

CONSIDERAÇÕES SÔBRE ALGUMAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DO BACILO DA DIFTERIA

— *Corynebacterium diphtheriae*

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe de Sub-divisão do Instituto Adolfo Lutz

MARIA FLORA QUIRINO FERREIRA

Técnica do Instituto Adolfo Lutz

Numerosos são os trabalhos publicados sôbre as propriedades bioquímicas do *Corynebacterium diphtheriae*. Há, no entanto, divergências quanto à sua propriedade de produzir indol, H_2S , de reduzir os nitratos e de fermentar os carboidratos.

Lehmann e Neumann (1896) descrevendo o bacilo diftérico, dizem que êle produz: fracamente H_2S , nitritos nas culturas velhas, reação de indol positiva, dando um pequeno pigmento amarelo ou vermelho. Fermenta a dextrose e levulose. Em 1927 descrevendo outra vez êsse bacilo, dizem que êle produz H_2S , nitritos nas velhas culturas, dando indol com H_2SO_4 , fermentando sempre, dextrina, levulose, maltose, galactose e glicerina, enquanto que, somente algumas raças fermentam a sacarose.

Topley e Wilson (1936) descrevendo o bacilo diftérico, dizem que não produz indol, mas que, de acôrdo com os resultados obtidos por Frieber (1921) o *C. diphtheriae* dá reação colorida com H_2SO_4 e nitrito de potássio (reação de Salkowski) dada a formação de indol-ácido acético, derivado do triptófano, mas que não produz a reação de indol com o paradimetilamidobenzaldeído (reativo de Ehrlich). Reduz o nitrato, não liquefaz a gelatina.

Bergey, Manual of Determinative Bacteriology, 5th edition — 1939, descrevendo o *Corynebacterium diphtheriae* dá como não produzindo indol, não reduzindo nitratos para nitritos, nada se referindo quanto ao H_2S . Tôdas as raças formando ácido em dextrose e levulose, algumas fermentando galactose, maltose, dextrina e glicerina, nada dizendo dos demais carboidratos.

Referindo-se aos tipos, relata os trabalhos de Durant e Mac Leod, sôbre a fermentação dos diversos carboidratos para a sua diferenciação.

Knapp (1904) foi, no entanto, quem primeiro empregou os diversos carboidratos como meio diferencial dos bacilos diftéricos e pseudo-diftéricos, usando o meio sôro água de Hiss. Achou, êsse autor, que o bacilo diftérico fermentava a dextrose, a manita, a maltose, a dextrina e não a sacarose, que o bacilo xerosis fermentava a dextrose, a manita, a maltose a sacarose e não a dextrina. Acha êle que a dextrina e a sacarose são carboidratos diferenciais para êsses dois germes. Alice Hamilton e Jessie Horton, estudando o grupo dos bacilos diftéricos, confirmam os resultados obtidos por Knapp, menos no que diz respeito ao emprêgo da dextrina, pois, verificaram que algumas raças de bacilos diftéricos, não fermentam a dextrina, e encontraram 2 raças do grupo semelhante ao bacilo pseudo-diftérico que fermentavam a dextrina. Hanz Zinsser (1917), verificando os trabalhos de Knapp e Hamilton e Horton, chegou à conclusão que certas irregularidades verificadas na fermentação, podem ser devidas às impurezas do carboidrato e da cultura a que dá grande importância. Chegou à seguinte conclusão:

“O bacilo diftérico fermenta a dextrose, a levulose, a galactose, a maltose e a dextrina, não fermentando a manita, a lactose, a sacarose e a dulcita.

O bacilo xerosis fermenta a dextrose, a levulose e a galactose, a maltose e a sacarose, não fermentando a manita, a lactose, a dulcita e a dextrina.

No grupo dos pseudos diftéricos, que fermentam os carboidratos do mesmo modo que o bacilo diftérico, todos êsses germes fermentaram a dextrina levemente, depois de 10 dias de estufa e eram virulentos”.

