

BIOTIPAGEM E RESISTOTIPAGEM PARA O TRAÇADO EPIDEMIOLÓGICO DA ORIGEM FECAL DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EM INFECÇÕES URINÁRIAS

JOSÉ AUGUSTO A. PEREIRA & ÍTALO SUASSUNA

Em 24 (82,7%) de 29 pacientes com infecção urinária por Klebsiella pneumoniae isolamos a mesma espécie a partir de amostras fecais. Estudamos 24 cepas urinárias e 219 cepas fecais encontrando 50 biótipos distintos (em média quatro biótipos por amostra fecal). Em dez (34,4%) dos 29 pacientes o biotipo de uma ou mais cepas fecais corresponderam ao biotipo da cepa urinária -- sem encontrarmos associação entre a simultaneidade e a prévia cateterização vesical ($p > 0,05$).

Na resistotipagem -- utilizando quatro substâncias químicas previamente escolhidas entre 34 produtos testados (verde brilhante, verde malaquita, telurito de potássio e cloreto mercúrico) encontramos 16 resistotipos distintos. Em 14 (58,3%), dos 24 casos houve detecção do mesmo resistotipo em cepa(s) fecal(is) e urinária do mesmo paciente, entretanto, só em cinco (20,9%) dos casos houve concordância com a biotipagem na indicação de simultaneidade. A concordância de resultados quanto à ausência ou presença de biótipos ou resistotipos simultâneos, na urina e nas fezes, foi de somente 54,2%. A presença de resistência aos íons telurito e mercúrico, entre cepas fecais e cepas urinárias, no mesmo paciente, estava significativamente associada ($p < 0,001$).

São numerosas as evidências quanto ao papel da flora intestinal como reservatório dos microrganismos, nas infecções endógenas (Vosti et al., 1964; Grünberg, 1969; Schwarz et al., 1969; Selden et al., 1971; Shooter, 1971; Hable et al., 1972; Ducan & Booth, 1975 e Gerding et al., 1979). Nas infecções urinárias, uma série de estudos corroboram esta visão. Em relação a *Escherichia coli* como agente mais comum Vosti et al. (1964) estudando mulheres hospitalizadas encontraram em 80% dos casos, o sorogrupo responsável pela infecção urinária, na flora fecal. Schwarz et al. (1969) com abordagem semelhante, identificaram o sorogrupo urinário em 100% dos exames de fezes dos pacientes. Grünberg (1969), em mulheres não internadas com infecção pelo agente encontrou mesmo sorogrupo em 80% dos casos, enquanto que em 93% e 90%, respectivamente, detectou o mesmo sorogrupo urinário nas floras periuretral e vaginal. Há concordância quanto às infecções urinárias, se darem por microrganismos que ascendem pelo trato genitourinário a partir da uretra (Kunin, 1972).

Klebsiella pneumoniae tem sido um dos mais importantes agentes de infecção hospitalar, aparecendo -- entre outras localizações como agente de infecções urinárias (Eickhoff, Steinhauer & Finland, 1966; Barrett, Casey & Finland, 1968; Johanson et al., 1972; Davies & Matsen, 1974; Finland, 1977; Thomas et al., 1977 e Stamm et al., 1981), mas os dados sobre sua epidemiologia são menos precisos que os relativos a *E. coli*.

Na marcação epidemiológica de *K. pneumoniae* têm-se utilizado, tradicionalmente, a sorotipagem, que se fundamenta na discriminação de mais de 70 antígenos capsulares (Edwards & Ewing, 1972). O método oferece problemas dado à existência de cepas com insuficiente material capsular, e conseqüentemente, em termos práticos não tipáveis. Cerca de 10% das cepas isoladas em estudos epidemiológicos correspondem a esse caso (Dans et al., 1970; Martin, Yu & Washington II, 1971 e Blanchette & Rubin, 1980). Riser, Noone & Bonnet (1976) propuseram a realização da sorotipagem por técnicas de imunofluorescência, para obviar as freqüentes reações cruzadas pela técnica tradicional.

