of enteric bacteria, by using the phenylalanine test of Ewing & cols. (1957), are presented. Technical aspects related to this and other similar tests are discussed.

REFERÊNCIAS

BACHRACH, U. — A simple and rapid technique for the identification of Proteus — Providence strains. Jour. Clin. Pathol., 1960. **13:** 525-526.

BUTTIAUX, R., J. MORIAMEZ & J. PAPAVASSILIOU - Méthode simplifieé d'identification des **Enterobacteriaceae n'attaquant** pas rapidement le lactose. Ann. Inst. Pasteur, 1956. **90:** 133-143.

BUTTIAUX, R., R. OSTEUX, R. FRESNOY & J. MORIAMEZ — Les propriétés biochimiques du genre **Proteus.** Inclusion souhaitable des **Providencia** dans celui-ci. — Ann. Inst. Pasteur, 1954. **87:** 375-386.

CLARKE, P. H. & C. SHAW — Biochemical tests for **Proteus** and Providence cultures, J. Gen. Microbiol., 1954. **10:** i.

CLOSS, K. & S. D. HENRIKSEN — Uber den Nachweis von d — und l — Phenylanin in biologischen Flussigkeiten. Zentralbl. Physiol. Chem., 1938. **254:** 107-114.

EDWARDS, P. R., M. A. FIFE & W. H. EWING — Publ. Health Lab., 1961. **19:** 85. (citado por P. R. EDWARDS & W. H. EWING. 1962 — Identification of **Enterobacteriaceae.** 2nd ed. Burgens Publishing Co. Minneapolis. 258 p.).

EWING, W. H., B. R. DAVIS & R. W. REAVIS — Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. Publ. Health Lab., 1957. **15:** 153-167.

FALKOW, S. — A screening method for enteric organisms using a ferric chloride test. Amer. J. Clin. Pathol., 1957. **28:** 99-102.

HAMIDA, F. B. & L. LE MINOR — Une méthode rapide de recherche de la transformation de la L-phényl-alanine en acide phenyl-pyruvique. Ann. Inst. Pasteur. 1956. **50:** 671-673.

HENRIKSEN, S. D. — A comparison of the phenyl-pyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of **Proteus** from other enteric organism. J. Bacteriol. 1950. **60:** 225-231.

HENRIKSEN, S. D. & K. CLOSS — The production of phenyl pyruvic acid by bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1938. **15:** 101-113.

LE MINOR, L. — Le diagnostic de laboratoire des entérobactéries. St. Mandé, Seine. Ed. de La Tourelle. 1959. 150 p.

SHAW, C. & P. H. CLARKE — Biochemical classification of **Proteus** and Providence cultures. J. Gen. Microbiol., 1955. **13:** 155-161.

SINGER, J. — The breakdown of amino acids by **Enterobacteriaceae.** Atti del VI Cong. Internaz. Microbiol., 1953. Vol. I (Sez. V): 867.

SINGER, J. & J. BAR-CHAY — Biochemical investigation of Providence strains and their relationship to the **Proteus** group. Jour. Hyg., 1954. **52:** 1-8.

SINGER, J. & B. E. VOLCANI — An improved ferric chloride test for differentiating Proteus — Providence group from other enterobacteriaceae. J. Bacteriol., 1955. **69:** 303-306.

STEWART, D. J. — The phenylalanine test on Kligler's iron agar for the identification of **Proteus.** Nature, 1959. **183:** 1537-1538.

STUMPF, P. K. & D. E. GREEN — L-amino acid oxidase of **Proteus vulgaris.** J. Biol. Chem. 1944. **153:** 387-399.

SUASSUNA, I. — Estudos ssôbre a detecção de indol em culturas bacterianas. Tese. Faculdade Nacional de Medicina. Univ. do Brasil. Rio de Janeiro, 1962. 169 p.

SUASSUNA, I. R., I. SUASSUNA & R. DIOGO - MACHADO — Valor da prova da fenil-alanina-desaminase e do reativo de Silberstein-Rabinowitz em rotina diagnóstica de **Enterobacteriaceae.** Ciência & Cultura, 1961. **14:** 53-54.

UEMURA, T. — The decomposition of amino acids by bacteria. I. The oxydative decomposition of amino acids by **Proteus vulgaris.** — J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1942. **18:** 245-256. In, Chem. Abst., **45:** 3024e, 1951.

Rev. Bras. Microb., 1962, 3 (2): 47-56

DETERMINAÇÃO DE UM CICLO VITAL DO VIRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE (NDV) EM CULTURA DE CÉLULAS HeLa E FIBROBLASTO DE EMBRIÃO DE PINTO (*)

JOSÉ MILTON ANDRIGUETTO

Do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná
Da Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade do Paraná

Recebido para publicação em 10 de junho de 1963

Nosso trabalho procura demonstrar um ciclo vital do vírus da doença de Newcastle em células HeLa e fibroblasto de emibrião de pinto, pela verificação do efeito citopatogênico.

O ciclo vital, ou seja, a adsorção do vírus sôbre a célula, e período de latência ou eclipse e a liberação das partículas de vírus produzidas nas células, já é bem conhecido e estabelecido em bacteriófagos, onde foi primeiro estudado. Apresenta DELBRUCK (1942) detalhada exposição sôbre o assunto. Sabe-se que cada partícula de vírus é composta de duas unidades — uma ligada à adsorção do vírus na célula viva e contém os elementos da especificidade; a outra é responsável pela multiplicação das partículas de vírus. Assim um vírus em presença da célula viva, absorve-se ou prende-se à mesma, num período de tempo maior ou menor, conforme sua afinidade para com a célula. Uma vez adsorvido, há um período durante o qual aparentemente desaparece e, virtualmente, por isso, nenhum vírus pode ser detectado, por tempo variável, dependente do vírus estudado, da natureza da célula e de outros fatôres circunstanciais. Findo êste período, denominado período de latência ou «eclipse», numerosas partículas são libertadas pelas células.

Diversos autores estudaram um ciclo vital do NDV, em diferentes tipos de células e através diferentes métodos. BANG (1953), por exemplo, estudou, pela microscopia eletrônica, o NDV em fibroblasto de embrião de pinto, verificando a formação de projeções na superfície das células infectadas que, aparentemente, após a destruição celular, liberariam partículas recém-formadas.

MAESTRONE (1954) comparou o crescimento do vírus sôbre cultura de membrana cório-alantóide, com o título hemaglutinante, comprovando maior atividade desta para a produção celular.

QUESADA e CONTINI (1954) compararam paralelamente o crescimento do **Myxovirus multiforme** em fibroblasto de embrião de pinto e o título de hemaglutinação dos fluidos infectados na 9.ª hora, parecendo contemporânea com o segundo ciclo do desenvolvimento do vírus que, segundo os autores, chegara então a seu gráu máximo de maturidade ou proliferação.

Enqontraram LEVINE e SAGIX coincidência de título entre formação de placas em camada monocelular de fibroblasto de embrião de pinto, método de DULBECCO (1952) e a titulação em ovos embrionados. O cres-

(*) Tese de doutoramento, abril de 1963, E.A.V.U.P.

cimento do vírus exibia um período latente de 3 para 4 horas, seguido por período de liberação, com duração de 4 a 8 horas e uma média de produção, por célula, de 18 a 37 partículas.

