

# ESTUDO SÔBRE O *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* II — OBSERVAÇÕES SÔBRE BACILOS DIFTÉRICOS E DIFTERÓIDES ISOLADOS EM SÃO PAULO: ASPECTO MORFOLÓGICO, PROPRIEDADES FERMENTATIVAS, VI- RULÊNCIA E FREQUÊNCIA DOS TIPOS DE *CORYNE- BACTERIUM DIPHTHERIAE* ENCONTRADOS <sup>o</sup>

DACIO DE ALMEIDA CHRISTOVÃO \*

## INTRODUÇÃO

“Há poucos assuntos em bacteriologia que tenham dado lugar a tanta controvérsia como a ação do bacilo diftérico sôbre os açúcares. Os resultados obtidos pelos diversos autores mostram numerosas divergências. Estas divergências parecem ser devidas sobretudo ao meio empregado, à maior ou menor pureza do açúcar e à pouca sensibilidade do indicador”. Estas palavras de Besson <sup>3</sup>, na edição de 1930 de seu livro sôbre a técnica bacteriológica e soroterápica, conservam ainda a atualidade de quando foram escritas. Se as diferenças de opinião, ocasionadas por impurezas dos hidratos de carbono, estão desaparecendo, devido à alta qualidade mais uniformemente atingida pelas marcas geralmente empregadas, todavia perduram as outras causas de desacôrdo. O bacteriologista que usa meios que satisfazem melhor as exigências metabólicas do *Corynebacterium diphtheriae*, ou indicador de viragem em pH ácido não muito afastado do neutro, ou ambas as cousas, tem de chegar a conclusões bem diversas das alcançadas pelo emprêgo de substratos nutritivos deficientes e indicadores de maior grau de acidez. A falta de uniformidade na técnica dos pesquisadores continua sendo grande fonte de diversidade de resultados. Embora decorridos 130 anos do início da distinção e do agrupamento científico das bactérias por Ehrenberg e um século após a classificação de Cohn, passados mais de 70 anos do nascimento da moderna técnica bacteriológica nas mãos de Koch e meio século depois da introdução por Hiss da pesquisa simplificada da ação fermentativa bacteriana, ressen-te-se ainda a bacteriologia da falta de normas técnicas, que permitam realmente a comparação dos resultados obtidos pelos diversos investigadores. Seria altamente compensador que a tarefa de uniformização das técnicas bacteriológicas fôsse empreendida vigorosamente. Os conhecimentos necessários de há muito se acham acumula-

---

Recebido para publicação em 25-7-1957.

<sup>o</sup> 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.

dos, pelo menos para a grande maioria das bactérias de interesse sanitário e médico.

Entretanto, no que se refere ao bacilo diftérico, tornou-se patente que existe outra causa para a divergência de opiniões encontradas na literatura mundial. Trata-se da ocorrência de variedades diversas, dotadas de caracteres fermentativos próprios, cuja frequência relativa pode ser bastante variável de região para região, podendo ainda na mesma área flutuar de ano para ano. Não é de admirar, portanto, que estudos baseados em número relativamente pequeno de amostras, isoladas em épocas diferentes e locais diversos, possam apresentar até mesmo resultados contraditórios.

Em São Paulo foi comprovada a existência de cepas de *C. diphtheriae* virulentas, fermentadoras de sacarose, em alta incidência, atingindo até a 35,7%<sup>5</sup>. Tal fato veio complicar a identificação do microrganismo. Em países onde cepas dotadas de tal propriedade parecem ser inexistentes ou são raríssimas, a diferenciação das corinebactérias, isoladas de casos suspeitos de difteria, costuma ser feita através de provas bioquímicas simplicíssimas, valendo-se do emprego de provas de fermentação de apenas dois açúcares, a glicose e a sacarose. Tendo tal esquema clássico perdido todo o significado para a região de São Paulo, resolveu o autor verificar o comportamento de cepas de diftéricos e difteroides, isoladas nesta cidade, não só em relação aos dois glucídios citados, como também à destrina e a à glicerina, compostos de maior probabilidade de utilização no diagnóstico bioquímico das corinebactérias de interesse no caso.

#### TÉCNICAS

*Fonte de material* — Todas as cepas estudadas foram isoladas a partir de material obtido de doentes suspeitos ou confirmados de difteria, recolhidos ao Hospital de Isolamento Emílio Ribas de São Paulo, no decorrer de 1949 e 1950.

A colheita do material para exame foi realizada pelas enfermeiras da seção de difteria. Por ocasião da colheita, a todos os doentes já havia sido administrada antitoxina diftérica e a maioria também já recebera tratamento local por penicilina.

*Isolamento e provas de fermentação e virulência* — As técnicas empregadas no isolamento das corinebactérias e nas provas de fermentação e virulência a que todas as cepas isoladas foram submetidas já se acham descritas em trabalho anterior<sup>5</sup>, no qual também os vários controles empregados em ambos os tipos de provas foram detalhados.

A prova de virulência empregada, de inoculação intradérmica em coelho, é extraordinariamente econômica comparada à prova clássica de inoculação subcutânea em cobaia. Foram realizadas quase 400 provas, as quais com seus controles — feitos simultaneamente — exigiram apenas 40 coelhos, em vez das quase 800 cobaias que se fariam necessárias para a prova clássica.