As mesmas dificuldades com a sorotipagem têm levado à tentativas de marcação epidemiológica por outros métodos destacando-se: tipagem por bacteriocinas (Heddell & Mitchell, 1978 e Edmondson & Cooke, 1979), e a biotipagem (Cowan et al., 1960; Rennie & Duncan, 1974 e Haverkorn & Michel, 1979a, b). A resistotipagem foi proposta para outras espécies, não tendo sido avaliada em relação a *Klebsiella* (Elek & Higney, 1970; Elek, Davies & Miles, 1973 e

Trabalho realizado com auxílio da FINEP, no Serviço de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ. Av. 28 de Setembro, 87 - fundos, 20550 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido para publicação em 15 de janeiro e aceito em 6 de maio de 1985.

Kashbur, George & Ayliffe, 1974). Pelo exposto relatamos a aplicação da biotipagem e da resistotipagem para avaliar a origem fecal de *K. pneumoniae* em casos de infecção urinária. Em relação à resistotipagem descrevem-se as investigações para o desenvolvimento e a padronização das técnicas aplicadas à *Klebsiella*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se 243 cepas de *K. pneumoniae* isoladas a partir de urina e fezes de 29 pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), entre setembro de 1980 a janeiro de 1981. Com quadros clínicos subjacentes diversos todos apresentaram infecção urinária por *Klebsiella* durante a internação.

Cepas de *K. pneumoniae* isoladas de urina: a detecção da infecção urinária foi feita pelos exames de rotina no Laboratório de Bacteriologia do HUPE. Considerou-se significativa a contagem de 100.000, ou mais bactérias, por mililitro de urina, em pacientes com quadro compatível de infecção urinária. O germe isolado foi mantido em agar semi-sólido (Suassuna et al., 1977) até a realização dos testes de identificação e tipagem.

Obtenção de dados e de amostra fecal do paciente: após identificado o caso de infecção urinária, anotaram-se os dados do paciente de interesse para a investigação e obteve-se uma amostra fecal, no período, no máximo de 72 horas após o exame urinário. Por todos os modos procurou-se prevenir o contato de urina com as fezes, na hora da colheita. A amostra fecal era conservada a 4°C, até a manhã seguinte, caso tivesse sido colhida à noite.

Isolamento de colônias de *K. pneumoniae* das amostras fecais: as fezes eram semeadas em EMB agar (Difco), e o meio incubado a 37°C, durante 18-24 horas. Colônias morfologicamente sugestivas de *K. pneumoniae* eram repicadas, em número de até 15 colônias, para agar semi-sólido, como descrito para as amostras urinárias. Quando houve crescimento invasor de *Proteus sp.* o reisolamento era tentado em agar "Brolacyn" (Merck).

Identificação das cepas: as cepas urinárias e fecais visando a caracterização como *K. pneumoniae* foram posteriormente estudadas com os métodos descritos por Suassuna & Suassuna (1978) e por Edwards & Ewing (1972).

Biotipagem: as cepas identificadas como *K. pneumoniae* foram submetidas às provas de VM (vermelho de metila) e VP (Voges-Proskauer); fermentação do adonitol, dulcitol e sorbose; utilização do mucato, citrato, tartarato e malonato, e o desdobramento da uréia — esquema proposto por Haverkorn & Michel (1979a). As provas foram realizadas e interpretadas segundo Edwards & Ewing (1972), salvo as provas de fermentação do adonitol, do dulcitol e da sorbose para as quais, o tempo de incubação para a leitura, correspondeu a 24 horas.

