

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DO SUCO DUODENAL E DAS FEZES DE 67 CRIANÇAS DIARRÉICAS^d

Vera Lúcia Cortez Mostaço^a
Luiz Rachid Trabulsi^b
Ulysses Fagundes Neto^c

RESUMO

O suco duodenal e as fezes de 67 crianças diarréicas foram estudados simultaneamente, com o objetivo de verificar quais os enteropatógenos que poderiam colonizar o intestino delgado, durante um estágio diarréico.

O suco duodenal foi obtido através de intubação naso-duodenal com sonda nasogástrica estéril. Ambos os materiais foram estudados microbiologicamente através de métodos convencionais, fazendo-se também a contagem de colônias/ml para o líquido intestinal.

Obtivemos resultados positivos em 9 (13,43%) das 67 culturas de suco duodenal e em 42 (62,69%) das 67 coproculturas.

Somente dois dos microrganismos que colonizam o intestino delgado foram isolados do suco duodenal, isto é, *Escherichia coli* enteropatógena clássica (EPEC) e *Salmonella*.

EPEC foi enteropatógeno isolado mais frequentemente, tanto do suco duodenal, em 7 casos (10,45%), quanto das fezes, em 23 casos (34,33%). Os sorogrupos O55 e O111 foram os mais freqüentes.

O não isolamento de outros enteropatógenos do suco duodenal poderia ser atribuído ao nível do intestino delgado, onde se procedeu a coleta, bem como ao estágio em que se encontrava a diarréia.

A ausência de outros germes do suco duodenal não indica que estes não colonizem o intestino delgado, em algum dos seus vários níveis anatômicos.

PALAVRAS-CHAVE: Intestino delgado; Colonização do duodeno; Microrganismos enteropatógenos.

1 - INTRODUÇÃO

A doença diarréica, em especial a gastroenterite, é considerada uma das principais causas de mortalidade de crianças entre 0 e 5 anos de idade. A população infantil afetada pela diarréia, principalmente a diarréia aguda, caracteriza-se pelo seu baixo nível sócio-econômico e de higiene existentes nos países, subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde vivem^{9, 12, 24, 30}.

Nos últimos anos, tem sido atribuída grande importância ao estudo da colonização do intestino delgado por parte de bactérias pertencentes à microflora intestinal, mas principalmente da colonização e isolamento de agentes reconhecidamente enteropatógenos, para se determinar o papel desses agentes na gênese da diarréia, já que em inúmeros casos não é possível o isolamento de qualquer agente nas fezes de indivíduos portadores de diarréia aguda^{2, 5, 9, 11, 12, 15, 20}.

Os microrganismos que causam doença diarréica têm afinidades específicas para colonizar o intestino em seus diferentes segmentos anatômicos e produzir seus efeitos patogênicos. Alguns enteropatógenos podem colonizar o intestino delgado, outros, o intestino grosso, e outros, ainda, podem colonizar tanto o intestino delgado, quanto o intestino grosso³⁴.

Alguns estudos demonstraram que as enterobactérias, principalmente alguns cepas de *Escherichia coli* enteropatógena clássica, são os microrganismos mais frequentemente isolados no intestino delgado em crianças portadoras de síndrome diarréica^{10, 15, 17, 26}.

Apesar de a diarréia predominar entre as doenças que ocorrem na infância, até agora não foram realizados muitos estudos detalhados sobre a microflora no intestino delgado, durante o estágio diarréico^{9, 12}.

Considerando que os dados existentes, além de raros, são

Recebido em 16/11/87

^a Setor de Microbiologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná - CCS/UUEL

^b Departamento de Microbiologia - Escola Paulista de Medicina/São Paulo.

^c Departamento de Pediatria - Escola Paulista de Medicina/São Paulo.

^d Este trabalho é a reprodução parcial da tese de Mestrado da Dra. Vera Lúcia Cortez Mostaço, realizado no Departamento de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina, com apoio financeiro da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior.