A. Perry, Ona Whitley e Elizabeth Petram (1936), estudando 285 amostras de *Corynebacterium diphtheriae*, verificaram que tôdas produziam ácido em dextrose e dextrina e nenhuma em sacarose. Referindo-se à fermentação da dextrina, chamam a atenção para certas raças que dão pouco ácido, sendo necessário fazer-se a leitura com 24, 48 e 72 horas.

Frobisher (1938) estudando algumas propriedades bioquímicas do *C. diphtheriae*, chegou à seguinte conclusão: Fermenta os seguintes carboidratos — dextrose, *d*-manose, galatose, *d*-levulose. Não fermenta xilose, sacarose, lactose, celobiose, melecitose, inulina, *l*-eritridol, adonita, *d*-manita, dulcita, sorbita, esculina arbri-

tina, amidalina, *d*-metil-glucósido, inosita e perseita. Variam na sua ação fermentativa quanto à *l*-arabinose, ramnose, trealose, rafinose, amido, glicogênio, glicerina e salicina. Não reduz nitratos a nitritos, não liquefaz a gelatina, não produz H₂S, indol e acetil-metil-carbinol.

Relata os meios empregados e a técnica usada, sendo esta parte do trabalho importante, porquanto, para que os resultados sejam comparados com os de outros autores, é necessário que os métodos empregados sejam os mesmos. Só assim, poderemos então, tirar conclusões para estabelecer uma classificação.

Numerosos trabalhos foram feitos sobre a bioquímica do bacilo diftérico, verificando a maioria dos autores que o *C. diphtheriae* fermenta a glicose, produzindo somente ácido, e que a dextrina é usualmente fermentada. Quanto aos outros carboidratos, as opiniões diferem, achando alguns autores que são fermentados frequentemente, outros que variam com a espécie estudada.

Quis-se mesmo admitir a classificação do *C. diphtheriae*, em grupos, baseados na ação fermentativa dos diferentes carboidratos. Durant (1921) estudando diversas raças de bacilos diftéricos verdadeiros, diz que todas fermentam a glicose e levulose e que a ação sobre a glicerina, galactose, maltose, sacarose e dextrina varia segundo os tipos, o que permite fazer a distinção entre êles.

Park, Williams e Mann de acôrdo com os trabalhos de Durant, estabeleceram 5 tipos citados por Bergey no seu Manual.

		Maltose,	Dextrina,	Glic.	Galact.	Sacar.
Tipo	I — American (n.º 8)	+	+	—	—	—
"	II — Durant	—	—	—	—	—
"	III — Nodet	+	+	+	+	—
"	IV — Benjamin	+	+	+	+	—
"	V — Subeaux	+	+	+	+	—

MacLeod, baseado na morfologia da colônia e na ação fermentativa, divide em três tipos: um que fermenta dextrina, amido e glicogênio e dois que não fermentam êsses dois ultimos carboidratos.

Tendo estado o serviço de difteria a nosso cargo, julgamos interessante fazer considerações sobre algumas propriedades bioquímicas de 1.452 amostras de *Corynebacterium diphtheriae* por nós isoladas e identificadas.

Antes, porém, vamos descrever os métodos por nós usados.

As amostras aquí estudadas, foram isoladas na maioria de doentes de difteria recolhidos ao hospital de Isolamento "Emílio Ribas", sendo que 283 foram verificadas pela Dra. Jandira Planet do Amaral, do Instituto Butantã, a virulência e a toxigenicidade. Foram tôdas elas identificadas pela sua morfologia, como bacilos diftéricos típicos e só depois de verificar a sua pureza é que foram estudadas as suas propriedades bioquímicas.

Empregámos também as culturas Park 8 e as n. 3985 "Gravis", 3990 "Mitis" e 3988 "Intermedius", da coleção do Instituto Lister.

OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS — E' êste um ponto importante. E' necessário que se tenha certeza de que as culturas se achem em estado de pureza, sem o que, os resultados serão falhos.

