

ESTUDO DE *KLEBSIELLA* E SEU ENVOLVIMENTO EM DIARRÉIA INFANTIL: UMA AVALIAÇÃO

ROSEANA SEABRA NOGUEIRA *
IVONE ROCCO SUASSUNA **

Foi investigado o possível papel da Klebsiella na patologia da infecção intestinal.

De um total de 230 amostras isoladas durante o período de 1979 e 1980 provenientes de diferentes hospitais na Cidade do Rio de Janeiro, 91,0% foram identificados como Klebsiella pneumoniae e 9,0% como Klebsiella ozaenae.

Em aproximadamente 10,0% dos casos as amostras de Klebsiella foram encontradas em associação a patógenos intestinais definidos, pertencentes a outros gêneros. Os exames parasitológicos feitos paralelamente em 43 pacientes revelaram helmintos e/ou protozoários em 14,0% das amostras. Foi também investigado o significado patogênico de outros mecanismos, excluindo cápsulas. Em 187 amostras foi pesquisada enterotoxina termo estável mas, somente, dois casos revelaram resultados duvidosos, sendo sem significado nas demais amostras. A enterotoxina termo lábil foi investigada em 110 amostras, com nenhum resultado positivo. Finalmente, o fator de colonização CFA/1 não foi encontrado nas 21 amostras testadas.

Os germes que pertencem ao gênero *Klebsiella*, seguem as definições da família *Enterobacteriaceae* e da tribo *Klebsiellae* propostas por Edwards & Ewing (1972), sendo a espécie tipo a *Klebsiella pneumoniae* (Ewing, 1967).

O gênero *Klebsiella* apresenta grande variabilidade em seus caracteres bioquímicos, tanto que quando se estabelece um padrão bioquímico deste grupo, freqüentes variações são esperadas (Edward & Fife, 1952).

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Parte de tese para obtenção do título de Mestre com auxílio do CNPq e CAPES.

*Instituto Oswaldo Cruz – Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, Brasil.

**Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Recebido para publicação em 5 de novembro de 1982 e aceito em 20 de junho de 1983.

Fife, Ewing & Davis (1965) admitiram três espécies para o gênero *Klebsiella*: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*.

Edwards & Ewing e Le Minor (1972) consideraram como subespécie de *K. pneumoniae* a variedade *oxytoca*.

A etiologia da diarreia infantil tem sido objeto de muitas pesquisas devido ao aparecimento, cada vez mais freqüente, de germes de patogenicidade até então desconhecida apontados como possíveis agentes (Karpas & Boman, 1966).

Embora, a associação de *K. pneumoniae* com diarreia aguda infantil seja conhecida (Olarite et al, 1961; Weil, Ramchand & Arias, 1966) a patogenicidade desse germe ainda não está comprovada apesar de existirem evidências sugerindo a possibilidade de *Klebsiella* ser também um dos patógenos enterotoxígenos responsáveis por casos de diarreia (Klipsteins et al, 1979).

Foi verificado, que a enterotoxina elaborada pelo *K. pneumoniae* era termo estável (ST) semelhante em vários aspectos à produzida pela *Escherichia coli* enterotoxígena (Klipstein & Engert, 1975), assim como a toxina termo lábil (LT) (Guerrant et al, 1975).

A necessidade de buscar métodos mais simples e rápidos que possam simplificar ou substituir o laborioso processo da técnica da alça ligada para pesquisa de produção de enterotoxina LT e ST, tem motivado vários pesquisadores a procurarem novas técnicas (Klipstein et al, 1979).

A presença de fímbrias em algumas amostras de *Klebsiella* demonstra sua capacidade de adesividade (Duguid, 1959), mas nesse germe, semelhante ao que ocorre com outros, ainda é desconhecido o fato desta propriedade ser ou não um fator de virulência (Klipstein et al, 1979).