Padronização e execução do método de resistotipagem: selecionamos pelo método de Szybalski (1952), quatro (entre 34 substâncias) consideradas úteis quanto ao potencial tóxico diferencial em agar, segundo o procedimento descrito por Elek & Higney (1970): verde brilhante (Carlo Erba), verde malaquita (Merk), telurito de potássio (Merk) e cloreto mercúrico (Reagen). Adaptamos o método à difusão em agar, segundo Barry (1976). Discos de papel tipo poroso de 80 libras, com 7,5 mm de diâmetro, eram impregnados com soluções das quatro substâncias. Espalhávamos, com swab de algodão estéril, suspensão de microrganismos, em turvação correspondente ao grau 0,5 de MacFarland, homoganeamente, por toda a superfície de agar Mueller Hinton. Após 18 a 20h de incubação a 37°C, medíamos os halos de inibição de crescimento e classificávamos as cepas em categorias de resistência, resistência intermediária e sensibilidade, segundo os limites definidos a partir de estudo da variação de concentração de soluções de preparo dos discos e da distribuição de halos de inibição para cerca de 130 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de variados materiais clínicos (Tabela I).

Método estatístico aplicado: empregamos a análise de variância, no estudo da distribuição dos halos de inibição às substâncias utilizadas na resistotipagem, e o teste de Qui-quadrado (χ^2), na comparação de diferença de frequência dos eventos estudados, segundo Berquó, De Souza & Gottlieb (1980).

RESULTADOS

Em 24 (82,7%) dos 29 pacientes com infecção por *K. pneumoniae* isolamos a mesma espécie das amostras fecais. Desses 24 pacientes foram estudadas 243 cepas do agente em questão: 24 urinárias e 219 fecais.

Biotipagem: pela biotipagem observou-se que as provas de VM, VP e urease careciam de capacidade significativa para a discriminação das 243 estirpes de *Klebsiella* estudadas. As demais

sete provas utilizadas foram úteis, e a combinação dos resultados para as mesmas quando em conjunto, admite 128 possibilidades ou biotipos diferentes. Desses, encontramos 50 biotipos entre as 243 cepas. Detectamos desde a presença de um único biotipo nas fezes (casos 401, 521 e 721) até oito biotipos diversos (casos 344 e 390) em um mesmo espécime fecal. Em média foram encontrados quatro biotipos diferentes por paciente (Tabela II). Não houve correlação entre o tempo de internação até o momento da detecção bacteriológica de infecção urinária, e o grau de heterogeneidade de biotipos de *K. pneumoniae* presente nas fezes dos pacientes. Também não houve diferença significativa no grau de heterogeneidade, revelado pelos biotipos quando considerados crianças e adultos (Tabela II).

TABELA I

Limites arbitrados a partir da análise da curva de distribuição de halos de inibição de cerca de 130 cepas de *K. pneumoniae*

Nome	g% *	Classificação de acordo com os halos de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Telurito	0,20	≤ 11	11 – 20	≥ 20
Mercúrio	0,25	≤ 13	14	≥ 15
Verde malaquita	3,00	≤ 15	15 – 18	≥ 18
Verde brilhante	0,40	≤ 13	13 – 16	≥ 16

* Solução aquosa empregada no preparo dos discos.

TABELA II

Tempo de internação e variedade de biotipos das cepas fecais de *K. pneumoniae*, relativos a pacientes com infecção urinária pelo agente

Nº do caso	Tempo de internação (dias)	Total de cepas estudadas	Total de biotipos	Nº de cepas de cada biotipo encontrado
674(*)	45	13	7	1, 1, 1, 1, 2, 3, 4
57	40	9	7	1, 1, 1, 1, 1, 1, 3
581(*)	31	6	3	1, 2, 3
1000(*)	16	9	3	1, 1, 7
582	24	8	4	1, 1, 1, 5
521(*)	10	2	1	2
401	24	11	1	11
103(*)	17	8	3	1, 2, 5
381	9	8	2	1, 7
213	10	11	2	2, 9
404	4	14	6	1, 1, 1, 2, 2, 6
721	50	15	1	15
540(*)	37	10	3	1, 2, 7
726	6	10	2	1, 9
225	3	7	4	1, 1, 2, 3
555(*)	2	11	7	1, 1, 1, 1, 2, 2, 3
390	53	9	8	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 2
344	2	10	8	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 3
703(*)	8	9	2	4, 5
299	5	9	5	1, 1, 1, 3, 3
371	7	10	2	1, 9
398(*)	11	5	4	1, 1, 1, 2
93	3	6	5	1, 1, 1, 1, 2
185	18	7	2	1, 6

(*) Pacientes pediátricos.