SAGIK e LEVINE (1957) verificaram que o ataque do vírus à célula é máximo e constante entre pH 5,0 e 9,0, caindo para um mínimo a pH 4,0 e pH 10,0 a 10,5. Parece haver maior multiplicação do vírus entre pH 6,8 e 7,7 em temperatura de 37°C. Salientam os autores que a eluição pode ocorrer mesmo quando sòmente uma partícula de vírus é relacionada (em eritrócitos), na temperatura de 37°C.

RUBIN, FRANKLIN e BALUDA (1957), estudando quantitavamente os vários estágios da infecção do NDV às qélulas de embrião de pinto, cultivadas pelo método de DULBECCO (1952) determinaram a velocidade constante para a adsorção. Encontraram que, durante o período exponencial de multiplicação viral, o vírus liberado e aquêle associado às células se correspondiam quantitativamente. Segundo os autores o tempo necessário para a eluição de uma partícula de vírus, após sua formação e depois de adquirir característica infectiva, é aproximadamente de 80 minutos. Determinaram que o aparecimento da primeira progênie do vírus ocorre 3 a 4 horas após a infecção.

KOHN e GOLDWASSER (1957) verificaram que o período latente de uma amostra de NDV, em fibroblasto de embrião de pinto, método de DULBECCO (1952), era de 9 horas, seguido de um período de liberação com duração de 3 a 4,30 horas. Calcularam que a produção média, por célula, era de 300 partículas.

BANG e WARWICK (1957), em estudo comparativo de duas amostras de NDV sôbre células de membrana alantóica, em cultura primária, verificaram que cêrca de 80 % do vírus se adsorvia às células dentro de meia hora. Para as duas amostras, uma virulenta e outra avirulenta para embriões de pinto, encontraram diferença de poder destrutivo para com as células, sendo maior para a primeira amostra.

HORVÁTH (1958) encontraram um período de latência de 3 a 4 horas para o NDV, em fragmentos de membrana córioalantóide, seguido de dois ciclos de multiplicação do vírus separados por período constante.

DEINHARDT e cols. (1958), em estudo minucioso sôbre a relação existente entre a célula hospedeira e o vírus, encontraram elementos que sugerem uma reprodução linear do vírus com liberação do mesmo, simultaneamente à sua formação.

No presente trabalho procuramos determinar um ciclo vital do NDV, considerando o tempo de adsorção, latência e liberação, verificados pela infectividade do fluido de cultura às células HeLa e fibroblastos de embrião de pinto. A nossa experimentação baseou-se nos valôres médios de infectividade, expressos pela DITC50, sem preocupação do número de partículas produzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRA DO VIRUS: Utilizamos em nossas experimentações amostra de virus da doença de Newcastle, da coleção do Laboratório de Virus do Instituto de Microbiologia, da Universidade do Brasil. Esta amostra, quando testada, mostrou possuir título infeccioso, em DITC50, na diluição de 10^{-5} para fibroblasto de embrião de pinto e 10^{-3} para células HeLa. Quando inoculada em ovo embrionado matava o embrião em, aproximadamente, 40 horas. O líquido alantóico acusava título hemaglutinante de 1:1.280. Para nossas experiências partimos de um «pool» de culturas de células HeLa, e de fibroblasto de embrião de pinto, infectadas pela amostra do virus.

2. CULTURA DE TECIDOS: a) **HeLa** — utilizamos células na cepa em uso no Laboratório de Virus, que eram mantidas em meio de GEY e GEY (1936), ligeiramente modificado naquele laboratório:

Sol. mãe A

Na Cl (J. T. Baker Chemical Co.)	70,0 g
K Cl (J. T. Baker Chemical Co.)	3,7 g
$NaHPO_4$ — 12 H_2O (J. T. Baker Chemical Co.)	3,01g
KH_2PO_4 (J. T. Baker Chemical Co.)	0,24g
Glicose (E. Merck)	10,0 g
Vermelho de Fenol a 0,1% (Fisher Scientific Co.)	100
Água deionizada q. s. p.	1.000 ml

Esta solução era conservada a 4°C e, no momento do uso, diluida a 1:10, esterilizada por autoclavagem a 110-115°C, durante 10 minutos.

Sol. B

Mg Cl_2 — 6 H_2O (E. Merck)	0,42g
Mg SO_4 (J. T. Baker Chemical Co.)	0,14g
Ca Cl_2 (J. T. Baker Chemical Co.)	0,34g
Vermelho de Fenol a 0,1% (Fisher Scientific Co.)	1 ml
Água deionizada q. s. p.	100 ml

Esterilizada por autoclavagem a 110 - 115°C, por 10 minutos.

Sol. C

$NaHCO_3$ (J. T. Baker Chemical Co.)	2,25g
Vermelho de Fenol a 0,1% (Fisher Scientific Co.)	1 ml
Água deionizada q. s. p.	100 ml

Após saturação com CO_2 era distribuída em tubos com capuz atarrachado e autoclavada a 110 - 115°C, por 10 minutos.

Sol. salina de GEY e GEY, completa

Solução A	90%
Solução B	5%
Solução C	5%

A solução salina completa era acrescida de 10% de sôro humano, 10% de hidrolisado de lactoalbumina (a 5% em sol. de GEY A + B) e 10% de extrato de levedo (a 1% em sol. GEY A + B). Adicionavam-se antibióticos — penicilina 1.000 U/ml, estreptomicina 1.000 U/ml, Mycostatin 50 U/ml. As células, mantidas neste meio, eram tripsinizadas, quando do uso, com solução de tripsina (Difco 1:250) a 0,5%, diluida em solução salina ABC para 0,1%. A suspensão de células assim obtida era centrifugada a 1.000 rpm, por 3 minutos, sendo o precipitado ressuspenso na proporção de 1:100, aproximadamente, em solução salina completa e inoculada em 50 ml de meio constituído de solução ABC 85%, lactoalbumina 10%, sôro de coelho 5% e atnbióticos, meio êste designado como M2. O M2 contendo a suspensão de células era distribuído em 100 tubos 12 mm x 100 mm, de vidro neutro Pyrex, na quantidade de 0,5 ml por tubo. Os tubos de ensaio contendo as células, depois de perfeitamente fechados com rôlha de borracha, eram incubados a 37°C, por aproximadamente 24 horas. Após êste período eram acrescentados 0,4 ml, por tubo, de solução constituída por solução salina ABC 95%, sôro de coelho 5% e antibióticos, a fim de transformar o M2 em meio de inóculo (M3). O M3, no qual a multiplicação de células é mínima, constituiu o meio para nossas experiências.

