

ESTUDOS SÔBRE A *E. COLI* 0111:B4. I — TIPOS SOROLÓGICOS E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO

Maria Elisa ZULIANI ⁽¹⁾ e Luiz Rachid TRABULSI ⁽²⁾

RESUMO

Foram determinadas as características antigênicas e bioquímicas de 350 amostras da *E. coli* 0111:B4, isoladas em nosso meio entre 1963 e 1968. Das 350 amostras, 349 pertenciam ao subgrupo 0111a111b:B4 e uma ao subgrupo 0111a111c:B4. Quanto aos tipos sorológicos, 272 amostras (77,71% possuíam o antígeno H2, 9 (2,57%) o antígeno H12, 55 (15,71%) foram imóveis e em 13 (3,71%) o antígeno H não foi caracterizado. A única amostra do subgrupo 0111a111c:B4, possuía o antígeno H4. O comportamento bioquímico de todas as amostras foi homogêneo na maioria das provas realizadas. Entretanto, foram observadas algumas diferenças bioquímicas entre as amostras possuindo o antígeno H2 e aquelas possuindo o antígeno H12. As amostras do tipo 0111a111b:B4:H2 caracterizaram-se por fermentar a sacarose e a rafinose e por utilizarem o ácido fenil-propiónico; por sua vez, as do tipo 0111a111b:B4:H12 caracterizaram-se por não fermentar os dois açúcares e por não utilizar o ácido fenil-propiónico. As demais amostras do subgrupo 0111a111b:B4, apresentaram comportamento bioquímico semelhante ao apresentado por um ou outro dos tipos sorológicos mencionados. Entre as 55 amostras imóveis, 54 tiveram comportamento idêntico ao da *E. coli* 0111a111b:B4:H2 e uma ao da *E. coli* 0111a111b:B4:H12. Quanto às amostras cujos antígenos H não foram caracterizados, todas comportaram-se como a *E. coli* 0111a111b:B4:H2. A única amostra do subgrupo 0111a111c:B4, não utilizou o ácido fenil-propiónico. Com relação às provas de descarboxilação de aminoácidos, a única diferença registrada diz respeito a não descarboxilação da arginina e ornitina pelas amostras da *E. coli* 0111a111b:B4:H12, em 24-48 horas. Os resultados são discutidos.

INTRODUÇÃO

O grupo antigênico *E. coli* 0111:B4, encerra dois subgrupos, 0111a111b:B4 e 0111a111c:B4. O primeiro subgrupo corresponde a *E. coli* 0111:B4, caracterizada por KAUFFMAN & DUPONT⁹, inicialmente isolada de crianças com enterite por BRAY¹ e denominada *Bacterium coli neapolitanum*. O subgrupo possuindo os antígenos 0111a111c:B4 foi caracterizado por EWING & col.⁹, ten-

do sido isolado das fezes de macacos com enterite. Enquanto todas as amostras do último subgrupo têm se mostrado imóveis, no primeiro, os seguintes antígenos H já foram caracterizados: H2, H4, H6, H11, H12, H16, H21, H25, H27 e H40⁴.

Desde os estudos iniciais de BRAY¹ e de outros Autores^{2,3}, tornou-se evidente que a *E. coli* 0111:B4 apresentava comportamento

Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz)

(1) Professor-Assistente-Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

(2) Professor de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

bioquímico diferente daquele comumente visto nos demais grupos sorológicos da *E. coli*, uma vez que tôdas as amostras fermentavam a sacarose e a salicina. Posteriormente, verificou-se que o tipo sorológico possuindo o antígeno H2, diferia daquele possuindo o antígeno H12, pois o primeiro fermentava a sacarose e utilizava o ácido fenil-propiónico, o mesmo não acontecendo com o último. As amostras imóveis podiam apresentar comportamento de um ou de outro tipo sorológico^{9, 10, 11}. Outras diferenças menos constantes também foram observadas e, mais recentemente, RICHARD¹² demonstrou que de 71 amostras da *E. coli* 0111:B4 possuindo diferentes antígenos H, somente aquelas portadoras do antígeno H2 e uma imóvel, foram capazes de descarboxilar a ornitina. Além da diferença entre tipos sorológicos, tem sido possível caracterizarem-se variedades bioquímicas dentro de alguns déles^{10, 11}.