Os autores agradecem à CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento do pessoal de Nível Superior, pela ajuda financeira; à Fundação Universidade Estadual de Londrina, por permitir a realização deste trabalho e à equipe do Prof. Ulysses Fagundes Neto, pela valiosa ajuda na coleta do material.

incompletos, pois tratam somente de um ou outro enteropatógeno isoladamente, ou referem-se somente à microflora do intestino delgado, ou apenas à coprocultura^{5, 9}, realizamos este estudo bacteriológico do líquido intestinal, simultaneamente com a cultura de fezes, em crianças com diarreia aguda e protraída, no sentido de verificar quais os enteropatógenos que colonizam o intestino delgado superior em diferentes estágios do período diarréico.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 67 pacientes de ambos os sexos, com idade compreendida entre 1 a 24 meses, durante o período de julho de 1983 a março de 1985, portadores de diarreia aguda ou protraída, internados no Departamento de Pediatria do Hospital Umberto I (ex: Hospital Matarazzo, São Paulo-S.P.).

A diarreia aguda foi considerada como um processo síndromico de má absorção de água e eletrólitos, que acarreta depleção hidrossalina com duração inferior a duas semanas. A diarreia protraída foi considerada como um processo síndromico de evolução superior a suas semanas, acometendo crianças menores de um ano, provocando sério agravo nutricional e risco de vida.

A secreção duodenal foi obtida por intubação intestinal, utilizando-se sonda nasogástrica estéril, após jejum de pelo menos seis horas, de acordo com o método descrito por TOCCALINO & FAGUNDES NETO²⁹. A porção do duodeno adotada como referência para a coleta foi a 3ª porção ou, no máximo, 20cm abaixo do ligamento de Treitz (4ª porção).

A secreção duodenal e as fezes foram colhidas em recipientes estéreis e enviados imediatamente ao laboratório para o processamento das amostras; não foi utilizada solução conservadora no transporte das fezes. Agentes virais causadores de processos diarréicos não foram pesquisados neste estudo.

Processamento laboratorial das fezes e da secreção duodenal

Aproximadamente 1 g de fezes foi suspensa em 3 ml de solução salina fisiológica estéril; 0,01ml da secreção duodenal e 1 alçada da suspensão de fezes foram semeadas nos meios de isolamento: ágar MacConkey (MC), ágar *Salmonella Shigella* (SS), caldo tetracionato e em meio específico para bactérias do gênero *Campylobacter*, Skirrow modificado (SKM) (Probac). Após incubação de 18 a 24 horas a 37°C, uma alçada do caldo tetracionato foi inoculado em ágar Verde-Brilhante (VB), seletivo para o gênero *Salmonella*, e este, incubado durante 18 a 24 horas a 37°C.

3 - IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

3.1- Identificação bioquímica

A partir do crescimento nos meios de isolamento MC, SS e VB, foram selecionadas colônias que apresentavam características morfológicas diferentes, fermentadoras ou não de lactose. Uma colônia de cada tipo morfológico foi inoculada nos meios de identificação bioquímica EPM (31), MILI (32) e citrato de Simmons, sendo estes incubados a 37°C durante 18 a 24 horas.

O resultado das reações apresentadas permitiu a identificação do gênero e espécies bacterianas das colônias inoculadas. A identificação sorológica com anti-soros específicos

foi realizada quando se necessitou de confirmação para determinada espécie ou do sorogrupo.

3.2-Identificação sorológica para *Escherichia coli*

As colônias identificadas bioquimicamente como *E. coli* foram submetidas à identificação sorológica a partir do meio EPM. Essa identificação foi realizada através de testes de aglutinação em lâminas, com anti-soros polivalentes e monovalentes OK (Probac) contra os diferentes sorogrupos clássicos e invasores para a confirmação definitiva do sorogrupo.

As aglutinações positivas com anti-soros monovalentes, tanto para amostras de *E. coli* enteropatogênica clássica como para amostras invasoras de *E. coli*, foram confirmadas através do teste de aglutinação quantitativa em tubo (titulação), utilizando-se anti-soros "O" e antígenos aquecidos a 100°C durante uma hora. O preparo dos anti-soros, a execução e leitura do teste acima descrito foram realizados seguindo as recomendações de EDWARDS & EWING⁷.

3.3-Pesquisa de enterotoxinas

Amostras de *E. coli* consideradas negativas na sorologia com anti-soros polivalentes clássicos e invasores foram testadas quanto à produção de enterotoxinas. Para pesquisa de enterotoxina termoestável (ST) foi realizado o teste que utiliza camundongos recém-nascidos descrito por DEAN et alii⁶.

Para a pesquisa de enterotoxina LT foi realizado o método de imuno-hemólise passiva (PIH), descrito por EVANS & EVANS⁸, modificado por RAMOS²².