b) **Fibroblasto de embrião de pinto** — Ovos embrionados, com 9 dias (PAUL, 1957), eram convenientemente desinfectados na região da câmara de ar e abertos com tesoura. O embrião era colocado em placa de Petri contendo solução salina balanceada GEY (ABC), onde sofria lavagem e extirpção dos olhos. Após uma segunda lavagem nas mesmas condições, o embrião era colocado em vidro de relógio contido em placa de Petri e, com auxílio de tesoura, reduzido a finos fragmentos. Adicionavam-se 10 ml de solução ABC, para suspender os fragmentos que eram, então, transferidos para tubo de ensaio onde se sedimentavam, sendo o sobrenadante abandonado. Os fragmentos eram lavados por 3 vêzes com solução ABC. Retirado o sobrenadante da última lavagem, adicionava-se tripsina (4 partes de tripsina a 0,5% em 1 parte de solução C de GEY), na quantidade de 7 ml por embrião, e agitava-se durante 5 minutos por pipetagens sucessivas, com pipeta provida de borracha para cota-gotas, conservando o tubo com os fragmentos em banho maria a 37°C, para melhor ação da tripsina. Obtinha-se assim o embrião microfragmentado. O homogeneizado de células era filtrado em gaze, recebido em tubo de centrífuga, e centrifugado a 1.000 rpm por 3 minutos. Abandonava-se o sobrenadante e ressuspendiam-se as células em solução ABC, para retirar o excesso de tripsina, centrifugando-se novamente nas mesmas condições. O precipitado era ressuspenso no seguinte meio, ajustando-se o pH em tôrno de 7,6:

Sol. de GEY ABC	90%
HLA	5%
Sôro bovino	5%
Penicilina	10.000 U/ml
Estreptomicina	10.000 U/ml
Mycostatin	50 U/ml

Utilizamos dois embriões para 100 ml do meio acima. Distribuimos, sob agitação, 0,9 ml por tubo de 12 mm x 100 mm, num total de 100 tubos de vidro neutro Pyrex, fechando-os com rôlha de borracha e incubando-os a 37°C, por 24 horas.

A vidraria utilizada nas culturas citadas passava pelo seguinte processo de limpeza e esterilização:

1. — Fervura em água de sabão, por 60 minutos;
2. — Lavagem em água corrente;
3. — Fervura em água deionizada;
4. — Lavagem em água deionizada;
5. — Secagem em estufa;
6. — Esterilização a 160°C, por 120 minutos.

3. INOCULAÇÃO DO VIRUS NAS CULRAS: a) **Cultura de HeLa** — Utilizamos culturas de 24 horas aproximadamente, em tubo de ensaio, inoculadas com DITC50 de virus, calculada pelo método de REED e MUENCH (1960). Em tantos tubos quantos fossem necessários era inoculada diluição do virus que, no tubo inóculo, desse diluição de DITC50. A partir dêstes tubos, marcados «inóculo», era retirado o fluido (fluido inicial designado doravante por F 1), após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, sendo cada inóculo substituido por novo fluido, que designaremos por F 2. O fluido inicial, F 1, era titulado por diluições sucessivas, para cada tempo, em tubos de cultura de HeLa, incubadas a 37°C. Visava êste procedimento medir, pela verificação posterior do efeito citopatogênico, a quantidade de virus existentes no F 1 e, portanto, ainda não adsorvida ou, se fôsse o caso, a adsorção total.

Do fluido (F 2) que substituiu o fluido inicial, retirávamos cada hora, contada a de 0,1 ml, que eram diluidos sucessivamente em tubos contendo cultura de células partir do momento da inoculação, inóculos HeLa. Pretendíamos, assim, verificar a que tempo, aproximado, se daria a liberação do virus, sempre pela posterior verificação do efeito citopatogênico.

Por ocasião da substituição do F 1 pelo F 2, o lençol de células e as paredes internas do tubo eram lavados com M3, a 37°C. Visava esta lavagem a retirada de partículas adsorvidas.

Em cada diluição e passagem de fluido era feita homogeneização por pipetagens sucessivas, usando-se uma nova pipeta para cada diluição. Nos intervalos das semeaduras a cultura era conservada em estufa a 37.C.

b) **Fibloblasto de embrião de pinto** — Para verificação do período de adsorção, eclipse e liberação do virus da doença de Newcastle em fibroblastos de embrião de pinto, usamos a mesma técnica descrita para células HeLa, modificada apenas quanto ao meio de cultura.

