

CARACTERIZAÇÃO DE SOROTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI* POTENCIALMENTE PRODUTORES DE ENTEROTOXINAS EM ALIMENTOS

DJAIR ERNANDEZ & ERNESTO HOFER

Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia, Caixa Postal 926, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Serotype characterization of *Escherichia coli* potentially inducers of enterotoxins in food stuff

The incidence of serotypes of *Escherichia coli* usually described as enterotoxins producer was investigated in 137 samples of food from different origins (animal and vegetal). The serological analysis of the somatic "O", capsular "K" and flagellar "H" antigens in 265 isolates of *Escherichia coli* resulted in the characterization of 34 strains, distributed in 12 serotypes. These organisms were obtained from 24 samples of food of animal origin. A possible association with epidemiological markers for other test, were analyzed. The fermentation pattern of the 34 strains with melibiose, raffinose, sucrose, salicin, and sorbitol allowed classification into 11 biotypes.

However the marked heterogenicity of the biotypes distributed among the serotypes did not allow correlation between the serofermentative types and the origin of the food.

The other tests based on hemolysis and hemagglutinating ability did not aid in the differentiation of the phenotypes.

Key words: foods - *Escherichia coli* - enterotoxigenic serotypes - biotipification

As investigações sobre a ocorrência de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) em alimentos de diferentes origens, foram discretamente referenciadas na literatura. Neste particular, destacam-se as observações de Sack et al. (1977), Tjoa et al. (1977) e Echeverria et al. (1978), em situações não associadas a surtos de toxinfecção, assim como, aquelas realizadas em nosso meio por Reis et al. (1980) e Franco et al. (1985).

O problema da veiculação desses microrganismos por alimentos, principalmente de origem animal, foi levantado por Hobbs et al. (1975), embora não tenham descartado a importância da água nem tampouco negligenciado outros fatores como as condições precárias de saneamento básico, que de forma direta ou indireta, têm implicações no processamento de alguns alimentos.

Considerando que determinados sorotipos de *Escherichia coli* são mais comumente responsabilizados pela produção de enterotoxinas, segundo Ørskov & Ørskov (1977) e Merson et al. (1979), procurou-se nesta investigação analisar a frequência de alguns desses tipos sorológicos em alimentos de origem animal e vegetal industrializados ou não.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem — Os alimentos analisados originaram-se do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do

Rio de Janeiro, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro, sendo colhidos no período de setembro de 1977 a dezembro de 1978. Na Tabela I especificam-se os alimentos analisados com as respectivas frequências, salientando-se que o critério de escolha da amostragem foi aleatório, condicionado essencialmente à demanda de exames das áreas supramencionadas.

Os produtos facilmente deterioráveis, como filé de peixe congelado, leite e mexilhões, após a colheita foram mantidos em condições de baixa temperatura (mais ou menos 4°C) até o momento da execução do exame bacteriológico. Via de regra o prazo, entre a colheita e a execução laboratorial não ultrapassou a 4 horas.

No processo de isolamento empregou-se o enriquecimento em caldo lactosado na proporção de 25g ou ml do produto para 225ml do meio de cultura, com incubação a 37°C durante 18 horas. O crescimento do caldo foi transferido para EMB ágar e após permanecer 24 horas a 37°C, cinco colônias lactose/sacarose positivas foram isoladas e caracterizadas por provas bioquímicas, de acordo com os esquemas propostos por Edwards & Ewing (1972), Costa & Hofer (1972) e Ewing (1973).

Para a biotipificação, adotaram-se os critérios recomendados por Buissière et al. (1977) e Ørskov & Ørskov (1977) utilizando os seguintes substratos: melibiose, rafinose, sacarose, salicina e sorbitol, incorporados na concentração de 1g% ao meio para fermentação de carboidratos. A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C.

Parte de tese de mestrado, UFRRJ, 1982 (D.E.).

Recebido em 17 de abril de 1986.

Aceito em 7 de outubro de 1986.