TABELA III

Dados relativos a 24 pacientes com infecção urinária por *K. pneumoniae*, sobre localização no hospital, sexo, idade, realização de cateterização e achado dos biotipos da cepa urinária do agente, em amostra fecal

Nº do caso	Origem	Sexo	Idade	Cateterização	Achado do biotipo urinário nas fezes(*)
674	Ped	M	6a*	-	+
581	Ped	M	8a	-	-
1000	Ped	M	2m**	-	-
521	Berç	F	12d***	-	+
103	EmInf	F	7m	-	-
540	Ped	M	2m	-	-
555	Ped	M	10a	-	-
703	EmInf	M	6m	-	-
398	Ped	F	6m	-	-
57	EnfClin	M	58a	+	+
582	Ginec	F	56a	+	+
401	EnfClin	F	29a	+	+
213	EnfClin	F	58a	+	-
721	EnfClin	M	17a	+	-
225	Urol	M	78a	+	+
390	Neuroc	F	59a	+	-
299	Obst	F	27a	+	+
371	EnfClin	F	50a	+	-
93	Urol	M	72a	+	-
381	Oftal	M	73a	-	-
404	UnCor	F	60a	-	+
726	EnfClin	M	59a	-	-
344	EnfCir	F	29a	-	+
185	EnfClin	M	21a	-	+

a* = anos; m** = meses; d*** = dias; (+) = ocorrência; (-) = não ocorrência; Ped = Pediatria; Berç = Berçário; EmInf = Emergência Infantil; EnfClin = Enfermaria Clínica; Ginec = Ginecologia; Urol = Urologia; Neuroc = Neurocirurgia; Obst = Obstetrícia; Oftal = Oftalmologia; UnCor = Unidade Coronária; (*) Quando a diferença entre os biotipos foi em um único teste, a exclusão de identidade foi confirmada, pela repetição do teste.

TABELA IV

Distribuição dos resistotipos das cepas de *K. pneumoniae* encontradas em 24 casos de infecção urinária

T	Resistotipo			Casos nos quais foi detectado em cepa urinária
	C	B	M	
-	-	(+)	+	344, 185, 93, 390
+	+	-	+	540, 721
+	+	(+)	(+)	401, 103
+	+	(+)	+	381, 674
-	+	-	(+)	57, 299
-	+	-	+	703, 555
-	-	-	(+)	404
-	-	(+)	-	225
+	+	-	(+)	582
-	-	-	-	726
-	-	(+)	(+)	398
+	+	-	-	1000
+	-	(+)	+	213
-	+	(+)	(+)	371
+	-	-	+	581
+	-	(+)	(+)	521

T = telurito de potássio; C = cloreto mercúrico; B = verde brilhante; M = verde malaquita.

+ = resistência; (+) = intermediário; - = sensível.

TABELA V

Comparação dos métodos de biotipagem (BT) e resistotipagem (RT) quanto à detecção do tipo da cepa urinária de *K. pneumoniae*, na amostra fecal, de 24 pacientes com infecção urinária pelo agente

Tipo urinário entre cepas fecais	Casos	
	Nº	%
Negativo na BT e RT	8	33,3
Positivo na BT e RT	5	20,9
Positivo na BT e RT mas discordante quanto às cepas	3	12,5
Positivo só na RT	6	25,0
Positivo só na BT	2	8,3

TABELA VI

Modelos de resistência, de cepas urinárias e fecais, de *K. pneumoniae* ao telurito de potássio (T) e ao cloreto mercúrico (C)

