

ESTUDO SÔBRE O *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* I — FERMENTAÇÃO DA SACAROSE POR BACILOS DIFTÉRICOS VIRULENTOS ISOLADOS EM SÃO PAULO °

DACIO DE ALMEIDA CHRISTOVÃO *

INTRODUÇÃO

A julgar pelas opiniões expressas por diversos autores de livros de bacteriologia, publicados no último decênio, ainda existe grande controvérsia a respeito da existência de cêpas de *Corynebacterium diphtheriae* capazes de fermentar a sacarose. É importante o esclarecimento desta questão, porquanto, de acôrdo com a maioria, dela dependeria a possibilidade da identificação bioquímica do bacilo diftérico.

Há poucos anos atrás, era opinião sobremaneira generalizada, quase universal entre os bacteriologistas, que o *C. diphtheriae* não exercia qualquer ação sobre êsse hidrato de carbono, o que podia ser exemplificado pelas palavras — traduzidas textualmente — de Wilson e Miles ⁵⁶, na edição de 1946 dos autorizados “Topley and Wilson’s Principles of bacteriology and Immunity”: “Os hidratos de carbono, empregados mais freqüentemente como substratos de prova para a diferenciação das espécies dentro dêste gênero (*Corynebacterium*), são a dextrose, maltose e sacarose. A espécie tipo, *C. diphtheriae*, produz ácido, mas não gás na maltose e dextrose, porém não ataca a sarcose”.

Realmente, revendo em ordem cronológica, as opiniões dos autores dos livros de bacteriologia geralmente mais difundidos entre nós, publicados até 1950, encontram-se as seguintes opiniões:

1) Kolle e Hetsch ³², citando Rothe, não acusam a possibilidade de fermentação da sacarose pelo bacilo diftérico.

2) Calmette, Negre e Boquet ⁹ afirmam que o bacilo diftérico nunca fermenta êsse hidrato de carbono.

3) Kendall ³⁰ é da mesma opinião.

4) Tanner-Hewlett ⁵⁵ — autor do capítulo sôbre o *Corynebacterium diphtheriae* e os organismos difteróides, no Vol. V. do tratado “A System of Bacteriology in Relation to Medicine”, publicado em 1930 — apresenta a relação de

Recebido para publicação em 25-7-1957.

° Trabalho realizado na Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Lucas de Assumpção) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Apresentado à sessão de 5-8-1957, do Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina.

* Assistente da Cadeira.

açúcares atacados ou não pelo bacilo diftérico, na qual a sacarose figura como não sofrendo qualquer ação. Posteriormente, ao discutir o diagnóstico completo desta bactéria, diz que, após o isolamento da cultura pura, o organismo é submetido a exame de coloração e de fermentação, acrescentando "... somente três açúcares são necessários na rotina: a glicose, galactose e sacarose... O bacilo diftérico é constante em suas reações: produz ácido na glicose e galactose, nunca na sacarose... O uso da sacarose permite-nos desprezar os fermentadores da sacarose".

5) Besson ⁴ afirma que o "bacilo da difteria... é sem ação sobre a sacarose..."

6) Belding e Marston ³ também consideram o *C. diphtheriae* como sem ação sobre o dissacarídeo.

7) Park e Williams ⁴⁷ apresentam quadro de fermentações, que atribuem a Knapp, no qual a sacarose é dada como não atacada pelo bacilo da difteria.

8) No Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, edição de 1939, Murray e Breed ⁴³, revisores do capítulo "*Corynebacteriaceae*", também apresentam o *C. diphtheriae* como não fermentando êsse hidrato de carbono.

9) Lacorte ³⁴ referindo-se a êste bacilo, considera-o como sem ação sobre a sacarose.

10) Colien e Odegard ¹² são da mesma opinião.

11) Carvalho Lima ³⁵ diz: "Para a identificação, lançar mão dos meios contendo açúcar". E apresenta quadro de fermentações, no qual a sacarose figura como não atacada.

12) Nos "Diagnostic Procedures and Reagents", da Associação Americana de Saúde Pública, edição de 1945, Frobisher ¹⁹, autor do capítulo sobre o bacilo diftérico, ao tratar das suas características culturais, diz que os organismos que atacam a sacarose podem ser desprezados, rotineiramente. Chama a atenção, entretanto, para *addendum* no final do capítulo, no qual observa que, após ter preparado o artigo, encontrara cêpas virulentas fermentando a sacarose, o que tornava não verdadeiras as observações relativas à identificação por provas de fermentação.

13) Jordan e Burrows ²⁷ não admitem nenhuma ação do *C. diphtheriae* sobre o dissacarídeo.

14) Zinsser e Bayne-Jones ⁶⁰, citando os resultados de Zinsser, dão a sacarose como não atacada.

15) Simmons e Gentzkow ⁵², autores dos "Laboratory Methods of the United States Army", dizem que a reação no meio com sacarose é negativa.

16) Whitby ⁵³ segue a mesma opinião.

17) Ortiz Patto ⁴⁶ ao citar as propriedades bioquímicas do bacilo diftérico em relação aos hidratos de carbono, nada refere sobre a sacarose, dando-o como fermentador da glicose e da levulose e de ação variável sobre a gelaetose, maltose, amido, dextrina e glicerina. Entretanto, ao tratar do diagnóstico, diz que o *C. diphtheriae* se diferencia do *C. xerose*, por atacar a glicose, a dextrina e a sacarose, enquanto o último não fermenta a dextrina.

18) Stitt e Clough ⁵⁴ referem o bacilo da difteria como sem nenhuma ação sobre a sacarose.

19) Mueller ⁴¹, autor do capítulo sobre o bacilo diftérico em "Bacterial and Mycotic Infections of Man", editado por Dubos, diz: "O bacilo da difteria tipicamente... não fermenta a sacarose".

20) Murray e Breed ⁴⁴, na 6.^a edição, de 1948, do "Bergey's Manual of Determination Bacteriology" admitem que algumas cêpas fermentam a sacarose.

21) Mackie e McCartney ³⁶, na oitava edição de seu livro, de 1949, não admitem ação do *C. diphtheriae* sobre o dissacarídeo em questão.

22) Frobisher ¹⁸, na edição de 1949 de seu livro, apresenta as "reações usuais de fermentação de algumas *Corynebacteria* comuns" em forma de quadro, encontrando-se o diftérico como sacarose negativo.