*Classificação dos tipos de bacilo diftérico* — A grande maioria das cêpas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas foi enviada ao Dr. M. Frobisher Jr. Em seus laboratórios, foram classificadas em tipos por sua colaboradora Dra. Elizabeth I. Parsons, que também verificou e comprovou nossos resultados relativos à virulência, ou avirulência, e capacidade de fermentar ou não a sacarose apresentadas pelas mesmas.\*

A técnica empregada por Frobisher para a determinação dos tipos foi descrita em um dos seus trabalhos<sup>7</sup>. Foi também detalhada no capítulo “O Bacilo da Difteria (*Corynebacterium diphtheriae*)”<sup>8</sup>, escrito por esse pesquisador para os “Diagnostic Procedures and Reagents” da Associação Americana de Saúde Pública. Compreende a determinação das 6 propriedades originalmente descritas por Anderson, Happold, McLeod e Thomson<sup>1</sup>, que caracterizam os tipos *gravis*, *mitis* e as formas intermediárias.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Morfologia e propriedades fermentativas* — a) Foram isoladas 378 cêpas de bactérias com as características morfológicas e tintoriais do gênero *Corynebacterium*. A classificação da morfologia foi realizada de maneira simplificada, considerando-se as corinebactérias apenas como semelhante ou não semelhantes ao bacilo diftérico e subdividindo-se a primeira classe unicamente em dois grupos, as de morfologia típica e aquelas cujas características morfológicas não obedeciam integralmente aos tipos clássicos mais comumente descritos pelos vários autores, designados como “não típicas”, existindo toda uma graduação de formas de um a outro extremo da escala morfológica das corinebactérias, é evidente que nem mesmo tal divisão mais simples está ao abrigo de erros, havendo necessariamente bacilos que um técnico classificaria num grupo e que, possivelmente, seriam atribuídos à classe imediata por outro observador.

Tôdas as cêpas foram submetidas a prova de virulência e inoculadas nos dois meios básicos de fermentação<sup>5</sup>, sólido e líquido, contendo glicose, dextrina ou sacarose. As últimas 137 cêpas isoladas foram inoculadas, além disso, nos mesmos meios básicos com glicerina. O meio sólido permitiu leitura mais rápida e mais nítida. Tôdas as cêpas virulentas, nesse meio, atacaram a glicose, dextrina e sacarose (quando foi o caso) em 24 horas. A acidificação do meio contendo glicerina, freqüentemente se processou no terceiro dia de incubação e, às vezes, somente no quarto dia. Provas duvidosas surgiram unicamente entre os difteróides, tendo mesmo ocorrido casos de reversão durante os 7 dias de incubação.

\* — Os dados constantes da tabela VI referem-se justamente às cêpas enviadas ao Dr. M. Frobisher Jr. A observação relativa à fermentação de dextrina e glicerina, porém, é de exclusiva responsabilidade do autor.

No meio líquido houve grande tendência à reversão da mudança de cor do meio contendo dextrina. Em considerável percentagem dos casos a prova passou de positiva a duvidosa. Com algumas cêpas deu-se mesmo reversão completa, de cor, voltando à original no quinto dia. Ainda nesse meio a glicerina não foi fermentada por 4 cêpas virulentas. Por outro lado, com o meio líquido muito raramente se obteve fermentação da dextrina ou da glicerina com corinebactérias que tudo levava a crer se tratasse de difteróides.

b) A tabela I apresenta a distribuição das 378 cêpas de corinebactérias isoladas, por virulência e aspecto morfológico. As percentagens relativas a cada tipo morfológico, encontradas entre as cêpas virulentas e entre as não virulentas e também as percentagens de cêpas virulentas e de não virulentas dentro de cada classe morfológica são apresentadas. É visível a associação de alto grau existente entre morfologia típica e virulência. Deve-se observar, entretanto, que 7,3% das cêpas virulentas tiveram o aspecto morfológico descrito como "não típico" ou, vista a questão de outro lado, verifica-se que uma de cada quatro cêpas de morfologia "não típica" mostrou-se virulenta; nota-se mesmo o achado de uma cêpa virulenta atípica, descrita como não semelhante a bacilo diftérico.

Na tabela II vê-se que tôdas as 193 cêpas de diftéricos virulentos fermentaram a glicose e a dextrina e na tabela III, que tôdas as 66 cêpas virulentas experimentadas também atacaram a glicerina. A ação sobre a sacarose é variável e, dada a sua importância especial, foi objeto de comunicação anterior<sup>5</sup>.

Ainda, relativamente ao aspecto morfológico, entre as cêpas de corinebactérias avirulentas, pode-se verificar, pelos dados da tabelas II e III, que daquelas que não atacaram nem a glicose, nem a dextrina e nem a sacarose (que poderiam ser identificadas, muito provavelmente, como *C. pseudo-diphtheriticum* e certamente como não sendo *C. diphtheriae*), 15 e 24%, respectivamente, foram descritas como de morfologia semelhante ao bacilo diftérico, "não típica". A reconhecida possibilidade de falha do critério morfológico de identificação é patente.

Quanto às fermentações observadas entre as corinebactérias avirulentas, vê-se na tabela II que tôdas as combinações de resultados com a glicose, dextrina e sacarose foram encontradas, com uma única exceção: não foram isoladas bactérias atacando somente a dextrina e sacarose. O simples fato de ter aparecido uma cêpa que somente atacou a dextrina, retira à fermentação deste hidrato de carbono o valor diferencial absoluto que se pudesse querer emprestar-lhe. Observado os dados da tabela, vê-se claramente que não é possível tomar nenhuma combinação de resultados como absolutamente específica do bacilo diftérico. O máximo que se poderia concluir, dos resultados encontrados, é que o *C. diphtheriae*, tipicamente, apresenta morfologia bastante característica e, no meio de cultura sólido empregado, ataca a glicose e a dextrina, fermentando ou não a sacarose.

TABELA I

Distribuição das Cêpas de Corinebactérias por Virulência e Morfologia

Virulência \ Morfologia	Semelhante a bac. diftérico		Não semelhante a bac. diftérico	TOTAL
	típica	não típica		
positiva .....	178 (92,2)* (92,2)	14 (7,3) (25,5)	1 (0,5) (0,8)	193 (100,0)
negativa .....	15 (8,1) (7,8)	41 (22,2) (74,5)	129 (69,7) (99,2)	185 (100,0)
<b>Total</b> .....	193 (100,0)	55 (100,0)	130 (100,0)	378

\* O primeiro número entre parênteses é a percentagem sobre o total da linha; o segundo é a percentagem sobre o total da coluna.