3.4-Teste de invasão

Amostras invasoras de *E. coli* foram submetidas ao teste de invasão em olho de cobaia (teste de Serény), conforme técnica descrita por TRABULSI³³.

3.5-Pesquisa do gênero *Shigella*

Amostras identificadas bioquimicamente como *Shigella* foram submetidas a testes de aglutinação em lâmina, com anti-soros (Probac), contra as quatro espécies do gênero *Shigella*.

3.6-Pesquisa do gênero *Salmonella*

Amostras identificadas bioquimicamente como *Salmonella* foram submetidas a testes de aglutinação em lâmina, utilizando-se anti-soros somáticos "O" e anti-soros flagelares "H" (Probac).

3.7-Pesquisa do gênero *Campylobacter*

As placas de SKM semeadas com a suspensão de fezes e a secreção jejunal, foram examinadas para se verificar a presença de colônias suspeitas de *Campylobacter*. Partindo-se dessas colônias foi feito um esfregaço em lâmina, corado com fucsina por um minuto. A observação, ao microscópio óptico em imersão, de bacilos gram-negativos afilados, em forma de "S" ou em forma de "asa de gaivota" era indicativa de bactérias pertencentes ao gênero *Campylobacter*. A

identificação definitiva, quando necessária, foi realizada de acordo com a técnica de SKIRROW & BENJAMIN²⁵ e FERNANDEZ¹³.

4-RESULTADOS

Em 67 casos estudados obtivemos resultados positivos em 9 casos (13,43%) dos 67 cultivos de suco entérico e em 42 casos (62,68%) dos 67 coprocultivos.

TABELA 1

Frequência de enteropatógenos no suco entérico e nas fezes de 67 crianças com diarreia

Material	Nº casos estudados	Casos positivos	
		Nº	%
Suco entérico	67	9	13,43
Fezes	67	42	62,69

Os microrganismos enteropatógenos isolados dos cultivos de suco entérico foram: *E. coli* enteropatógena em sete casos (10,44%) e *Salmonella* em dois casos (2,98%). Nas coproculturas os microrganismos isolados foram: *E. coli* enteropatógena (EPEC) em 23 casos (34,32%), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) em dois casos (3,98%), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) em oito casos (11,93%), *Shigella* em apenas um caso (1,49%), *Salmonella* em 17 casos (25,37%) e *Campylobacter* em quatro casos (5,97%).

TABELA 2

Frequência dos diferentes enteropatógenos nas 67 culturas de suco entérico e fezes

Enteropatógenos	Suco entérico		Fezes	
	Nº casos positivos	%	Nº casos positivos	%
<i>E. coli</i> enteropatógena	7	10,45	23	34,33
<i>E. coli</i> enteroinvasora	0	—	2	2,98
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	0	—	8*	11,94
<i>Shigella</i>	0	—	1	1,49
<i>Salmonella</i>	2	2,98	17	25,37
<i>Campylobacter</i>	0	—	4	5,97
Total	9	13,43	55**	82,08

* = das 8 amostras de *E. coli* enterotoxigênicas, uma delas pertence ao sorogrupo 0128ac de *E. coli* enteropatógena, mas é produtora de enterotoxina termo-estável (ST).

** = Inclui 11 infecções mistas.

Os sorogrupos de EPEC isolados dos cultivos do suco entérico foram: EPEC 0111 (2,98%) e EPEC 055 (4,47%). Os sorogrupos de EPEC mais frequentemente isolados dos coprocultivos foram: EPEC 0111 (10,44%), EPEC 055 (10,44%) e EPEC 0119 (4,47%).

TABELA 3

Sorogrupos de *E. coli* enteropatógena isolados das 67 culturas de suco entérico e fezes

Sorogrupos	Suco entérico		Fezes	
	Nº amostras	%	Nº amostras	%
026	0	—	1	1,49
055	3	4,48	7	10,45
0111	2	2,98	7	10,45
0114	1	1,49	1	1,49
0119	1	1,49	3	4,48
0126	0	—	1	1,49
0127	0	—	1	1,49
0128	0	—	1	1,49
0158	0	—	1	1,49
Total	7	10,44	23	34,32

A frequência de ETEC isoladas dos coprocultivos foi de 11,94% (8 amostras). Os fenótipos apresentados pelas amostras de ETEC isoladas foram: ST⁺/LT⁻ em cinco casos (7,46%) e ST⁻/LT⁺ em três casos (4,48%). Amostras apresentando fenótipo ST⁺/LT⁻ não foram isoladas dos coprocultivos.