A grande importância da *E. coli* 0111:B4 como causa de enterite infantil, dispensa qualquer comentário. Revisões extensas podem ser encontradas^{2, 18}. Em nosso meio, vários trabalhos demonstram que esta bactéria é uma das mais freqüentes na enterite de crianças durante o primeiro ano de vida^{13, 14, 15}, além de representar cerca de 60% dos colibacilos enteropatogênicos¹⁷.

No presente trabalho apresentamos os resultados de estudos sorológicos e bioquímicos realizados com 350 amostras de *E. coli* 0111:B4, isoladas em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

1) *Amostras* — Foram estudadas 350 amostras, isoladas das fezes de crianças, entre 1963 e 1968. Destas, 342 foram isoladas em São Paulo (capital e interior) e oito enviadas pela Dra. Diva Montenegro, do Hospital Pedro II, de Recife. Tôdas as amostras foram mantidas em tubos de ágar nutriente, fechados com rôlhas de cortiça parafinada, em temperatura ambiente e protegidos da luz até o momento do estudo.

2) *Soros* — Foram utilizados os seguintes: 0111a111b:B4, 0111a111b e os fatores 0111b e 0111c, bem como os soros flagelares H1 a H49. Com exceção de alguns so-

ros H, fornecidos pelo "Communicable Disease Center, Atlanta, Ga", todos os demais foram preparados em nossos laboratórios, seguindo-se as recomendações de EDWARDS & EWING⁴. Antes do uso foram avaliados, utilizando-se as amostras padrão indicadas⁷.

3) *Determinação das características antigênicas* — O seguinte esquema foi observado: a partir do estoque em ágar nutriente, semeou-se uma placa de ágar MacConkey, transferindo-se, em seguida, uma mesma colônia para dois tubos de ágar inclinado e um tubo de ágar semi-sólido (0,4%). Após incubação a 37°C por 18-20 horas, colhia-se o crescimento de um dos tubos de ágar inclinado em solução fisiológica e fazia-se aglutinação em lâmina, inicialmente com o soro 0111a111b:B4 e, em seguida, com o soro 0111a111b. A suspensão era aquecida por 15 minutos em água fervente e, novamente aglutinada com os soros já mencionados e com os soros contendo os fatores 0111b e 0111c. Depois da aglutinação em lâmina, a suspensão era diluída (até se obter densidade correspondente ao tubo 3 da escala de Mac Farland), aquecida a 100°C durante uma hora, formolada e usada para aglutinação em tubo. Preparava-se a diluição em série do soro 0 indicado (1:20 a 1:5.120), adicionando-se, em seguida, a cada tubo, 0,5 ml da suspensão. Após incubação em banho-maria a 48°C durante 16-18 horas era feita a leitura. Se a amostra em estudo aglutinasse no mesmo título que a cultura usada no preparo do soro 0, considerava-se aquela do mesmo grupo sorológico que esta. O ágar semi-sólido era mantido a 37°C durante 7 dias, fazendo-se leituras diárias. Se durante este período a amostra permanecia somente no local da picada, era considerada imóvel. Ao contrário, se o crescimento se difundia no ágar, a cultura era considerada móvel, sendo então preparada para identificação do antígeno H. O preparo consistia em passagens sucessivas em ágar semi-sólido (em média cinco) com posterior inoculação de caldo nutriente que, após incubação e adição de formalina, passava a ser o antígeno. A identificação dos antígenos H foi feita por aglutinação em tubo, usando-se, inicialmente, soros polivalentes e, em seguida, os monovalentes indicados, na diluição 1:500 e 1:1000, respectivamente. Completada a identificação so-

rológica, novo estoque era preparado a partir do segundo tubo de ágar inclinado. O estoque era mantido, para os estudos bioquímicos, conforme descrevemos anteriormente. A determinação dos antígenos H foi feita seguindo-se as recomendações de EWING & col. ⁷.