MATERIAL E MÉTODOS

De um total de 1.000 pacientes examinados foram estudadas 230 amostras de *Klebsiella*, sendo 38 isoladas de fezes de crianças (sem diarreia), 167 de fezes de crianças (com diarreia), 4 de fragmentos de intestino (material de autópsia) e 21 de fezes de adultos com diarreia, isoladas no Instituto de Puericultura Martagão Gesteira, Hospital Municipal de Petrópolis, Hospital Central da Aeronáutica e Hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro no período de 1979 a 1980.

As amostras foram inicialmente submetidas ao controle de pureza pela passagem no meio de agar azul de metileno (Difco Manual, 1972) com incubação a 37°C durante 24 horas. Após comprovação da pureza das culturas, através da observação macroscópica do aspecto colonial (colônias mucóides, apresentando ou não brilho metálico no centro) e da observação microscópica após coloração pelo método de Gram, as colônias foram repicadas para os seguintes meios de triagem: Meio DAU (Duplo açúcar uréia ou Monteverde modificado) (Suassuna & Suassuna, 1978) e Meio SIM (Sulphid indol motility) (Difco Manual, 1972).

Após passagem nos meios de triagem, os germes foram submetidos às seguintes provas adicionais: fermentação de glicose, lactose e dulcitol (Edwards & Ewing, 1972); verificação da produção de gás a partir da glicose; verificação da produção de urease (Studart et al, 1945); modificação do meio de Rustigian & Studart (1941) – Suassuna & Suassuna, (1969); pesquisa de acetoina (teste de Voges & Proskawer) Edwards & Ewing, 1972); prova de vermelho metila (Meio de Clark & Lubs, 1915) – Suassuna & Suassuna (1969); descarboxilação da lisina (Meio de Moeller – Difco Manual, 1972; utilização do citrato (Simmons, 1926) – Suassuna & Suassuna (1969); malonato (Leifson, 1933) modificado

por Ewing et al, 1957) – Edwards & Ewing (1972) e mucato (Kauffman & Petersen, 1956).

Dentre as 230 amostras pesquisamos enterotoxina ST em 187 pela técnica de Dean (Dean et al, 1972) (6 isoladas de fezes de crianças sem diarreia, 4 de fragmentos de intestino (autópsia), 159 de fezes de crianças com diarreia e 18 de fezes de adultos com diarreia. Em 110 destas amostras (5 isoladas de fezes de crianças sem diarreia, 100 de fezes de crianças e 5 de adultos com diarreia) foi também pesquisada a enterotoxina LT.

Em 10,0 ml de Meio Caye (Evans, Evans & Gorbach, 1973) contidos em frascos Erlenmeyer com capacidade para 100,0 ml foram isolados 2,0 ml de culturas estacionárias obtidas por semeadura em Meio de Caldo BHI (“Brain Heart Infusion”, Difco Manual, 1972) após incubação em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas.

Esse preparado foi reincubado com agitação de 150 rev min, em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas; a seguir esses cultivos foram centrifugados a 9999g por 40 minutos e os sobrenadantes se constituíram em preparados brutos, onde se pesquisou a produção de enterotoxina ST e que ficaram guardados à temperatura de – 4°C durante a realização das experiências.

Camundongos albinos, recém-nascidos (2 a 5 dias de idade), em lotes de 5, foram inoculados por via intragástrica com 0,1 ml de preparado bruto (supostamente contendo enterotoxina ST), adicionado de Azul de Evans (solução a 2%), na proporção de 2 gotas por ml. Após a inoculação os camundongos foram mantidos à temperatura ambiente durante 4 horas, sendo a seguir sacrificados. Para o cálculo da atividade de enterotoxina ST, os intestinos foram removidos, calculando-se para cada lote a relação entre o peso dos intestinos/peso das carcaças (int/carc).

Utilizamos como controle amostras de *Escherichia coli* produtora de enterotoxina ST e outra não produtora, ambas cedidas pela bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Campinas.

A cinética para averiguar se a variação de tempo exercia alguma influência nos resultados com a metodologia acima descrita foi realizada em 21 amostras cuja relação int/carc foi maior ou igual a 0,070 e em 7 onde a relação foi menor que 0,070, durante um período de 4 horas com intervalo de 60 minutos.