23) Bier ⁵, na edição de 1949, apresenta as fermentações de glucídios em tabela atribuída a Hohn, 1938, na qual a ação do bacilo da difteria sobre a sacarose é dada como negativa.

Vê-se, pois, que dos autores dos vinte e três livros citados, publicados antes de 1950, não tomando em consideração o caso incompreensível de Ortiz Patto, apenas quatro não manifestavam inteiramente a mesma opinião que Wilson e Miles, exposta no início desta introdução: Frobisher, relatando em "addendum" nos "Diagnostic Procedures and Reagents" de 1945, o achado de cêpas virulentas fermentadoras da sacarose e, em seu livro, apresentando a não fermentação deste açúcar como reação usual; Mueller, em 1948, adotando aparentemente o mesmo ponto de vista, ao restringir também com um "tipicamente", não muito enfático, o caráter de não fermentador da sacarose, atribuído classicamente ao bacilo e Murray e Breed, também em 1948, dizendo claramente que algumas estirpes eram capazes de atacar o dissacarídeo.

Daquela data para cá, inverteu-se a posição dos autores de compêndios de bacteriologia, restando muitos, entretanto, a negar a possibilidade da existência de cêpas de diftéricos capazes de fermentar a sacarose. Assim:

1) Bryan e Bryan ⁸, 1950, ainda afirmam que o *Corynebacterium diphtheriae* não ataca aquele hidrato de carbono.

2) Sartory, Sartory e Meyer ⁵⁰, 1950, apresentam a mesma opinião.

3) Na terceira edição, de 1950, dos "Diagnostic Procedures and Reagents" da Associação Americana de Saúde Pública, Frobisher ²⁰ repete o que

afirma em "addendum" na edição anterior, observando que cêpas fermentando a sacarose haviam sido encontradas e acrescentando que a sua existência, conquanto não comum nos Estados Unidos em 1947, roubava às provas de fermentação muito do seu valor.

4) Bier⁶, na edição de 1951, já chamou a atenção sôbre os resultados obtidos pelo presente autor¹¹. Nas edições sucessivas de 1953, 1955 e 1957⁷, apresenta o estudo da fermentação da glicose e sacarose como permitindo, apenas via de regra, distinguir o bacilo da difteria dos difteróides. Em tabela de caracteres bioquímicos, apresenta o *C. diphtheriae* como podendo ou não atacar a sacarose.

5) Mueller⁴², na segunda edição de 1952, do livro "Bacterial and Mycotic Infection of Man", ainda editado por Dubos, mantém a mesma pequena restrição, apresentada em 1948: "O bacilo da difteria tipicamente... não fermenta a sacarose".

6) Kolmer, Spaulding e Robinson³³, 1951, relatam que o "*C. xerose*... é separado do *C. diphtheriae* pela fermentação da glicose e da sacarose e pelo crescimento em meios de caldo simples", parecendo deixar claro que não admitem a possibilidade de fermentação da sacarose pelo bacilo diftérico.

7) Agasse-Lafont¹, 1952, afirma textualmente que o bacilo da difteria não ataca a sacarose.

8) Smith, Conant, Beard, Pope, Shap e Poston⁶¹, na décima edição, de 1952, do "Zinsser's Textbook of Bacteriology", após apresentarem o *C. diphtheriae* como sem ação sôbre êsse açúcar, acrescentam: "As reações de fermentação, no entanto, não são constantes. Algumas cêpas toxígenas de *intermedius* fermentam a sacarose".

9) Schaub e Foley⁵¹ devem admitir a fermentação do dissacarídeo, porquanto na edição de 1952, afirmam que a única maneira válida de identificar o bacilo da difteria é a demonstração da produção de toxina, acrescentando que a morfologia de colônia ou da bactéria são apenas sugestivas e que os caracteres bioquímicos não têm nenhum sentido.

10) Na nona edição, de 1953, de seu "Handbook of Practical Bacteriology", Mackie e Mc Cartney³⁷ ainda são da opinião que o *C. diphtheriae* não fermenta a sacarose. Todavia, registram em nota de rodapé: "Tem sido afirmado que ocasionalmente, cêpas podem fermentar a sacarose".

11) Jawetz, Melnick e Adelberg²⁶, 1954, apresentam o bacilo diftérico como não atuando sôbre a sacarose.

12) Wilson e Miles⁵⁷, na edição de 1955 dos "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity", referem à pág. 541: "Os hidratos de carbono usados comumente para distinguir as espécies dêste gênero são a dextrose maltose e sacarose. Dêstes, o *C. diphtheriae* fermenta os dois primeiros; a sacarose é atacada sômente por estirpes ocasionais. O *C. xerose* fermenta

todos os três açúcares e o *C. hoffmanni* nenhum...” À pág. 554 conservam, entretanto, o texto da edição anterior: “O *C. diphtheriae* fermenta a glicose, galactose e maltose, com produção de ácido, mas sem nenhum gás. Não tem nenhuma ação sôbre a sacarose e manita”.

13) Gastinel²³, na décima edição, de 1957, apresenta o dissacarídeo em questão como não sofrendo nenhuma ação por parte do bacilo diftérico.

Em seis dos livros mencionados, publicados de 1950 para cá, ainda se encontra, portanto, a afirmação de que o *Corynebacterium diphtheriae* nunca fermenta a sacarose.

Por outro lado, revendo os trabalhos realizados sôbre a ação fermentativa do *C. diphtheriae*, vê-se que sempre houve bacteriologistas que relataram terem observado fermentação da sacarose. A literatura a respeito da contravertida ação do bacilo sôbre esse dissacarídeo é extensa e começa muito cedo. Embora pareça estranho, dada a simplicidade do fato investigado, a questão data de sessenta anos atrás. Citando apenas os estudos mais importantes, encontramos os que seguem:

Theobald Smith⁵³, em 1896, parece ter sido o primeiro a investigar êste ponto, chamando a atenção sôbre a ausência de produção de ácido em caldo contendo sacarose.

Martin³⁸, em 1898, foi o primeiro a afirmar o contrário. No célebre trabalho em que estuda fatores de importância na produção da toxina diftérica e no qual apresenta seu clássico “caldo de bucho” (bouillon de panse) — hoje mundialmente adotado e conhecido por caldo-Martin — ao tratar das causas que favorecem a produção de acidez, cita, entre outras, a presença de sacarose.