RESULTADOS

Os resultados obtidos vêm representados nos gráficos que seguem, onde são compa-

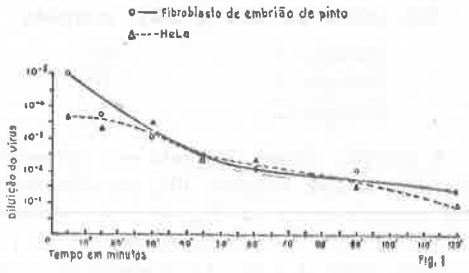


Fig. 1

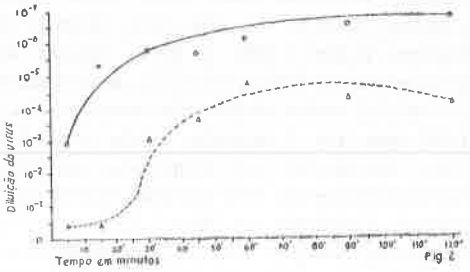


Fig 2

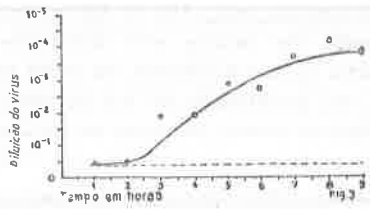


Fig 3

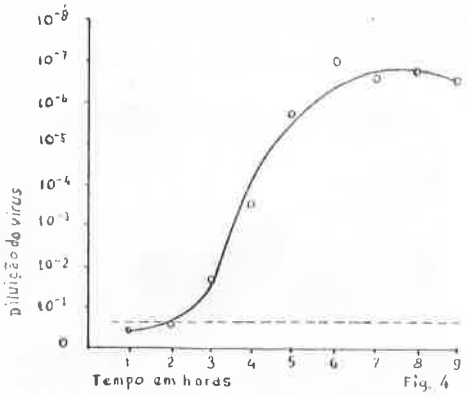


Fig. 4

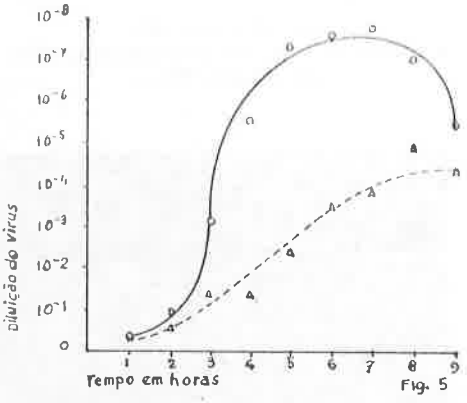


Fig. 5

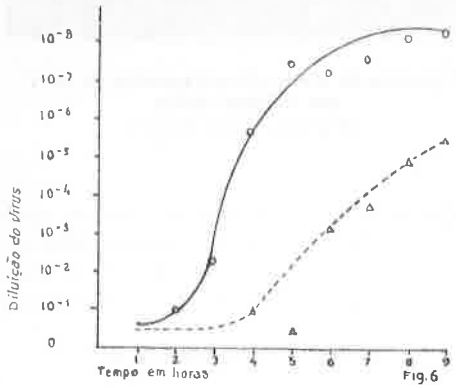


Fig. 6

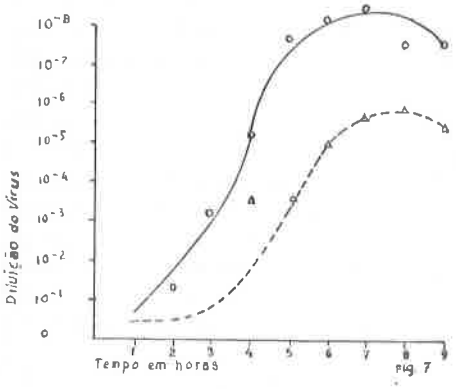


Fig. 7

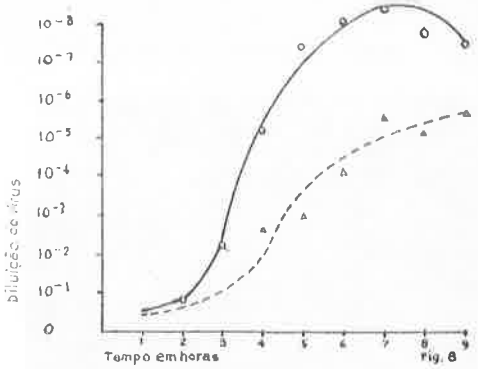


Fig. 8

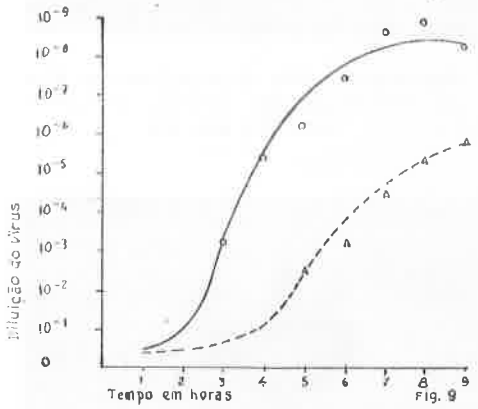
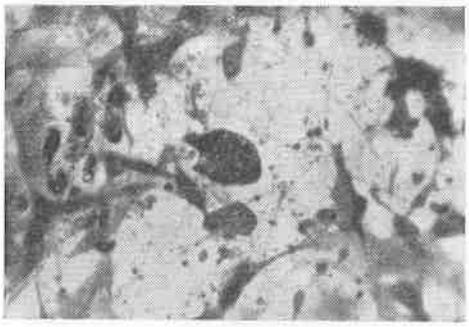


Fig. 9

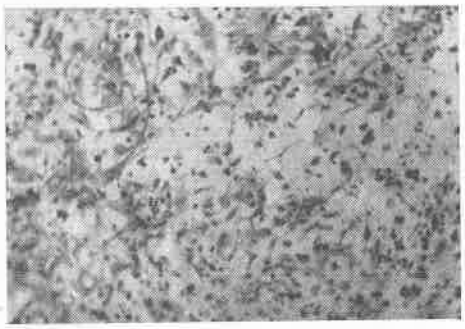


Aspectos do efeito citopatogênico do NDV em fibroblastos de embrião de pinto. (oc. 10 x obj. 45).

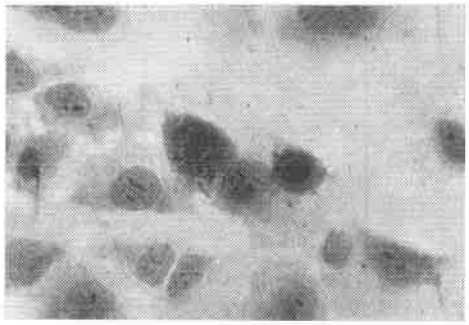
rados os efeitos produzidos em fibroblasto de embrião de pinto e em células HeLa.

A figura 1 mostra os resultados, expressos em valôres médios, pela DITC50, da adsorção do virus, medidos no fluido inicial.

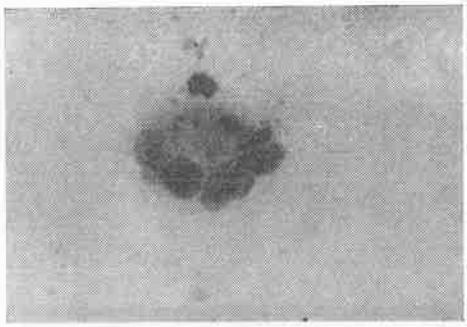
Na figura 2 temos a intensidade da liberação do virus, expressa em DITC50. Resulta da titulação do F 2, em função dos diversos tempos em que o F 1 ficou em



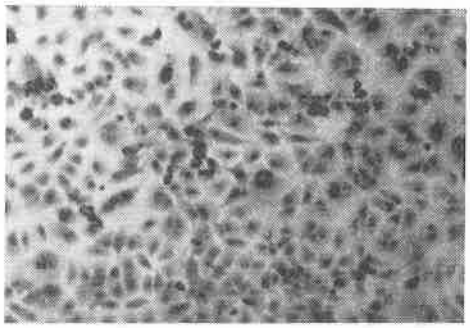
Aspectos do efeito citopatogênico do NDV em fibroblasto de embrião de pinto. (oc. 10 x obj. 45)



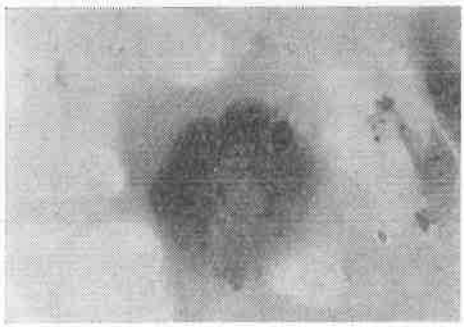
(oc. 10 x obj. 45) Aspectos do efeito citopatogênico do NDV em células HeLa.



Aspectos do efeito citopatogênico do NDV em células HeLa. (Aspecto Panorâmico)



Aspectos do efeito citopatogênico do NDV em células HeLa. (Aspecto Panorâmico)



contato com as células, sendo os valôres dados pela média aritmética das DITC50, dos diversos tempos.

As figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, comparam e demonstram a DITC50 por valôres encontrados no F 2, para ambas as culturas, após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, respectivamente, de contato do F 1 com as células. Referem-se à titulação no F 2 até 9 horas.

COMENTÁRIOS

O efeito citopatogênico nos permitiu verificar a existência ou não do virus nos fluidos analisados e o título alcançado pelas diluições sucessivas do mesmo. Traduziu-se, principalmente, por descontinuidade do lençol celular ocasionada por desprendimento das células que, de início, tornavam-se arredondadas e de bordos eriçados. Observamos que a solução na continuidade da camada celular era progressiva e com rápido desprendimento de tôda a camada. Verificou-se freqüente formação de sincícios, no-

tando-se que as células infectadas apresentavam maior refringência.

Êstes efeitos mostravam-se com maior intensidade em menor tempo para os fibroblastos do que para as células HeLa.

Em preparações coradas, feitas a partir de lamínulas colocadas nos tubos de cultura, e sôbre as quais cresciam as células posteriormente infectadas, podia-se notar, em complementação, citoplasma vacuolar, muitas vêzes com granulações eosinófilas e em progressiva desintegração, núcleos picnóticos e ocorrência freqüente de células gigantes.

