

DEMONSTRAÇÃO DE CÁPSULAS BACTERIANAS

J. P. DE CARVALHO LIMA

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

LÚCIA DE QUEIROZ TELES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Relativamente à estrutura da cápsula bacteriana, em 1897 Zettnow¹ introduziu na bacteriologia os termos “endoplasma” e “ectoplasma” para significarem, respectivamente, a área interna das bactérias tomando facilmente os corantes comuns e a zona periférica só tomando os flagelares, isto é, corando-se com dificuldade e à custa de mordentes. Pelo referido sobre a resistência do ectoplasma aos corantes ordinários, muitos o tem correspondente ao que hoje se descreve como cápsula.

São frequentes, entre os que tem estudado a citologia das bactérias, discordâncias não só quanto à terminologia, mas quanto a certos detalhes estruturais. Contudo, de modo geral, concorda-se em se admitirem zonas endoplásmica e ectoplásmica; há mais discussão no que toca à existência de membrana limitando o ectoplasma externamente. Embora negada por muitos, provas de que existe tem sido registadas, baseadas largamente na descrição de células alteradas por fenômenos osmóticos. Demonstraram Fischer² e outros que bactérias imersas em solução hipertônica sofrem plasmólise, isto é, retração do protoplasma, pondo, então, em evidência a membrana celular. Fora desta condição as limitações óticas tem dificultado observar-se a membrana. Mesmo assim, Wámoscher³, em 1930, estudou por dissecação com micro-manipulador, a estrutura de várias bactérias, entre as quais membros do grupo coli-tífico-disentérico, concluindo terem membrana ou camada externa de grande elasticidade que lhes possibilita resistirem à pressão e à tensão. Este resultado satisfaz opiniões anteriormente emitidas como a seguinte, de Henrici⁴: “o protoplasma livre teoricamente apresentaria forma esférica; portanto, a forma rígida bacilar de muitas

bactérias provavelmente indica ser ele limitado por alguma membrana”.

Tem-se, geralmente, a membrana como o próprio ectoplasma que sofreu condensação superficial. Macé⁵ diferencia nesta membrana uma camada periférica, gelatinosa, que, quando exageradamente desenvolvida constituiria a cápsula.

De maneira geral é a cápsula considerada espessamento da camada externa da célula bacteriana. Tida, por muitos, como parte integrante da célula, parece datar dos trabalhos de Meyer⁶, em 1912, outro significado que se lhe tem atribuído: ser produto de secreção. Também assim a considerou Zettnow⁷, em 1918.

Toenniessen⁸, relatando seus estudos sobre o bacilo de Friedländer, hoje *Klebsiella pneumoniae*, adotou, em 1912, a expressão “ectoplasma” significando cápsula. Porém, 1 ano depois, descreveu zona larga às vezes vista ao redor desse germe e considerou-a como cápsula ou parte dela. Denominou-a “Schleimhülle”. No ano seguinte, em 1914, definiu-se mais descrevendo na *Klebsiella pneumoniae*: endoplasma, ectoplasma circundando-o e cápsula, camada externa a que chamou “Schleimhülle” ou “Gallert-hülle” e que seria não parte vital da célula bacteriana, mas produto de secreção. Finalmente, em 4.^a publicação, 7 anos depois, substituiu o termo “Schleimhülle” por “Aussenhülle”, acrescentando ser desprovida de membrana periférica. Condenou chamar-se cápsula ao que se vê, por processos especiais de coloração, circundando o endoplasma fortemente corado, pois consiste, diz ele, de ectoplasma e “Aussenhülle”. Acentuou que apenas “Aussenhülle” é cápsula.

Muito se tem discutido a opinião de Toenniessen.

Churchman e Emelianoff⁹ criticaram-na, em 1933, objetando que, se se tomar “Aussenhülle” como cápsula não se pode considerar capsulados o *Bacillus anthracis* e o *Clostridium welchii*, pois não possuem, necessariamente, “Aussenhülle”, nem a maioria das amostras de *Diplococcus pneumoniae* III S, que, muitas vezes, apesar de apresentarem estruturas consideradas por todos os bacteriologistas como cápsulas típicas, não revelam “Aussenhülle”. Comprovam, com ilustrações muito nítidas, a ocorrência de “Aussenhülle” em suas preparações de *Klebsiella pneumoniae* e *Diplococcus pneumoniae* III S, definindo-a como zona secundária não constante,

de forma irregular, sem periferia definida. Não a consideram com aparência de estrutura organizada, mas de camada de material amorfo aderente à superfície da cápsula.

Thompson¹⁰, em 1935, diz que, pelas ilustrações, em os trabalhos de Toenniessen, vê-se, claramente, ser a cápsula o que ele designou como "ectoplasma".

Parece, assim, estabelecer-se, aos poucos, não significar a "Aussenhülle" cápsula.

No que diz respeito à função da cápsula, já em 1895 Babes¹¹ considerava-a meio de defesa do germe. Preisz¹², em 1904 e 1911, e Eisenberg¹³, em 1912, mostraram, no *Bacillus anthracis*, correlação entre formação de cápsula e virulência; Bordet¹⁴, em 1910, verificou resistência dos germes capsulados à fagocitose e Bail¹⁵, em 1915, registou serem menos suscetíveis a soros bactericidas do que os não capsulados.