Seguem-se dados inconclusivos de alguns investigadores e o primeiro trabalho de importância é o de Knapp³¹, publicado em 1904. Êste bacteriologista por sugestão de Hiss, estudou a capacidade fermentadora do bacilo diftérico e de difteróides, empregando o meio de água-sôro com tornassol como indicador, que Hiss empregara pela primeira vez, em 1902, na diferenciação do pneumococo e do estreptococo. O meio de Hiss representou avanço notável na técnica bacteriológica, permitindo a aplicação de provas de produção de ácido em larga escala, com grande número de hidratos de carbono, de maneira muito mais simples que a do método de titulação empregado até então. Dessa maneira, Knapp investigou a ação de 27 cêpas de bacilos diftéricos, 10 de bacilos “xerosis” e 4 de “pseudo-diftéricos” sôbre vários hidratos de carbono e apresentou várias conclusões, entre elas a da não fermentação da sacarose pelo verdadeiro bacilo da difteria, conclusão à qual atribuiu grande importância diferencial.

Grahm-Smith²⁴, em 1906, investigando 23 cêpas de bacilos diftéricos típicos, dos quais 19 virulentos, não pôde notar nenhuma mudança de reação nos meios contendo sacarose. Posteriormente, porém, examinando bacilos de vários surtos ocorridos em pequenas cidades ou aldeias, onde, possivelmente, teria havido fonte única de infecção, observou que 16 estirpes isoladas de 5

surtos pequenos também não atacaram aquêles açúcar; entretanto, 19 das 22 estirpes provenientes de surto maior, o fermentaram. Concluiu o célebre bacteriologista inglês que somente poucas cêpas atuam sobre êsse dissacarídeo.

Segue-se, em 1908, o trabalho de Zinsser⁵⁹, duplamente importante, pelos cuidados tomados pelo grande bacteriologista e pela fama do autor. Logo na introdução, diz Zinsser: "Knapp... alcançou conclusões definidas, as quais, se confirmadas, devem tender a simplificar consideravelmente o trabalho de identificação". Em seguida, cita autores que não confirmaram os achados de Knapp e acrescenta: "Em vista da importância de deixar estabelecido conclusivamente se as provas de fermentação de açúcares fornecem ou não dados dignos de fé na identificação das bactérias do grupo, que nos são conhecidas no presente, o autor acreditou valer a pena percorrer o terreno novamente. O trabalho de Knapp, além disso, requeria desenvolvimento maior, uma vez que na sua publicação nenhuma referência foi feita à virulência das bactérias por êle classificadas como verdadeiros bacilos de Klebs-Loeffler".

Zinsser estudou 42 cêpas de *C. diphtheriae*, 21 de *C. xerose* (algumas das quais fornecidas por Knapp), 8 de bacilo de Hoffmann e algumas cêpas de bacilos não classificados, semelhantes ao bacilo da difteria. Das cêpas de bacilos diftéricos, 39 eram tipicamente virulentas para cobaias. A primeira conclusão de Zinsser foi: "1. Que o *B. hoffmanni*, o *B. diphtheriae* e o *B. xerosis* podem ser diferenciados, rapidamente, nos meios de água-sêro-açúcar; o primeiro, não formando ácido com nenhum dos açúcares empregados; os dois últimos, diferindo em que o *B. diphtheriae* fermenta a dextrina, mas não a sacarose, e o *B. xerosis* fermenta a sacarose, mas não a dextrina. Isto confirma o trabalho de Knapp".

Hine²⁵, em 1913, examinando 15 cêpas de bacilos diftéricos virulentos para cobaia, também não encontrou nenhuma atacando a sacarose, ao que atribuiu enorme valor diferencial.

Em 1916, Moshage e Kolmer⁴⁰, realizaram estudo em escala bem maior, examinando 392 culturas de bacilos do grupo diftérico, isolados em Philadelphia, 59% isolados de material da garganta, 21% de origem nasal e o restante proveniente de casos de otite média supurada, da pele e de olhos. Tôda as culturas foram submetidas a provas de virulência em animal. Os autores admitiram como critério de virulência sinais de toxemia geral e, mesmo, a simples presença de edema no local de inoculação. Não empregaram provas de neutralização específica, o que torna discutível, na sua totalidade, a classificação apresentada. Concluíram pela fermentação da sacarose por grande percentagem, 20,8, das 154 cêpas virulentas encontradas.

Durand¹³, em 1921, examinando 224 cêpas de bacilos diftéricos, perfeitamente típicos e virulentos, encontrou 7, classificadas como do tipo II, que atacaram a sacarose.

Eagleton e Baxter¹⁴, em 1922, entre 33 culturas virulentas isoladas de casos clínicos de difteria, encontraram duas fermentando a sacarose, porém,

tornando a passá-las em placa, verificaram que se achavam contaminadas. Quando livres de contaminação, não mais atacaram êsse açúcar. O mesmo vieram suceder com uma dentre 30 culturas virulentas isoladas de portadores. Concluíram que os bacilos diftéricos, em cultura realmente pura não fermentam aquêlê açúcar.

Jordan, Smith e Kingsbury²⁸, estudaram, em 1922, 74 cêpas virulentas e 32 avirulentas. Nenhuma cêpa virulenta atacou a sacarose.

Okell e Baxter⁴⁵, em 1923, não observaram a fermentação da sacarose nenhuma vez, ao estudarem a capacidade fermentativa de 100 cêpas virulentas.

Christiansen¹⁰, ainda em 1923, publicou sua monografia sôbre o bacilo da difteria. Um de seus estudos referia-se à fermentação de açúcares e dêle concluiu que o bacilo diftérico não ataca a sacarose. Suas observações eram baseadas, neste particular, na ação de 15 cêpas toxígenas e algumas não toxigênicas.

Barratt², em 1924, dentre 102 cêpas virulentas, não encontrou nenhuma acidificando a sacarose.

Em 1936, Perry, Whitley e Petram⁴⁸, estudando 285 cêpas de *C. diphtheriae*, também não encontraram nenhuma fermentando a sacarose.

Frobisher¹⁵, estudou os caracteres bioquímicos de cêrca de 158 cêpas de bacilos diftéricos de virulência conhecida. Nenhuma atacou a sacarose.