Na tabela III os resultados são análogos. Observa-se que das 16 combinações possíveis de resultados, 9 foram encontradas. Há uma cêpa atacando unicamente a glicerina. Há 4 cêpas fermentando só a glicose e a glicerina, das quais uma de aspecto morfológico semelhante a *C. diphtheriae*. Se, pelo menos esta se trata de bacilo diftérico avirulento, não fermentador de dextrina e sacarose, nada se pode afirmar. O mesmo se diria das 6 cêpas que atacaram a glicose, dextrina e sacarose. Dentre elas se encontram duas com morfologia de *C. diphtheriae* e não é possível negar nem afirmar sua condição de diftéricos não fermentadores da glicerina. Ainda aqui, com base nos resultados encontrados, apresentados na tabela III, apenas se poderia dizer que, tipicamente, o bacilo diftérico, além de apresentar morfologia bastante característica, fermenta, no meio sólido empregado, a glicose, dextrina e glicerina, atacando ou não a sacarose.

e) Entretanto, os dados revelados por esta investigação parecem indicar que a bactéria, mesmo morfológicamente semelhante ao bacilo diftérico, que — ainda no meio sólido empregado — deixar de fermentar a glicose, ou a dextrina, ou a glicerina, terá pequena probabilidade de ser *C. diphtheriae*. Este ponto de vista seria apoiado, não só pelo fato de entre as cêpas virulentas não se ter observado nenhuma que não fermentasse essas três substâncias como também pelo que se poderia concluir da frequência relativa das cêpas morfológicamente não semelhantes a bacilo diftérico, dentro de cada classe de tipo fermentativo e de acôrdo com o caráter de virulência.

Realmente, já foi visto, pela tabela I, que, das 193 cêpas virulentas isoladas, apenas uma teve seu aspecto morfológico classificado como não semelhante ao *C. diphtheriae*. A morfologia deveria constituir, portanto, um caráter identificador bastante valioso. Que não pode, no entanto, ser conside-

TABELA II — Distribuição das cépas de corinebactérias isoladas, por virulência, morfologia e fermentação da glicose, dextrina e sacarose nas várias combinações possíveis.

Virulência	MORFOLOGIA	HIDRATOS DE CARBONO FERMENTADOS*										TOTAL	
		Os três			Dois			Um			Nenhum		
		Go	D	S	Go	D	S	Go	D	S			
+	Semelhante a bacilo diftérico	típica	49	129	—	—	—	—	—	—	—	—	178
		não típica	—	9	—	—	—	—	—	—	—	—	14
		sub-total	54	138	—	—	—	—	—	—	—	—	192
	Não semelhante a bac. diftérico		—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
—	Semelhante a bacilo diftérico	típica	3	12	—	—	—	—	—	—	—	—	15
		não típica	11	10	2	—	—	5	—	—	—	13	41
		sub-total	14	22	2	—	—	5	—	—	—	13	56
	Não semelhante a bac. diftérico		18	8	8	—	—	19	1	4	—	71	129
	<b>Total</b>		<b>86</b>	<b>169</b>	<b>10</b>	<b>—</b>	<b>24</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>—</b>	<b>84</b>	<b>378</b>	

\* — Go = Glicose; D = Dextrina; S = Sacarose.

TABELA III — Distribuição de cépas de corinebactérias, por virulência, morfologia e fermentação da glicose, dextrina, sacarose e glicerina, nas combinações possíveis.

Virulência	MORFOLOGIA	COMPOSTOS FERMENTADOS*																TOTAL				
		Os quat.				Três				Dois				Um					Nenhum			
		Go	D	S	Gi	Go	D	S	Gi	Go	D	S	Gi	Go	D	S	Gi					
+	típica	19	—	—	—	42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	61
	não típica	1	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
	sub total	20	—	—	—	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	65
	Não semelhante a bac. diftérico	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
—	típica	2	1	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6
	não típica	5	1	—	—	6	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	24
	sub total	7	2	—	—	9	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	30
	Não semelhante a bac. diftérico	1	4	—	—	1	—	—	—	2	3	—	—	—	—	—	—	3	—	1	1	41
	<b>Total</b>	28	6	56	—	—	—	—	—	3	4	—	—	5	—	—	—	1	—	—	—	137

\* — Go = Glicose; D = Dextrina; S = Sacarose; Gi = Glicerina.

rada caráter absoluto, prova-o, não somente o que já foi referido atrás, como também o fato de, entre as cêpas não virulentas que, segundo o critério fermentativo adotado por muitos bacteriologistas, poderiam ser classificadas como *C. diphtheriae*, existir, em percentagem bem maior do que entre as virulentas, cêpas classificadas como de morfologia “semelhante” à do bacilo diftérico, porém, apenas “não típica”. Isto é bem visível, por exemplo, tomando-se as cêpas fermentadoras somente da glicose e dextrina, apresentadas na tabela II. Enquanto entre as virulentas se encontram 9 “semelhantes, não típicas” para 129 “semelhantes, típicas” — numa relação de 7/100 — pode-se ver que, entre as não virulentas, são encontradas 10 “semelhantes, não típicas” para 12 “semelhantes, típicas” — numa relação de 83/100. O mesmo parece mostrar a tabela III, se fôrem consideradas tanto as cêpas fermentadoras de glicose, dextrina e glicerina, como as que atacaram também a sacarose. Das virulentas, no primeiro caso, 3 são “não típicas” e 42, “típicas”, e no segundo, 1 e 19, respectivamente. A relação é de 7/100 no primeiro grupo e de 5/100 no segundo. Entre as não virulentas, há 6 “não típicas” para 3 “típicas” no primeiro grupo fermentativo e 5 para 2, no segundo, com inversão das razões respectivas. Encontra-se, assim, ao se passar das cêpas virulentas para as não virulentas, grande aumento da razão “não típicas”/“típicas”. Isso indicaria que a ausência de virulência é freqüentemente acompanhada de mudança de morfologia, não se tratando, muitas vezes, de fenômeno isolado, e que os caracteres morfológicos não somente não são absolutos, como têm valor identificador muito maior entre as cêpas virulentas do que entre as não virulentas, onde, justamente, surgem os problemas de identificação.

Apesar disso, permanece o valor relativo do aspecto morfológico como critério de identificação e passando-se a examinar a relação “número de cêpas não semelhantes” sobre o “número de semelhantes”, nota-se claramente tendência à evidência de outro aspecto, que parece ser de valor . Os dados são poucos para permitir conclusão definitiva, mas seriam bastante indicativos.