Caso	Marcadores de Resistência	
	Cepa urinária	Cepa fecal apresentando mais marcadores
674	T; C	T; C
57	C	C
581	T	T
1000	T; C	T; C
582	T; C	T; C
521	T	T
401	T; C	T; C
103	T; C	T; C
381	T; C	T; C
213	T	T; C
721	T; C	T; C
540	T; C	T; C
404		T; C
726		
225		C
555	C	C
390		
344		T; C
703	C	C
299	C	C
371	C	T; C
398		
93		
185		

T = telurito de potássio; C = cloreto mercúrico.

Em dez pacientes uma ou mais cepas isoladas de fezes correspondiam ao biotipo de cepa urinária, o que corresponde a 34,4% no total de 29 pacientes com infecção urinária e a 41,6% se considerado somente o total de 24 pacientes com *K. pneumoniae* nas fezes. Não verificamos associação entre o achado de cepas, fecais e urinária, com o mesmo biotipo, e a realização prévia de cateterização da bexiga ($p > 0,05$). Também não se observou correlação entre aquela coincidência de biotipos fecais e urinários e o sexo ou idade (criança x adultos) dos pacientes ($p > 0,05$) (Tabela III).

Resistotipagem: para as 24 amostras urinárias, classificando-as segundo os limites apresentados na Tabela I, encontramos 16 resistotipos diferentes (Tabela IV). As cepas de cada amostra fecal, mostraram (como na biotipagem) uma nítida heterogeneidade de tipos. Em 14 dos 24 casos encontramos nas fezes o resistotipo coincidente com a cepa urinária do mesmo indivíduo (Tabela V). Em 13 dos 24 casos (54,2%) o resultado da resistotipagem concordou com o da biotipagem, quanto ao aparecimento ou não de mesmo tipo em urina e fezes. Em três dos 24 casos (12,5%)

foi detectado um mesmo tipo em fezes e urina mas a incriminação das cepas não coincidiu. Em dois dos 24 casos (8,3%) o achado pela biotipagem de mesmo tipo em urina e fezes, não foi confirmado pela resistotipagem (Tabela V).

Constatou-se uma baixa capacidade de discriminação pela resistotipagem, tendo em conta a frequência com que cepas de mesmo resistotipo foram discriminados como pertencentes a diferentes biotipos. Entretanto, a utilização da resposta ao cloreto mercúrico e ao telurito de potássio empregados na resistotipagem permitiu revelar uma associação significativa da resistência aos mesmos quando considerados isoladamente entre cepas urinárias e fecais ($p < 0,001$) (Tabela VI).

DISCUSSÃO

Isolamos *K. pneumoniae* das fezes em 82,7% dos casos, o que é comparável aos 81,7% de Cooke et al. (1979) em pacientes com infecções urinárias ou outras, pelo mesmo agente. Em estudo prospectivo Selden et al. (1971) constataram que em 11 de 31 pacientes hospitalizados, nos quais apareceu infecção por *K. pneumoniae*, a mesma espécie não foi detectada nas fezes.

A biotipagem definiu 50 biotipos entre as 243 cepas de *Klebsiella* estudadas. Haverkorn & Michel (1979a) em estudo de colonização hospitalar pelo agente, utilizando esquema semelhante de biotipagem (exceto que usaram indol e não empregaram malonato), detectaram 66 biotipos entre 530 cepas estudadas.