Em 1945, Frobisher, Adams e Kuhne²¹, encontraram, entre 169 cêpas virulentas isoladas em Baltimore, 4 que fermentaram a sacarose. Deram a êste fato grande realce, uma vez que Frobisher, conhecido pelos seus trabalhos sôbre o bacilo da difteria, ainda não o havia observado, apesar de, já em 1942¹⁶, ter acumulado uma coleção de mais de 2.000 corinebactérias, tôdas perfeitamente documentadas quanto a propriedades biológicas.

Mauss e Keown³⁹, de South Dakota, em 1946, também comunicaram o achado de bacilos diftéricos virulentos fermentadores da sacarose, relatando terem, no espaço de dois anos, isolados 4 cêpas de ação nítida e constante sôbre aquêlê dissacarídeo.

Desta revisão dos estudos principais realizados na Europa ou nos Estados Unidos, todos publicados até 1946, resulta a evidencição nítida de existência de bacilos diftéricos virulentos fermentadores da sacarose. No entanto, poucos foram os investigadores que os encontraram. O fato de nenhum caso dessa ordem ter sido registrado na Inglaterra ou nos Estados Unidos de 1920 a 1945, aliado aos resultados negativos obtidos antes dessa época por pesquisadores do renome de Knapp³¹ e, principalmente Zinsser⁵⁹, deve ter sido a causa de a maioria dos bacteriologistas passarem a ignorar essa possibilidade, o que se fêz refletir nos livros de texto da matéria. Os achados de Frobisher e cols.²¹, em 1945, e de Mauss e col.³⁹, no ano seguinte, confirmaram modernamente a existência de cêpas com tal propriedade fermentativa, porém, ainda assim, comprovando seu caráter excepcional.

Entretanto, em 1943, Rangel Pestana e Quirino Ferreira ⁴⁰, haviam publicado importante trabalho, investigando as propriedades bioquímicas de 1.452 cêpas isoladas, na maioria, de doentes de difteria recolhidos ao hospital de isolamento "Emílio Ribas" de São Paulo, e identificadas pela sua morfologia como típicas de *C. diphtheriae*. Encontraram 184, 12,6%, fermentando a sacarose. Relataram os autores: "Das raças típicas de *C. 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 Butantan, tendo tôdas elas demonstrado serem virulentas e produzir toxina".

Fenômeno ocorrendo na proporção de 12,8%, evidentemente, não podia mais ser classificado como excepcional e tornava obrigatória a mudança completa da concepção da classificação dessa bactéria pelas propriedades fermentativas. Todavia, não tendo os autores mencionados realizado a pesquisa da virulência das amostras identificadas pela sua morfologia como típicas de *C. diphtheriae*, tornava-se impossível o conhecimento exato da percentagem de diftéricos capazes de fermentar a sacarose, pois, é conhecida a possibilidade de falha do critério de identificação adotado. Por outro lado, o fato de não terem mencionado o número das "algumas" cêpas, dentre as 184 classificadas como diftéricos fermentadores da sacarose, que submeteram às provas de virulência, com resultado positivo, também não permitia estimar-se a probabilidade de sua freqüência relativa, mesmo dentro dos critérios adotados. Outrossim, seria desejável que tivessem incluído contrôles do meio básico de fermentação utilizado.

Em vista disso e dada a importância da questão, resolveu o presente autor, em fins de 1949, retomar o seu estudo. Empreendeu o isolamento de corynebactérias a partir de material colhido de doentes com casos típicos ou suspeitos de difteria, recolhidos ao Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo. Tôdas as cêpas isoladas, com caracteres do gênero *Corynebacterium*, foram submetidas a provas de fermentação e à prova intradérmica de virulência em coelho, sendo esta sempre controlada por segunda prova, realizada no mesmo animal, após proteção pela antitoxina específica. Por ocasião do Quinto Congresso Internacional de Microbiologia, realizado em Agosto de 1950, tendo acumulado dados suficientes para perfeito esclarecimento do problema, foram êles comunicados àquele organismo ¹¹. Haviam sido isoladas 95 cêpas de bacilos diftéricos virulentos, das quais 19, ou seja 20%, tinham, indubitavelmente fermentado a sacarose. Portanto, ficou comprovada a existência em São Paulo, e em extraordinária proporção, de bacilos da difteria virulentos, dotados da controversa propriedade de atacar a sacarose. Êstes estudos foram continuados e a apresentação dos novos resultados encontrados constitui o objetivo principal d'êste trabalho. Entretanto, tendo sido publicados apenas os resumos das investigações apresentadas ao referido congresso e não os seus Anais, que iriam trazer na íntegra os trabalhos comunicados, será aproveitada a oportunidade para a apresentação detalhada também daqueles primeiros resultados.

TÉCNICAS

Fonte de material — Todo material colhido para o isolamento dos bacilos diftéricos, estudados nesta investigação, foi obtido, em chumaço comum de algodão, pelas enfermeiras do Serviço de difteria do Hospital de Isolamento “Emílio Ribas” de São Paulo, que o retiraram de doentes confirmados ou suspeitos de difteria, ali internados. Todos os pacientes, quando o material foi colhido, já tinham recebido anti-toxina diftérica e tratamento local por penicilina.

Isolamento — Os chumaços de algodão, com o material colhido para exame, foram passados em placas de agar-sangue-telurito de Kellog e Wende²⁹, um dos três meios recomendados por Frobisher e cols.²² em seu estudo sôbre a eficiência de sete meios de telurito.

Colônias suspeitas foram inoculadas em tubos de meio de Loëffler. Tôdas as cêpas apresentando caracteres morfológicos de *Corynebacterium*, após cuidadoso exame microscópico para comprovação de sua pureza, foram submetidas a provas de fermentação de hidratos de carbono e, independentemente do resultado destas, a provas de virulência em animal. Sempre que surgia qualquer dúvida quanto à pureza de cêpa, era ela passada em placa de agar-sangue-telurito, realizando-se assim seu reisolamento.

Provas de fermentação — A ação sôbre hidratos de carbono foi investigada em dois meios de cultura diferentes, um sólido, empregado no serviço de rotina do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, e o outro líquido, usado por Rangel Pestana e Quirino Ferreira⁴⁹. Suas fórmulas respectivas:

A) A agar-Martin, pH 7,4 — juntar:

Hidrato de carbono	1%
Indicador de Andrade	1%

Esterilizar em vapor fluente durante 15 minutos; após *resfriar*, adicionar 20% de sôro de cavalo; distribuir em tubos e inclinar.