Para a extração das possíveis enterotoxinas LT, as amostras foram semeadas em Erlenmeyer com capacidade para 100,0 ml contendo 10,0 ml de meio Caye e incubados com agitação 150 rev min em estufa a 37°C durante 18 horas. A seguir, ao crescimento de cada amostra foi adicionado 1,0 ml de polimixina (Evans, Evans & Gorbach, 1974).

As culturas foram incubadas, com agitação em estufa à temperatura de 37°C durante 40 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e mantidos a – 25°C até o momento da execução do teste.

Para verificação da possível produção de enterotoxina LT foi utilizado o teste de Imuno hemólise passiva (Evans & Evans, 1977) modificado por Pestana de Castro e Marlene Serafin (dados não publicados). Para cada reação foram utilizados 2 tubos de tamanho 13 x 100 mm contendo 0,050 ml de tampão veronal isotônico; 0,050 ml de extrato de polimixina (antígeno) e 0,1 de hemácias de carneiro padronizados anteriormente, de tal forma que fornecessem uma densidade igual a 0,42 a 550 nm no espectrofotômetro Coleman Jr. Trinta minutos após incubação à temperatura de 37°C foram colocados em banho de gelo, sendo então adicionado 0,1 ml de anti-soro inativado preparado com enterotoxina LT purificada de *E. coli* (cedido pelos Profs. Pestana de Castro e Marlene Braide Serafin do Departamento de Microbiologia e Imunologia de Campinas) na diluição de 1:80 em tampão veronal isotônico e reincubada em banho-maria à

temperatura de 37°C durante 30 minutos. Após esse período os tubos foram colocados em banho de gelo com adição de 0,1 ml de complemento de cobaio diluído 1:10 em tampão veronal isotônico, e mais de 3,6 ml do mesmo tampão, sendo incubados durante 60 minutos em banho-maria à temperatura de 37°C.

A leitura foi feita a 220 nm pelo espectrofotômetro (Coleman Jr.) após centrifugação a 4999 g durante 10 minutos à temperatura de 5°C.

Extratos obtidos de *Escherichia coli* LT positivas e de LT negativas, cedidas pela bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Campinas, foram usadas como controle dos testes.

A fim de se evitarem erros na leitura da reação, usamos controle de anti-soro (tampão veronal isotônico, anti-soro, complemento e hemácias de carneiro), do complemento (tampão veronal isotônico, extrato em teste, complemento e hemácias de carneiro), do extrato de polimixina, e das hemácias (tampão veronal isotônico, extrato em teste de hemácias de carneiro).

Os respectivos volumes, como também os detalhes técnicos foram semelhantes aos utilizados nos tubos da reação.

A pesquisa do fator de aderência foi feita em 21 amostras que revelaram relação int/carc maior ou igual a 0,70 e 5 onde a relação foi menor que 0,70.

Para a hemaglutinação manose-resistente as amostras foram semeadas em meio de agar sólido peptonado e incubadas em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas, sendo feita semeadura de colônias isoladas deste meio para o de CFA/1 (Evans, Evans & Weillie, 1977) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas. Em lâminas comuns de microscopia, colocou-se uma gota de sangue humano tipo A, previamente adicionado de 0,5% de manose e uma colônia isolada do meio para CFA/1. A aglutinação de hemácias humanas pela suspensão bacteriana, em presença de D-manose, tem sido verificada quando as bactérias em questão possuem antígenos de aderência.

Para cada amostra utilizada testamos 10 colônias selecionadas, utilizando-se, também, controles positivos e negativos de *Escherichia coli*.

RESULTADOS

Dentre os 1.000 pacientes examinados foram isoladas 230 amostras assim distribuídas: em 20 (8,69%) foi isolada *Klebsiella* em cultura pura, sendo 4 (1,74%) em indivíduos sem diarreia, 15 (6,52%) em crianças e 1 (0,43%) em adultos, com diarreia (Tabela I).

Desses casos, em 24 oportunidades foram encontradas associações com germes de patogenicidade definida: 12 (5,22%) com *Salmonella*, 11 (4,78%) com *Shigella* e 1 (0,43%) com *Escherichia coli* invasora (Tabela II).