O exame repetido do fluido inicial, no qual inoculamos dose conhecida de vírus, e no qual foi o mesmo pesquisado após os diversos períodos de contato do fluido virulento com a cultura de células, fornece dados para a verificação da adsorção do vírus. Para células HeLa a adsorção deu-se sòmente após 15 a 30 minutos de contato, conforme a experiência. Tal discordância pode ser explicada pela maior ou menor afinidade das partículas de virus pelas células, pelo bloqueio de sua ação por material estranho a elas aderido, segundo SCHLESINGER, citado por DELBRUCK (1942). Outra explicação aceitável para esta discrepância pode ser a variação, embora mínima, de partículas na porção (0,1 ml) de fluido inoculado. Estas mesmas razões podem explicar a adsorção total em alguns casos (experimentos 3 e 6 aos 90 minutos e 2, 3 e 5 aos 120 minutos, e parciais em outros, para os mesmos tempos. Igualmente, alguns valôres podem ser devidos a alguma partícula de virus não removida da parede do tubo ou de sôbre o lençol de células, pela lavagem efetuada por ocasião da troca de fluidos. Podem também, como observaram DEINHARDT e cols. (1958) serem provenientes de uma multiplicação linear do virus, com liberação de poucas partículas face a uma adsorção mínima.

Para a adsorção do virus em fibroblastos de embrião de pinto, há maior concordância para os mesmos que para células HeLa. A intensidade de adsorção parece ser maior até 60 minutos. Também aos 5 minutos já há adsorção eficiente, como evidencia a liberação para êste período de adsorção.

A liberação do virus, pesquisada no F 2, parece iniciar-se após 2 a 3 horas, contadas da inoculação, para fibroblasto de embrião de pinto, alcançando um máximo entre 5 e 8 horas. Para HeLa a liberação parace ser mais demorada, iniciando-se sòmente após 4 a 5 horas da inoculação e alcançando seu maior gráu entre 7 e 9 horas.

Em função do tempo que o F 1 ficou em contato com as células e durante o qual deu-se a adsorção, parece não haver diferença bastante significativa para a liberação do virus em fibroblasto de embrião de pinto, entre 15 e 60 minutos, havendo ligeiro aumento para os 90 minutos e 120 minutos, como se observa na figura 2. Nesta mesma figura e para o mesmo objetivo em cultura de células HeLa, a intensidade de liberação do virus parece ser maior aos 60 minutos.

Quanto ao período de latência, para o virus estudado, a análise dos diversos quadros, que expõem os resultados encontrados, permitem-nos deduzir que é de 2 a 3 horas para fibroblastos, e de 4 a 5 horas para células HeLa.

CONCLUSÕES

Os nossos estudos sôbre o período de adsorção, latência e liberação da amostra de NDV, frente à células HeLa e fibroblastos de embrião de pinto, permitem concluir que:

1. **HeLa.**

a. — A adsorção mais intensa se processa sòmente após 30 minutos de contato do fluido virulento com a camada celular;

b. — O período de latência tem duração de 4 para 5 horas;

c. — A liberação se inicia após a 5 horas, parecendo alcançar um máximo entre 7 e 9 horas.

2. **Fibroblasto de embrião de pinto**

a. — Após 5 minutos de contato do fluido virulento com o lençol celular já existe adsorção;

b. — O período de latência parece ser de 2 a 3 horas;

c. — A liberação das partículas virais inicia-se após 2 a 3 horas, alcançando um máxido entre 5 e 8 horas.

3. Em relação ao conjunto podemos concluir ainda, com o método empregado, que parece haver maior afinidade da amostra estudada para fibroblastos de embrião de pinto do que para células HeLa.

RESUMO

Pesquisou-se a adsorção, latência e liberação de uma amostra do virus da doença de Newcastle em cultura de tecido de fibroblasto de embrião de pinto e em células HeLa. Buscou-se evidências, que permitissem concluir o proposto, na verificação do efeito citopatogênico do virus, frente às células citadas. Para tanto foi o virus inoculado na cultura de tecido e após 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, trocou-se o fluido destas culturas, pesquisando-se no fluido original a presença de virus por inoculações, em diluições sucessivas, em novas culturas, sendo após verificado, pelo efeito citopatogênico, o título alcançado. No fluido que substituiu o fluido original pesquisou-se, pelo mesmo método, a presença do virus depois de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 horas.

Os resultados, baseados em DITC50, permitiram concluir que a absorção era efetiva aos 30 minutos, aproximadamente, para HeLa, e que aos 5 minutos já se processava, com bastante evidência, em fibloblasto de embrião de pinto. Para o período de latência encontrou-se uma duração de 2 a 3 horas para fibroblasto e 4 a 5 horas para HeLa, depois do que iniciava-se a liberação, com um máxima entre 5 e 8 horas para as primeiras células e 7 a 9 para as segundas.

SUMMARY

The adsorption, the period of latency and the liberation of particles of a sample of the virus of Newcastle disease, in tissue culture of chicken embryo fibroblasts, and in HeLa cells, was studiend. The main aim of this work was to look for evidences of cytopathogenic effect of the virus on the mentioned cells. The virus was inoculated in tissue culture and the fluid of these cultures was changed in different times from 5 to 120 minutes. The presence of the virus was tested in the original fluid after inoculation, as well as in new cultures obtained after successive dilutions. The titrations were carried out in the basis of the cytopathogenic effect.

From the DITC50 determinations, it was possible to conclude that the adsorption was effective at 30 minutes for the HeLa cells and 5 minutes for fibroblasts. The duration of the period of latency was of 2 to 3 hours for fibroblasts and of 4 to 5 hours for the HeLa cells. The maximum liberation was between 5 to 8 hours for fibroblasts and between 7 to 9 hours for HeLa cells.

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho foi possível graças ao interêsse e auxílio das seguintes Instituições, às quais somos gratos:

— CAMPANHA NACIONAL DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES);

— ESCOLA DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PARANÁ;

— INSTITUTO DE BIOLOGIA E PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DO PARANÁ;

— SERVIÇO DE VIRUS DO INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA DA UNIVERSIDADE DO BRASIL.

Agradecemos também a todos os que, de qualquer modo, nos proporcionaram ajuda.

BIBLIOGRAFIA

1. BANG, F. B. — The development of the virus of Newcastle disease in epitelial and fibroblast cells in tissue culture. **Bulletin of Johns Hopkins Hospital,** 1953. **92:** 291 - 307.

2. BANG, F. B. & WARWICK, A. — The effect of an avirulent and a virulent strain of Newcastle virus (**Myxovirus multiforme**), on cells in tissue culture. **Journal of Pathology,** 1957. **73** (2): 321 - 330.

3. DEINHARDT, F. et alii — Studies on persistent infections of tissue cultures. III. Some quantitative aspects of host-cell-virus interactions. **Journal of Experimental Medicina,** 1958. **108** (4): 573 - 589.

4. DELBRUCK, M. — Bacterial viruses (Bacteriophages). **in** NORD, F. F. & WERKMAN, C. H. — Advances in Enzimology and related Subjects, 1st, ed. New York, Interscience Publishers, 1942, **2**, p. 1 - 30.