B) Sôro de cavalo	200 ml
Água destilada	800 ml
Fosfato dissódico	1 g
Fenol vermelho em sol. a 0,2%	10 ml
Hidrato de carbono	10 g

Diluir o sôro em 600 ml de água, ajustar ao pH 8,4 e adicionar mais 3 ml de solução normal de sôda. Autoclavar 20 minutos a 120°C. Dissolver a peptona e o fosfato de sódio em 200 ml de água,

ferver e juntar à solução do sêro acima preparada. Completar o volume a 1000 ml com água destilada e ajustar ao pH 7,6. Juntar o hidrato de carbono e o indicador. Esterilizar em vapor fluente por 30 minutos.

Os hidratos de carbono empregados foram da marca Baker's, C. P.

Tôdas as cêpas com caracteres morfológicos de *Corynebacterium* foram inoculadas em séries de ambos os meios, contendo os hidratos de carbono mais comumente empregados no caso. As cem primeiras cêpas isoladas foram inoculadas também em tubos de contrôle de ambos os meios básicos de fermentação, preparados exatamente segundo as fórmulas e métodos já descritos, apenas não se juntando nenhum hidrato de carbono.

Os tubos inoculados foram incubados a 37°C, sendo a leitura realizada diariamente, durante uma semana.

Provas de virulência — Submeteram-se tôdas as cêpas morfológicamente semelhantes a *Corynebacterium* a provas de virulência em animal, empregando-se a técnica adaptada de Fraser, recomendada por Frobisher¹⁹. Esta prova é realizada intradêrmicamente em coelho. Inclui a verificação da especificidade das reações positivas — caracterizadas pelo aparecimento de área de necrose — pela neutralização da ação toxigênica do germe na prova contrôle, a qual é efetuada após a administração de anti-toxina diftérica ao mesmo animal. A inclusão da prova contrôle não permite nenhuma dúvida sôbre a verdadeira identidade e virulência das cêpas positivas.

RESULTADOS

Ambos os meios de prova de fermentação funcionaram satisfatôriamente. Todos os diftéricos virulentos e tôdas as corinebactérias que, embora avirulentas, puderam ser diagnosticadas como diftéricos, provocaram em 24 horas mudança de côr do meio dos hidratos de carbono por êles atacados. Não houve, durante os sete dias de observação, nenhum caso de reversão da côr do indicador. Houve concordância quase total entre os resultados observados em ambos os meios. A mudança de côr foi, porém, sempre mais intensa no meio sólido, no qual foi suficientemente nítida para não deixar dúvida quanto à leitura. Nenhum tubo testemunha do meio sólido teve sua côr alterada dentro dos sete dias de observação. Em alguns casos, os tubos testemunhas do meio líquido apresentaram leve mudança de côr nas primeiras 48 horas de incubação, posteriormente havendo, porém, completa reversão à côr original.

Das 18 primeiras cêpas de bacilos isolados e diagnosticados como diftéricos virulentos, 5 fermentaram a sacarose. Apesar de não haver a menor suspeita quanto à pureza destas cêpas, foram tôdas passadas em placa de agar-sangue-telurito. Após fazer esfregaços com material colhido de várias colônias e verificar que todos revelavam igual evidência de pureza de colônia, inocularam-se séries de tubos de fermentação com material colhido de três colônias to-

madras ao acaso de cada placa. Em todos os casos repetiu-se a acidificação dos meios contendo sacarose.

Em vista desses resultados, não mais se realizou tal operação, passando-se a agir apenas com os rigorosos cuidados usuais, já descritos.

Na primeira parte deste trabalho, já comunicada, isolaram-se 95 cêpas de bacilos diftéricos virulentos, das quais 18, ou 20%, fermentaram a sacarose. Destas 19, 10 foram submetidas a outro contrôle, sendo inoculadas nos meios de fermentação, sólido e líquido, contendo sacarose, porém, sem a adição de sôro. Atacaram o açúcar da mesma maneira, embora mais lentamente; a mudança de côr só apareceu após 48 horas de incubação.

Para mais um contrôle dos meios usados e da sacarose, inocularam-se 24 cêpas de *Salmonella typhosa* nos meios sólido e líquido contendo êsse açúcar. Não provocaram a menor alteração de côr do indicador durante os 7 dias de observação.

Com a continuação do estudo, foram isoladas outras 98 cêpas virulentas e destas, mais surpreendentemente, 35, ou seja 35,7%, atacaram aquêle hidrato de carbono.

Ao todo, de 193 cêpas virulentas, 54 fermentaram o dissacarídeo, o que corresponde à elevada percentagem de 28%.

Releva notar que 166 cêpas virulentas, das quais 45 fermentadoras da sacarose, foram enviadas ao Dr. M. Frobisher Jr., renomado por sua extensa série de trabalhos sôbre o bacilo diftérico, entre muitas outras investigações, e então diretor do "Bacteriology Branch" do "Communicable Disease Center", Atlanta, Ga., U.S.A. Em seus laboratórios, nossas verificações foram tôdas confirmadas por sua colaboradora, Dra. Elizabeth I. Parsons.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui referidos deixaram perfeitamente comprovado que existem em São Paulo, em freqüência muito elevada, cêpas de *Corynebacterium diphtheriae*, isoladas de casos clínicos de difteria, virulentas para animal, dotadas da propriedade de fermentar a sacarose. Os cuidados tomados não permitem outra conclusão.

Realmente, a possibilidade da acidificação não ser devida à fermentação da sacarose e sim à da pequena quantidade de hidratos de carbono normalmente existente no agar-infusão empregado no meio sólido, ou no sôro de cavalo empregado em grande quantidade em ambos os meios, foi afastada pelos resultados negativos obtidos em todos os tubos testemunhas dos meios básicos.

A possibilidade da fermentação da sacarose ser devida à presença de hidrolases existentes no sôro também não pode ser aceita, porquanto, no meio líquido empregado, o sôro é submetido a 120°C, durante 20 minutos antes de ser posto em contacto com o açúcar, o que inativaria qualquer porven-

tura presente. Além disso, as provas positivas obtidas com 10 das 19 primeiras cêpas virulentas fermentadoras da sacarose, realizadas pela sua inoculação em ambos os meios contendo sacarose, porém, sem qualquer quantidade de sôro, servem de prova adicional à rejeição desta hipótese.