Identificação sorológica – Preparo de anti-genos e anti-soros – Foram utilizadas as amostras padrão, oriundas do WHO Collaborative Centre for Reference and Research on *Escherichia*, Copenhagen, Dinamarca, representadas pelos seguintes sorogrupos/sorotipos: OX2:H9 – grupo sorológico preliminar segundo Ørskov & Ørskov (1976), atualmente caracterizado como 0169; 011:H27; 015:H11; 020:H⁻; 027:H7; 078:H11; 078:H12; 0128:H12; 0148:H28; 0149:H10; 0159:H20; 06:K15:H16; 08:K40:H9; 025:K7:H42 e 025:K98:H⁻.

Na obtenção dos antígenos e anti-soros O, K e H, empregaram-se os métodos descritos por Kauffmann (1966), Edwards & Ewing (1972) e Ørskov & Ørskov (1975). A identificação sorológica preliminar das amostras foi realizada pelo processo de aglutinação rápida, observando-se, concomitantemente, a termo-estabilidade das culturas entre aquelas que revelassem aglutinação. A caracterização definitiva foi executada pela técnica de aglutinação lenta ou em tubos, segundo Edwards & Ewing (1972), pareando-se os resultados com os antígenos das amostras padrão.

Ação hemolítica – A atividade hemolítica foi observada em ágar nutriente (Difco) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após a semeadura, o meio foi incubado a 37°C por 24 horas, anotando-se a presença ou ausência de hemólise total.

Teste de hemaglutinação – O método adotado baseou-se nas técnicas descritas por Duguid et al. (1955) e Ørskov & Ørskov (1977). Além da suspensão de hemácias de cobaia, foram utilizadas hemácias humanas do tipo O e a verificação da sensibilidade ou resistência da he-

maglutinação em presença de solução a 1g% de D-manose, de acordo com a orientação de Ørskov & Ørskov (1977).

Ação invasiva “in vivo” – Foi utilizado como modelo a conjuntiva ocular de cobaias (Serény, 1955). Em decorrência do grande número de amostras isoladas, a prova somente foi executada em 31 culturas, selecionando-se aquelas que foram incapazes de descarboxilar a L-lisina e de evidenciar a mobilidade, segundo Silva et al. (1980) e Toledo & Trabulsi (1983).

RESULTADOS

Nos 137 alimentos representados por 11 variedades, foram reconhecidos 54 (39,4%) distribuídos em sete tipos, que continham *Escherichia coli*. As 265 colônias isoladas, indicaram que 24 (17,5%) alimentos, carregavam sorotipos potencialmente produtores de enterotoxinas (Tabela I).

Identificação Sorológica – A análise da estrutura somática (O) permitiu o reconhecimento de doze sorogrupos nos 265 isolamentos de *Escherichia coli*, representando 80 culturas. Destas, 34 (42,5%) foram compatíveis com aqueles sorotipos de referência empregados na obtenção dos anti-soros O:K:H e O:H. A distribuição dos sorotipos por alimentos está indicada na Tabela II.

Caracterização bioquímica – Sob este prisma dois pontos devem ser considerados: 1) No perfil clássico que define a espécie, os resultados foram praticamente uniformes, ressaltando-se apenas 11 amostras não possuidoras de lisina descarboxilase, pertencentes aos seguintes sorogrupos: 08; 015; 025; 027; 078; 0148; 0149; e OX2(0169) e 2) Nas 34 amostras soro-

TABELA I

Discriminação dos alimentos quanto à natureza dos produtos analisados e pelo número de amostras de *Escherichia coli* isoladas

Alimentos	Nº	Presença de <i>E. coli</i>	Nº de colônias de <i>E. coli</i> isoladas	Alimentos com sorotipos de <i>E. coli</i>
Queijo “tipo Minas”	43	24	120	10
Sopa desidratada	36	17	85	8
Filé de peixe (congelado)	23	2	10	1
Leite pasteurizado	9	2	5	2
Vagem enlatada	7	—	—	—
Leite cru	6	3	15	2
Mexilhão	5	4	20	—
Chocolate em pó	3	—	—	—
Néctar de mamão	2	—	—	—
Lingüiça	2	2	10	1
Pasta de carne	1	—	—	—
Total	137	54 (39,4)	265	24(17,5)