Em 43 casos, (18,7%) foi pesquisada a presença de parasitos no laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Puericultura Martagão Gesteira, pelos Métodos de Faust e Hoffmann revelando ausência de formas parasitárias em 37 (86,0%), entretanto, em 6 pacientes foram encontrados parasitos com a seguinte distribuição: um (2,32%) com *Trichuris trichiuria*; um (2,32%) com *Ascaris lumbricoides*; dois (4,65%) com *Giardia lamblia* e dois com (4,65%) *Strongiloide stercoralis*.

TABELA I

Isolamento de *Klebsiella* em culturas puras nos 230 casos examinados

	Nº de Amostras	%
Crianças sem diarreia	4	1,74
Crianças com diarreia	15	6,52
Adultos com diarreia	1	0,43
Total	20	8,69

TABELA II

Klebsiella em associação com *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* invasora nos 230 casos examinados

	Nº de Amostras	%
<i>Salmonella</i>	12	5,22
<i>Shigella</i>	11	4,78
<i>E. coli</i> invasora	1	0,43
Total	24	10,43

Em nossa amostragem houve relativa uniformidade de comportamento bioquímico, destacando-se os resultados negativos no meio SIM, nos testes de mobilidade e produção de H₂S e somente duas amostras (0,87%) produziram indol em 24 horas de incubação, sendo por identidade de comportamento bioquímico, identificadas com *K. pneumoniae* variedade *oxytoca* segundo Le Minor (1972).

No meio Duplo Açúcar Uréia (DAU) houve fermentação pela totalidade das amostras enquanto a alcalinização do meio foi notada em 210 (91,30%) após 24 horas de incubação (Tabela III).

TABELA III

Comportamento de 230 amostras de *Klebsiella* em meios de triagem

Meios	Testes	Positivos		Negativos	
		Nº	%	Nº	%
Sim	H ₂ S	0	0	230	100,0
	Indol	2	0,87	228	99,13
	Mobilidade	0	0	230	100,0
Duplo	Glicose	230	100	0	0
Açúcar	Lactose	222	96,52	8	3,48
Uréia	Uréia	210	91,30	20	8,70

Nas Tabelas IV e V estão os resultados das 210 amostras de *Klebsiella pneumoniae* e de 20 amostras de *Klebsiella ozaenae* submetidas a testes bioquímicos adicionais.

TABELA IV

Comportamento de 210 amostras de *Klebsiella pneumoniae* em testes bioquímicos adicionais

Teste ou Substrato	Total de Amostras			
	Positivas		Negativas	
	Nº	%	Nº	%
Produção de urease	105	50,0	105	50,0
Produção de indol	2	0,95	208	99,05
Vermelho de metila	0	0	210	100,0
Voges Proskawer	210	100,0	0	0
Utilização do citrato (Simmons)	210	100,0	0	0
Descarboxilação da lisina	193	91,90	17	8,10
Fermentação da glicose	210	100,0	0	0
Produção de gás	210	100,0	0	0
Fermentação da lactose	202	96,19	8	3,81
Fermentação do dulcitol	157	74,76	53	25,24
Utilização do malonato	204	97,14	6	2,86
Utilização do mucato	205	97,62	5	2,38

TABELA V

Comportamento bioquímico de 20 amostras de *Klebsiella ozaenae* em testes bioquímicos adicionais

Teste ou Substrato	Total de Amostras			
	Positivas		Negativas	
	Nº	%	Nº	%
Produção de urease	14	70,0	6	30,0
Produção de indol	0	0	20	100,0
Vermelho de metila	20	100,0	0	0
Voges Proskawer	0	0	20	100,0
Utilização do citrato (Simmons)	20	100,0	0	0
Descarboxilação da lisina	20	100,0	0	0
Fermentação da glicose	20	100,0	0	0
Fermentação do dulcitol	3	15,0	17	85,0
Utilização do malonato	9	45,0	11	55,0
Utilização do mucato	18	90,0	2	10,0
Produção de gás	20	100,0	0	0
Fermentação da lactose	20	100,0	0	0

As *K. pneumoniae* mostraram-se negativas nos testes de vermelho de metila, positivas no de Voges Proskawer e Citrato de Simons e fermentaram a glicose com produção de gás.