TABELA 4

Fenótipos de *E. coli* enterotoxigênica isolados das 67 culturas de fezes

Fenótipos	Fezes	
	Nº amostras	%
ST ⁺ /LT ⁻	5	7,46
ST ⁻ /LT ⁺	3	4,48
Total	8	11,94

A frequência de isolamento de amostras de EIEC dos coprocultivos foi de 2,98%. Quanto aos sorogrupos isolados, estes foram: EIEC 028ac (1,49%) e EIEC 0152 (1,49%). Somente uma amostra do gênero *Shigella* (1,49%) foi isolada dos coprocultivos, pertencente à espécie *Shigella flexneri*. A frequência de isolamento de *Campylobacter* nos coprocultivos foi de 5,97% (quatro casos).

A frequência de isolamento e os sorotipos de *Salmonella* isolados dos cultivos de suco entérico e dos coprocultivos podem ser vistos na Tabela 5. Nos cultivos do suco entérico, das duas amostras de *Salmonella* isoladas, uma (1,49%) pertence ao sorotipo *Salmonella typhimurium* e a outra não teve seu sorotipo determinado. Foi de 16,41% (11 amostras) a frequência com que *Salmonella typhimurium* foi isolada dos coprocultivos, enquanto 6 amostras (8,95%) foram de *Salmonella*, cujo sorotipo não foi determinado.

TABELA 5

Sorotipos de *Salmonella* isolados das 67 culturas de suco entérico e fezes

Sorotipos	Suco entérico		Fezes	
	Nº amostras	%	Nº amostras	%
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	1,49	11	16,42
<i>Salmonella</i> sp*	1	1,49	6	8,95
Total	2	2,98	17	25,37

* *Salmonella* cujo sorotipo não foi possível determinar.

Nos coprocultivos houve a ocorrência de infecções mistas, com frequência de 16,41% (11 casos). O microrganismo mais comumente isolado em associação com outros enteropatógenos foi *Salmonella*, que se encontrava associada com outras bactérias em nove dos 11 casos.

TABELA 6

Frequência de infecções mistas em 67 culturas de fezes

Enteropatógenos associados	Fezes	
	Nº casos	%
EPEC 0111 + <i>Salmonella</i> + <i>Campylobacter</i>	1	1,49
EPEC 0111 + EIEC 0152 + <i>Sh. flexneri</i>	1	1,49
EPEC 0158 + <i>Campylobacter</i>	1	1,49
ETEC (ST) + <i>Salmonella</i>	1	1,49
ETEC (LT) + <i>Salmonella</i>	1	1,49
EPEC 0127 + <i>Salmonella</i>	1	1,49
EPEC 0128 + <i>Salmonella</i>	1	1,49
EPEC 055 + <i>Salmonella</i>	4	5,97
Total	11	16,41

Houve isolamento simultâneo do mesmo enteropatógeno, dos coprocultivos e dos cultivos do suco duodenal, em oito casos (11,92%). Os enteropatógenos isolados nesses casos foram: EPEC pertencente aos sorogrupos O111 (dois casos), O114 (um caso), O119 (um caso), O55 (dois casos) e EPEC, sorogrupos O55, O111 e O119, e *Salmonella*, como grupos de EPEC e sorotipos de *Salmonella* isolados.

As concentrações dos enteropatógenos isolados do suco entérico estão indicadas na Tabela 7. Dos nove cultivos positivos, a maioria apresentou concentrações entre 10^3 e 10^4 microrganismos/ml ou superiores a 10^5 microrganismos/ml de suco duodenal.

TABELA 7
Concentrações dos enteropatógenos no suco entérico

Enteropatógenos	Nº amostras	Nº casos				Total
		< 10^3	$10^3 - 10^4$	$10^4 - 10^5$	> 10^5	
EPEC O55	3	0	1	1	1	3
EPEC O111	2	0	0	0	2	2
EPEC O114	1	0	0	0	1	1
EPEC O119	1	0	1	0	0	1
<i>Salmonella</i> sp.	2	1	1	0	0	2
Total	9	1	3	1	4	9

5 - DISCUSSÃO

Apesar de a doença diarreica se constituir na principal causa de mortalidade de crianças entre 0 e 5 anos, nos países subdesenvolvidos, onde as condições sócio-econômicas e de higiene são precárias, pouco conhecimento se dispõe a respeito da colonização do intestino delgado por agentes enteropatógenos e qual o seu verdadeiro papel desempenhado durante um episódio diarreico^{9, 24, 26, 30}.