() – percentual

TABELA II

Freqüências e distribuição de sorogrupos e sorotipos de *Escherichia coli* referidos como potencialmente produtores de enterotoxinas nos alimentos analisados

Sorogrupos	Freqüência		Sorotipos	Freqüência		Alimentos carreadores
	Nº	%		Nº	%	
027	10	12,5	027:H7	5	6,2	Queijo (2); sopa desidratada (2) e leite pasteurizado
015	9	11,2	015:H11	2	2,4	Sopa desidratada
025	9	11,2	025:K7:H42	4	4,9	Sopa desidratada (3) e lingüiça
0148	9	11,2	0148:H28	3	3,7	Sopa desidratada (2) e queijo
08	8	10,0	08:K40:H9	5	6,2	Sopa desidratada (4) e queijo
078	8	10,0	078:H11	1	1,2	Queijo
0159	8	10,0	0159:H20	2	2,5	Leite "in natura" e sopa desidratada
OX2	6	7,5	OX2:H9	5	6,2	Queijo (2); sopa desidratada (2) e filé de peixe
011	4	5,0	011:H27	2	2,5	Queijo
0149	4	5,0	0149:H10	3	3,7	Queijo (2) e leite "in natura"
0128	3	3,75	0128:H12	1	1,2	Queijo
020	2	2,5	—	—	—	
Total	80	99,9		34	42,5	

() — Nº de alimentos

TABELA III

Distribuição dos sorotipos de *Escherichia coli* em tipos fermentativos, classificados de acordo com a ação sobre melibiose, sacarose, rafinose e sorbitol

Sorotipos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
	abcde*	abcde	abcde	abcde	abcde	abcde	abcde	abcde	abcde	abcde	abcde
	+++++	+++--+	++---+	+----+	-----+	---+--	----+-	+++---	++++-	+++--+	----++
OX2:H9	2	1	2								
011:H27					1	1					
015:H11	1	1									
027:H7	2		1	1							1
078:H11				1							
0128:H12							1				
0148:H28	1	1	1								
0149:H10				1			1	1			
0159:H20		1	1								
08:K40:H9	2	2							1		
025:K7:H42	2				1					1	
078:H12					1						
Total	Nº	10	6	5	3	3	1	2	1	1	1
	%	29,41	17,64	14,70	8,82	8,82	2,94	5,88	2,94	2,94	2,94

+ : acidez em 24h a 37°C; - : ausência de acidez; *a — melibiose; b — sacarose; c — rafinose; d — salicina; e — sorbitol.

logicamente definidas, a análise do comportamento diante de melibiose, rafinose, sacarose, salicina e sorbitol, possibilitou o reconhecimento de 11 tipos fermentativos (Tabela III).

A exclusão dos achados referentes à melibiose e sorbitol, tendo em vista a acentuada predominância de amostras com ação sobre esses substratos, simplificou o esquema para oito biotipos. Os resultados obtidos na associação dos tipos soro-fermentativos com as respectivas fontes de isolamento, foram consignados na Tabela IV.

Ação hemolítica e capacidade hemaglutinante — As 265 amostras de *Escherichia coli*, se comportaram como anhemolíticas.

Quanto à hemaglutinação, realizada nas 34 amostras caracterizadas sorologicamente, destaca-se a predominância de reações positivas em presença de hemácias de cobaia (23 ou 67,6%), em contraposição à discreta positividade em relação às hemácias humanas (9 ou 26,4%). Das 23 amostras com atividade hemaglutinante, 20 ou 86,9%, se qualificaram como manose-sensíveis (Fimbria tipo 1) e apenas 3 ou 13%, se revelaram manose-resistentes (Tabela V).

Ação invasiva "in vivo" — Em nenhuma oportunidade foi visualizada qualquer alteração patológica aos níveis de conjuntiva e pálpebras dos animais inoculados.