A biotipagem mostrou simultaneidade de biotipos na urina e nas fezes em 34% do total de casos, o que é comparável aos 41% encontrados por Cooke et al. (1979) estudando 45 pacientes com infecção por *Klebsiella* (21 infecções urinárias e o restante, em outros sítios). Esses autores utilizaram sorotipagem e a tipagem por bacteriocinas para "marcar" as estirpes não reconhecidas pelo primeiro método. A simultaneidade de ocorrência apareceu em 54% (17/31) dos casos de infecção detectados na prospecção dos pacientes considerados. Tal percentual bastante superior ao que encontramos deve-se, possivelmente, aos métodos utilizados. Entretanto, tais percentuais de forma geral contrastam com aqueles relativos à presença simultânea da mesma cepa na urina e fezes, quando se trata da infecção por *E. coli*. Para essa última espécie, Schwarz et al. (1969) e Grünberg (1969) encontraram identidade de sorogrupos em 100% dos casos, e Vosti et al. (1964) em 80%. Não se pode atribuir com exclusividade a divergência dos resultados entre as duas espécies à ineficiência relativa dos métodos de tipagem utilizados para *K. pneumoniae*, sem considerar peculiaridades de colonização (localização, aparecimento nas fezes, tempo de instalação, intervalo entre os eventos, antagonismos, etapas intermediárias de localização anatômica, facilidade de contaminação fecal, etc.).

A aparente heterogeneidade de biotipos nas fezes atestada pela observação de quatro biotipos, em média, por paciente variando entre um único tipo até oito biotipos por caso (Tabela II), contrasta com os achados de Cooke et al. (1979) que em 27 de 36 casos, examinando dez colônias, observaram um único sorogrupo em cada caso.

Já Montmerie et al. (1970), em estudo prospectivo de infecção por *K. pneumoniae* em pacientes transplantados, detectaram uma média de 7,1 sorotipos por amostra fecal. Em *E. coli* Schooter (1971), estudando a colonização intestinal em pacientes hospitalizados, constatou uma variação constante dos sorotipos com o tempo de internação.

Importa discutir nos casos de divergência entre os biotipos de fezes e de urina, se tal divergência não dever-se-ia a variações e erros intrínsecos dos testes utilizados. Entretanto, as variações de reprodutibilidade por nós detectados nos testes utilizados não sugerem alterações de monta a repercutirem na consistência dos resultados. O mesmo observaram Haverkorn & Michel (1979a). Acrescenta-se que a divergência de padrões ocorreu, na maioria das vezes em relação a duas ou mais provas bioquímicas, tornando difícil a influência do erro de técnica, em uma delas. Os resultados da resistotipagem, não foram animadores, quando comparados aos da biotipagem. Todavia, parecem indicar que a utilização de um número maior de substâncias com poder tóxico diferencial, possam levar a resultados melhores. Essa possibilidade pode apoiar-se na concordância encontrada entre a biotipagem e a resistotipagem para detecção de tipo urinário na flora fecal, em 13 dos 24 casos (54,2%), e pela sua positividade exclusiva em seis dos 24 casos (25%) (Tabela V), estas não confirmadas pela biotipagem. Tal fato dever-se-ia à baixa discriminação com o conjunto reduzido de substâncias que nos foram de utilidade.

Um dos problemas sempre presente na escolha das substâncias destinadas à resistotipagem, na sua concepção original, é a inclusão de marcadores químicos para os quais a resistência bacteriana estivesse codificada em fatores ou elementos genéticos extracromossomiais (Elek & Higney, 1972). De qualquer forma, na nossa amostragem, a resistência ao telurito de potássio e/ou ao cloreto mercúrico, codificadas extracromossomialmente, permitiram constatar associação entre cepas de infecção urinária e de flora fecal de mesmo paciente, o que pode estimular o uso daqueles marcadores na análise de outros tipos de relações epidemiológicas.