No presente estudo procuramos isolar agentes enteropatógenos na secreção duodenal, em crianças portadoras de diarreia aguda e protraída, correlacionando esses achados com os microrganismos enteropatógenos isolados das fezes dessas mesmas crianças.

Com base no fato de que os microrganismos têm afinidades específicas para colonizar determinados locais do trato intestinal e produzirem seus efeitos patogênicos³⁴, verificamos em nosso trabalho que somente dois dos microrganismos que colonizam o intestino delgado foram isolados do suco duodenal das 67 crianças estudadas, ou seja, *Escherichia coli* enteropatógena clássica (EPEC) em 7 casos e *Salmonella* em 2 casos.

Outros enteropatógenos, tais como *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Campylobacter*, foram colonizar o intestino delgado. Esses microrganismos foram isolados anteriormente por STINTZING & MOLLBY²⁶ e FERNANDEZ et alii¹⁴, respectivamente.

Com relação à etiologia, chama a atenção a presença de EPEC, sorogrupos O55, O111 e O119, e *Salmonella*, como agentes mais frequentemente isolados, tanto nas culturas do líquido intestinal quanto nas culturas de fezes^{1, 4, 17, 19, 21, 28, 30}.

Neste trabalho, os resultados estão de acordo com os dados acima citados, quanto a frequência de isolamento, sorogrupos de EPEC e sorotipos de *Salmonella* isolados.

Nos cultivos de secreção duodenal, dos 9 casos com positividade, 7 foram positivos para EPEC, principalmente os sorogrupos O55 e O111, e 2 foram positivos para *Salmonella* uma das quais pertencia ao sorotipo *S. typhimurium*.

Todas as amostras de EPEC e *Salmonella* isoladas dos cultivos de secreção duodenal foram também isoladas das coproculturas, com exceção de uma amostra de EPEC, sorogrupos O55.

Fatores tais como eliminação dos microrganismos, para parte mais baixas do intestino delgado, ocorrida anteriormente ao momento da coleta; afinidade maior dos microrganismos em colonizar segmentos inferiores do intestino delgado (jejuno e ileo) ou mesmo o intestino grosso; ou inibição do crescimento pela flora fecal, poderiam explicar os baixos índices, ou o não isolamento de enteropatógenos da secreção duodenal, quando comparados à maior frequência de isolamento desses enteropatógenos, dos coprocultivos.

Poderia admitir-se também a possibilidade de que agentes virais fossem os responsáveis pelo processo diarreico.

Com relação aos coprocultivos, obtivemos resultados positivos em 42 (62,69%) dos 67 casos estudados, embora muitos autores^{2, 3, 9, 12, 15} citem o fato de que a maioria dos processos diarreicos ficam sem diagnóstico quanto à etiologia.

Nosso trabalho apresentou a maioria dos coprocultivos (62,69%) com positividade para algum enteropatógeno, de 16,41% (11 casos) sendo a frequência de infecções mistas.

Assim como nos cultivos de secreção duodenal, os microrganismos mais comumente isolados dos coprocultivos foram EPEC, em 23 casos (34,33%) e *Salmonella*, em 17 casos (25,37%).

A literatura^{18, 21, 23, 34} cita maior frequência de isolamento para os sorogrupos O111 e O119 de EPEC e, o sorotipo *S. typhimurium* para o gênero *Salmonella*^{18, 19, 21, 34}.

Nossos dados concordam com os da literatura, quanto ao sorotipo mais frequente de *Salmonella*, pois das 17 amostras isoladas, 11 (16,42%) foram de *S. typhimurium*. Quanto aos sorogrupos de EPEC, os mais comumente isolados foram O55 e O111, em 7 casos cada (10,45%), e o sorogrupos O119, em 3 casos (4,48%).

GUERRANT et alii¹⁶ observaram que a diarreia infantil no Brasil está mais frequentemente associada à ETEC.