TABELA IV

Incidência de tipos soro-fermentativos de *Escherichia coli* nos alimentos, caracterizados pelo esquema de biotipificação simplificada

Tipos fermentativos	Sorotipos	Nº	Origem
I (Sac+Raf+Sal+)*	OX2:H9	2	Sopa desidratada
	08:K40:H9	3	Sopa desidratada
	015:H11	1	Sopa desidratada
	025:K7:H42	2	Sopa desidratada - lingüiça
	027:H7	3	Sopa desidratada - queijo - leite pasteurizado
	0148:H28	1	Sopa desidratada
	II (Sac+Raf+Sal -)	OX2:H9	1
08:K40:H9		2	Sopa desidratada - queijo
015:H11		1	Sopa desidratada
0148:H28		1	Sopa desidratada
0149:H10		1	Queijo
0159:H20		1	Sopa creme
III (Sac+Raf - Sal+)	OX2:H9	2	Queijo
	027:H7	1	Queijo
	0148:H28	1	Queijo
	0159:H20	1	Leite cru
IV (Sac - Raf - Sal +)	027:H7	1	Sopa desidratada
	078:H11	1	Queijo
	0128:H12	1	Queijo
	0149:H10	2	Queijo - leite cru
V (Sac - Raf - Sal -)	011:H27	1	Queijo
	025:K7:H2	1	Sopa desidratada
	078:H12	1	Queijo
VI (Sac - Raf + Sal +)	011:H27	1	Queijo
VII (Sac + Raf - Sal -)	025:K7:H42	1	Sopa desidratada

*Sac - Sacarose; Raf - Rafinose; Sal - Salicina; + : acidez em 24h a 37°C; - : ausência de acidez.

TABELA V

Atividade hemaglutinante (hemácias de cobaia e humana) nas 34 amostras de *Escherichia coli*, sorologicamente caracterizadas, e ação da manose sobre a hemaglutinação

Sorotipos	Nº amostras	Hemaglutinação				Ação da D - Manose	
		Cobaia		Humana		MS ^a	MR ^b
		+	-	+	-		
OX2:H9	5	5	-	1	4	4	1
011:H27	2	2	-	-	2	2	-
015:H11	2	1	1	-	2	1	-
027:H7	5	4	1	1	4	4	-
078:H11	1	-	1	-	1	-	-
078:H12	1	1	-	1	-	-	1
0128:H12	1	1	-	1	-	1	-
0148:H28	3	2	1	-	3	2	-
0149:H10	3	1	2	-	3	1	-
0159:H20	2	2	-	2	-	2	-
08:K40:H9	5	2	3	1	4	1	1
025:K7:H42	4	2	2	2	2	2	-
Total	Nº 34 %	23 (67,6)	11 (32,3)	9 (26,4)	25 (73,5)	20 (86,9)	3 (13,0)

a - Manose sensível, forma T1; b - Manose resistente; () - percentual.

DISCUSSÃO

Em princípio, os resultados obtidos configuraram uma situação sanitária dos alimentos pouco satisfatória para o consumo, considerando, do ponto de vista qualitativo, a detecção, em 54

produtos, (39,4%) de um indicador de contaminação fecal. Particulariza-se este acontecimento nos produtos de origem animal, alguns ingeridos pelo consumidor sem sofrer a cocção, como os laticínios (Tabela I). Logicamente, que as conseqüências da ingestão de alimentos

contaminados estão condicionadas a uma série de fatores, inerentes tanto ao agente como ao hospedeiro. Exemplifica-se no caso de *Escherichia coli* enterotóxicas (ETEC) o inóculo de células viáveis, estimado em torno de 10^9 – 10^{10} , associado à presença de fatores de colonização e da produção de enterotoxinas.