Muita importância se tem dado à cápsula, nos últimos tempos, principalmente após os resultados colhidos do estudo de sua composição química. Depois de haver Kramár¹⁶, em 1922, dividido as cápsulas, conforme sua composição, em dois grupos: um, contendo só polissacarídeos; outro, polisacarídeos e proteína, e ter sugerido ser a cápsula do *Bacillus anthracis* constituída de proteína, multiplicaram-se os trabalhos. Como conclusão admitem-se, atualmente, nesse germe: na cápsula, proteína de grande valor antigênico; na porção somática, polissacarídeo incapaz de estimular a produção de anticorpos. Ao contrário, nos pneumococos importantes trabalhos de Avery¹⁷ e colaboradores, a partir de 1923, mostraram, nas formas lisas normais, serem polissacarídeos os componentes capsulares, aceitando-se, hoje, existir em cada tipo de pneumococo um polissacarídeo capsular específico responsável pela especificidade-tipo. É bastante conhecida a reação de Neufeld para a tipagem do pneumococo diretamente do escarro, baseada na precipitação do carboidrato intracapsular por antissoro específico e que se manifesta por característico entumescimento. Verificou-se, ainda, coincidir no pneumococo a variação da forma lisa à rugosa com a perda de cápsula (consequentemente do polissacarídeo específico) e perda parcial ou total de virulência. Daí considerar-se virulência e comportamento antigênico dos pneumococos como determina-

dos pelos constituintes antigênicos capsulares. Igualmente, na *Klebsiella pneumoniae* alguns desses autores e também Julianelle¹⁸ mostraram existirem tipos sorológicos bem distintos, sendo a especificidade-tipo determinada por polissacarídeo presente na cápsula, ao passo que a proteína da porção somática caracterisaria esse germe como espécie. Nele, entretanto, Toenniessen considera ser a formação de cápsula não necessariamente associada com virulência por ter isolado variante não capsulada e altamente virulenta. Também na *Pasteurella pestis*, Sokhey¹⁹, em 1940, concluiu existirem cápsulas tanto em germes virulentos como em avirulentos.

Quanto à prioridade em observação de cápsula, segundo Thompson, já em 1881 Loewenberg notara zonas claras circundando a *Klebsiella ozaenae*. Churchman e Emelianoff atribuem, entretanto, a Friedländer a primeira demonstração de cápsula em germes patogênicos. Há mais razão para esta afirmativa pelo seguinte. Em 1881 ainda não havia sido descrito germe do grupo de bacilos capsulados. O primeiro o foi em 1882, por von Frisch²⁰, e isolado de casos de rinoscleroma. No ano seguinte, Friedländer²¹ cultivou dos pulmões de indivíduos que tinham morrido de pneumonia o germe que hoje traz seu nome. Só passados dez anos foi registada por Loewenberg²² e Abel²³, independentemente, a cultura de microorganismo isolado de secreção nasal de indivíduos portadores de ozena. Entretanto, diz White²⁴ ter a cápsula sido descrita primeiro por Pasteur, em 1881, como "auréola".

Surgiram, aos poucos, publicações sobre a existência de cápsula em certos germes e ausência em outros, admitindo-se, então, um grupo "capsulado" e um "não capsulado".

Há, entretanto, forte corrente considerando todas as bactérias capsuladas mas diferindo quanto ao tamanho da cápsula, que só em algumas seria suficientemente desenvolvida e estável para ser de fácil demonstração e de valor diferencial. Cabe a Migula²⁵, em 1896, a primazia da admissão de cápsula em todas as bactérias. Entre seus partidários, Boni²⁶, em 1900, afirmou ter demonstrado cápsula em todos os germes e em qualquer meio, tendo, aliás, sido seu processo criticado como contendo causas possíveis de erro. Carpano²⁷ atribue à falta de técnicas perfeitas a impossibilidade de se por em evidência a cápsula, estrutura constante.

Cresce na literatura, dia a dia, o registo de cápsula em germes considerados não capsulados. Foram já citadas espécies dos

gêneros: *Bacillus*, *Diplococcus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Eberthella*, *Proteus*, etc.. Convem, entretanto, lembrar as palavras prudentes de St. John-Brooks²⁸: há processos que podem levar à demonstração de falsas cápsulas.

A cápsula é definida como invólucro que, pela sua resistência aos corantes básicos da anilina, que são os corantes por excelência das bactérias, aparecem em preparações coradas por processos comuns geralmente como zona clara circundando a célula bacteriana; por métodos especiais incluindo o emprego de mordentes apresenta-se corada. Sabe-se ser de tamanho variável, vendo-se na mesma preparação cápsulas grandes e pequenas, e influir decididamente o meio sobre o grau de seu desenvolvimento. Babes²⁹, Gruber e Futaki³⁰, Preisz³¹, Bail³², Sauerbeck³³, Eisenberg³⁴ mostraram sua formação máxima em tecidos animais. Em culturas, quanto maior o conteúdo do meio em proteína inalterada ou levemente alterada, maior desenvolvimento da cápsula. Churchman e Emelianoff consideram-na estrutura bacteriana frequente, talvez constante, capaz de se avolumar ou encolher e provida de membrana periférica.

Diversos tem sido os termos empregados para significarem a cápsula: ectoplasma, membrana bacteriana entumescida, auréola, halo, zona de retração, zona clara, zona capsular, etc..

Para a demonstração de cápsulas recorre-se a métodos de coloração negativa, isto é, apresentando a cápsula como zona incolor entre a porção somática do germe fortemente corada e o fundo da preparação também corado, ou a métodos de coloração positiva, nos quais a cápsula se cora, mas em tonalidade mais fraca ou em cor diversa da que toma a porção somática.

São inúmeros esses processos e neles tem predominado o emprego do corante violeta de genciana, como se vê nos de Guarnieri³⁵, Welch³⁶, Nicolle³⁷, Buerger³⁸, Rübiger³⁹. Johnne⁴⁰ preferiu violeta de metila; Ribbert⁴¹, violeta dália; Mac Conkey⁴², mistura de fucsina, verde metila e violeta dália; Cooper⁴³, azul de metileno; Huntoon⁴⁴, fucsina; Anthony⁴⁵, cristal violeta. Friedländer⁴⁶ recomendava cristal violeta ou violeta de genciana, indiferentemente; Hiss⁴⁷, violeta de genciana ou fucsina.

Parecem datar de 1910 os métodos de coloração negativa de cápsula, com a introdução de tinta Nanquim, por Rulison⁴⁸; seguiram-no, apresentando técnicas um tanto modificadas, Gins⁴⁹, Gózon⁵⁰, Baker⁵¹, Butt, Bonyng e Joyce⁵².