Restaria, como causa de êrro, a questão da maneira pela qual foi esterilizada a sacarose, dada a possibilidade de seu desdobramento por ação do calor. A temperatura e o tempo usados, entretanto — vapor fluente por 15 minutos, para o meio sólido, e por 30 minutos para o meio líquido — deveriam excluir essa possibilidade. Além disso, no trabalho em que relata o achado de cêpas fermentadoras de sacarose, Frobisher e colab.²¹ mostrou que não há diferença nenhuma entre a esterilização dêsse hidrato de carbono por autoclavagem ou por filtração.

Têm-se, ainda, os resultados negativos obtidos com 24 cêpas de *S. typhosa*.

A par dêstes argumentos, que nos parecem suficientes, existe a valiosa comprovação dos nossos resultados nos laboratórios do Dr. M. Frobisher Jr. Note-se ainda, que o meio básico para a prova de fermentação empregado por Frobisher¹⁵ é diferente daqueles usados nesta investigação, e não contém sôro.

Impõe-se, portanto, a conclusão acima referida e é interessante observar a aparente ascensão da freqüência relativa de tais bacilos. Rangel Pestana e Quirino Ferreira⁴⁹, em 1943, relataram o achado de 12,6%. Em 1950, comunicamos o achado de 20%; posteriormente, na série isolada no ano seguinte, a percentagem dos fermentadores de sacarose subiu a 35,7. Devendo a extensa série estudada por aquêles investigadores corresponder a mais de um ano de observações, deveríamos comparar a percentagem achada por êles com a de 28 encontrada no conjunto de nossos dados. Ainda assim, nota-se um aumento extraordinário.

Para êsse aumento, de 12,6 a 28, não ser real, teríamos de admitir estarem em operação um ou mais dos fatores hipotéticos seguintes:

a) O material recebido por nós para isolamento provinha todo de doentes já internados, às vêzes há mais de um dia. Tratava-se de pacientes já medicados, pela antitoxina específica e por tratamento local com penicilina. É de se acreditar que o material recebido por Rangel Pestana e Quirino Ferreira⁴⁹, na seção de diagnóstico de difteria do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório de Saúde Pública do Estado de São Paulo), fôsse mais recente e, em muitos casos, pelo menos, até mesmo anterior à medicação. O isolamento foi por nós realizado em placa de agar-sangue-telurito, enquanto aquêles pesquisadores usaram meio com telurato de sódio. Em nosso caso, foram isolados bacilos que podiam ser classificados como diftéricos, de apenas 60% dos casos. A percentagem verdadeira de doentes com lesões ocasionadas por *C. diphtheriae* é desconhecida. Supondo ser substancialmente maior que aquela encontrada, a percentagem não revelada — além da proporção normalmente não evidenciável — poderia ser devida, primeiramente, a influência dos tratamentos, e em segundo lugar a alguma possível ação impediante do telurito. Se

esses agentes exercem ou não ação seletiva sobre os bacilos não fermentadores de sacarose, facilitando o isolamento em maior proporção das bactérias dotadas da propriedade de atacar esse açúcar, nada se sabe; seria improvável, mas, *a priori* nada se pode afirmar.

b) O fato do material que recebíamos para isolamento ser retirado de pacientes já internados a algum tempo, às vezes dias, na enfermaria de difteria, não permite desprezar-se a possibilidade de terem ocorrido infecções cruzadas. Parte das cêpas fermentadoras de sacarose poderiam ter tido essa origem. Ainda aqui, Rangel Pestana e Quirino Ferreira⁴⁹, tendo recebido material mais recente, proveniente de pacientes com nenhum ou menor estágio no hospital, não teriam tido oportunidade de encontrá-las na mesma frequência por nós revelada. Se este possível fator interveniente seria capaz de explicar a diferença observada entre nossos dados e os dos autores citados, nada se poderá adiantar.

Cabe ressaltar, entretanto que, mesmo dentro das condições em que foi efetuada esta investigação, foi observado aumento da incidência de diftéricos fermentadores de sacarose de um ano para o outro, de 20 para 35,7%. Esta diferença mostra-se significativa estatisticamente, não podendo ser atribuída a simples flutuação de amostra, e para ela não se pode imaginar nenhum fator intercorrente.

Para concluir, parece, portanto, não restar dúvida sobre a existência em São Paulo, em proporção considerável, de bacilos diftéricos virulentos capazes de atacar rápida e vigorosamente a sacarose, nem sobre o aumento de sua frequência relativa, verificado neste estudo. A elevada incidência de tais bacilos parece ainda mais extraordinária ao lembrar que há poucos anos a sua simples existência era negada por bacteriologistas dos mais renomados.

Foi visto, na introdução desta investigação, que vários autores de livros de bacteriologia recentemente editados ainda apresentam o *Corynebacterium diphtheriae* como absolutamente incapaz de atacar a sacarose. Mesmo nos livros onde se admite a possibilidade dessa fermentação, vê-se que, em quase todos, o fato é apresentado como excepcional. Isso tudo poderia levar, ainda hoje, bacteriologistas menos avisados a confiarem na identificação bioquímica clássica das corinebactérias, desprezando como difteróides todos os bacilos fermentadores da sacarose. Tal fato poderia trazer sério erro sobre o conhecimento da incidência comprovada da difteria nos locais, como São Paulo, onde as afirmativas referidas não correspondem absolutamente à realidade.

RESUMO

O autor, em 1950, comunicou ao V Congresso Internacional de Microbiologia, reunido no Rio de Janeiro, o achado, entre 95 cêpas diagnosticadas indubitavelmente como bacilos diftéricos virulentos, de 19 ou 20%, capazes de fermentar rápida e vigorosamente a sacarose. Não tendo sido publicados os trabalhos apresentados ao referido congresso, relata agora aquela investigação, assim como seu prosseguimento.