Duzentas e cinco (97,62%) amostras de *K. pneumoniae* utilizaram o mucato, enquanto, 204 (97,14%) utilizaram o malonato.

Houve fermentação de lactose em 202 (96,19%) e fermentação do dulcitol em 157 (74,86%). Cento e noventa e três (91,90%) das amostras descarboxilaram a lisina, 150 (50%) hidrolizaram a uréia e 2 (0,95%) produziram indol.

As amostras de *K. ozaenae* mostraram-se negativas na produção de acetofina, pelo teste de Voges Proskawer, e de indol pelo método de Braun & Silberstein, sendo positivas no teste do vermelho de metila, descarboxilando lisina e utilizando o citrato, a lactose e a glicose, sendo esta última com gás.

Dezoito das amostras (90%) utilizaram mucato e 9 (45%) o malonato. Quatorze (70%) hidrolizaram a uréia e 3 (15%) fermentaram o dulcitol.

A pesquisa de enterotoxina termo estável (ST) realizada em 187 (81,30%) das amostras (18 *K. ozaenae* e 169 *K. pneumoniae*), revelou em 73 (39,04%) uma relação int/carc na faixa de maior ou igual a 0,040 e menor ou igual a 0,050.

Em 94 amostras (50,27%) foi encontrada a relação maior que 0,050 e menor ou igual 0,070 e menor ou igual a 0,080 e em 2 (1,07%) a relação foi maior que 0,080 e menor que 0,085 (Tabela VI). Todas amostras de *K. ozaenae* testadas revelaram relação int/carc entre 0,040 e 0,050.

TABELA VI

Relação intestino/carcaça das 187 amostras de *Klebsiella* estudadas

<i>Relação Intestino/Carcaça</i>	<i>Nº de Amostras</i>	<i>%</i>
$\geq 0,040 - \leq 0,050$	73	39,04
$> 0,050 - \leq 0,070$	94	50,27
$> 0,070 - \leq 0,080$	18	9,62
$> 0,080 - < 0,085$	2	1,07
Total	187	100,0

Como controle positivo, foi utilizada uma amostra de *Escherichia coli* cuja relação int/carc foi de 0,10 e para controle negativo foi utilizada a amostra de *E. coli* que teve relação int/carc de 0,060. A cinética das 21 amostras, cuja relação int/carc foi maior ou igual a 0,070 e as 7 onde a relação for menor que 0,070, não mostrou nenhuma diferença, o mesmo ocorrendo em relação à pesquisa de fator de aderência (CFA/1) que foi negativa com a amostra controle positivo de *Escherichia coli*.

Em 110 destas amostras, além da pesquisa de enterotoxina ST, foi também pesquisada enterotoxina termo lábil LT. Os extratos dos controles negativos e positivos depois da correção para hemólise não imune deram uma absorvância de 0,06-0,12 e 1,0-1,2 respectivamente. A média dos extratos das 110 amostras depois da correção para hemólise não imune foi de 0,06-0,13.

DISCUSSÃO

Verificamos que em 23% dos casos foi isolada *Klebsiella* e que somente em 10,43% houve associação com germes de patogenicidade definida.

Nas 210 amostras de *K. pneumoniae* foi encontrado 100% de positividade nos testes de Voges Proskawer, utilização do citrato do Simmons, fermentação da glicose e produção de gás, enquanto Edwards & Ewing em 1972, informaram 91,1%, 97,7%, 100% e 96,5% de positividade respectivamente.

Edwards & Ewing descreveram 94,5% de positividade no teste de urease, resultado esse por nós obtido apenas em 50% das amostras.

No teste de utilização do dulcitol obtivemos 74,76% de positividade, enquanto Edwards & Ewing relataram um achado de 31,5%; 0,95% produziram indol, enquanto que Edwards & Ewing obtiveram 6% de positividade.