Entre os processos de coloração diferencial destacam-se os de Rosenow⁵³ e de Muir⁵⁴, empregando violeta de genciana e eosina; Smith⁵⁵, esses corantes seguidos de azul de metileno; Wherry⁵⁶, Churchman e Emelianoff, Sokhey, os corantes Romanowsky, segundo Wright.

Muitos desses processos são, entretanto, complicados e morosos. Certamente atendeu a razões de eficiência e de ordem prática a Comissão de Técnica Bacteriológica da Sociedade de Bacteriologistas Americanos⁵⁷ salientando os de Hiss e de Anthony.

Hiss descreveu dois processos para coloração de cápsula. O primeiro consiste em se fixar a preparação pelo calor e corar durante alguns segundos com solução aquosa, saturada, de violeta de genciana diluída ao dobro de seu volume com água destilada. Em seguida, lavar com solução aquosa a 0,25% de carbonato de potássio. O segundo manda corar a quente com solução aquosa de violeta de genciana ou fucsina (5 cc. de solução alcoólica saturada para 95 cc. de água destilada) e lavar com solução aquosa a 20% de sulfato de cobre.

Anthony dispensa fixação, aplicando a frio, durante 2 minutos, solução aquosa a 1% de cristal violeta como corante e, como decolorante solução de sulfato de cobre idêntica à do segundo processo de Hiss.

Interessava-nos processo rápido para a demonstração de cápsulas bacterianas em culturas, o que é reconhecidamente mais difícil que em exames diretos. Estudando, com amostra de *Klebsiella pneumoniae*, as vantagens e desvantagens dos três acima, entre os dois de Hiss obtivemos melhores resultados com o primeiro, o do carbonato de potássio: lindas cápsulas grandes, levemente coradas, bem distintas (Fig. 1). Aliás, no segundo processo (Fig. 2) a superioridade apontada pelo autor refere-se a preparações montadas em bálsamo. Também o de Anthony muito nos satisfaz (Fig. 3). As cápsulas, ora incolores, ora coradas com maior ou menor intensidade, são perfeitamente distintas; bem menores que no processo de Hiss.

A matéria corante empregada por Anthony é, incontestavelmente, superior à de Hiss. É sabido serem, entre os corantes básicos da anilina, mais intensos em ação os violetas e os vermelhos, principalmente os primeiros; destes, o cristal violeta, por ser produto bem definido, oferece vantagem sobre violeta de genciana, de composição variável.

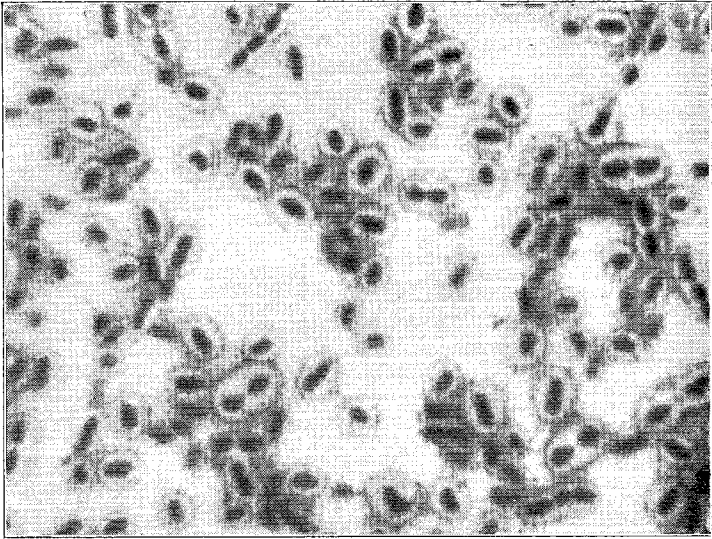


FIG. 1 — 1.º processo de Hiss (x 2600)

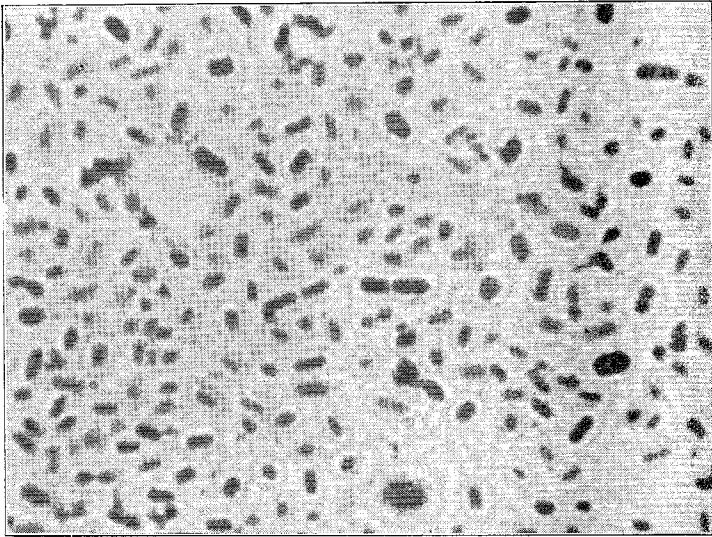


FIG. 2 — 2.º processo de Hiss (x 2600)



Em ambos os processos o veículo empregado em a solução corante poderia ser melhor. As soluções aquosas conservam-se mal, não se opondo suficientemente ao desenvolvimento de bactérias em seu interior e, também, facilitando ao corante depositar-se; por serem necessariamente usadas em a maioria das colorações, previnem-se tais inconvenientes empregando-se soluções aquosas recentemente preparadas, geralmente partindo-se de soluções alcoólicas em estoque.

Ora, a demonstração de cápsula não se faz com tanta frequência; portanto, a solução aquosa para tal finalidade raramente pode ser recente.

Ocorreu-nos tentar processo mais prático: empregar solução alcoólica de cristal violeta que, vantajosa quanto ao veículo e quanto à composição não variável do corante, ofereceria a vantagem adicional de dispensar prévia fixação, por ser o álcool fixador. Teem as soluções alcoólicas reduzida aceitação por serem pouco eletivas em razão da intensidade e, sobretudo, uniformidade de colorações que fornecem. Para o nosso objetivo seriam, ao contrário, muito eficazes dada a resistência da cápsula aos corantes; diferenciar-se-ia, perfeitamente, da porção somática fortemente corada.