5. DULBECCO, R. — Productions of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. **Proceedings of the National Academy Science of U. S.,** 1952. **38:** 747 - 752.

6. GEY, G. O. & GEY, M. K. — The maintenance of human animal cells and tumor cells in continuous culture. I. Preliminary report: Cultivation of mesoblastic tumours and normal tissue and notes on methods of cultivation. **The American Journal of Cancer,** 1936. **27:** 45 - 76.

7. HORVÁTH, S. — Study on the cyclic multiplication og influenza and Newcastle disease viruses in tissue culture. **Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungriae,** Budapest, 1958. **5:** 123 - 131.

8. KONH, A. & GOLDWASSER, R. — Multiplication of Newcastle disease virus in chick embryo tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** 1957. **96:** 198 - 200.

9. LEVINE, S. & SAGIK, B. P. — The interactions of Newcastle disease virus (NDV) with chick embryo tissue culture cells: attachment and growth. **Virology,** Baltimore, 1956. **2:** 57 - 68.

10. MAESTRONE, G. — Richerche sulla curva di crescita del virus di Newcastle su colture di tessuti "in vitro". **Atti della Societá Italiana delle Scienze Veterinarie,** 1954. **8:** 640 - 643.

11. PAUL, J. — Cell and tissue culture. 1st. ed. London, E. & S. Livingstone, 1957, VIII + 261 p.

12. QUESADA, A. & CONTINI, A — Curve di crescita del virus della malattia di Newcastle basate sui titoli di emoaglutinazione. **Atti della Societá Italiana Scienze Veterinarie,** 1954. **8:** 660.

13. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints, **in** JAWETZ, E. et alii. — Manual de Microbiologia Medica, 1.ª ed. en español, México, El Manual Moderno, 1960, p. 271-272.

14. RUBIN, H. et alii — Infection and growth of Newcastle disease virus (NDV) in cultures of chick embryo lung epithelium. **Virology,** 1957. **3:** 597-600.

15. SAGIK, B. P. & LEVINE, S. — The interaction of Newcastle disease virus (NDV) with chicken erythrocites: attachment, elution and hemolysis. **Virology,** 1957. **3:** 401-416.

Crônica

REVISTAS CIENTÍFICAS

Em artigo recente, Gutierrez-Vasquez (1), redator da Revista Latinoamericana de Microbiologia, faz judicioso comentário a respeito de publicações científicas de biologia nos países latinoamericanos. Há muito pensamos no assunto, concluindo do mesmo modo que êle.

Enumera Vasquez defeitos e deficiências daquelas publicações e suas causas, desde deficiências de planejamento até a forma de sua apresentação. Essas falhas poderão e deverão ser corrigidas, pensamos nós, com o progresso técnico e cultural dos biologistas dos países latinoamericanos. Tudo indica que uma transformação neste sentido está se operando, a cultura dêsses povos vai atingindo um desenvolvimento satisfatório e permitirá a expansão de sua capacidade e inteligência.

Todavia, já se tem feito, e se fazem, excelentes trabalhos de biologia nesses países, os quais deixam de ser conhecidos pela distribuição pequena e pela exiguidade do número de cópias. Resulta que tais trabalhos ficam com caráter puramente local. De outro lado, as publicações não obedecem a um critério padronizado ou standard, o que lhes tira em parte o valor.

De outro lado as instituições oficiais, que são as que reunem os melhores investigadores e as condições mais favoráveis para pesquisar, retêm errôneamente os trabalhos alí realizados para serem publicados em revistas próprias, cuja direção e divulgação são deficientes e muitas vêzes dirigidas por funcionários pouco qualificados para essa função.

Em vez de inúmeros jornais e revistas de medicina e biologia, lutando todas com carência de recursos e trabalhos para manterem regularidade de publicação e nível elevado do padrão científico, deveria-se reduzir o seu número à decima parte ou menos, conforme as possibilidades de cada país, para poder elevar o padrão publicitário e científico com benefício de todos e do próprio país. Aqueles defeitos fazem os bons investigadores menospresar a literatura nacional por suas deficiências e se voltarem para a literatura dos países organizados onde seus conhecimentos ficam assim a ela subordinados, sem poderem colaborar no progresso geral com as luzes dos seus proprios trabalhos, apagados e retidos no estreito mérito do respetivos paises.

Nos países latinoamericanos em fase de desenvolvimento cultural, não se comprende uma pletora de revistas científicas cheias de falhas e com trabalhos deficientes, feitos muitos para satisfazer a vaidade dos diretores daqueles estabelecimentos. Melhor será ter pouco e bom. Ademais, essas revistas prejudicam os bons trabalhos diluidos e inclusos entre outros deficientes, na heterogeneidade daquelas publicações.

Fazemos nossas as explicações de Vasquez, que não há propósitos demolidôres mas apenas crítica construtiva no sentido de melhorar o padrão das publicações, selecionando trabalhos que obedeçam a um mínimo de perfeição que tragam realmente progresso aos conhecimentos científicos e tenham suficiente difusão.

---

(1) Gutierrez Vasquez — Rev. Latinoamericana de Microbiologia, 4: 1, 1961.

Noticiário

ATIVIDADES DAS SOCIEDADES FEDERADAS

— SÃO PAULO —

Reunião de Junho de 1962:

Resultado de Laboratório sôbre a vacinação contra a poliomielite (tipo Sabin), realizada em São Paulo. Dados sorológicos.

Reunião de Outubro de 1962:

1) Trabulsi, L. R. & Ewing, W. H. — Uso do meio de acetato de sódio na determinação entre **Shigella** e **Escherichia.**
2) Coli Brito, T. Tava Neto, E. — Blastomicose disseminada da cobaia.
3) Martins de Castro, R. & Avelar Alchorme — **Micresporum cookei;** seu isolamento de roedores silvestres brasileiros.

Reunião de Dezembro de 1962:

1) Santa-Rosa, C. A. & Pestana de Castro, A. F. — Leptoespirose. Animais silvestres como reservatório em São Paulo.
2) Camargo, A. — Considerações sôbre a sorologia da Toxoplasmose.
3) Taunay, A. E., Bastos, C. O. & Martins, H. — Epidemia de meningite por **Salmonella grumpensis.**

CONCURSO DE DOCÊNCIA

Para concorrer ao títulos de Docente-Livre de Higiene e Legislação Farmacêutica da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade do Ceará, nossa conssócia Farmacêutica **MARIA ZELIA ROUQUAYROL** apresentou a seguinte tese: **Diarréias Infantis em Fortaleza. Contribuição ao seu estudo com especial referência às shigeloses».**

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Esta moderna Instituição foi ideada e organisada em 1958 pelo Prof. Carlos da Silva Lacaz, Catedrático de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a colaboração dos Profs. Antonio Dacio Franco do Amaral e João Alves Meira, das Cátedras de Parasitologia e de Doenças Tropicais.

Reuniu o Instituto o antigo Pavilhão de Vírus e Rickettsias e as cátedras de Microbiologia e Immunologia, Clínica de Doenças Tropicais e Infectuosas da mesma Faculdade.

Além das finalidades do ensino dessas cátedras, o Instituto destina-se a estudo de doenças chamadas tropicais, portanto interessantes para o nosso país.