4) *Determinação das características bioquímicas* — Os meios de cultura foram preparados e as provas realizadas e lidas de acordo com as recomendações do Comité de Enterobactérias ⁵ e de EDWARDS & EWING ⁴. Seguindo-se estas normas, foram feitas as seguintes provas: indol, vermelho de metila (VM) Voges-Proskauer (VP), cianeto de potássio, citrato de Simmons, citrato de Christensen, gelatinase, fenil-alanina e urease, bem como as provas de fermentação dos seguintes carboidratos: rafinose, ramnose, sorbitol, xilose, arabinose, galactose, dulcitol, salicina, trealose, inositol, manose, melicito-se, celobiose, adonitol, sorbose, manitol, lactose, sacarose, maltose e glicose. Estas foram feitas usando-se caldo contendo Indicador de Andrade (Andrate Peptone Water-Oxoid), como meio básico e os carboidratos na concentração de 1%.

A prova de acetato foi realizada de acordo com o trabalho de TRABULSI & EWING ¹⁶.

A reação fenil-propionica (F.P.) ou Teste d'Alessandro foi feita seguindo-se as recomendações do Autor ³: adicionava-se ao ágar nutriente Oxoid, o ácido beta-fenil-propionico na concentração final de 1:5000, o meio sendo distribuído em placas. A sementeira era feita a partir de um caldo de 24 horas, sobre a superfície do ágar, em pequenos círculos de 1 cm de diâmetro e a leitura após 24 horas de incubação a 37°C. Se a reação era negativa ou fracamente positiva, o meio era deixado em temperatura ambiente, fazendo-se leituras diárias, durante 5 dias.

As provas de descarboxilação da lisina, arginina e ornitina foram verificadas no meio de FALKOW ⁴ e no meio proposto por RICHAD ¹², que é o mesmo meio de Falkow sem peptona. Apenas 160 amostras foram estudadas.

RESULTADOS

1) *Características antigênicas* — Na Tabela I encontram-se os resultados dos exames sorológicos realizados com as 350 amo-

TABELA I

Tipos sorológicos da *E. coli* 0111:B4

Tipos sorológicos	N.º	%
<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:H2	272	77,71
<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:H12	9	2,57
<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:I	55	15,71
<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:H-	13	3,71
<i>E. coli</i> 0111a111c:B4:H4	1	0,30
Total	350	

tras inicialmente classificadas como *E. coli* 0111:B4. Com exceção de uma amostra que foi colocada no subgrupo 0111a111c, todas as demais pertenciam ao subgrupo 0111a111b. Tanto nestas como naquela foi encontrado o antígeno B4 em quantidade suficiente para impedir a aglutinação pelo soro 0.

Quanto aos tipos sorológicos verificou-se que:

- 272 amostras (77,71%) pertenciam ao tipo 0111a111b:B4:H2;
- nove (2,57%) ao tipo 0111a111b:B4:H12;
- 55 (15,71%) eram imóveis;
- em 13 (3,71%) não foi caracterizado o antígeno H;
- a única amostra do subgrupo 0111a111c, possuía o antígeno H4.

2) *Características bioquímicas* — Com relação à maioria das provas, as amostras dos diferentes tipos sorológicos, apresentaram comportamento homogêneo. Foram VM positivas, VP negativas, não cresceram em presença de cianeto de potássio, não utilizaram o citrato de Simmons, não hidrolizaram a gelatina e não formaram ácido fenil-pirúvico a partir da fenil-alanina. Utilizaram o acetato como fonte única de carbono e o citrato de sódio, no meio de Christensen. Não hidrolizaram a uréia. Fermentaram, no período de observação, os seguintes carboidratos: glicose, lactose, manitol, sorbitol, xilose, arabinose, galactose, trealose, manose e maltose. Dei-

xaram de fermentar o adonitol, inositol, melicitose, sorbose e celobiose. A fermentação do dulcitol foi variável com relação as amostras de todos os tipos.