Em nosso estudo, porém, amostras de ETEC foram isoladas das fezes em apenas oito casos (11,94%), das quais 7,46% foram amostras produtoras de enterotoxina termoestável (ST) e 4,48% de amostras produtoras de enterotoxina termolábil (LT).

Amostras de *Campylobacter* foram isoladas das fezes com frequência um pouco inferior (5,97%) às citadas por KITAGAWA¹⁸ e FERNANDEZ¹³, de 6,2% e 7,4%, respectivamente.

Amostras de EIEC (*Escherichia coli* estero-invasora) e *Shigella* foram isoladas com baixa frequência, de 2,98% e 1,49% respectivamente, talvez pelo fato de que esses microrganismos sejam mais frequentemente isolados de crianças com idade superior a um ano e de adultos^{5, 21, 27, 34}.

O isolamento de EPEC e *Salmonella* na secreção duodenal é uma evidência de que esses enteropatógenos colonizam o intestino delgado; por outro lado, a ausência de ETEC e *Campylobacter* não indica que esses germes não colonizem o intestino delgado em algum de seus segmentos.

A maioria de enteropatógenos, entretanto, incluindo aqueles com afinidade para colonizar o intestino delgado, podem ser isolados da coprocultura, utilizando-se de métodos apropriados e meio de cultura adequados.

ABSTRACT

The duodenal juice and the stools of 67 diarrheal children were studied with the purpose of checking which of the enteropathogenic microorganisms could colonize the small gut, during the diarrheal stage. The duodenal juice was obtained by sterile nasogastric search. The duodenal juice and the stools were studied microbiologically by conventional methods, and countings of colonies/ml of the intestinal liquid were made.

We found positive results in 9 (13,43%) of the 67 cultures of the duodenal juice and in 42 (62,69%) of the ciprocultures.

Only two of the microorganisms that colonized the small gut, were isolated from the duodenal juice: Classis Enteropatogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Salmonella*.

EPEC was the enteropatogenic microorganisms more frequently isolated from the duodenal juice in 7 cases (10,45%), and from the stools in 23 cases (34,33%). The 055 and the 0111 serogroups were the most frequent.

The non-isolation of others enteropatogenic microorganisms from the duodenal juice could be attributed to the small gut level where the collecting was proceeded, as well to the collecting was proceeded, as well to the evolution stage of the diarrhea.

The absense of others germs of the duodenal juice doesn't indicate that they don't colonize the small gut, in some of its various anatomic levels.