Pode observar-se, com efeito, na tabela III, que as cêpas virulentas, como já referido, somente se apresentaram fermentando a glicose, dextrina e glicerina ou êsses três compostos e a sacarose. Entre as não virulentas, pertencentes a êsses tipos fermentativos, verifica-se o já discutido aumento da relação “cêpas de morfologia semelhante a bacilos diftéricos, não típicas”/“semelhantes, típicas”. Em ambas as classes, porém, nota-se a existência de apenas uma cêpa “não semelhante”, enquanto entre todos os outros tipos fermentativos as “não semelhantes” predominam, inclusive entre as cêpas que fermentaram a glicose, dextrina e sacarose. Isso parece indicar que a fermentação da glicerina, além daquela da glicose e dextrina, teria real valor diagnóstico, porquanto somente a dextrina, além da glicose, não permite a obtenção de resultados dessa ordem. Tal argumento encontra apoio no fato de se encontrarem na tabela II, entre as cêpas avirulentas que atacaram a glicose, a dextrina e a sacarose, a presença de 18 “não semelhantes” para somente 14 “semelhantes”. Não pareceria aceitável considerar tôdas como *C. diphtheriae*, permanecendo,



portanto, a impressão de que unicamente a capacidade de fermentar a dextrina não deve constituir critério suficiente de distinção entre o *C. xerose* e o *C. diphtheriae* fermentador da sacarose e que a propriedade de atacar também a glicерina, além da glicose e dextrina, seria característica do bacilo diftérico.

Fica implícita, obviamente, a admissão da existência de corinebactérias fermentadoras de glicose, dextrina e sacarose, não identificáveis a bacilo diftérico.

Pode-se demonstrar ainda de outra maneira a aparente importância da glicерina. Dentre as 185 cêpas avirulentas, 129 eram morfológicamente “não semelhantes” a bacilo diftérico (tabela I); considerando-se, nas tabelas II, todas as cêpas avirulentas que fermentaram a glicose e a dextrina (colunas Go D S e Go D), encontram-se 62, das quais 26 (42%) não semelhante morfológicamente a bacilo diftérico; quando se toma em consideração também a fermentação da glicерina (tabela III, colunas Go D S Gi e Go D Gi), somente 2 (11%), das 18 cêpas avirulentas que atacaram os três compostos, não se assemelham a *C. diphtheriae*.

Por outro lado, 13 das 84 cêpas avirulentas (tabela IV) que não fermentaram nenhuma das substâncias experimentadas assim como 6 das 20 cêpas (tabela V) que deixaram de atacar um ou dois dos três compostos — glicose, dextrina e glicерina — eram morfológicamente semelhantes ao bacilo diftérico, ainda que não tipicamente (tabela III).

Assim, se poderia dizer que há indicações de que a corinebactéria que, no meio sólido empregado, deixar de fermentar qualquer das três substâncias — glicose, ou dextrina ou glicерina — terá pequena probabilidade de ser *C. diphtheriae*, mesmo quando formológicamente semelhante ao bacilo diftérico.

Outro ponto interessante a ser observado, de acôrdo com os dados das tabelas II e III, é que a corinebactéria que fermentar a glicose e dextrina sem atacar a sacarose tem grande probabilidade de fermentar também a glicерina, pois que não se encontrou nenhuma cêpa nessas condições que o tivesse deixado de fazer (tabela III). Isso não acontece, como já visto, com as cêpas que fermentaram a glicose, dextrina e sacarose, as quais tanto podem vir a fermentar a glicерina como não.

A simplificação das tabelas II e III, pela classificação das cêpas isoladas apenas em semelhantes ou não ao bacilo diftérico e pela apresentação somente das colunas das combinações de fermentações ocorridas, realça as observações referidas, que são melhor avaliadas pela distribuição percentual. As tabelas mencionadas são dessa maneira, transformadas, respectivamente, nas tabelas IV e V (as percentagens são calculadas unicamente com finalidade ilustrativa, pois a frequência de observações em muitas das classes é demasiadamente pequena para permitir mais que isso).

A investigação dos aspectos revelados pelos dados apresentados, em escala mais extensa, que abrangesse número bem maior de corinebactérias avi-

rulentas, poderia ser estudo de grande valia, permitindo provávelmente atribuir real significado ao que agora se trata de indicação.

Enquanto não forem totalmente esclarecidos os aspectos discutidos, pareceria útil tomar-se o aspecto morfológico semelhante (típica ou não tipicamente) a bacilo diftérico, mais a fermentação da glicose, dextrina e glicerina — no meio de cultura sólido empregado nesta investigação, ou em outro qualquer que forneça resultados idênticos — como característicos do *Corinebacterium diphtheriae*. A incubação das provas de fermentação deveria ser realizada durante uma semana, devido às possibilidades, já mencionadas, de fermentação lenta da glicerina ou da reversão da acidificação do meio.

*Tipos de C. diphtheriae: virulência e capacidade de fermentar a sacarose* — Das 168 cêpas de bacilos diftéricos, 151 virulentas e 17 avirulentas, cujos tipos foram determinados, vemos, pela tabela VI, que 69,6% são do tipo *mitis* e somente 2,4% do tipo *gravis*; 28% são intermediárias, cabendo 22,6% ao tipo semelhante a *mitis* e 5,4 ao tipo semelhante a *gravis*.

Comparando as percentagens relativas dos vários tipos entre as cêpas virulentas e as avirulentas, nota-se, nas primeiras, tendência a maior proporção do tipo *mitis*, passando as percentagens dos 4 tipos, de *gravis* a *mitis*, de 0,7, 4,0, 23,2 e 72,2 entre as virulentas, a 17,6, 17,6, 17,6, e 47,1 entre as avirulentas. A evidencição de tal tendência é ainda mais flagrante se fôr feita comparação igual entre os bacilos virulentos sacarose-negativos e os avirulentos, que talvez seria mais apropriada, por não se terem incluído no quadro avirulentos fermentadores de sacarose.