Na Tabela II encontram-se os resultados das provas do indol, fenil-propionico e de fermentação da rafinose, ramnose, salicina e sacarose. Conforme se deprende, tôdas as amostras do tipo 0111a111b:B4:H2 fermentaram a ramnose e utilizaram o ácido beta-fenil-propionico. Apenas duas amostras não produziram indol e duas outras não fermentaram a sacarose e a rafinose. Quanto à salicina, das 272 amostras, 17 não a fermentaram.

Com relação ao tipo 0111a111b:B4:H12 tôdas as amostras produziram indol, fermentaram a salicina, não utilizaram o ácido beta-fenil-propionico e deixaram de fermentar a rafinose e sacarose. Quanto a ramnose cinco das nove amostras a fermentaram.

No que diz respeito as 55 amostras do tipo 0111a111b:B4:I, observa-se que tôdas produziram indol e fermentaram a ramnose. Apenas uma amostra não fermentou a rafinose, a sacarose, salicina e não utilizou o ácido beta-fenil-propionico. Quanto à salicina, 11 amostras não a fermentaram além da mencionada.

As amostras cujo antígeno H não foi determinado, comportaram-se de modo semelhante a *E. coli* 0111a111b:B4:H2. Uma deixou de produzir indol e outra não fermentou a salicina.

A *E. coli* 0111a111c:B4:H4 não apresentou características particulares, com exceção da não utilização do ácido beta-fenil-propionico.

Os resultados das provas de descarboxilação da lisina, arginina e ornitina encontram-se na Tabela III. Com exceção da não descarboxilação imediata da arginina e ornitina pela *E. coli* 0111a111b:B4:H12 o comportamento de tôdas as amostras foi semelhante.

DISCUSSÃO

Os resultados do exame sorológico demonstram extensa predominância da *E. coli* 0111a111b:B4:H2 em nosso meio, êste tipo representando quase 78% das 350 amostras investigadas. Assim a elevada frequência desta *E. coli* parece ser universal, sendo interessante notar que a frequência registrada por nós é praticamente idêntica à referida por outros Autores. LE MINOR & col.¹¹, estudan-

TABELA II

Características bioquímicas dos tipos sorológicos da *E. coli* 0111:B4

	<i>E. coli</i>				<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i>			<i>E. coli</i>			<i>E. coli</i>
	0111a111b: B4:H2				0111a111b: B4:H12		0111a111b: B4:I			0111a111b: B4:H-			0111a111c: B4:H4
	1	2	3	4	1	2	1	2	3	1	2	3	1
Indol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Rafinose	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Ramnose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Sacarose	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
F.P.	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
N.º amostras ..	251	2	17	2	5	4	43	11	1	11	1	1	1
Total	272				9		55			13			1

+ = Positivo em 24-48 horas

- = Negativo em 30 dias de observação

TABELA III

Reação de descarboxilação da lisina, arginina e ornitina dos tipos sorológicos da *E. coli* 0111:B4 *

		<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:H2				<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:H12				<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:I				<i>E. coli</i> 0111a111b:B4:H-				<i>E. coli</i> 0111a111c:B4:H4			
		+	(+)	×	-	+	(+)	×	-	+	(+)	×	-	+	(+)	×	-	+	(+)	×	-
		Lisina	c/peptona	114	9	2	0	8	1	0	0	17	1	0	0	6	1	0	0	1	0
s/peptona	108		5	2	10	8	1	0	0	14	1	0	3	6	1	0	0	1	0	0	0
Arginina	c/peptona	27	70	28	0	0	5	3	1	5	9	3	1	2	5	0	0	0	1	0	0
	s/peptona	40	68	10	7	0	7	0	2	5	11	1	1	2	5	0	0	0	1	0	0
Ornitina	c/peptona	115	5	4	1	0	6	1	2	16	1	0	1	4	3	0	0	1	0	0	0
	s/peptona	35	57	11	22	0	4	0	5	6	5	2	5	3	1	0	3	1	0	0	0