Instalado num moderno edifício de 2 pavimentos, funciona anexo à Fac. de Medicina, porém como entidade própria e tem o seguinte organograma:

I — Conselho Administrativo, composto do Diretor ou Vice-Diretor da Faculdade de Medicina e dos Profs. das Cátedras de Micro-

biologia e Imunologia e Parasitologia e de Doenças Tropicais e Infectuosas.

II — Órgão Executivo:

A — a) Diretor; b) Departamento de Microbiologia; c) Clínica de Doenças Tropicais e Infectuosas.

B — 1) Divisão de ensino de Pos-graduação; 2) Divisão de Zoologia Médica, climatologia e Geografia médica.

Elementos de cooperação: Departamento de Anatomia Patológica; Serviço de Hematologia; Departamento de Histopatologia; Departamento de Fisiologia; Departamento de Enzimologia; Departamento de Farmacologia; Clínica Dermatológica; Secção de Bioestatística; Serviço de Nutrição.

O Instituto mantém ligações com o Instituto Oswaldo Cruz, Dep. de Endemias Rurais, Faculdade de Higiene e Saúde Pública de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Adolfo Lutz, Instituto Biológico e mais alguns serviços públicos do Estado.

Além dos cursos pertinentes às cadeiras constantes dos componentes do Instituto, nele se prelecionam cursos de aperfeiçoamento (pos-graduação) para médicos tropicalistas.

Organizou um Museu de Medicina Tropical e promoveu campanhas de Educação Sanitária, constantes do seu programa de atividades.

Edita uma bem elaborada Revista de Medicina Tropical, regularmente publicada, um Boletim informativo das suas atividades e possue uma biblioteca especializada.

Constitue o corpo docente do Instituto algumas dezenas de médicos integrantes das Cátedras que o compõem e de outras Instituições e Serviços do Estado.

Funciona como coordenador dos Cursos o Dr. Raymundo Martins de Castro, a quem se poderão dirigir os interessados para obter informações, inclusive bolsas de estudo.

Endereço do Instituto: Avenida Dr. Arnaldo. Caixa Postal 2921. — São Paulo — Brasil.

XV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA

Por ocasião da XV Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizou-se em Campinas (São Paulo), no dia 10 de julho de 1963, um encontro informal de sócios da Sociedade Brasileira de Microbiologia, no qual participaram:

Rahme Nelly Neder — Piracicaba, São Paulo.

Sérgio Olavo Pinto da Costa — Curitiba, Paraná.

João Lúcio de Azevedo — Piracicaba, São Paulo.

Waldenor Barbosa da Cruz — Rio de Janeiro, Gb.

Miguel Flôres da Cunha — Rio de Janeiro, Gb.

Irene Picard Flôres da Cunha — Rio de Janeiro, Gb.

Adenir Perini — São Paulo, S.P.

Celso Bianco — São Paulo, S.P.

Rudolf L. Hausmann — Rio de Janeiro, Gb.

Foram abordados vários tópicos referentes à nossa Sociedade, principalmente em relação à «Revista Brasileira de Microbiologia». Foi constatada, de início, a necessidade de maior colaboração, por parte dos sócios, no sentido do envio de trabalhos originais ou de revisões atualizadas, afim de que a revista possa, de agora em diante, ter a sua publicação regularizada, inicialmente em dois números por ano. Desde que exista a garantia da publicação regular, não haverão de faltar, de certo, contribuições cada vez mais freqüentes. Reiteramos aqui, pois, o apêlo aos sócios e demais interessados, para que remetam os seus manuscritos à redação da Revista. Já está em preparação o número seguinte e aceitamos também contribuições para o primeiro número do Vol. 4, a ser publicado no início de 1964.

TRABALHOS DE MICROBIOLOGIA PUBLICADOS EM 1962

Solicitamos aos sócios que publicam trabalhos em outras revistas, que nos remetam as respectivas referências, para publicação.

PEREIRA, O. A., MOREIRA, L. P. & ROJAS, E. — Encefalomielite eqüina em Conchas, São Paulo, Brasil: Incidência de anticorpos inibidores da hemaglutinação no homem e em eqüideos. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, **4:** 149-151, 1962.

FERRI, R. G. & OLIVEIRA, L. D. — Reação de precipitação entre extrato eritrocitário e proteínas séricas, em dupla difusão e imuno-eletroforese em gel de ágar. Rev. Hosp. Clín., **17:** 27-34, 1962.

EWING, W. H. & TRABULSI, L. R. — Further studies with cultures of **Shigella** classified according to the method used in the USSR. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, **12:** 1-8, 1962.

CASTRO, R. M. & ALCHORNE, M. M. A. — **Microsporum cookei;** seu isolamento de roedores silvestres brasileiros. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, **4:** 35-37, 1962.

MONTEIRO, E. L. — Experimental behaviour of the etiologic agents of South American Blastomycosis and Keloid Blastomycosis in the chick embryo. Sabourandia, **2:** 12-13, 1962.

CASTRO, R. M. & BELLIBONI, N. — Uber Sporotrichintest bei Patienten mit geheilter Sporotrichose. Mykosen, **5:** 24-26, 1962.

MONTEIRO, E. V. L. — Blastomicose sul-americana experimental em ovos embrianados. Bol. Acad. Nac. Med., **13:** 57-62, 1962.

BRITO,, T., MEIRA, J. A. & BASSOI, O. N. — Contribuição ao estudo da malária. II — Patologia do fígado na malária aguda. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, **4:** 105-111, 1962.

BRITO, T., CASTRO, R. M. & SAMPAIO, S. A. P. — Histopathology of the Sporotrichinskin test. Dermatologia, **125:** 121-131, 1962.

BRITO, T., & ENGE, L. G. H. B. — Pneumonia intersticial plasmocelular pelo **Pneumocystis carinii.** Estudo anátomo-clínico de três casos. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, **4:** 261-268, 1962.

LACAZ, C. S., FERRI, R. G., FAVA NETTO, C. e BELFORT A. E. — Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul-americana e blastomicose queloideana (Doença de Jorge Lôbo). Med. Cir. Farm., **298:** 63-74, 1962.

LACAZ, C. S. — Simpósio sôbre Tétano. Rev. paulista med., **60:** 111-124, 1962.

LACAZ, C. S. — Emílio Ribas e sua participação na profilaxia da febre amarela e da febre tifóide. Arq. Hig. e Saúde Púb., **27:** 67-68, 1962.

SERRANO, J. A. — Isolamento de **Clostridium tetani** do côto umbilical e de material onfalectomizado procedente de recém-nascidos com tétano. Rev. Med., **46:** 71-80, 1962.

PEREIRA, A. M., GONÇALVES, A. P., LACAZ, C. S., FAVA NETTO, C. & CASTRO, R. M. — Imunologia da esporotricose. I. A prova da esporotriquina após a cura da esporotricose. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, **4:** 383-385, 1962.

PEREIRA. A. M., GONÇALVES, A. P., LACAZ, C. S., FAVA NETTO, C. & CASTRO, R. M. — Imunologia da esporotricose. II. A prova da esporotriquina em crianças sem esporotricose. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, **4:** 386-388, 1962.