Outro resultado interessante é o fato de 3 das 4 cêpas *gravis* isoladas serem avirulentas e a coincidência da única cêpa *gravis* virulenta ser fermentadora da sacarose. Pode-se observar também, entre as cêpas virulentas, que a sacarose foi fermentada por 19 (17%) das 109 pertencentes ao tipo *mitis*, por 5 (14%) das 35 semelhantes a *mitis*, e por 5 das 6 semelhantes a *gravis*.

*Revisão sumária da literatura* — Knapp<sup>13</sup>, em 1904, como resultado de sua investigação, apresenta o bacilo diftérico como atacando a dextrina; as cêpas de *C. xerose* experimentadas não a fermentaram. Atribuiu valor diferencial a êsse hidrato de carbono.

Graham-Smith<sup>9</sup>, em 1906, relatou que a maioria das cêpas de *C. diphtheriae*, em condições apropriadas, produz ácido a partir da dextrina e da glicerina.

Zinsser<sup>22</sup>, em 1908, examinou 42 cêpas de *C. diphtheriae* (39 virulentas) e 21 de *C. xerose*. Concluiu que o bacilo diftérico fermenta a dextrina e o *C. xerose*, não.

Hine<sup>10</sup>, em 1913, deu enorme valor à verificação da acidificação da glicose, dextrina e sacarose. As 15 cêpas virulentas que examinou atacaram a dextrina.

Durand<sup>6</sup>, em 1921, examinando 224 cêpas de bacilo diftérico perfeitamente típicas e virulentas, concluiu que os resultados eram variáveis com dextrina e glicerina. Baseado nos resultados de fermentação de vários hidratos

TABELA IV - Distribuição das Cepas de corinebactérias isoladas, por virulência, morfologia e fermentação da glicose, dextrina e sacarose (Simplificação da tabela II, apresentando também a distribuição percentual\*)

Virulência	Morfologia	HIDRATOS DE CARBONO FERMENTADOS**														
		Go D S		Go D		Go S		Go		D ou S		Nenhum				
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%			
positiva	semelhante a bac. diftérico	54	100,0	138	99,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	não semelhante a bac. diftérico	—	—	1	0,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>100,0</b>	<b>139</b>	<b>100,0</b>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
negativa	semelhante a bac. diftérico	14	43,7	22	73,3	2	20,0	5	20,8	—	—	—	—	13	15,5	—
	não semelhante a bac. diftérico	18	56,3	8	26,7	8	80,0	19	79,2	5	100,0	71	84,5	—	—	—
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	<b>24</b>	<b>100,0</b>	<b>5</b>	<b>100,0</b>	<b>84</b>	<b>100,0</b>	<b>84</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

\* — Nas classes de frequência muito pequena, as percentagens são apresentadas com intuito apenas ilustrativo;

\*\* — Go = glicose; D = dextrina; S = sacarose.

TABELA V — Distribuição de Cepas de Corinebactérias, por virulência, morfologia e fermentação da Glicose, Dextrina, Sacarose e Glicerina (Simplificação da tabela III, apresentando também a distribuição percentual\*)

Virulência	Morfologia	COMPOSTOS FERMENTADOS**															
		Go D S Gi		Go D S		Go D Gi		Go S		Go Gi		Go ou Sou Gi		Nenhum			
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
positiva	semelhante a b. diftérico	20	100,0	—	—	45	97,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	não semelhante a b. diftérico	—	—	—	—	1	2,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>100,0</b>	—	—	<b>46</b>	<b>100,0</b>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
negativa	semelhante a b. diftérico	7	87,5	2	33,3	9	90,0	1	33,3	1	25,0	2	28,6	8	24,2	—	—
	não semelhante a b. diftérico	1	12,5	4	66,7	1	10,0	2	66,7	3	75,0	5	71,4	25	75,8	—	—
	<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>100,0</b>	<b>6</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	<b>3</b>	<b>100,0</b>	<b>4</b>	<b>100,0</b>	<b>7</b>	<b>100,0</b>	<b>33</b>	<b>100,0</b>	—	—

\* — Nas classes de frequência muito pequena, as porcentagens são apresentadas com intuito apenas ilustrativos;

\*\* — Go = glicose; D = dextrina; S = sacarose; Gi = glicerina.

TABELA VI — Distribuição de Cepas de *Corynebacterium Diphtheriae* por tipo, virulência e capacidade fermentar de a sacarose\*

Virulência	Fermentação da sacarose	Não submetidas a classificação em tipos	CLASSIFICAÇÃO EM TIPOS										TOTAL
			Mitis		Semelhantes a MITIS		Semelhantes a GRAVIS		GRAVIS		Sub-total		
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Virulentos ...	Sacarose — ...	0	74,4	30	24,8	1	0,8	0	0,0	121	100,0	121	100,0
	Sacarose + ...	15	63,3	5	16,7	5	16,7	1	3,3	30	100,0	45	100,0
	Sub-total ...	15	72,2	35	23,2	6	4,0	1	0,7	151	100,0	166	100,0
Avirulentos ...	Sacarose — ...	0	47,1	3	17,6	3	17,6	3	17,6	17	100,0	17	100,0
		15	69,6	38	22,6	9	5,4	4	2,4	168	100,0	183	100,0
<b>Total</b> .....													

\* — Todas as cepas fermentaram a dextrina; a glicerina foi atacada por todas as experimentadas, 66 virulentas e 9 avirulentas.

de carbono, distinguiu 5 tipos de *C. diphtheriae*: entre outras propriedades, os tipos I fermentavam dextrina, mas não glicerina; o tipo II não atacava nem um e nem outro; os tipos III, IV e V fermentavam os dois. Encontrou cêpas atípicas com variações individuais.

Barratt<sup>2</sup>, em 1924, verificou a ação de 102 cêpas virulentas e 31 avirulentas de *C. diphtheriae* e de 150 difteróides sôbre vários hidratos de carbono. Apresenta o bacilo diftérico como fermentando a dextrina. Encontrou uma única cêpa de difteróide que atacou êste hidrato de carbono. Teve, porém, oportunidade de verificar a variabilidade dos lotes de dextrina e não a julgou substância apropriada a uso em provas de fermentação.