- + = Positivo em 24 — 48 horas
 (+) = Positivo em 3 ou 4 dias
 × = Positivo irregular (fraco ou acima de 4 dias)
 — = Negativo em 4 dias de observação
 * = Foram estudadas 160 amostras

do 230 amostras da *E. coli* 0111 isoladas na França e em outros países, verificaram que aquelas possuindo o antígeno H2 ocorriam numa frequência de 79,5%. De maneira semelhante, KAUFFMANN¹⁰, verificou que entre 167 amostras da *E. coli* 0111:B4, existentes no "Centro Internacional de Escherichia" (Copenhague, Dinamarca), 103 ou sejam 77,7%, possuíam também o antígeno H2. Entretanto, devemos salientar que além de amostras possuindo o antígeno H2 e de outras imóveis, tanto LE MINOR & col.¹¹ como KAUFFMANN¹⁰ encontraram amostras possuindo outros antígenos H como: H4, H11, H12 e H21. Conforme se depreende da Tabela I, entre as 350 amostras estudadas por nós, tais tipos sorológicos não foram encontrados, exceção feita daquele caracterizado pelo antígeno H12. A única amostra possuindo o antígeno H4, pertencia ao subgrupo 0111a111c.

A não identificação do antígeno H, em 13 amostras, não implica necessariamente na existência de novos tipos sorológicos. É possível não ocorrer aglutinação visível de colibacilos móveis quando os flagelos são pouco desenvolvidos, ou por outras razões, ainda obscuras. EWING & col.⁸ referem que não lhes foi possível identificar por aglutinação, o antígeno H, de algumas amostras de *E. coli*, embora outros dados sugerissem que tais amostras pertencessem a tipos já conhecidos. Conforme veremos em seguida, é provável estarmos em situação idêntica.

Ainda com relação às características sorológicas das 350 amostras, por nós estudadas, dois fatos devem ser destacados. Primeiro, a presença do antígeno B4 em tôdas, em quantidade suficiente para impedir a aglutinação pelo soro 0, não obstante ter sido de vários anos o tempo de estocagem de muitas amostras. Parece grande e uniforme a estabilidade do antígeno B4, ao contrário do que costuma acontecer com vários outros antígenos somáticos, superficiais ou não. O segundo diz respeito ao encontro de, apenas, uma amostra de *E. coli* 0111a111c, por sinal, possuindo antígeno H não encontrado nas amostras do subgrupo 0111a111b. Além de não podermos atribuir-lhe qualquer papel etiológico, sua raridade sugere pouca importância epidemiológica. Conforme mencionamos, o subgrupo 0111a111c foi encontrado em fezes de macacos com diarreia, tôdas as amostras sendo, entretanto, imóveis⁸. Tanto quan-

to sabemos, sua presença em fezes humanas está sendo registrada pela primeira vez.

A análise dos resultados das provas bioquímicas revelou comportamento homogêneo das 350 amostras na maioria das provas utilizadas. Entretanto, algumas provas permitiram distinguir a *E. coli* 0111a111b:B4:H2 da *E. coli* 0111a111b:B4:H12. Como já demonstrado por outros Autores¹¹, o primeiro tipo sorológico utilizou o ácido beta-fenil-propiónico e, com exceção de duas amostras, fermentou a sacarose. O segundo foi inativo nos dois substratos. Nôvo achado diz respeito à fermentação da rafinose, cujos resultados foram idênticos aos da sacarose. Em conclusão, podemos considerar a *E. coli* 0111a111b:B4:H2 como sendo rafinose +, sacarose + e F.P. + e a *E. coli* 0111a111b:B4:H12, rafinose —, sacarose — e F.P. —.