Experimentamos, então, solução alcoólica de cristal violeta em diversas porcentagens e uma série de descorantes em diluições também variadas: carbonato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de amônio, sulfato de cobre, ácido acético, ácido clorídrico, ácido nítrico. Melhores resultados obtivemos com a solução corante a 5% e, como descorante, solução aquosa de carbonato de potássio a 0,5%. Empregamos cristal violeta de Grübler e carbonato de potássio, para análise, de Merck. Culturas em gelose-sangue, incubação 24 hs. a 37°C..

Do seguinte modo podemos fixar a técnica do processo:

1. Fazer esfregaço fino; como diluente, a água de condensação do meio de cultura.
2. Corar, 1-2 minutos, por solução a 5% de cristal violeta em álcool absoluto.
3. Esgotar; descorar com solução aquosa a 0,5% de carbonato de potássio.
4. Secar com papel de filtro.

As cápsulas, ora incolores, ora coradas, são perfeitamente nítidas e muitas bem maiores que as do método de Anthony (Fig. 4). Como já registaram muitos autores, em algumas a periferia é incolor como o resto da cápsula; em outras é bem corada e o restante da cápsula incolor. Para alguns, como Churchman e Emelianoff, a periferia corada representa a membrana capsular; para outros, entre os quais Hiss, depende, em parte, de precipitação do corante no exterior das cápsulas. Rulison procura explicar o fenômeno dizendo que as bactérias repousam um tanto acima do nível geral da preparação, facilitando, assim, reunir-se o corante ao redor delas.

Melhores aspectos são obtidos onde há escassez de material, principalmente nas bordas da preparação, o que já foi, também, observado por Wherry, Huntoon e outros.

Quanto à "Aussenhülle", é perfeitamente evidenciada pelo nosso método. Não a obtivemos pelos de Hiss e de Anthony. Confirmamos os dizeres de Churchman e Emelianof quanto a ser zona não constante, de forma irregular e sem periferia definida, que circunda a cápsula e parece material amorfo (Fig. 5). Notamos, ainda, quando presente a "Aussenhülle", esparso pelo campo, irregularmente, material idêntico ao que a constitue. A "Aussenhülle" não toma o corante, a não ser em concentrações muito elevadas. Pudemos apurar isso empregando quantidades fixas de decorante e variáveis de corante, como se vê abaixo:

Solução corante a 0,5%	Germes mal corados; cápsulas levemente perceptíveis em alguns; "Aussenhülle" ausente (Fig. 6).
Solução corante a 3%	Germes bem corados; cápsulas incolores, sem periferia corada; "Aussenhülle" ausente (Fig. 7).
Solução corante a 5% (Concentração ótima)	Germes bem corados; cápsulas distintas, ora incolores, ora coradas, periferia corada em muitas (Fig. 4); "Aussenhülle", quando há, incolor (Fig. 5).
Solução corante a 10%	Germes fortemente corados; cápsulas coradas (Fig. 8); "Aussenhülle", quando há, corada.

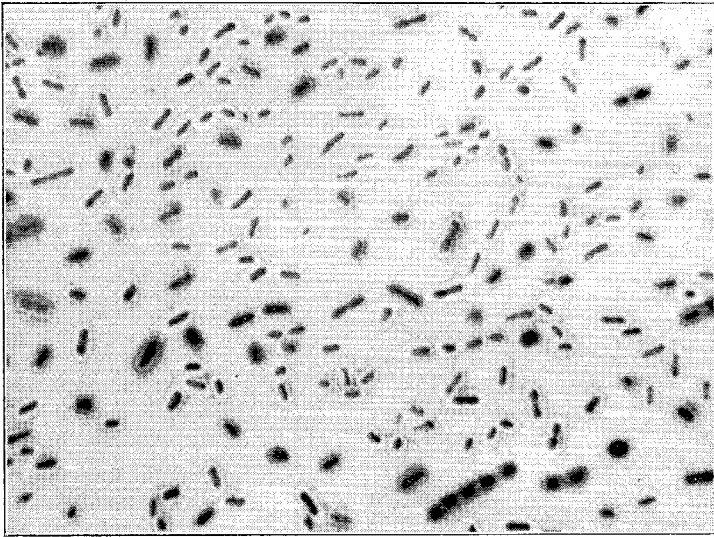


FIG. 3 — Processo de Anthony (x 2600)