ESTEVES, M. B., PEREIRA, O. A., NILSSON, M. R. & TRAPP, E. E. — A reação de imuno-aderência em arborvírus do grupo A isolados no Brasil. I. Comparação com as reações de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, **4:** 351-357, 1962.

TRABULSI, L. R. & EDWARDS, P. R. — The differentiation of **Salmonella gallinarum** by biochemical methods. Cornell Veterinarian, **52:** 563-569, 1962.

LACAZ, C. S. — Adolfo Lutz (1855-1940). Rev. Brasil. Malariol e Doenças Trop., **14**: 167-168, 1962.

WANTUIL CORREA DA CUNHA — Portadores de Estafilococos Coagulase Positivos em Hospitais do Rio de Janeiro — GB.
(Estudos da incidência entre pessoas em serviço e doentes hospitalizados).
Tese aprovada de concurso — Rio de Janeiro, 1963.

A. ASCHWAB, D. O. VOSS & M. BACILA — Estudo da cadeia respiratória de bactérias à temperatura do nitrogênio líquido. Ciência e Cultura. **14**: 4, 1962.

E. T. OLIVEIRA, R. S., FURLANETO & N. P. SANTOS — Preparo do sôro antibotulínico tipo A. Ciência e Cultura. **14**: 4, 1962.

RUBENS ROCHA VIEIRA — A sensibilidade de bactérias e antibióticos. Nova técnica para avaliar "in vitro", a sensibilidade de bactérias e antibióticos. Ciência e Cultura. **14**: 4, 1962.

A. ASCHWABB e C. H. M. VIANA — Anaeróbios do aparelho digestivo de planórbideos. Ciência e Cultura. **14**: 4, 1962.

C. A. SANTA ROSA, A. F. PESTANA DE CASTRO e C. TROISE — Leptospirose bovina. Inquérito sorológico na região de Campinas. Arch. Inst. Biol. **28**: 18, 1961.

C. A. SANTA ROSA, A. F. PESTANA DE CASTRO e A. D. CALDAS — Isolamento de leptospira icterohaemorrhagiae e leptospira hyos de suínos abatidos em matadouro. Arquiv. Inst. Biol. **29**: 31, 1962.

C. A. SANTA ROSA, A. F. PESTANA DE CASTRO e C. TROISE. Isolamento de leptospira pomona de suíno em S. Paulo. Arquiv. Inst. Biol. **29**: 19, 1962.

C. A. SANTA ROSA, A. F. PESTANA DE CASTRO e C. TROISE — Isolamento de leptospira icterohaemorrhagiae de bovino em S. Paulo. Arquiv. Inst. Biol. **28**: 13, 1961.

A SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA aceita como sócios tôdas as pessoas interessadas nas atividades e no desenvolvimento da Microbiologia no Brasil, tal como, técnicos, assistentes, pesquisadores, instrutores, professôres e outros grupos profissionais. São seus objetivos agremiar os microbiologistas brasileiros, estimular a pesquisa científica e suas aplicações, manter intercâmbio e fazer aproximação com outras sociedades e instituições.

A S.B.M. edita a REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, destinada à publicação de trabalhos originais e ao registro de notícias e acontecimentos de interêsse para o microbiologista.

A S.B.M. vem realizando reuniões anuais para o congraçamento e contato entre os seus sócios das diversas Seções Regionais, e conhecimento das linhas de pesquisa em andamento nas diversas instituições de pesquisa do país.

São obrigados os sócios da S.B.M. a uma anuidade de Cr$ 400,00, recebendo gratuitamente a REVISTA e outras publicações que, eventualmente, a Sociedade venha a editar.

A fórmula abaixo pode ser usada para a proposição de um associado, desde que devidamente assinada por dois sócios quites.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

FUNDADA EM 28 DE SETEMBRO DE 1956

PROPOSTA PARA SÓCIO

Os abaixo assinados, sócios da S. B. M., propõem para o Quadro Social da Sociedade, na categoria de Sócio ..... *o Senhor* .....

.....

....., ... *de* ..... *de* .....

Assinaturas dos proponentes : .....

.....

Assinatura do proposto : .....

INFORMAÇÃO SÔBRE O PROPOSTO

Nome por extenso .....

Idade ..... *anos Sexo* ..... *Estado civil* .....

Nacionalidade .....

Naturalidade .....

Endereço ..... *Tel.:* .....

Faculdade em que se diplomou .....

Atividade profissional .....

Endereço profissional ..... *Tel.:* .....

A REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia, tem por fim a publicação de trabalhos científicos e divulgar assuntos relacionados com a Microbiologia e a Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Os conceitos existentes em artigos assinados são de responsabilidade exclusiva de seus autores e a publicação dos trabalhos não implica na aprovação dos mesmos pela Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Aos autores de artigos serão fornecidos gratuitamente 25 separatas. Para quantidades maiores serão necessários entendimentos prévios, sendo cobradas as separatas excedentes de 25.

Os membros da Sociedade Brasileira de Microbiologia receberão gratuitamente a REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA.

Para os não sócios os preços são os seguintes:

Assinatura anual: para o Brasil — Cr$ 400,00, para o estrangeiro — US$ 2,00; Número avulso: para o Brasil — Cr$ 200,00; para o estrangeiro — US$ 1,00.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser enviados à Redação em duplicata (original e cópia), datilografados em papel liso tipo almaço, com espaço duplo e margens grandes. Poderão ser em qualquer língua, seguidos de resumo em inglês ou português, quando forem escritos em português ou outra qualquer língua, respectivamente.

Cada artigo será revisto por um ou mais membros da Comissão Técnica, sendo mantido o anonimato dêstes a fim de que seus comentários possam ser francos e objetivos. Essa revisão tem por fim auxiliar os Autores a evitar enganos em suas contribuições e permitir a publicação de trabalhos que se ajustem às finalidades da REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA.

Solicita-se que os Autores limitem a extensão de seus artigos a 20 páginas impressas, no máximo, bem como os entreguem prontos para impressão, a fim de diminuir os custos das correções de provas. Nos casos em que a extensão ou as correções tipográficas forem muito grandes, será cobrada taxa adicional.

A REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA se reserva o direito de fazer pequenas modificações de natureza tipográfica nos artigos, de modo que êstes tenham apresentação uniforme. Quando a Comissão Técnica sugerir alterações nos artigos, serão êstes devolvidos aos Autores, com o parecer ou as sugestões da Comissão Técnica.

Os gráficos e os desenhos deverão ser feitos a tinta nanquim e em papel apropriado. Todo o material ilustrativo deverá limitar-se ao estritamente necessário e ser absolutamente nítido, para permitir sua reprodução fotográfica, sem retoque.

Para outros detalhes, relativos à organização, bibliografia, abreviações, símbolos, nomenclatura microbiana etc., devem ser seguidas as "Instruções aos Autores", publicadas pelo *"Journal of Bacteriology"*.

Tôda correspondência deve ser dirigida à Redação da
REVISTA BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
Caixa Postal 6-ZC-02 — Botafogo — Rio de Janeiro (GB)

Publicada pela SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

GRÁFICA MILONE LTDA. - Rua dos Inválidos, 116/118 - Rio de Janeiro (GB)