KEY WORDS: Small intestine; Duodenal colonization; Enteropatogenic microorganisms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, M.J.; BHAT, P.; RAGAN, P.P. et alii. Jejunal microbial flora of Southern Indian infants in health and with acute gastroenteritis. *J. Med. Microbiol.*, 11:433-440, 1978.
- BISHOP, R.F.; BARNES, G.L.; TOWLEY, R.R.W. Microbial flora of stomach and small intestine in infantile gastroenteritis. *Acta paediatr. scand.*, 63:418-422, 1974.
- CHALLACOMBE, D.N.; RICHARDSON, J.M.; ROWE, B.; ANDRESON, C.M. Bacterial microflora of the upper gastrointestinal tract in infants with protracted diarrhoea. *Arch. Dis. Childh.*, 49:270-277, 1974.
- CLAUSEN, C.R. & CHRISTIE, D.L. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr.*, 100:358-361, 1982.
- CRAMBLETT, H.G. & SIEWERS, C.M.F. The etiology of gastroenteritis in infants and children, with emphasis on the occurrence of simultaneous mixed viral-bacterial infections. *Pediatrics*, 35:885-898, 1965.
- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3 ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1972.
- EVANS JR., D.J. & EVANS, D.G. Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immunohemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
- FAGUNDES NETO, U. Bacteriologia del tracto digestivo en el niño. *Acta gastroent. latinoam.*, 5:195-212, 1973.
- FAGUNDES NETO, U.; PATRÍCIO, F.R.S.; WEHBA, J.; REIS, M.H.L.; GIANOTTI, O.F.; TRABULSI, L.R. An *E. coli* strain that causes diarrhea by invasion of the small intestine mucosa and induces monosaccharide intolerance. *Arq. of gastroenterol.*, 16, 205, 1979.
- FAGUNDES NETO, U.; REIS, M.H.L.; WEHBA, J.; SILVESTRINI, S.; TRABULSI, L.R. Small bowel bacterial flora in normal and in children with acute diarrhea. *Arq. Gastroenterol.*, 17:103-108, 1980.
- FAGUNDES NETO, U.; TOCCALINO H.; DUJOVNEY, F. Stool bacterial aerobic overgrowth in the small intestine of children with acute diarrhoea. *Acta paediatr. scand.*, 65:609-615, 1976.
- FERNANDEZ JR., H. Espécies termofílicas de *Campylobacter*. Aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1983. Tese (Doutorado).
- FERNANDES, H.; TOLEDO, M.R.F.; FAGUNDES NETO, U.; TRABULSI, L.R. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in diarrhoeic and nondiarrhoeic children in São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 27:102-104, 1985.
- GORBACH, S.L.; BANWELL, J.G.; CHATTERJEE, B.D.; JACOBS, B.; SACK, R.B. Acute indifferiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. *J. clin. Invest.*, 50:881-889, 1971.
- GUERRANT, R.L.; MORRE, R.A.; KIRSCHENFELD, P.M.; SANDE, M.A. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *New Engl. J. Med.*, 293: 567-573, 1975.
- HILL, I.D.; MANN, M.D.; MOORE, L.; BOWIE, M.D. Duodenal microflora in infants with acute and persistent diarrhoea. *Arch. Dis. Childh.*, 58:330-334, 1983.
- KITAGAWA, S.M.S. Contribuição para o estudo da etiologia da diarréia infecciosa aguda da criança. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1984. Tese (Doutorado).
- LEVI, G.C. Infecção pela *S. typhimurium*: importante problema de Saúde Pública e infecção hospitalar em nosso meio. *Ped. Prát.*, 11:13-16, 1980.
- LIFSHITZ, F. The enteric flora in childhood disease. Diarrhea. *Amer. J. clin. Nutr.*, 30:1811-1818, 1977.
- PENNA, F.J.; WEHBA, J.; FAGUNDES NETO, U. *Gastroenterologia pediátrica*. Rio de Janeiro, 1983. Editora Médica Científica.

22. RAMOS, E.C.B. Padronização e avaliação da técnica de PIH Imunohemólise passiva – em microplaca para detecção da enterotoxina LT de *Escherichia coli*. São Paulo, 1983. TESE (Mestrado), Escola Paulista de Medicina.
23. ROTHBAUM, R.J.; McADAMS, A.; GIANNELLA, R.; PARTIN, J.C. A clinicopathologic study of enterocytadherent *Escherichia coli*: A cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology*, 83: 441-454, 1982.
24. RUOCO, G. & MOURIGAN, H. Diarréia aguda infantil (Aspectos Epidemiológicos). *Acta Gastroenterol. latinoam.*, 9:101-106, 1979.
25. SKIRROW, M.B. & BENJAMIN, J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.*, 33: 1122, 1980.
26. STINTZING, G. & MOLLBY, R. Colonization of the upper jejunum by enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in paediatric diarrhoea. *Acta Paediatr. Scand.*, 71:457-465, 1982.
27. STOOL, B.J.; GLASS, R.I.; HUQ, M.I.; KHAN, M.U. BANU, H.; HOLT, J. Epidemiologic and clinical features of patients infected with *Shigella* who attended a diarrheal disease Hospital in Bangladesh. *J. infect. Dis.*, 146:177-183, 1982.
28. THOMSON, S. The role of certain varieties of *Bacterium coli* in gastroenteritis of babies. *J. Hyg. (Lond.)*, 53:357-367, 1955.
29. TOCCALINO, H. & FAGUNDES NETO, U. Multiple channel tube for intestinal bacteriological samples. *Acta gastroenterol. latinoam.*, 5:151-153, 1973.
30. TOCCALINO, H. & O'DONNELL, J.O. Técnica para la introducción de la sonda capsula de "Crosby" en niños. *Rev. Hosp. Niños (Buenos Aires)*, 12:29, 1962.
31. TOLEDO, M.R.F.; ALVARIZA, M.C.B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *E. coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect. Immun.*, 39:586-589, 1983.
32. TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. Mítium meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 13: 230-235, 1982.
33. TRABULSI, L.R. Experimental Keratoconjunctivitis of the guinea-pig by enterobacteria. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 7:16-23, 1965.
34. TRABULSI, L.R. coord. Microbiologia das Infecções Intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981. (Atualização em Microbiologia Clínica, Vol. 1).