Em estudo posterior, isolou mais 98 cêpas virulentas, encontrando 35, ou seja a elevada proporção de 35,7%, capazes de atacar aquêle açúcar. Assim, isolou em São Paulo, de casos clínicos de difteria, 193 cêpas virulentas de *C. diphtheriae*, das quais 54, ou 28% fermentaram a sacarose. Os ensaios de virulência foram realizadas intradêrmicamente em coelho, pela técnica de Frazer, a qual inclui a verificação da especificidade das reações positivas por segunda prova no mesmo animal, após sua proteção antitoxina diftérica. A ação sôbre a sacarose foi verificada pela inclusão dos contrôles apropriados, os quais excluíram a possibilidade do efeito observado ser devido quer a hidratos de carbono presentes nos meios básicos de cultura quer a enzimas sacarolíticas do sôro empregado nos mesmos meios.

Tem sido negada por inúmeros bacteriologistas a possibilidade do *Corynebacterium diphtheriae* fermentar a sacarose. Êste açúcar tem ocupado posição chave na identificação bioquímica das corinebactérias, permitindo sua fermentação distinguir o difteróide *C. xerose* do bacilo diftérico. A quase totalidade dos bons compêndios de bacteriologia, publicados até 1950, registrava opinião de acôrdo com êsse ponto de vista. Dos livros editados desde então, alguns ainda mantêm igual afirmativa, parecendo ter a maioria, todavia, passado a admitir a capacidade de cêpas de bacilos diftéricos fermentarem aquêle hidrato de carbono. Quase todos, entretanto, dão a êste fato o cunho de excepcional, o que poderia levar ainda ao emprêgo da identificação bioquímica clássica das corinebactérias. Erros sérios adviriam daí ao conhecimento da incidência comprovada da difteria em locais, como São Paulo, onde tal fato absolutamente não corresponde à realidade.

SUMMARY

In a preliminary communication to the 5th International Congress of Microbiology, in 1950, the author reported the occurrence, in a group of 95 strains of undoubtedly virulent diphtheria bacilli, of 19 strains (20 per cent) which were able to ferment saccharose vigorously and promptly.

In a subsequent investigation, 35 new saccharose fermenting strains were found among 98 virulent strains isolated (like those of the first group) from clinical cases of diphtheria in São Paulo, an incidence of 35.7 per cent.

The virulence tests were performed intradermally in rabbits according to Frazer's technique, which includes a control of the specificity of the positive tests. Controls of the action on saccharose were included, ruling out the possibility of the observed effect being due to the presence of either other carbohydrates in the basic culture media or of saccharolytic enzymes in the serum incorporated to these media.

The possibility of *Corynebacterium diphtheriae* to ferment saccharose has been denied by many bacteriologists. The fermentation test with this carbohydrate has been therefore used in the biochemical identification of *Corynebacteria*, in order to differentiate the diphtheria bacillus from *C. xerose*.

Several text-books of bacteriology, in recent editions, admit the possibility of occasional strains of *C. diphtheriae* attacking that sugar. Since strains exhibiting this property are considered as exceptional, the usual biochemical classification of *Corynebacteria* might still be resorted to, leading to an underestimation of the incidence of *C. diphtheriae* infections in areas where the forementioned strains are rather frequent, as it occurs in São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Nossas verificações foram integralmente confirmadas nos laboratórios do Dr. Martin Frobisher Jr. (*Bacteriology Branch, Communicable Disease Center, Atlanta, Ga., U.S.A.*), a quem enviamos a grande maioria das cêpas isoladas, conforme relatado no estudo ora apresentado. Ao Dr. Frobisher Jr. e a sua colaboradora, Dra. Elizabeth I. Parsons, somos imensamente gratos.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our findings have been confirmed in the laboratories of Dr. Martin Frobisher Jr. (Bacteriology Branch, Communicable Disease Center, Atlanta, Pa., U.S.A.) to whom we have sent the great majority of our strains, as described in this paper. To Dr. M. Frobisher Jr. and to his collaborator, Dr. Elizabeth I. Parsons, we are very grateful.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agasse-Lafont, E.: Le laboratoire: notions générales de chimie, biologie, bacteriologie, cytologie, sérologie... Paris, Vigot Frères, 1952. 2v.
2. Barratt, M. M.: A study of *C. diphtheriae* and other members of the genus *Corynebacterium* With special referente to fermentative activity. *J. Hyg.* **23**:247, 1924.
3. Belding, D. L. & Marston, A. T.: A text-book of medical bacteriology. New York, D. Appleton-Century Co., 1938.
4. Besson, A.: Technique microbiologique et sérothérapique. 8e ed. Paris, J. B. Baillière et Fils, 1930. 2v.
5. Bier, O.: Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene. 4.^a ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1949.
6. —: Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene. 5.^a ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1951.
7. —: Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à hagiene. 8.^a ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1957.
8. Bryan, A. H. & Bryan, C. G.: Principles and practice of bacteriology. Third ed. New Ycrk, Barnes & Noble. 1950.
9. Calmette, A.; Nègre, L. & Boquet, A.: Manuel technique de microbiologie et sérologie. Paris, Masson & Cie, 1935.
10. Christiansen, M.: Le bacille de la diphtérie. Paris, Gaston Doin, éditeur, 1923.