SUMMARY

Twenty-four (82.7%) out of 29 patients suffering from hospital acquired urinary infections by *Klebsiella pneumoniae* had the same species in their faeces. Biotyping of 24 urinary and 219 fecal strains of *K. pneumoniae* resulted in 50 different biotypes – an average of four biotypes per fecal sample. Ten patients (34.4%) had the same biotype in urine and faeces without any correlation with previous vesical catheterization ($p > 0.05$). Using resistotyping to four chemical compounds selected among 34 tested substances (brilliant green, malachite green, potassium tellurite and mercuric chloride) 16 different resistotypes were found. Fourteen patients (58.3%) presented the same resistotype in urine and faeces but only in five patients was there correlation with simultaneous biotyping identity. Simultaneous occurrence of identical biotypes or resistotypes in faeces and urine occurred in only 54.2% of cases. However, there was a significant association between resistance to mercuric and tellurite ions in fecal and urinary strains isolated from the same patient ($p < 0.001$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRET, F.F.; CADEY, J.I. & FINLAND, M., 1968. Infections and antibiotic use among patients at Boston City Hospital, February, 1967. *N. Engl. J. Med.*, 278 :5-9.
- BARRY, A.L., 1976. The antimicrobial susceptibility test: Principles and practices. Lea & Febiger ed., Philadelphia.
- BERQUÓ, E.S.; DE SOUZA, J.M.P. & GOTTLIEB, S.L.D., 1980. Bioestatística. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária.
- BLANCHETTE, E.A. & RUBIN, S.J., 1980. Seroepidemiology of clinical isolates of *Klebsiella* in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.*, 11 :474-478.
- COOKE, E.M.; BRAYSON, J.C.; EDMONDSON, A.S. & HALLA, A., 1979. An investigation into the incidence and source of *Klebsiella* infections in hospital patients. *J. Hyg. Camb.*, 82 :473-480.
- COWAN, S.T.; STELL, K.J.; SHAW, C. & DUGUID, J.P., 1960. A classification of the *Klebsiella* group. *J. Gen. Microbiol.*, 23 :601-612.
- DANS, P.E.; BARRETT, F.F.; CASEY, J.I. & FINLAND, M., 1970. *Klebsiella-Enterobacter* at Boston City Hospital, 1967. *Arch. Intern. Med.*, 125 :94-101.
- DAVIES, T.J. & MATSEN, J.M., 1974. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. *J. Infect. Dis.*, 130 :402-405.
- DUCAN, I.B.R. & BOOTH, E.V., 1975. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections investigated by pyocin-typing. *Can. Med. Assoc. J.*, 112 :837-840.
- EDMONDSON, A.S. & COOKE, E.M., 1979. The development of a bacteriocin typing method for *Klebsiella*. *J. Hyg. Camb.*, 82 :207-223.
- EDWARDS, P.R. & FWING, H.W., 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- ELEK, S.D. & HIGNEY, L., 1970. Resistotyping – A epidemiological tool: Application to *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 3 :103-110.
- ELEK, S.D.; DAVIES, J.R. & MILES, R., 1973. Resistotyping of *Shingella sonnei*. *J. Med. Microbiol.*, 6 :329-345.
- EICKHOFF, T.C.; STEINHAUER, B.W. & FINLAND, M., 1966. The *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* division. Biochemical and serologic characteristics and susceptibility to antibiotics. *Ann. Intern. Med.*, 65 :1163-1178.
- FINLAND, M., 1977. Nosocomial epidemics seriatim. Multidrug-resistant bacteria and R-factors. *Arch. Intern. Med.*, 137 :585-587.
- GERDING, D.N.; BUXTON, A.E.; HUGHES, R.A.; CLEARY, P.P.; ARBACZAWSKI, J. & STAMM, W.E., 1979. Nosocomial multiply resistant *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology of an outbreak of apparent case origin. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 15 :608-615.
- GRÜNEBERG, R.N., 1969. Relationship of infecting urinary organism to the faecal flora in patients with symptomatic urinary infection. *Lancet*, 2 :766-768.
- HABLE, K.A.; MATSEN, J.M.; WHEELER, D.J.; HUNT, C.E. & QUIE, P.G., 1972. *Klebsiella* type 33 septicemia in an infant intensive care unit. *J. Pediatr.*, 80 :920-924.
- HAVERKORN, M.L. & MICHEL, M.F., 1979a. Nosocomial *Klebsiella(s)*. I. Colonization of hospitalized patients. *J. Hyg. Camb.*, 82 :117-193.
- HAVERKORN, M.L. & MICHEL, M.F., 1979b. Nosocomial *Klebsiella(s)*. II. Transfer in a hospital ward. *J. Hyg. Camb.*, 82 :195-205.
- HEDDELL, G.W. & MITCHELL, A.B., 1978. Evaluation and application of a improved bacteriocin typing method for *Klebsiella aerogenes*. *J. Clin. Path.*, 31 :16-21.
- JOHANSON JR., W.G.; PIERCE, A.K.; SANFORD, J.P. & THOMAS, G.D., 1972. Nosocomial respiratory infections with Gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann. Intern. Med.*, 77 :701-706.