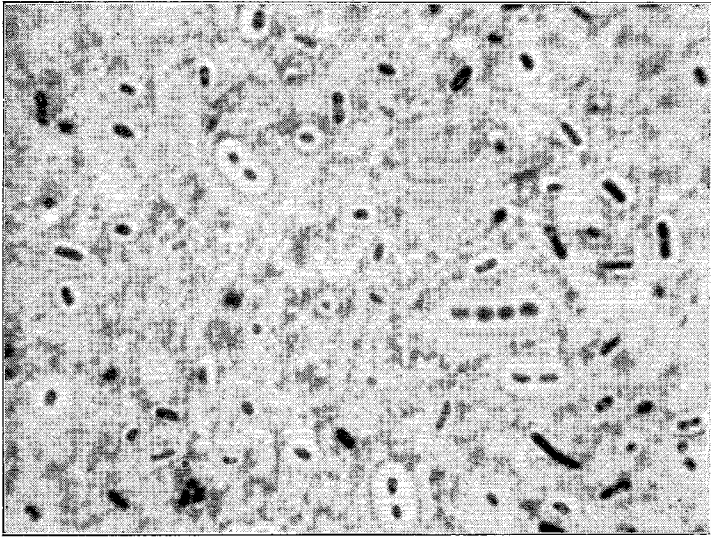
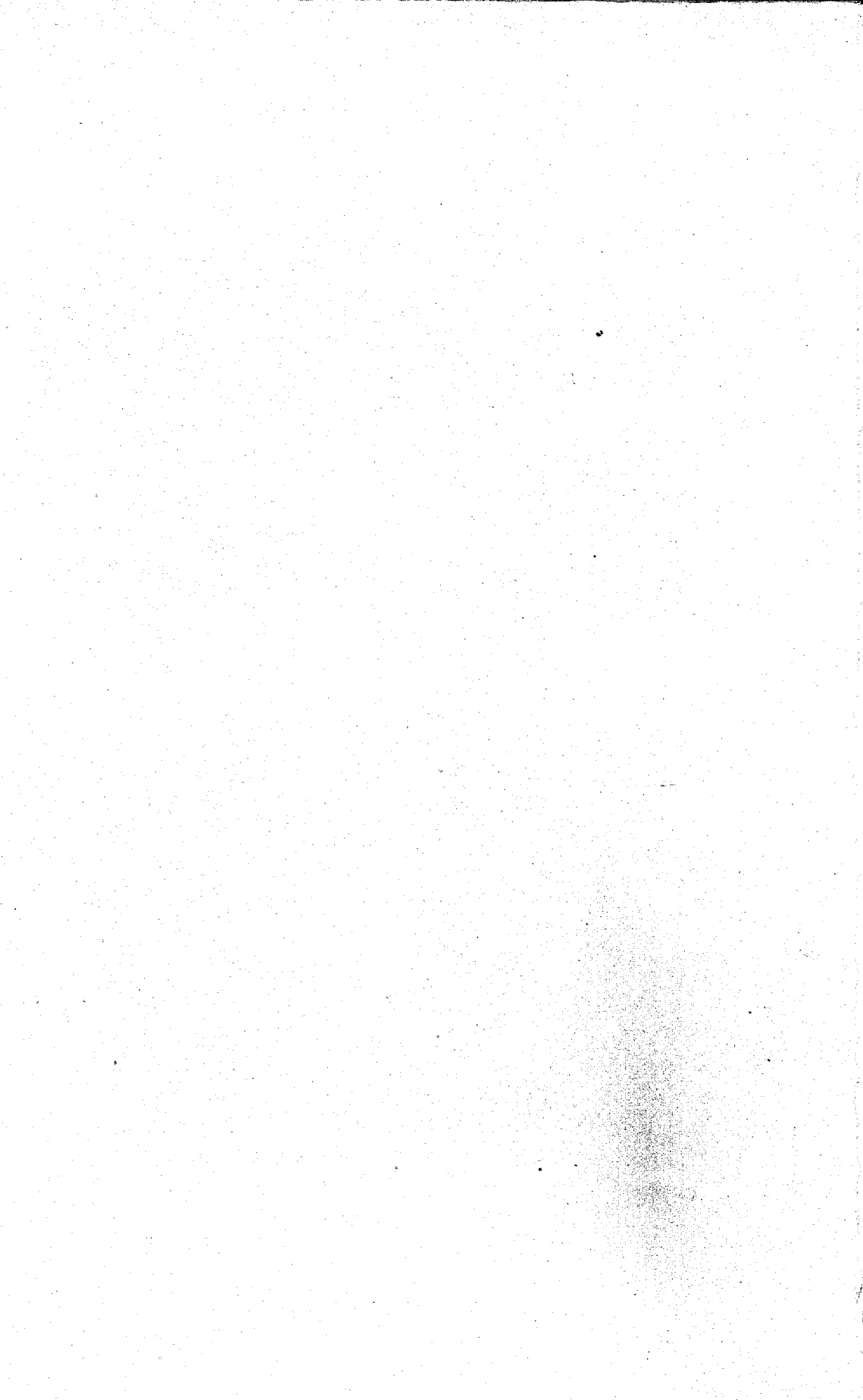


FIG. 4 — Processo dos Autores. Solução corante a 5%, concentração ótima. (x 2600)



Quando a "Aussenhülle" se cora pode passar despercebida porque a tonalidade vai se esmaecendo na periferia, simulando difusão do corante.

Tivemos confirmação destes resultados empregando, inversamente, quantidade fixa de corante e quantidades variáveis de descorante. Idem com quantidades fixas de corante e descorante, mas tempo variável de coloração.

Para fins de controle experimentamos nosso processo com *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, pela maioria dos autores tidos como não capsulados. Não revelaram cápsula; apenas, em alguns elementos, reduzidíssima orla clara, que se costuma observar até pelo método de Gram. Talvez pelo fato de ser a luz mais facilmente transmitida na zona periférica das bactérias.

Confessamos não haver, ainda, apurado as razões da falha já por muitos registada: às vezes não se consegue boa preparação; outras vezes, entre preparações feitas na mesma ocasião e partindo-se da mesma cultura, algumas são plenamente satisfatórias enquanto outras apresentam raras e pequenas cápsulas. Tal diversidade se observa, também, em campos diversos da mesma lâmina. Hiss notou que o processo de Welch falha, às vezes; Anthony cita falhas no de Hiss e, referindo-se ao seu próprio processo, diz que praticamente não falha; Wadsworth⁵⁸ aponta os resultados irregulares dos métodos de Friedländer, Ribbert, Roux, Muir, Mac Conkey. Agasse-Lafont⁵⁹ lembra a necessidade de se prepararem diversas lâminas para se ter uma satisfatória.

Entre os fatores já lembrados como responsáveis pela irregularidade de resultados, Sokhey diz ter notado influência da temperatura ambiente; acha que a umidade do ar condensando-se sobre a lâmina pode interferir com a ação do corante e afirma serem resultados uniformes só obtidos em quarto de ar condicionado. É interessante terem diversos de nossos menos satisfatórios resultados coincidido com os dias de mais baixa temperatura.