Dos tubos de Loeffler, foi feita a sementeira em placas de ágar telurato de sódio. Isolámos uma ou duas colônias em meio de Loeffler, verificando a sua morfologia e pureza. Os casos duvidosos foram reisolados, afim de podermos ter absoluta certeza de trabalharmos com culturas puras.

PRODUÇÃO DE INDOL — Pesquisámos com o reativo de Ehrlich em culturas de 10 dias a 37°, em meio de água peptonada.

LIQUEFAÇÃO DA GELATINA — Culturas foram incubadas a 37°C por 10 dias. Foi verificada a ação sôbre a gelatina, por permanência das culturas na geladeira, durante alguns minutos. Se não liquefeita a gelatina, voltavam os tubos de cultura, à temperatura de 37° por mais 20 dias, sendo então, pesquisada novamente, por permanência na geladeira, se havia ou não liquefação da mesma.

LEITE COM LITMUS — Técnica comumente usada, prolongando-se o período de incubação por 10 dias.

REDUÇÃO DE NITRATOS — O meio de cultura e os reagentes foram os recomendados pelo Manual of Methods of the Society of American Bacteriologist.

Depois de semeados, eram incubados os tubos à temperatura de 37°, pesquisando-se os nitratos pela técnica alí recomendada, até dez dias de estufa.

H₂S — Foi empregado o papel acetado de chumbo, suspenso na bôca do tubo contendo caldo comum. Os tubos foram mantidos na estufa a 37°, por 5 dias. A peptona empregada foi a de Park & Davis, pois é sabido que a produção de H₂S varia com a qualidade da peptona.

FERMENTAÇÃO DE CARBOHIDRATOS — Para verificação do poder fermentativo, usámos o meio de Hiss modificado, adicionando-se o carbohidrato na proporção de 1 %, indicador Andrade ou vermelho neutro. A fórmula é a seguinte:

1 — Sêro de cavalo	200,0 cm ³
2 — Água destilada	800,0 cm ³
3 — Peptona	10,0 gr.
4 — Fosfato di-sódico	1,0 gr.
5 — Fenol vermelho em sol. a 0,2%	10,0 cm ³
6 — Carbohidrato	10,0 gr.

Técnica de preparação:

Diluir o sêro em 600 cm³ de água, ajustar ao pH 8,4 e adicionar mais 3 cm³ de sol. normal de soda. Autoclavar 20 minutos a 120° C. Dissolver a peptona e o fosfato de sódio nos 200 cm³ de água, reservados, ferver e ajuntar ao sêro acima preparado. Completar 1000 cm³ com água destilada e ajustar ao pH 7,6. Ajuntar o carbohidrato e o indicador. Esterilizar 30 minutos a vapor corrente.

A pureza do carbohidrato empregado é também de grande importância, bem como o seu poder rotatório, isto é, se é levógiro, dextrógiro ou inativo. Estas propriedades deverão ser sempre mencionadas, para que os resultados sejam constantes e comparáveis.

Outra dificuldade, é a obtenção da dextrina, pois o seu poder de ser fermentada varia muito, conforme já demonstraram Andrews e seus colaboradores em sua monografia sobre a difteria (1923). Verificaram que as dextrinas do comércio variam quanto ao seu poder rotatório e o de reduzir, e não existir relação entre o poder de fermentação e a quantidade da maltose. Assim, tivemos ocasião de examinar diversas amostras, que continham maior quantidade de amido o que dificultava em grande parte o seu ataque. A dextrina por nós empregada foi a Pfanstihel Chemical — Special Bacteriological (pptd from alcohol) cujo poder rotatório é em solução aquosa a 1% $[\alpha]_{19} = + 170$.