Jensen e Falk<sup>11</sup>, em 1928, verificando a ação de 45 cêpas virulentas e 5 avirulentas sôbre 36 substâncias fermentáveis, notaram que tôdas atacaram a dextrina e a glicerina.

Tanner Hewlett<sup>20</sup>, em 1930, apresenta o *C. diphtheriae* como fermentando constantemente a dextrina e glicerina.

Anderson, Happold, McLeod e Thonson<sup>1</sup>, em 1931, ao descreverem os tipos de *C. diphtheriae*, apresentaram o tipo *gravis* como fermentando invariavelmente a dextrina e o tipo *mitis* como dando resultados inconstantes.

Pestana e Ferreira<sup>17</sup>, em 1943, relatam que tôdas as 1.452 cêpas de bacilo diftérico estudadas, identificadas por sua morfologia, fermentaram a dextrina e glicerina, o que não foi feito por nenhum pseudodiftérico.

Jordan e Burrows<sup>12</sup>, em 1945, são de opinião que algumas cêpas de *C. diphtheriae* fermentam os compostos de carbono em questão.

Simmons e Gentskow<sup>18</sup>, em 1946, apresentam o bacilo diftérico como fermentando, geralmente, a dextrina e a glicerina.

Stitt e Clough<sup>19</sup>, em 1948, são da mesma opinião.

Murray e Breed<sup>16</sup>, na edição de 1948 do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", dão êsses compostos como atacados por algumas cêpas do bacilo diftérico.

Bryan e Bryan<sup>4</sup>, em 1950, apresentam igual opinião afirmativa.

Wilson e Miles<sup>21</sup>, na edição de 1952 de "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunology", apresentam apenas o tipo *gravis* como fermentando constantemente a dextrina; referem os tipos *mitis* e *intermedius* como dando resultados irregulares com êsse hidrato de carbono. Quanto ao *C. xerose*, afirmam que não ataca a dextrina. Nada referem quanto à glicerina.

Mueller<sup>15</sup>, em 1952, diz que os bacilos diftéricos do tipo *gravis* atacam a dextrina e que os dos outros tipos não têm ação sôbre ela.

Mackie e Mc Cartney<sup>14</sup>, em 1953, dão o *C. diphtheriae* como dextrina-positivo.

Vê-se que a opinião dos vários autores citados, sôbre a capacidade do *C. diphtheriae* de fermentar a dextrina e glicerina, está longe de ser concordante e que alguns procuram estabelecer diferença de ação sôbre a dextrina segundo o tipo de bacilo. Como ficou implícito, não foi encontrada nenhuma diferença desta ordem, pois tôdas as cêpas isoladas, atacaram êsse hidrato de carbono.

Outro fato de interêsse, revelado nesta investigação, refere-se à questão da capacidade de fermentar a sacarose e o tipo do bacilo diftérico. Smith e cols<sup>23</sup>, na 10.<sup>a</sup> edição, de 1952, do "Zinsser's Textbook of Bacteriology", referindo-se às propriedades bioquímicas do *C. diphtheriae*, afirmam: "...A lactose, sacarose e manita não são fermentadas... As reações de fermentação, no entanto, não são sempre constantes. Algumas cêpas toxígenas *intermedius* fermentaram a sacarose..." Foi visto, na série de cêpas virulentas apresentadas na tabela III, que 17% das pertencentes ao tipo *mitis*, 14% daquelas semelhantes a *mitis*, 5 das 6 semelhantes a *gravis* e a única amostra *gravis* virulenta isolada, atacaram a sacarose.

Os dados obtidos nesta investigação evidenciaram, mais uma vez, a variação dos resultados de provas de fermentação em meios básicos diferentes. No meio líquido, a fermentação da dextrina pelas cêpas virulentas foi muitas vêzes duvidosa e a ação sôbre a glicerina algumas vêzes negativa. Com o meio sólido tal não se deu; porém, o número de casos positivos obtidos com cêpas que não poderiam ser classificadas como diftéricas foi maior. A prova mais nítida e a positividade constante das cêpas virulentas com a dextrina e glicerina, obtidas no meio à base de agar-infusão-sôro de cavalo, levariam, entretanto, à preferência dêste meio.

A diversidade dos meios básicos de fermentação empregados em vários estudos explicaria, sem dúvida, muito da controvérsia encontrada na literatura.

#### RESUMO

As propriedades fermentativas do bacilo diftérico são ainda, em grande parte, assunto controvertido. A razão de tal fato se deve à falta de uniformidade das técnicas empregadas pelos vários investigadores e à existência ou predominância de variedades diversas do microrganismo em locais diferentes. A alta incidência em São Paulo de cêpas de *C. diphtheriae* virulentas, fermentadoras de sacarose (até 35,7%), torna impossível a distinção entre *C. diphtheriae* e *C. xerose* através da fermentação dêsse açúcar. Isso levou o autor a verificar a ação de 193 cêpas virulentas e 129 cêpas de difteróides e diftéricos avirulentos sôbre a dextrina, e de 66 cêpas virulentas e 71 avirulentas, difteróides e diftéricos, sôbre a glicerina, visando a possibilidade do emprêgo dêsses compostos na identificação do bacilo diftérico. A verificação das fermentações foi efetuada em dois meios de cultura, um sólido e outro líquido. Os contrôles apropriados foram empregados. O meio sólido forneceu melhores resultados, os quais se acham apresentados nas tabelas II a V, onde sua distribuição foi

feita pela virulência e aspecto morfológico da cêpa. A virulência foi comprovada pela técnica intradérmica em coelho, de Frazer, a qual inclui a averiguação da especificidade das reações positivas.

Os dados apresentados revelam claramente, mais uma vez, que só o aspecto morfológico não é caráter suficiente de identificação do bacilo diftérico. As cêpas de diftéricos virulentos estudadas geralmente apresentaram morfologia bastante característica e sempre fermentaram, no meio sólido, a dextrina e a glicerina, além da glicose. A glicerina, às vêzes, foi fermentada somente no quarto dia de incubação. A ação sobre a sacarose, dada sua importância particular, foi objeto de comunicação especial.