No decorrer de nossas investigações notamos influência dos ácidos: acético, fênico, nítrico e clorídrico sobre o entumescimento capsular. Certamente essa a razão do emprego dos ácidos: acético e fênico em a maioria dos processos de demonstração de cápsula. Também o cloreto de sódio influencia favoravel-

mente. Considerando estes fatores, atribuímos as lindas cápsulas obtidas em o processo de Hiss ao fato de ser o corante violeta de genciana mistura de cloridratos de violeta de metila. Com tais observações pretendemos melhorar o processo que hoje apresentamos para demonstração de cápsulas bacterianas em cultura.

RESUMO

Interessados os A.A. em processo rápido para a demonstração de cápsulas bacterianas em culturas e considerando:

- 1.º — serem as soluções corantes aquosas satisfatórias só quando recentemente preparadas;
- 2.º — não ser a demonstração de cápsulas tão frequente em laboratório, de modo que a solução corante raramente pode ser recente;
- 3.º — oferecer vantagem o emprego de corante de composição não variável;

fizeram investigações, e, após uma série de experiências, propõem novo processo para demonstração de cápsulas em culturas, rápido e tendo como corante solução alcoólica de cristal violeta.

Registam a ocorrência, não constante, de "Aussenhülle" em suas preparações de *Klebsiella pneumoniae*.

Tendo notado, no decorrer de seus trabalhos, a influência de certos agentes químicos sobre o entumescimento da cápsula, o que, sem dúvida, contribue para ser melhor observada, pretendem aperfeiçoar o método que no momento apresentam.

SUMMARY

Being the AA. interested in a rapid method for the demonstration of bacterial capsules in cultures and considering that:

- 1 — the aqueous staining solutions are not satisfactory unless recently prepared;

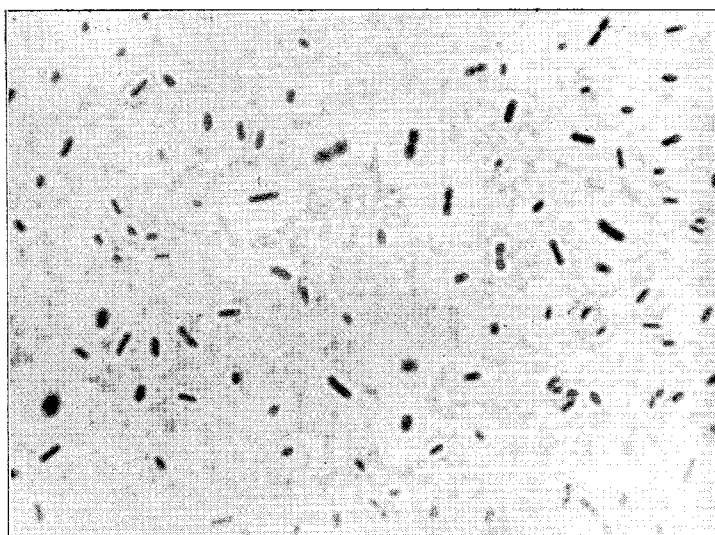


FIG. 5 — "Aussenhülle", processo dos Autores (x 2600)

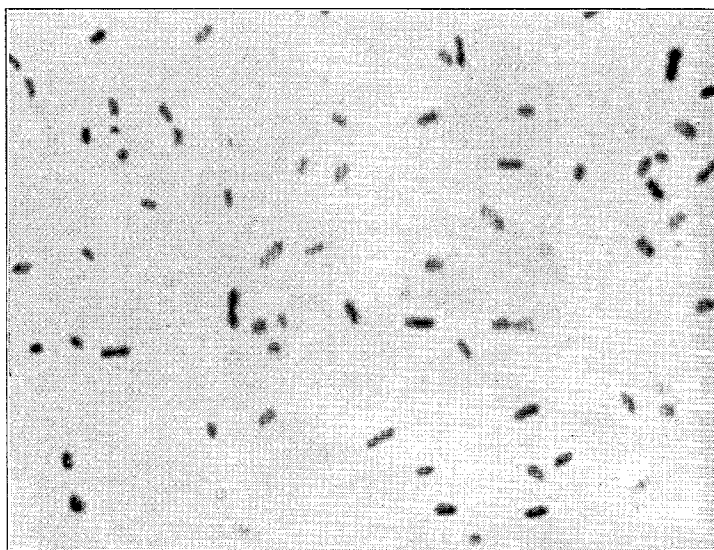
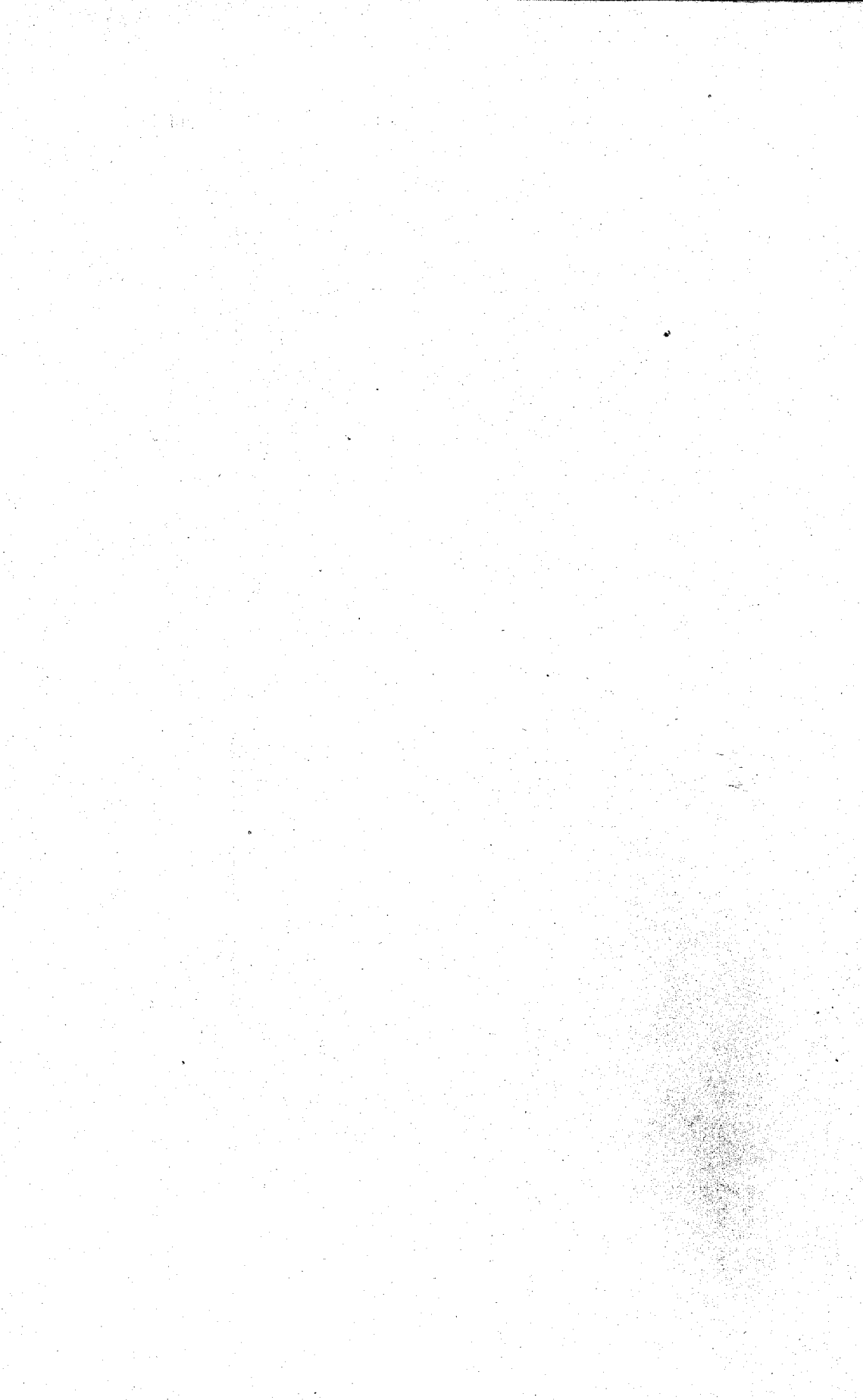