O problema da veiculação de estirpes enterotóxicas de *E. coli* através de alimentos, foi suscitado desde o seu reconhecimento; entretanto, a confirmação por meio de ensaios laboratoriais específicos, só foi relatada em 1977 por Sack et al. As discretas análises efetuadas nesse campo, em diferentes partes do mundo, apontam uma frequência de 0 a 10% de alimentos albergando ETEC (Sack et al., 1977; Echeveria et al., 1978; Jiwa et al., 1981; Reis et al., 1982 e Franco et al., 1985).

Por outro lado, as investigações de Ørskov & Ørskov (1977 e 1980), demonstrando uma associação de determinados sorotipos de *Escherichia coli* com a produção de enterotoxinas, motivaram a Merson et al. (1979) instituir como critério de seleção primária de ETEC, a soro-aglutinação, visando precipuamente, simplificar o diagnóstico laboratorial e na esfera epidemiológica, obter os dados da distribuição geográfica dos sorotipos.

Adotando-se o processo da soro-aglutinação no universo de *Escherichia coli* isoladas de alimentos, foram selecionadas inicialmente, através da caracterização do antígeno somático "O", 80 amostras. Destas, em 34 houve a possibilidade de identificar as estruturas O:H ou O:K:H, tendo sempre como ponto de referência as culturas padrão utilizadas na pesquisa (Tabela II).

A análise dos resultados da Tabela II, permite ainda ressaltar o elevado número de amostras, 46 ou 57,5%, nas quais os antígenos flagelares não se coadunaram com aqueles das culturas padrão. O problema é consequência de estirpes naturalmente imóveis e de outras móveis, mas possuidoras de estruturas H, diferentes. Aliás, tal circunstância também foi referida por Ørskov et al. (1976); Sack et al. (1977), Reis et al. (1980) e Franco et al. (1985).

Outro aspecto visualizado, reporta-se ao isolamento de mais de um sorotipo em alguns alimentos, principalmente nas amostras de sopa desidratada e queijo. Por sinal este achado nada tem de inusitado, uma vez que, assemelha-se àquele referido por Sack et al. (1977) em alimentos de origem animal. Admite-se que os produtos alimentícios mais complexos em sua composição e que não sofrem a intervenção de processos mais drásticos de descontaminação, podem apresentar um maior número de microrganismos, muitas vezes advindos da água de

qualidade sanitária discutível, pelo excessivo manuseio nas etapas de preparo e conservação de forma inadequada.

Quanto à possível análise de sorotipos de ETEC mais incidentes, nenhum confronto de maior profundidade poderá ser estabelecido, considerando as escassas referências existentes nesse campo, associadas à gama variável de alimentos analisados, assim como, às variações impostas pela distribuição de ordem geográfica. Todavia, tomando-se por base as observações de Sack et al. (1977), Reis et al. (1980) e Franco et al. (1985) acentuam-se as características cosmopolitas dos sorotipos 0149:H10 e 0149:H19, relativamente comuns em produtos naturais ou processados, constituídos basicamente de carnes de diferentes origens e laticínios.

Do ponto de vista epidemiológico, salienta-se que certos sorotipos estão envolvidos, primariamente, em processos patológicos de animais, como 078, na diarreia em bovinos e 0149, responsável por gastroenterite em suínos. No entanto, as experiências realizadas em voluntários por Dupont et al. (1971) patentearam que as ETEC de origem animal, não foram capazes de desencadear um quadro diarreico na espécie humana. Assim sendo, o problema da veiculação de ETEC, através de alimentos de origem animal, ainda é um ponto enigmático quando se tenta estabelecer o elo com a fonte de infecção primária.

É oportuno ressaltar a ausência de amostras com atividade hemolítica, o que até certo ponto afasta a possibilidade de imputar a contaminação primária dos alimentos a partir das fontes animais. Este aspecto está intimamente ligado à presença do plasmídeo Hly, carregado essencialmente por certas ETEC de origem animal.

Conquanto sejam conhecidos os mecanismos de agressão das várias linhagens patogênicas de *E. coli*, destaca-se que nas 31 culturas, englobando 11 sorologicamente definidas, que apresentaram o perfil bioquímico compatível de entero-invasivas, isto é, lisina descarboxilase negativas e imóveis, não foi evidenciada a ação invasiva na prova de Serény. De forma similar, Franco et al. (1985) também não detectaram tais estirpes, em alimentos.