Os resultados obtidos com os diftéricos avirulentos e os difteróides não permitiram conclusões absolutas. Observaram-se, no entanto, os seguintes aspectos. Dentre as 135 cêpas avirulentas, 129 eram morfológicamente “não semelhantes” a bacilo diftérico (tabela I); entre as 62 cêpas avirulentas que fermentaram glicose e dextrina, 26 (18 GoDS e 8 GoD — tabela IV) não apresentaram morfologia semelhante à do *C. diphtheriae*; ao se considerar também a fermentação da glicerina (tabela V), somente 2 das 18 cêpas que atacaram todos os três compostos (colunas GoDSGi e GoDGi), se classificaram como “não semelhantes”. Considerando-se as cêpas avirulentas que fermentaram a sacarose, observou-se que pequena proporção das que também atacaram glicose, dextrina e glicerina apresentaram morfologia “não semelhante” enquanto este caráter predominou entre as cêpas que fermentaram somente a sacarose, glicose e dextrina (tabela V). Não foram encontradas cêpas incapazes de fermentar a glicerina entre as cêpas que atacaram a glicose e dextrina, mas que não fermentaram a sacarose. Parece, portanto, haver razões para atribuir valor diagnóstico à fermentação da glicerina, além daquela da dextrina e glicose. Por outro lado, 6 das 20 cêpas que deixaram de atacar uma ou duas dessas três substâncias (tabela V) e 13 das 84 (tabela IV) que não fermentaram nenhuma das substâncias experimentadas eram morfológicamente semelhantes ao bacilo diftérico, ainda que não tipicamente (tabela III). Poder-se-ia dizer, assim, que há indicações de que a corinebactéria que, no meio sólido empregado, deixar de atacar pelo menos uma das três substâncias — glicose, dextrina e glicerina — tem pequena probabilidade de ser *C. diphtheriae*, mesmo quando sua morfologia se assemelhar à do bacilo diftérico.

A tabela VI apresenta a distribuição de 151 cêpas virulentas e 17 avirulentas de *C. diphtheriae* por tipos e, relativamente às virulentas, segundo a ação sobre a sacarose. Classificaram-se como do tipo *gravis* apenas 2,4%; como do tipo semelhante a *gravis*, 5,4%; semelhante a *mitis*, 22,6% e do tipo *mitis*, 69,6%; entre as cêpas virulentas, encontraram-se, respectivamente, as percentagens 0,7, 4,0 23,2 e 72,2; entre as avirulentas, 17,6, 17,6, 17,6 e 47,1. Revelou-se nitidamente tendência a maior proporção de tipo *mitis* entre as cêpas virulentas; tal tendência mostra-se mais intensa tomando-se das virulentas, somente as não fermentadoras da sacarose.



Das 4 cêpas *gravis*, 3 são avirulentas. A única cêpa *gravis* virulenta fermentou a sacarose. Entre as cêpas virulentas, verifica-se que a sacarose foi fermentada por 19 (17,4%) das 109 pertencentes ao tipo *mitis*, por 5 (14%) das 35 semelhantes a *mitis* e por 5 das 6 semelhantes a *gravis*.

#### SUMMARY

Fermentative properties of diphtheriae bacilli are still a controversial subject. This is due to lack of uniformity in the technique employed by several investigators and to the existence or predominance of different varieties of the microorganisms in different areas. The high incidence in São Paulo of saccharose fermenting, virulent strains of *C. diphtheriae* (up to 35.7 per cent) makes it impossible to differentiate *C. diphtheriae* from *C. xerose* by the fermentation of that sugar. This fact led the author to investigate the possibility of using dextrin and glycerol in the identification of the organisms. One hundred and ninety three virulent strains of diphtheria bacilli and 129 strains of diphtheroids and avirulent *C. diphtheriae* were examined for their action on dextrin; 66 virulent strains and 71 diphtheroids and avirulent diphtheria bacilli were investigated in relation to the fermentation of glycerol. Each strain was tested in two culture media, one solid, the other liquid, using appropriate controls. The solid medium furnished better results which are presented in tables II to V, where their distribution is made according to the virulence and morphological aspects of the strain. Virulence was verified through Frazer's intracutaneous technique in rabbits, which includes a control of the specificity of the positive tests.

The data presented reveal clearly, once more, that the morphological aspect by itself is not a sufficient character for the identification of diphtheria bacilli. The virulent strains studied generally presented a rather characteristic morphology and, in the solid medium, always fermented glucose, dextrin and glycerol. Occasionally, glycerol was fermented only on the fourth day of incubation. A considerable percentage of these strains also fermented saccharose. This finding, on account of its particular interest, has been the object of a special communication.

The results obtained with avirulent *C. diphtheriae* and diphtheroid strains do not permit definite conclusions, but the following aspects may be pointed out. The majority of these strains, 129 out of 185, were morphologically "not similar" to diphtheria bacilli (table I). However, among strains that fermented both glucose and dextrin, only 26 out of 62 did not show a characteristic morphology (18 GoDS and 8 GoD: table IV). When fermentation of glycerol also occurred besides that of the two forementioned carbohydrates, the proportion of strains morphologically not resembling *C. diphtheriae* was even smaller, 2 out of 18 (table V, columns GoDSGi and GoDGi). Considering the avirulent strains of corynebacteria that fermented saccharose, it was observed that a small proportion of those fermenting also glucose, dextrin and

glycerol showed a "not similar" morphology, whereas the latter characteristic predominated among strains fermenting only saccharose, glucose, and dextrin (table V). No strain unable to ferment glycerol was found among those strains that attacked glucose and dextrin but which did not ferment saccharose. It seems, therefore, that there are reasons to ascribe diagnostic value to the fermentation of glycerol, besides that of dextrin and glucose. Furthermore, 6 out of 20 strains not fermenting one or two of these three substances (table V) as well as 13 out of 84 strains not fermenting any of the substances tried (table IV) were morphologically similar to *C. diphtheriae*, though none in a typical way (table III). Accordingly, there are indications that corynebacteria which in the solid medium employed, fail to ferment at least one of the three substances -- glucose, dextrin and glycerol are very unlikely to be *C. diphtheriae*, even when morphologically similar to diphtheria bacilli.