11. Christovão D. de A.: Fermentação da sacarose por bacilos diftéricos virulentos (in Congresso Internacional de Microbiologia. 5.º, Rio de Janeiro, 1950 :Resumos dos trabalhos. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz [1950]. p. 83).
12. Colien, F. E. & Odegard, E. J.: Principles of microbiology. St Louis, The C. V. Mosby Co., 1941.
13. Durand, P.: Action des bacilles diphtériques sur les hydrates de carbone. C. R. Soc. Biol. (Paris), **84**:982-983, 1921.
14. Eagleton, A. J. & Baxter, E. M.: The virulence of diphtheria-like organisms. Brit med. J. **1**:139-140, 1922.
15. Frobisher, M. (Jr): Some biological properties of *C. diphtheriae*. Amer. J. Hyg., **28**:1-12, 1938.
16. —: Properties of strains of *Corynebacterium diphtheriae* obtained from various parts of the United States. Amer. J. Publ. Hlth, **32**:709-719, 1942.
17. —: Fundamentals of bacteriology. Third ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1944.
18. —: Fundamentals of bacteriology. Fourth ed. Philadelphia W. B. Saunders Co., 1949.
19. —: The diphtheria bacillus (in American Public Health Association: Diagnostic procedures and reagents, 2nd ed. New York, 1945. p. 270-305).
20. —: The diphtheria bacillus (Ibid. 3rd ed. 1950. p. 156-190).
21. —; Adams, M. L. & Kuhns, W. J.: Characteristics of diphtheria bacilli found in Baltimore since November, 1942. Proc. Soc. exp. Biol. & Med. (N. Y.) **58**:330-334, 1945.
22. —; Parsons, E. I.; Yeates, E. L. & Gay, K. L.: A comparative study of tellurite plating media for *Corynebacterium diphtheriae*. Amer. J. Hyg., **48**:1-5, 1948.
23. Gastinel, P.: Précis de bacteriologie médicale. 10e. ed., Paris, Masson et Cie., 1957.
24. Graham-Smith, G. S.: The diphtheria bacillus. (in Nuttal, G. H. F. & Graham-Smith, G. S.: The bacteriology of diphtheria. Cambridge, University Press, 1913. p. 122-448).
25. Hine, T. G. M.: Biochemical reactions of diphtheria-like organisms. J. Path. Bact., **18**:75-80, 1913-1914.
26. Jawetz, E.; Melnik, J. L. & Adelberg, E. A.: Review of medical microbiology. Los Altos (Calif.), Lang Medical Publications, 1954.
27. Jordan, E. O. & Burrows, W.: Textbook of bacteriology. 14th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1945.
28. Jordan, J. A.; Smith, F. & Kingsbury, A. N.: Pathogenicity of the diphtheria group: a study of the relation of morphological and cultural characteristics of the diphtheria group of bacilli to pathogenicity; with a note on the lesions resulting from animal inoculation. Lancet, **2**:1052-1056, 1922.
29. Kellog, D. K. & Wende, R. D.: Use of potassium tellurite medium in the detection of *C. Diphtheriae*. Amer. J. Publ. Hlth, **36**:739-745, 1946.
30. Kendall, A. I.: Bacteriology. General, pathological, intestinal. 3rd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1928.
31. Knapp, A.: The differentiation of *Bacillus diphtheriae*, *Bacillus xerosis* and *Bacillus pseudo-diphtheriae* by fermentation tests in the serum-water media of Hiss. J. Med. Res., **12**:475-481, 1904.

32. Kolle, W. & Hetsch, H.: La bacteriologie expérimentale appliquée a l'étude des maladies infectieuses. 3e ed. française d'après la 4e ed allemande. Paris, Octave Doin, 1918.
33. Kolmer, J. A.; Spaulding, E. H. & Robinson, H. W.: Approved laboratory technic. 5th ed. New York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1951.
34. Lacorte, J. G.: Compendio de bacteriologia e imunologia. 3.^a ed. Rio de Janeiro, Editôra Guanabara, 1940.
35. Lima, J. P. de C.: Bacteriologia. 4.^a ed. 1945.
36. Maekie, T. J. & Mc Cartney, J. E.: Handbook of practical bacteriology. 8th ed. Edinburgh, E. S. Livingstone Ltd, 1949.
37. —: Handbook of practical bacteriology. 9th ed. Edinburgh, E. S. Livingstone Ltd, 1953.
38. Martin, L.: Production de la toxine diphthérique. Ann. Inst. Pasteur, **12**:26-46, 1898.
39. Mauss, E. A. & Keown, M. J.: Saccharose-fermenting diphtheria bacilli. Science, **104**:252-253, 1946.
40. Moshage, E. L. & Kolmer, J.: A study of acid-production by diphtheria bacilli. J. Infect. Dis., **19**:19-27, 1916.
41. Mueller, J. H.: The diphtheria bacilli and the diphtheroids. (in Dubos, R. J.: Bacterial and mycotic infections of man. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1948. p. 196-216).
42. —: The diphtheria bacilli. (Ibid., 2nd ed. 1952. p. 222-243).
43. Murray, E. G. D. & Breed, R. S.: Genus I. *Corynebacterium* Lehmann and Neumann. (in Bergey's Manual of determinative bacteriology. 5th ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1939).
44. —: Family VIII. *Corynebacteriaceae* Lehmann and Neumann. (Ibid., 6th ed. 1948. p. 381-411).
45. Okell, C. C. Baxter, E. M.: Fermentative reaction of different types of *B. diphtheriae*. Lancet, **1**:436-437, 1923.
46. Ortiz Patto: Compendio de bacteriologia. 2.^a ed. Rio de Janeiro, Editôra Capitólio Ltda, 1947.
47. Park, W. H. & Williams, A. W.: Pathogenic microorganisms. 11th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1939.
48. Perry, C. A.; Whitley, O. R. & Petran, E.: Types of *C. diphtheriae* in Maryland. Amer. J. Hyg., **23**:580-599, 1936.
49. Pestana, B. R. & Ferreira, M. F. Q.: Considerações sôbre algumas propriedades bioquímicas do bacilo de difteria. Rev. Inst. Adolfo Lutz, **3**:32-43, 1943.
50. Sartory, A.: Sartory, R. & Meyer, J.: Microbiologie pratique. Paris, Librairie Maline, 1950.
51. Schaub, I. G. & Foley, M. K.: Diagnostic bacteriology. St Louis, C. V. Mosby Co., 1952.
52. Simons, J. S. & Gentzkow, C. J.: Laboratory methods of the United States Army. 5th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1946.
53. Smith, T., citado in 40.
54. Stitt, E. R.; Clough, P. W. & Branham, S. E.: Practical bacteriology, hematology and parasitology. 10th. ed. Philadelphia, Blackiston co.. 1948.

55. Tanner-Hewlett, R.: *Corynebacterium diphtheriae* and diphtheroid organisms. (in **Medical Research Council: A system of bacteriology in relation to medicine. London, 1930, v. 5, 67-150).**
56. **Topley and Wilson's Principle of bacteriology and immunity. 3rd ed. rev. by G. S. Wilson and A. A. Miles. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1946. 2v.**
57. ——. 4th ed. rev. by G. S. Wilson and A. A. Miles. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1955. 2v.
58. **Whitby, L.: Medical bacteriology. 4th ed. London, J. & A. Churchill Ltd., 1947.**
59. **Zinsser, H.: A study of the diphtheria group of organisms; with special reference to fermentation reactions. J. med. Res., 17:277-289, 1908.**
60. — & Bayne-Jones, S.: **Tratado de bacteriologia; traduzido da 8.ª ed. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1947.**
61. **Zinsser's Textbook of bacteriology. [10th ed. rev. by] David T. Smith [et al.] New York, Appleton Century Crofts, Inc., [c1952].**