Outra faceta abordada no estudo se concentrou na possível associação entre sorotipos e tipos fermentativos (Evans & Evans, 1973; Buissière et al. 1977; Ørskov & Ørskov, 1977; Merson et al. 1979; Reis et al., 1980 e DeBoy et al., 1980) que, precipuamente, visa a caracterização de marcadores de importância epidemiológica. Entretanto, os resultados revelaram uma extraordinária heterogeneidade de tipos

fermentativos. dentre os sorotipos, tanto no esquema de cinco ou três substratos fermentáveis. Esta ocorrência impossibilitou qualquer correlação, mesmo com a introdução da variável – tipo de alimento (Tabelas III e IV). Conjetura-se que o processo da biotipificação só poderá ser adequadamente avaliado e valorizado quando dirigido para determinadas situações, como por exemplo, durante surtos de toxinfecção alimentar, na “diarréia do viajante” e através da pesquisa rotineira em amostras de ETEC, isoladas de populações humana e animal, além daquelas oriundas de alimentos e meio ambiente. Tais alternativas, provavelmente, designariam os tipos soro-fermentativos mais incidentes ou suas flutuações, considerando a área geográfica, as fontes de infecção e os veículos de transmissão.

Como elemento adicional do comportamento bioquímico, convém salientar que todas as amostras de *E. coli*, caracterizadas sorologicamente, agiram sobre a lactose em 24 horas, corroborando os achados de Ørskov & Ørskov (1977) mas, contrapondo-se àqueles auferidos por Franco et al. (1985), que assinalaram com frequência nos alimentos ETEC não fermentadoras ou com ação tardia. Apesar das contradições nos resultados, enfatiza-se que o processo de reconhecimento de colônias lactose positivas nos meios seletivos-indicadores ainda se constitui no método de eleição para o isolamento dessas bactérias.

Finalmente, destaca-se o encontro de nove amostras, representadas por seis sorotipos, que evidenciaram atividade hemaglutinante (hemácias humanas), das quais três se comportaram como D-manose resistentes (Tabela V). Com base nas observações de Evans et al. (1977) e Ørskov & Ørskov (1977) sugere-se que tais amostras poderiam ser portadoras de um fator de colonização (CFA/I), particularmente àquela pertencente ao sorotipo 078:H12.

Não obstante a ausência de análises comprovando a produção de enterotoxinas e de fatores de colonização nas amostras sorologicamente definidas deve-se destacar a incidência e acentuada heterogeneidade de sorotipos e tipos fermentativos que realçam as condições inadequadas do ponto de vista higiênico-sanitário dos produtos alimentícios comercializados.

RESUMO

Em 137 amostras de alimentos de diferentes origens (animal e vegetal) foi investigada a ocorrência de sorotipos de *Escherichia coli*, mais comumente descritos como produtores de enterotoxinas. A análise sorológica dos antígenos somáticos, de envoltórios e flagelares nas 265 culturas isoladas, resultou na identificação de

34 amostras distribuídas em doze sorotipos e oriundas de 24 produtos de origem animal.

Outros aspectos foram analisados, visando associá-los como possíveis marcadores epidemiológicos. Assim, na biotipificação, verificou-se o perfil das 34 amostras diante da melibiose, rafinose, sacarose, salicina e sorbitol, obtendo-se a caracterização de 11 biotipos. Todavia, a acentuada heterogeneidade de biotipos distribuídos pelos sorotipos, não permitiu um relacionamento de tipos soro-fermentativos com as fontes de isolamento. Os demais testes, representados pela atividade hemolítica e a capacidade hemaglutinante, pouco acrescentaram para o problema da diferenciação de fenótipos ou na caracterização de marcadores epidemiológicos.