D

Os carbohidratos por nós empregados foram os seguintes, da firma Pfanstihel Chemical:

<i>Monosacharides:</i>	<i>Disacharides:</i>	<i>Alcool:</i>
<i>Pentoses:</i>	Sacarose	Glicerina
l — arabinose	d — lactose	Adonita
d — xilose	Trealose	d — manita
l — ramnose	Celobiose	dulcita
	<i>Trisacharides:</i>	d — sorbita
		i — inosita
<i>Hexoses:</i>	Rafinose	<i>Glicosides:</i>
dextrose	<i>Polisacharides:</i>	salicina
d — manose	inulina	esculina
d — galactose	amido	
d — levulose		

PESQUISA DE CROMOGÊNESIS — Foi observada em tubos de Loeffler com pH 8, em temperatura ambiente e a 37°C.

Tivemos ocasião de isolar e identificar 1.452 amostras, as quais, foram tôdas identificadas como típicas de *Corynebacterium diphtheriae*, pela sua morfologia. Tôdas essas raças fermentaram, a dextrose e dextrina, variando quanto à dextrina na sua intensidade, devendo, por êsse motivo, ser feita a leitura com 48 hs., e com 72 hs. Das 1.452 amostras, 184 fermentaram a sacarose, o que dá uma porcentagem de 12,6% e 32 o amido, ou seja 2,2%.

Das raças consideradas pela sua morfologia como pseudo diftéricas (*B. xerosis*), nenhuma fermentou a dextrina, sòmente fermentaram a sacarose e a dextrose. Foram inoculados em cobaias demonstrando serem avirulentas, não dando mesmo reação local.

Das raças típicas de *Corynebacterium diphtheriae* que fermentaram a sacarose, algumas foram inoculadas em cobaias e verificada a sua virulência e toxigenicidade, pela Dra. Jandira Planet do Amaral, do Instituto Butantã, tendo tôdas elas demonstrado serem virulentas e produzir toxina. Tivemos mesmo ocasião de isolar diversas raças provenientes de um pequeno surto em pessoas da mesma família. Tôdas elas fermentaram a sacarose, confirmando assim as pesquisas epidemiológicas, as quais filiaram os casos a um primeiro, do qual isolámos uma cultura que fermentou sacarose e era virulenta e tóxica. Algumas mesmo, isoladas da pele, demonstraram ser bem virulentas e produzir toxina.

As raças de *C. diphtheriae* por nós estudadas fermentaram os seguintes carboidratos: dextrose, maltose, *d*-galactose, *d*-levulose, *d*-manose, dextrina e glicerina. Devemos notar que a fermentação

da glicerina é muito irregular quanto a sua intensidade. Algumas raças fermentaram e coagularam em 24 horas, outras levaram 2 a 5 dias, para acidificarem. Tôdas elas fermentaram a glicerina, enquanto que as de pseudo diftéricos por nós estudadas, nenhuma fermentou.

Não fermentaram: d-lactose, d-manita, d-xilose, adonita, l-arabinose, dulcita, d-galactose, inosita, inulina, l-rhamnose, (isodulcита), rafinose, salicina, d-sorbita, celobiose, trealose e esculina.

A sacarose foi fermentada por 148 amostras típicas de *C. diphtheriae*. As raças que fermentam o amido são muito raras entre nós; isto está de acôrdo com os estudos por nós feitos quanto a morfologia da colônia, pois a forma *gravis* é muito rara na cidade de S. Paulo.

Das nossas observações, não resta dúvida ser a dextrina um elemento básico na identificação do *C. diphtheriae*, pois de 1.452 amostras por nós isoladas, nenhuma deixou de a fermentar. O mesmo aconteceu com as raças Park 8, 3.985 *gravis*, 3.990 *mitis* e 3.988 *intermedius*, do Instituto Lister.

Acreditamos, que as diferenças observadas por outros autôres quanto à fermentação dêsse carboidrato, possam talvez ser levadas em conta da qualidade do carboidrato usado. Tivemos ocasião de experimentar diversas marcas e partidas do mesmo fabricante, as quais eram sempre impuras, contendo em grande parte grânulos de amido o que dificultava a ação do bacilo. A dextrina usada por nós, foi sempre verificada a sua pureza e controlada com raças que não fermentam êsse carboidrato (*B. xerosis*), para termos a garantia absoluta do seu perfeito funcionamento.