FIG. 6 — Processo dos Autores. Solução corante a 0,5%, concentração insuficiente. (x 2600)



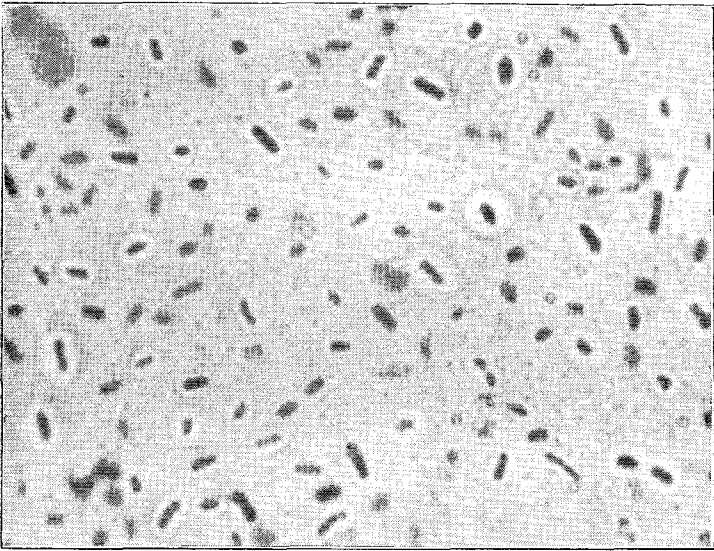


FIG. 7 — Processo dos Autores. Solução corante a 3%, concentração insuficiente. (x 2600)

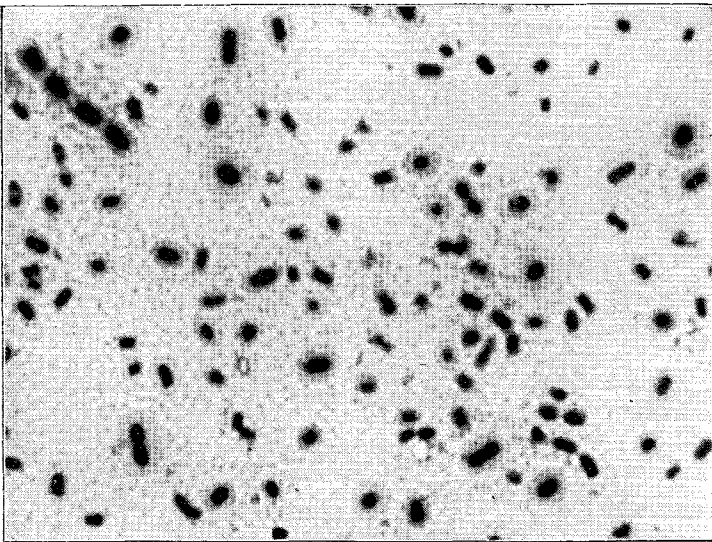


FIG. 8 — Processo dos Autores. Solução corante a 10%, concentração excessiva. (x 2600)



- 2 — the demonstration of capsules is not a frequent laboratory work, so that the aqueous staining solutions only at times may be recent;
- 3 — the most reliable stains are those of invariable composition;

an attempt was made in such a way and, after a series of tests, a new staining technic for the demonstration of capsules in cultures is proposed. It is simple and use is made of an alcoholic solution of crystal violet.

As far as the "Aussenhülle" is concerned, it was found to occur, not constantly, in the preparations of *Klebsiella pneumoniae* under observation.

In the course of experiments the A.A. have noted a marked action of certain chemicals on the capsular swelling; then, they intend to improve the method described in this paper.