- KASHBUR, I.M.; GEORGE, R.H. & AYLIFFE, A.J., 1974. Resistotyping of *Proteus mirabilis* and a comparison with other methods of typing. *J. Clin. Pathol.*, 27 :572-577.
- KUNIN, C.M., 1972. Detection, prevention and management of urinary tract infections. 1st ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
- MARTIN, W.J.; YU, P.K.W. & WASHINGTON II, J.A., 1971. Epidemiologic significance of *Klebsiella pneumoniae* a three month study. *Mayo. Clin. Proc.*, 46 :785-793.
- MONTGOMERY, J.Z.; DOAK, P.B.; TAYLOR, D.E. & NORTH, J.D.K., 1970. *Klebsiella* in faecal flora of renal-transplant patients. *Lancet*, 2 :787-792.
- RENNIE, R.P. & DUNCAN, B.R., 1974. Combined biochemical and serological typing of isolates of *Klebsiella*. *Appl. Microbiol.*, 28 :534-539.
- RISER, E.; NOONE, P. & BONNET, M.L., 1976. A new serotyping method for *Klebsiella* species: evaluation of the technique. *J. Clin. Pathol.*, 29 :305-308.
- SCHWARZ, H.; SCHIRMER, H.K.A.; POST, B. & EHLERS, B., 1969. Correlation of *Escherichia coli* occurring simultaneously in the urine and stool of patients with clinically significant bacteriuria: serotyping with group-specific O antisera. *J. Urol.*, 101 :379-382.
- SELDEN, R.; LEE, S.; WANG, W.L.L.; BENNETT, J.V. & EICKHOFF, T.C., 1971. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as reservoir. *Ann. Intern. Med.*, 74 :657-664.
- SHOOTER, R.A., 1971. Bowel colonization of hospital patients by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Proc. Roy. Med.*, 64 :989-990.
- STAMM, W.E.; WEINSTEIN, R.A. & DIXON, R.E., 1981. Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections. p. 9-13. In: Dixon, R.E., Nosocomial Infections. 1st ed., York Medical Books.
- SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I.R.; RICCIARDI, I.D. & FORMIGA, L.C.D., 1977. Efficacy of some simple methods for long-term preservation of bacterial cultures. *Rev. Microbiol.*, 8 :16-20.
- SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I.R., 1978. Duplo açúcar Uréia Agar (DAU). Um meio de triagem para enterobactérias. Nota Técnica. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, 14 :201-203.
- SZYBALSKI, W., 1952. Gradient plates for study of microbial resistance to antibiotics. *Bact. Proc.*, p. 36.
- THOMAS, F.E.; JACKSON, J.T.; MELLY, M.A. & ALFORD, R.H., 1977. Sequential hospital wide outbreaks of resistant *Serratia* and *Klebsiella* infections. *Arch. Intern. Med.*, 137 :581-584.
- VOSTI, K.L.; GOLDBERG, L.M.; MONTO, A.S. & RANTZ, L.A., 1964. Host-parasite interaction in patients with infections due to *Escherichia coli*. I. The sorogrouping of *E. coli* from intestinal and extra intestinal sources. *J. Clin. Invest.*, 43 :2377-2385.