A utilização do malonato e mucato foi positiva em 97,14% e 97,62% enquanto, no relato dos dois autores acima mencionados, o encontro foi de 92,5% e 92,8% respectivamente de amostras positivas. Na descarboxilação da lisina apesar de Edwards & Ewing terem obtido 97,2% de amostras positivas em 24 horas e 2,8% tardiamente, nós observamos 91,9% de positividade, não ocorrendo reação tardia.

A lactose foi utilizada por 96,19% das amostras e Edwards & Ewing relataram 98,2% observando também esses autores uma fermentação tardia de 1,4%.

Em nenhuma oportunidade foi observada positividade para o teste de vermelho de metila, enquanto Edwards & Ewing revelam que em 1,3% das amostras a prova mostrou-se positiva.

A biotipagem das 20 amostras de *K. ozaenae*, revelou 100% de positividade nas provas de vermelho metila, utilização do citrato de Simmons, descarboxilação da lisina, fermentação da lactose e fermentação da glicose com produção de gás. Nas amostras estudadas por Edwards & Ewing somente houve concordância na fermentação da glicose com produção de gás que foi 100%, o mesmo não ocorrendo com os demais testes: o teste de vermelho de metila, mostrou-se positivo em 99,1%, houve utilização do citrato de Simmons em 31,9% e em 31,0% o teste revelou-se positivo tardiamente, 48,0% das amostras descarboxilaram a lisina e somente 24,1% fermentaram a lactose, sendo que 70,7% o fizeram tardiamente.

Observamos utilização do dulcitol em 15% das amostras, resultado discordante dos de Edwards & Ewing, que relatam a não utilização do carboidrato. Nossas amostras utilizaram malonato na percentagem de 45% e o mucato na de 90%, enquanto Edwards & Ewing relatam a utilização do malonato em 4,0% e do mucato em 24,0%.

Observamos 70,0% de positividade na produção da urease enquanto os autores acima encontraram uma percentagem de 9,5%, sendo que 10,3% o fizeram tardiamente.

Em concordância com os relatos de Edwards & Ewing (1972) não foi observada produção de indol, nem positividade no teste de Voges Proskawer em nenhuma das 20 amostras de *K. ozaenae*.

Das 230 amostras estudadas 91,0% são da espécie *K. pneumoniae* e 9,0% da *K. ozaenae* e nenhum isolamento de *K. rhinoscleromatis*, fato em concordância com a literatura que aponta a *Klebsiella pneumoniae* como mais freqüente nos casos de diarreia, principalmente infantil.

Quanto à produção de enterotoxina ST, no nosso estudo somente duas amostras (1,07%) apresentaram relação int/carc maior que 0,080 e menor que 0,085. Pelo exposto fica difícil de afirmar em termos de *Klebsiella* se estas amostras são ou não produtoras de enterotoxina ST, pois para tal seria necessário confirmarmos o resultado pela técnica de perfusão "in vivo" em ratos, proposta por Klipstein et al (1975).

Na pesquisa de enterotoxina LT, podemos considerar nossos resultados negativos.

Apesar de não haver recomendação da leitura para utilização das técnicas de imuno hemólise passiva, para pesquisa de LT e de Dean para ST, em *Klebsiella*, optamos pelo emprego dos mesmos pela viabilidade da realização a nível de qualquer laboratório de pesquisa, caso fossem obtidos resultados de produção de toxinas comparáveis ao obtido quando usada a técnica de perfusão "in vivo" defendida por Klipstein et al (1979).

SUMMARY

The possible role of *Klebsiella* species on intestinal infection pathology was investigated.

From a total of 230 strains isolated during 1979 and 1980 from different hospitals in Rio de Janeiro City 91.0% corresponded to *Klebsiella pneumoniae* and 9.0% were *Klebsiella ozaenae*.

In 10.43% of the cases the *Klebsiella* strains were found in close association with a definite pathogeny, belonging the other genera. Besides, parasitological stool examination performed in 43 patients revealed helminthic and/or protozoan agents in 4.0% of the sample.