Extremamente interessantes são os resultados referentes aos tipos imóveis e àqueles cujos antígenos H não foram determinados.

Quanto aos imóveis é evidente a existência de dois tipos bioquímicos, um idêntico à *E. coli* 0111a111b:B4:H2 e outro à *E. coli* 0111a111b:B4:H12. Sendo a frequência dos dois tipos aproximadamente igual àquela encontrada para as amostras com antígenos H2 e H12, parece provável que estas tenham dado origem àquelas, por perda dos flagelos¹⁰.

O que foi dito, para as amostras imóveis, parece válido para aquelas cujos antígenos H não foram determinados. De fato, as 13 amostras comportaram-se bioquimicamente de maneira idêntica à *E. coli* 0111a111b:B4:H2. Seriam elas amostras de *E. coli* 0111a111b:B4:H2 cujos antígenos H não puderam ser aglutinados? É interessante notar que entre as amostras estudadas por LE MINOR¹¹, somente aquelas possuindo o antígeno H2 foram capazes de utilizar o ácido beta-fenil-propiónico.

As variações relativas à prova do indol, fermentação da salicina e ramnose têm sido referidas por outros Autores. O eventual valor destas provas, bem como das outras na caracterização de tipos bioquímicos dentro de cada tipo sorológico é evidente também na Tabela II.

Quanto à descarboxilação da ornitina (Tabela III) nossos resultados não confirmam

inteiramente os obtidos por RICHARD¹². O meio de Falkow sem peptona não apresentou vantagens sobre o mesmo meio com peptona. Além disto, muitas amostras da *E. coli* 0111a111b:B4:H2 não descarboxilaram o aminoácido no meio sem peptona e várias tiveram comportamento irregular no meio com peptona. Por outro lado, as amostras da *E. coli* 0111a111b:B4:H12 descarboxilaram a ornitina depois de 48 horas. Em todo o caso a prova positiva em 24-48 horas poderia ter algum valor na distinção dos dois tipos sorológicos. Aliás, valor idêntico poderia ter a prova da arginina, fato não verificado segundo nos consta. O estudo dos três aminoácidos, nos dois tipos de meio utilizados, não nos trouxe nenhuma outra informação de valor prático.

SUMMARY

Studies on E. coli 0111:B4. I — *Serological types and biochemical characteristics*

The serological and biochemical characteristics of 350 strains of *E. coli* 0111:B4 isolated from human feces in Brazil, between 1963 and 1968, were determined. With the exception of one strain that proved to belong to the subgroup 0111a111c:B4, all the others strains proved to belong to subgroup 0111a111b:B4. Of the strains belonging to the last subgroup, 272 (77.71%) had the H2 antigen, 9 (2.57%) the H12 antigen and 55 (15.71%) were non-motile. In 13 strains (3.71%) the H antigen could not be determined. The only strain of the subgroup 0111a111c:B4 had the H4 antigen (Table I).

The biochemical behaviour of all the strains was homogenous in most of the tests used. However, the strains of the serological type 0111a111b:B4:H2 presented a different biochemical behaviour when compared with those of the 0111a111b:B4:H12 serotype, in regard to some tests. Thus, sucrose and raffinose were fermented and the phenil-propionic acid was utilized by serotype 0111a111b:B4:H2 and not fermented or utilized by serotype 0111a111b:B4:H12; of the 55 non-motile strains, 54 presented biochemical behaviour identical with serotype 0111a111b:B4:H2 and one identical with serotype 0111a111b:B4:H12. The strains whose H antigen could not be determined were identical with

serotype 0111a111b:B4:H12 in regard to the biochemical characteristics. The only strain of the 0111a111c:B4 subgroup, did not utilise the phenil-propionic acid. Some differences in the biochemical behaviour of strains into serotype 0111a111b:B4:H2 and 0111a111b:B4:H12 were also observed (Table II).