A glicerina é também um bom elemento na classificação dos bacilos diftéricos, pois tôdas as amostras típicas de *C. diphtheriae*, a fermentaram, enquanto que, das não diftéricas, nenhuma raça produziu ácido. As raças Park 8, 3.985, 3.990 e 3.988 também fermentaram a glicerina.

Bergey, citando os trabalhos de Park, Williams e Mann diz que o Park 8 não fermenta glicerina e galactose; no entanto, as nossas observações demonstraram que, não só essa raça, como as de números 3.985, 3.990 e 3.988 também fermentam a glicerina e galactose.

Pela fermentação podemos separar o *C. diphtheriae* em 3 grupos:

I — fermentando dextrose e dextrina e não fermentando a sacarose.

II — fermentando dextrose, dextrina e sacarose.

III — fermentando dextrina, dextrose e amido.

NITRATOS — As raças por nós examinadas, tôdas reduziram nitratos à nitritos. Os nossos resultados estão em desacôrdo com Bergey — Manual of Determinative Bacteriology, 5.^a ed., 1939, o qual diz que o *C. diphtheriae* não reduz nitratos.

Está de acôrdo com as observações de Topley e Wilson e Frobisher, os quais verificaram que tôdas as raças reduzem nitratos à nitritos. Verificamos, no entanto, que a raça 3.985 *gravis* e, 3.990 *mitis* do Inst. Lister reduzem nitratos tardiamente.

A técnica por nós usada foi a mesma empregada por Frobisher e descrita no Manual and Methods of the Society of American Bacteriologist.

INDOL — Tôdas as raças deram reação de indol negativa pelo reativo de Ehrlich. As nossas observações estão de acôrdo com Topley e Wilson, Bergey e Frobisher.

H₂S — A produção de hidrogênio sulfurado varia de intensidade, sendo que nas raças tipo *gravis* a produção foi em geral mais acentuada e nas raças tipo *mitis*, foi onde houve maior número de produções mínimas e negativas.

Lehmann e Neumann, dão como produzindo H₂S o *C. diphtheriae*; Bergey, em seu Manual, nada refere a êsse respeito e Frobisher diz, que tôdas as raças por êle examinadas, não produziram H₂S. Essa divergência, talvez seja devida à qualidade da peptona usada, no método empregado.

GELATINA — Tôdas as amostras por nós verificadas, não liqüefizeram a gelatina, estando de acôrdo com as verificações feitas por outros autôres.

LEITE COM LITMUS — As raças verificadas não modificaram o meio ou acusaram uma ligeira acidez, estando as nossas observações de acôrdo com as de outros pesquisadores.

CROMOGÊNESIS — Vários autôres têm observado pigmentação em certas culturas de *C. diphtheriae*. Pigmento de côr amarela, se produz quando semeadas no sôro de Loeffler, na temperatura a 37° e na ambiente, sendo mais intensa nesta. As nossas observações confirmam as de outros autôres, pois, verificámos a existência de pigmentos nas culturas, quando semeadas em meio de Loeffler de reação alcalina e guardados na temperatura ambiente ou a 37°.

RESUMO

Foram identificadas pela sua morfologia, 1.452 raças como típicas de *Corynebacterium diphtheriae*, as quais fermentaram dextrose e dextrina, tendo a fermentação desta variado de intensidade, algumas fermentaram a sacarose, outras o amido.

As que foram classificadas como pseudo-diftérico (bacilo xerosis) não fermentaram a dextrina, tendo fermentado a dextrose e a sacarose. Tendo sido inoculadas em cobaia, estas raças de pseudo-diftérico, não mataram nem produziram reação local, demonstrando assim serem avirulentas.

Foram inoculadas, também, diversas raças típicas pela morfologia de *C. diphtheriae* que fermentaram sacarose, tendo elas demonstrado serem virulentas e tóxicas. Foram isoladas raças, de diversos casos em uma mesma família, filiadas a um primeiro caso, do qual tinha sido isolada uma cultura de *C. diphtheriae*, que fermentou sacarose e era virulenta e tóxica.