REFERÊNCIAS

- 1 — ZETTNOW, 1897, *Zeit. f. Hyg.*, 24, 72-92.
- 2 — FISCHER, 1894, "Untersuchungen über Bakterien" (Berlin).
- 3 — WÁMOSCHER, L., 1930, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 111, 422.
- 4 — HENRICI, A. T., 1923, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 20, 293.
- 5 — MACÉ, E., 1912, "Traité Pratique de Bactériologie", 6.^a ed., 1, 11-42.
- 6 — MEYER, A., 1912, "Die Zelle der Bacterien" (Jena).
- 7 — ZETTNOW, 1918, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 85, 17.
- 8 — TOENNIESSEN, E., 1912, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 65, 23-25; 1913, 69, 391-412; 1914, 73, 241-277; 1921, 85, 225.
- 9 — CHURCHMAN, J. W. e EMELIANOFF, N. V., 1933, *Journ. Exp. Med.*, 57, 485-510.
- 10 — THOMPSON, R., 1935, "Agents of Disease and Host Resistance", F. P. Gay, 148-170.
- 11 — BABES, V., 1895, *Zeit. f. Hyg.*, 20, 412-437.
- 12 — PREISZ, H., 1904, *Zbl. Bakt.*, 35, 280-293, 416, 537-545, 657-665; 1911, 58, 510-565.
- 13 — EISENBERG, P., 1912, *Zbl. Bakt.*, 63, 305-321.
- 14 — BORDET, J., 1910, *Zbl. Bakt., I. Abt., Ref.*, 45, 417-437.
- 15 — BAIL, O., 1915, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 75, 159-173.

- 16 — KRAMÁR, E., 1922, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 87, 401-406.
- 17 — AVERY, O. T. & Colaboradores, 1923, *Jour. Exp. Med.*, 38, 73-79, 81-85; 1924, 40, 301-316; 1925, 42, 347-353, 355-365, 367-376, 709-725.
- 18 — JULIANELLE, L. A., 1926, *Jour. Exp. Med.*, 44, 113-128, 683-696, 735-751.
- 19 — SOKHEY, S. S., 1940, *Jour. Path. & Bact.*, 51, 97-103.
- 20 — VON FRISCH, 1882, *Wien med. Woch.*, 32, 970.
- 21 — FRIEDLÄNDER, C., 1883, *Fortschr. Med.*, 1, 715.
- 22 — LOEWENBERG, 1894, *Ann. Inst. Pasteur*, 8, 292-317.
- 23 — ABEL, R., 1896, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 21, 89-155.
- 24 — WHITE, B., 1938, "The Biology of Pneumococcus", 32.
- 25 — MIGULA, W., 1896, *Deutsch. tierärztl. Woch.*, 4, 28.
- 26 — BONI, I., 1900, *Zbl. Bakt., I. Abt.*, 28, 705-707.
- 27 — CARPANO, M., 1913, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 70, 42-50.
- 28 — ST. JOHN-BROOKS, R., 1930, "A System of Bacteriology", Medical Research Council, 1, 104-114.
- 29 — BABES, V., 1895, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 20, 412-437.
- 30 — GRUBER, M. & FUTAKI, K., 1907, *Münch. med. Wschr.*, 54, 249.
- 31 — PREISZ, H., 1907, *Zbl. Bakt.*, 44, 209-210.
- 32 — BAIL, O., 1908, *Zbl. Bakt.*, 46, 488-502.
- 33 — SAUERBECK, E., 1909, *Zbl. Bakt.*, 50, 289-295; *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 63, 313-318.
- 34 — EISENBERG, P., 1903, *Zbl. Bakt.*, 34, 739-764; 1908, 45, 44-49, 134-159, 638-659; 1909, 49, 465-492.
- 35 — GUARNIERI, 1888, *Atti. d. v. Accad. med. di Roma*, Ser. II, 4, 114.
- 36 — WELCH, 1892, *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, 13, 128.
- 37 — NICOLLE, M., 1895, *Ann. Inst. Pasteur*, 9, 664-670.
- 38 — BUERGER, L., 1905, *Jour. Exp. Med.*, 7, 497-546.
- 39 — RÄBIGER, Cit. em 1920, "Technique Microbiologique et Sérothérapique", A. Besson, 7.^a ed., 255.
- 40 — JOHNE, Cit. em 1920, "Technique Microbiologique et Sérothérapique", A. Besson, 7.^a ed., 255.
- 41 — RIBBERT, 1885, *Deut. Med. Woch.*, 9, 136.
- 42 — MAC CONKEY, 1898, *Lancet*, 2, 1262.
- 43 — COOPER, M. L., 1925, *Jour. Inf. Dis.*, 36, 439-443.
- 44 — HUNTOON, F. M., 1917, *Jour. Bact.*, 2, 241-244.
- 45 — ANTHONY, JR., E. E., 1931, *Science, New Series*, 73, 319-320.
- 46 — FRIEDLÄNDER, C., 1885, *Fortschr. Med.*, 3, 757.
- 47 — HISS, P. H., 1901-05, *Jour. Exp. Med.*, 6, 317-345.
- 48 — RULISON, E. T., 1910, *Jour. Amer. Med. Ass.*, 54, 1426-1427.
- 49 — GINS, H. A., 1911, *Zbl. Bakt.*, 57, 472-478.
- 50 — GÓZONY, L., 1913, *Zbl. Bakt.*, 68, 594-597.

- 51 — BAKER, S. L., 1920, *Brit. Jour. Exp. Path.*, 1, 127-128.
- 52 — BUTT, E. M., BONYNGE, C W. e JOYCE, R. L., 1936, *Jour. Inf. Dis.*, 58, 5-9.
- 53 — ROSENOW, E C., 1911, *Jour. Inf. Dis.*, 9, 1-8.
- 54 — MUIR, R., 1915-1916, *Jour. Path. & Bact.*, 20, 257-259.
- 55 — SMITH, 1902, *Boston Med. and Surg. Jour.*, 147, 659-667.
- 56 — WHERRY, W. B., 1905, *Jour. Inf. Dis.*, 2, 577-588.
- 57 — SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1936, "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria", V₃₄-7.
- 58 — WADSWORTH, A., 1906, *Jour. Inf. Dis.*, 3, 610-618.
- 59 — AGASSE-LAFONT, E., 1929, "Les applications Pratiques du Laboratoire a la Clinique", 4.^a ed., 73.