The decarboxilase reactions of lysine, arginine and ornithine in two culture media showed that serotype 0111a111b:B4:H12 was not capable of decarboxilating those aminoacids in 24-48 hours (Table III). The results are discussed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAY, J. — Isolation of antigenically homogenous strains of *Bacterium neapolitanum* from summer diarrhea of infants. *J. Path. Bact.* 57:239-247, 1945.
2. BRAUN, O. H. — Das problem der Pathonität von *Escherichia coli* in Säuglingsalter. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk, Neue Folge* 4:92-194, 1953.
3. D'ALESSANDRO, G. & GOMES, R. — La reazione dell'acido fenil propionico reazione metabolica caratteristica di alcuni gruppi di *Shiegelle*. *Bol. I. S. M.* 31:291-300, 1952.
4. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — *Identification of Enterobacteriaceae*. Minneapolis, Burgess, 1962.
5. ENTEROBACTERIACEZE SUBCOMMITTEE — Report of the Enterobacteriaceae Subcommittee of the nomenclature committee of the International Association of Microbiological Societies. *Intern. Bull. Bact. Nomen. Tax.* 8:17-23, 1958.
6. EWING, W. H.; GALTON, M. M. & TANNER, K. E. — *Escherichia coli* 0111a, 111c:B4. A new serotype isolated from monkeys. *J. Bact.* 69:549-551, 1955.
7. EWING, W. H.; TATUM, H. W.; DAVIS, B. R. & REAVIS, R. W. — Studies on the serology *Escherichia coli* group. Communicable Disease Center (C.D.C.), Atlanta, Ga., August, 1956.
8. EWING, W. H.; TATUM, H. W. & DAVIS, B. R. — The occurrence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease in the United States. *Pub. Health Lab.* 15: 118-138, 1957.
9. KAUFFMANN, F. & DUPONT, A. — *Escherichia coli* strains from infantile epidemic gastro-enteritis. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 27:552-564, 1950.

10. KAUFFMANN, F. — *Bakteriologie der Escherichia coli — enterites*. In ADAM, A. (ed.) — Saülings. Stuttgart, George Thieme, 1956, pp. 1-40.
11. Le MINOR, S.; Le MINOR, L.; NICOLLE, P. & BUTTIAUX, R. — Études sur les *Escherichia coli* isolées au cours des gastro-entérites infantiles. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) 86:204-226, 1954.
12. RICHARD, C. — Intéret de la recherche de l'ornithine décarboxilase chez les *Escherichia coli* de gastro-entérite infantile. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) 110:114-119, 1966.
13. SERRANO, J. A. & TRABULSI, L. R. — Observações sobre a frequência de isolamento de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica das fezes de crianças com diarréia aguda, na cidade de São Paulo. *Arq. Gastroent.* 3:221-225, 1966.
14. SIMPÓSIO SOBRE DIARRÉIAS AGUDAS E ENTERO-INFEÇÕES NA INFÂNCIA. *Pediat. Prat.* 36:355-380, 1965.
15. TAUNAY, A. de E.; MARTINS, H.; TOPOROWSKI, J.; TOLEDO, L. A. & PEIXOTO, E. S. — Investigações laboratoriais sobre a enterite infantil por *E. coli* G.E.I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* (São Paulo) 18:45-82, 1958.
16. TRABULSI, L. R. & EWING, W. H. — Sodium acetate medium for the differentiation of *Shigella* and *Escherichia coli* cultures. *Pub. Health Lab.* 20:137-140, 1962.
17. TRABULSI, L. R. — Enterobactérias patogênicas para o intestino do homem. *J.B.M.* 10:556-563, 1966.
18. TRABULSI, L. R. & MURAHOVSKI, J. — Enterites por colibacilos. *Arq. Gastroent.* 3:37-52, 1966.

Recebido para publicação em 26/3/1969.