Tôdas as raças classificadas como *C. diphtheriae*, fermentaram a glicerina com maior ou menor intensidade, enquanto que, as de pseudo-diftérico não fermentaram êste carboidrato.

Das 1.452 raças de *C. diphtheriae*, 184 fermentaram sacarose o que dá uma percentagem de 12,6% e 32 amido, ou seja 2,2%. As raças que fermentam o amido (tipo *gravis*) são muito raras em São Paulo, o que concorda com os nossos estudos de classificação dos tipos, pela morfologia das colônias.

A dextrina pode ser considerada elemento básico na classificação dos diftéricos, pois das 1.452 raças nenhuma deixou de fermentá-la, apesar de variar de intensidade, tendo procedido da mesma maneira as raças Park 8, 3.985 (*Gravis*), 3.990 (*Mitis*) e 3.988 (*Intermedius*) do Inst. Lister.

A pureza do carboidrato empregado é de grande importância, bem como o seu poder rotatório. Estas propriedades deverão ser sempre mencionadas para que os resultados sejam constantes.

A qualidade de dextrina empregada é importante, pois o seu poder de ser fermentada varia muito, conforme já verificaram outros autores. Foi usada a dextrina Pfanstiehl Chemical — Special Bacteriological (pptd from alcool) cujo poder rotatório é em solução aquosa a 1% $[\alpha]_{19} = + 170$.

D

Todas as raças que foram classificadas como *C. diphtheriae* fermentaram: dextrose, maltose, *d*-galatose, *d*-levulose, *d*-mano-

se, dextrina e glicerina algumas a sacarose, outros o amido. Não fermentaram: *d*-lactose, *d*-manita, *d*-xilose, adonita, *l*-arabinose, dulcita, *d*-galatose, inosita, inulina, *l*-rhamnose (isodulcita) rafinose, salicina, *d*-sorbita celbiose, trealose e esculina. Todos os carbohidratos usados foram Pfanstieht Chemical.

Podemos pois, pela fermentação, separar o *Corynebacterium diphtheriae* em 3 grupos:

I — Fermentando dextrose e dextrina não fermentando sacarose.

II — Fermentando dextrose, dextrina e sacarose.

III — Fermentando dextrose, dextrina e amido.

Tôdas as raças reduziram nitratos a nitritos, nenhuma deu indol, na produção de H₂S variaram de intensidade, não liquefizeram a gelatina, acusaram ligeira acidez em leite litmus e quanto à cromogênese, algumas mostraram pigmento amarelo.

* * *

Queremos assinalar os nossos agradecimentos a D.^a Maria da Conceição Nistal pelo auxílio que nos prestou na parte técnica deste trabalho.

ABSTRACT

They were indentified by their morphology 1452 strains as typical *Corynebacterium diphtheriae* which fermented dextrose and dextrin, having this one the fermentation varying in intensity, some fermented saccharose and other starch.

Those which were classified as pseudo diphteria (xerosis bacillus) dit not ferment dextrin, but, fermented glucose and saccharose. The strains of pseudo diphteria, when inoculated in guinea pigs, did not kill them, having not even produced a local reaction, thus proving their avirulence.

Also there have been inoculated various strains typical by their morphology to *C. diphtheriae* which fermented saccharose, then proving to be virulent and toxic. Strains were isolated in various cases in a same family, descending from a first case, of which a strain of *C. diphtheriae* had been isolated, which fermented saccharose and was virulent and toxic.

All the strains as *C. diphtheriae* fermented glycerine with more or less intensity, while the pseudodiphteria bacillus did not ferment this carbohydrate.

In 1452 strains of *C. diphtheriae* 184 fermented saccharose which gives a percentage of 12,6% and 32 starch or 2,2%. The strains which fermented starch (typo *gravis*) rarely occurs in São Paulo, which is in accordance to our studies of the classification of types, by the morphology of the colonies.