Table VI presents the distribution of 151 virulent and 17 avirulent strains of *C. diphtheriae* according to type, and for the virulent strains, according to action on saccharose. Only 2.4 per cent were classified as belonging to *gravis* type; 54 per cent as *gravis*-like; 22.6 per cent as *mitis*-like and 69.6 per cent, as *mitis*. Among the virulent strains, the percentages 0.7, 4.0, 23.2 and 72.2 were found as belonging, respectively, to *gravis*, *gravis*-like, *mitis*-like and *mitis* types; among the avirulent ones, 17.6, 17.6, 17.6 and 47.1. Tendency to a greater proportion of *mitis* type among the virulent strains was clearly revealed; such a tendency seems to increase when, among the virulent strains, only the non-saccharose-fermenting strains are considered.

Three of the 4 *gravis* strains were avirulent. The only virulent *gravis* strain attacked saccharose. Among the virulent strains, it may be seen that saccharose was fermented by 19 (17.4 per cent) out of the 109 belonging to *mitis* type, by 5 (14 per cent) out of the 35 *mitis*-like and by 5 out of the 6 *gravis*-like strains.

#### AGRADECIMENTOS

A classificação em tipos das cêpas de *Corynebacterium diphtheriae*, apresentada nesta investigação (tabela VI), foi realizada nos laboratórios do Dr. Martin Frobisher Jr. (Bacteriology Branch, Communicable Disease Center, Atlanta, Ga., U.S.A.), a quem enviamos tôdas as cêpas referidas. Verificação e confirmação total da virulência, ou avirulência, e da propriedade de fermentar ou não a sacarose, apresentadas pelas mesmas cêpas, foi obtida em seus laboratórios. Ao Dr. Martin Frobisher Jr. e a sua colaboradora, Dra. Elizabeth I. Parsons, nosso profundo reconhecimento.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Most strains of *Corynebacterium diphtheriae* studied in this investigation were sent to Dr. M. Frobisher Jr. (Bacteriology Branch, Communicable Disease Center Atlanta, Ga., U.S.A.). The classification according to type, as well

as verification and confirmation of the virulence, or avirulence, and of the property of fermenting or not fermenting saccharose, were obtained in his laboratories. To Dr. Martin Frobisher Jr. and to his collaborator, Dr. Elizabeth I. Parsons, we are greatly obliged.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson, J. S.; Happold, F. D.; McLeods, J. W. & Thomson, J. G.: On the existence of two forms of diphtheria bacillus — *B diphtheriae gravis* and *B diphtheriae mitis* — and a new medium for their differentiation and for the bacteriological diagnosis of diphtheria. *J. Path. Bact.* **34**:667-681, 1931.
2. Barratt, M. M.: A study of *C. diphtheriae* and other members of the genus of *Corynebacterium* with special reference to fermentative activity. *J. Hyg. (London)* **23**:241-247, 1924.
3. Besson, A.: *Technique microbiologique et sérothérapique*. 8e ed. Paris, J. B. Baillière et Fils, 1930, 2v.
4. Bryan, A. H. & Bryan, C. G.: *Principles and practice of bacteriology*. 3rd ed. New York, Barnes & Noble, Inc., 1950.
5. Christovão, D. de A.: Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. 1. Fermentação da sacarose por bacilos diftéricos virulentos isolados em São Paulo. *Arq. Fac. Hig. Saúde Públ.* **11**:95-112, 1957.
6. Durand, P.: Action des bacilles diphthériques sur les hydrates de carbone. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **84**:982-983, 1921.
7. Frobisher, M. (Jr.): Types of *Corynebacterium diphtheriae* in Baltimore, Maryland. *Amer., J. Hyg.* **28**:13-35, 1938.
8. —: *The Diphtheria Bacillus* (in *American Public Health Association: Diagnostic procedures and reagents*. 3rd ed. New York, 1950. p. 156-190).
9. 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).
10. Hine, T. G. M.: Biochemical reactions of diphtheria-like organisms. *J. Path. Bact.*, **18**:75-80, 1913-14.
11. Jensen, L. B. & Falk, I. S., cit. in 21.
12. Jordan, E. O. Burrows, W.: *Textbook of bacteriology*. 14th. ed Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1945.
13. 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.
14. Mackie, T. J. & McCartney, J. E.: *Handbook of practical bacteriology*. 9th ed. Edinburgh, E. S. Livingstone Ltd., 1953.
15. Mueller, J. H.: *The diphtheria bacilli and the diphtheroids*. (in Dubos, R. J. *Bacterial and mycotic infections of man*. 2nd ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1952. p. 222-243).
16. Murray, E. G. D. & Breed, R. S.: Family VIII. *Corynebacteriaceae* Lehmann and Neumann. (in *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 6th ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1948. p. 381-411).

17. Pestana, B. R. & Ferreira, J. F. Q.: Considerações sobre algumas propriedades bioquímicas do bacilo da difteria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3:32-43, 1943.
18. Simmons, J. S. & Gentzkow, D. J.: *Laboratory methods of the United States Army*. 5th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1946.
19. Stitt, E. R.; Clough, P. W. & Branham, S. E.: *Practical bacteriology, hematology and parasitology*. 10th ed. Philadelphia, Blakinston Co., 1948.
20. Tanner-Hewlett, R.: *Corynebacterium diphtheriae* and diphtheroid organisms. *Ann Medical Research Council: A system of bacteriology in relation to medicine*. London, 1930. v. 5, p. 67-150).
21. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 4th ed., rev. by G. S. Wilson and A. A. Miles. London, Edward Arnold & Co, 1955. 2v.
22. Zinsser, H.: A study of the diphtheria group of organisms; With special reference to fermentation reaction. *J. med. Res.*, 17:277-289, 1908.
23. —: *Textbook of bacteriology*. [10th ed. rev. by] David T. Smith [et al.] New York, Appleton Century Crofts, Inc. [c1952].