Palavras-chave: alimentos – *Escherichia coli* – sorotipos enterotóxicos – biotipificação

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio técnico-científico durante a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BUISSIÈRE, J.; COYNAULT, C. & LE MINOR R. L. 1977. Étude des conditions d'expression du caractère raffinose chez les *Escherichia coli* et *Salmonella*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128A: 167-183.
- COSTA, G. A. & HOFER, E., 1972. Isolamento e identificação de Enterobactérias. Monografia Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.
- DEBOY, J. M.; WACHSMUTH, I. K. & DAVIS, B.R., 1980. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect. Immun.*, 29: 361-368.
- DUGUID, J. P.; SMITH, I. W.; DEMPSTER, G. & EDMUNDS, P. N., 1955. Non-Flagellar filamentous appendages (“fimbriae”) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 70: 335-347.
- DUPONT, H. L.; FORMAL, S.B.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.J.; LIBONATI, J.P.; SHEAHAN, D.C.; LaBREC, E. H. & KALLAS, J. P., 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.*, 285: 1-9.
- ECHEVERRÍA, P.; VERHAERT, L.; BASACASEVILLA, V.; BANSON, T.; CROSS, J.; ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I., 1978. Search for heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans, livestock, food and water in a community in the Philippines. *J. Infect. Dis.*, 138: 87-90.
- EDWARDS, P. R. & EWING, W. H., 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd., Ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- EVANS, D. G.; EVANS Jr, D. J. & TJOA, W., 1977. Hemagglutination of human, group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea; correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18: 330-337.
- EVANS Jr, D. J. & EVANS, D. G., 1973. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8: 322-328.
- EWING, W. H., 1973. Differentiation of *Enterobacteriaceae* by biochemical reactions. CDC Publica-

- tion. Communicable Disease Center, Atlanta.
- FRANCO, B. D. G. M.; GUTH, B. E. C. & TRABULSI, L. R., 1985. Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas de alimentos. *Rev. Microbiol.*, São Paulo 16: 49-55.
- HOBBS, B. C.; COLBOURNE, M. J. & MAYNER, P.E., 1975. Food hygiene and travel at sea. *Postgrad. Med. J.*, 51: 817.
- JIWA, S.F.H.; KROVACEK, K. & WADSTROM, T., 1981. Enterotoxigenic bacteria in food and water from an ethiopian community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 1010-1019.
- KAUFFMANN, F. 1966. The bacteriology of *Enterobacteriaceae*. Copenhagen, Munksgaard.
- MERSON, M. H.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; SACK, R. B.; HUQ, I. & KOSTER, F. I., 1979. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 23: 325-329.
- ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I., 1975. *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human boold. *Acta Path. Microbiol. Scand.* (sect B), 83: 595-600.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, F., 1977. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *E. coli* strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (Colonization Factor) antigen and of hemagglutinating abilities. *Med. Microbiol. Immun.*, 163: 99-110.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F., 1980. Significance of surface antigens in relation to enterotoxigenicity of *E. coli*. In: Ouchterlony, O. & Holmgren, J. (Editors): Cholera and related diarrheas., pp. 134-141, Karger, Basel.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; EVANS, D. J.; SACK, R. B.; SACK, D. A. & WADSTROM, T., 1976. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.*, 162: 73-80.
- REIS, M. H. L.; VASCONCELOS, J. C. & TRABULSI, L. R., 1980. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw foods from animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 270-271.
- SACK, R. B.; SACK, D. A.; MEHLMAN, I. J.; ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I., 1977. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *J. Infect. Dis.*, 135: 313-317.
- SERENY, B., 1955. Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: A preliminary report. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 2: 293-296.
- SILVA, R. M.; TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R., 1980. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 441-444.
- TJOA, W. A.; DUPONT, H. L.; SULLIVAN, P.; PICKERRING, L. K.; HOLGUIN, A. H.; OLARTE, J.; EVANS, D.G. & EVANS, D.J., 1977. Location of consumption and travelers diarrhea. *Am. J. Epidemiol.*, 106: 61-66.
- TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R., 1983. Correlation between the biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and the results of the Serény test. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 419-421.