Dextrin may be considered as a basic element to the classification of the diphteria bacillus, as of the 1452 strains all have fermented it (none has failed to ferment it), in spite of the different intensities, having behaved in the same way the strains Park 8, 3985 (*Gravis*), 3990 (*Mitis*) and 3988 (*Intermedius*) from the Lister Institute.

The purity of the carbohydrate used is of great importance, as well as its rotatory power.

These characteristics should be always mentioned in order the results may be constant.

The brand of the dextrin used is important, as its power of fermentation changes with quality, according to the various authors.

There was used dextrin Pfanstiehl Chemical — Special Bacteriological (pptd from Alcohol), the rotatory power of which in

19

a water solution in 1% () — to + 170.

D

All these strains which were classified by their morphology to *Corynebacterium diphtheriae* form acid from dextrose, maltose, d-galactose, d-levulose, d-manose, dextrin and glicerine; some strains also ferment saccharose and other starch. No acid from d-lactose, d-manitol, d-xilose, adonitol, l-arabinose, dulcitol, d-galactose, inositol, inulin, l-rhamnose (isodulcitol) raffinose, salicin, d-sorbitol celobiose, trealose, esculin. There was used all carbohydrate from Pfanstiehl Chemical.

Therefore we may separate the *Corynebacterium diphtheriae* in 3 groups according to the fermentation:

- I — Fermenting dextrose and dextrin, but not saccharose.
- II — Fermenting dextrose, dextrin and saccharose.
- III — Fermenting dextrose, dextrin and starch.

Alls strains were reduced nitrit, indol not formed, hydrogen sulfid was produced, varying in intensity, no gelatin liquefaction, litmus milk slightly acid. Some strains showed yellow pigment.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, J. S., JAPPOLD, T. C., MACLEOD, J. W. e THOMSON, J. A. — 1931 — *Jour. Path. & Bact.* 342, 667.
- ANDREWS, F. W., BULLOCH, W., DOUGLAS, S. R., DREYER, J., GARDNER, A. D., FILDES, P., LEDINGHAM, J. C. G. e WOLF, C. G. L. — 1923 — *Diphtheria Its bacteriology, pathology and immunology*. His Majesty's Stationer Office, London.
- BARRAT, M. M. — 1924 — 1925 — *Jour. Hyg.*, 23: 241.
- BERGEY — 1939 — *Manual of Determinative Bacteriology*, 5th. edition.
- DURAND, P. — 1920 — *Compt. Rendus. Soc. Biol.*, 83: 613.
- FROBISHER, M., Jr., — 1938 — *The Amer. Jour. Hyg.*, 28: 1.
- HAMILTON, A. e HORTON, J. — 1906 — *The Jour. Inf. Dis.*, 128.
- KNAPP, A. — 1904 — *Jour. Med. Res.*, 12: 475.
- LEHMAN-NEUMANN — 1896 — *Phililert, Manual of Bacteriology*.
- LEHMAN-NEUMANN — 1927 — *Bakteriologische Diagnostik*, 7 Auflage, II Band.
- MORSE, M. E. — 1912 — *Jour. Inf. Dis.*, 11: 253.
- MENTON, J. — 1923 — *Jour. Path. Bact.*, 35: 651.
- MORSE, M. — 1912 — *Jour. Inf. Dis.*, 11: 253.
- PARK WILLIAMS, e MANN — 1922 — *Jour. Immun.*, 7: 243.
- PERRY, WHITLEY, e BETRAN, E. — 1936 — *The Am. Jour. of Hyg.*, 23: 581.
- PESTANA, B. R., AMARAL, J. P. e BARRETO NETO — 1939 — *Memórias do Inst. Butantan*, 13:
- Medical Research Council — 1930 — *A System of Bacteriology in relation to Medicine*, vol. V.
- TOPLEY e WILSON — 1936 — *The Principles of Bacteriology and Immunity* — 2.^a ed., Baltimore.
- ZINSSER, H. — 1907-1908 — *Jour. Med. Res.*, 17: 89.