The significance of other meaningful mechanisms, excluded the capsule, to the pathogenic role *Klebsiella* was investigated. One hundred eighty seven strains were tested for the heat stable enterotoxin (ST) but in only two cases a borderline result was obtained, with no significant results in the remaining strains. The heat labile enterotoxin (LT) was investigated in 110 strains, with no positive results. Finally, the colonization factor CFA/1 was not identified in 27 strains tested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L.B., 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice. Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125 :407-411.
- DIFCO MANUAL, 1972. 9th ed. Difco Laboratoires Incorporated, Detroit - Michigan.
- DUGUID, J.P., 1959. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J. Gen. Microbiol.*, 21 :271-286.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H., 1972. *Identification of enterobacteriaceae*. 3rd ed. Burgess Publishing Co.
- EDWARDS, P.R. & FIFE, M.A., 1952. Capsule types of *Klebsiella*. *J. Infect. Dis.* 91 :92-104.
- EVANS JR., D.J. & EVANS, D.G., 1977. Direct serology assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.* 16 :604-609.
- EVANS JR., D.J.; EVANS, D.G. & GORBACH, S.L., 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8 :725-730.

- EVANS JR., D.J.; EVANS, D.G. & GORBACH, S.L., 1974. Polymixin B induced release of low molecular weight heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 10 :1010-1017.
- EVANS, D.G.; EVANS JR., D.J. & WEILLIE, T. JOA., 1977. Haemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.* 18 :330-337.
- EWING, W.H., 1967. Revised definition for the family Enterobacteriaceae its tribes and genero. Center for Disease Control, Atlanta – Georgia.
- FIFE, M.A.; EWING, W.H. & DAVIS, R.B.; 1965. The Biochemical reaction of the *Klebsiella*. CDC, Publications Communicable Disease Center, Atlanta – Georgia.
- GUERRANT, R.L.; MOORE, R.A.; KIRSCHENFELD, B.A. & SANDE, M.A., 1975. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *New Engl. J. Med.* 283 :567-573.
- KARPAS, C.M. & BOMAN, I.B., 1966. The significance of *Klebsiella enteritis*. A study of seven cases. *Am. J. Clin. Path.* 46 :632-640.
- KAUFMAN, F. & PETERSEN, A., 1956. The biochemical group and type differentiation of Enterobacteriaceae by organic acid. *Acta. Path. Microbiol. Scand.* 38 :481-491.
- KLIPSTEIN, F.A. & ENGERT, R.F., 1975. Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. III – Preliminary characterization of *Klebsiella pneumoniae enterotoxin*. *J. Infect. Dis.* 132 :200-203.
- KLIPSTEIN, F.A.; GUERRANT, R.L.; WEILS, J.G.; SHORT, H.B. & ENGERT, R.F.; 1979. Comparison of assay of coliform enterotoxins by conventional techniques versus "in vivo" intestinal perfusion. *Infect. Immun.* 25 :146-152.
- KLIPSTEIN, F.A.; HOROWITZ, I.; ENGERT, R.F. & SCHENZ, E.A., 1975. Effect of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin on intestinal transport in the rat. *J. Clin. Invest.* 56 :799-807.
- LE MINOR, L., 1972. *Le diagnostic de laboratoire des bacilles à Gram négatif*. I – Enterobacteries. 4^{ème} édition de la Tourelle, Saint-Mondé.
- OLART, J.; FERGUSON, W.W.; HENDERSON, N.D. & TORREGROSA, L., 1961. *Klebsiella* strains isolated from diarrheal infants. *Amer. J. Dis. Child* 101 :763-770.
- SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R., 1969. Enterobactérias. Diferenciação bioquímica. *Rev. Bras. Patol. Clín.* 5 :8-18.
- SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R., 1978. Duplo açúcar uréia agar (DUA), um meio de triagem para enterobactérias. *Rev. Bras. Patol. Clín.* 14 :201-202.
- WEIL, A.J.; RAMCHAND, S.M.B. & ARIAS, M.E., 1966. Nosocomial infection with *Klebsiella type 25*. *New Engl. J. Med.* 275 :17-21.