

Monografía

Diarrea por *Escherichia Coli*

Segunda de Tres Partes

Alejandro Cravioto, Juan José García, Carlos Eslava
Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM

Agente

Dependiendo de su localización en el organismo las diferentes cepas de *E. Coli* pueden causar un espectro de enfermedades. *E. Coli* es un anaerobio facultativo presente en forma abundante en las heces humanas normales, siendo común encontrarlo en concentraciones de 107 a 108 bacterias por gramo. No obstante, la mayoría de *E. Coli* aisladas de muestras fecales rara vez causan enfermedad²². Desde el punto de vista bioquímico las cepas de *E. Coli* asociadas con la producción de diarrea no se distinguen de cepas no patógenas presentes en el intestino. Por tal motivo las *E. Coli* patógenas sólo pueden diferenciarse a través de la demostración de sus propiedades de virulencia en laboratorios de referencia y de investigación. La identificación de cepas patógenas de *E. Coli* se comenzó a realizar gracias a un sistema de triplicación serológica desarrollado en 1947 por Kauffman²³. El esquema está basado en la presencia de dos antígenos comunes a la mayoría de las enterobacterias, uno somático («O») formado por el lipopolisacárido de la pared celular, y otro flagelar («H») formado por la proteína que constituye el órgano de locomoción de estas bacterias. En la actualidad el esquema completo de tipificación serológica de *E. Coli* comprende 175 antígenos «O» y 56 antígenos «H». En ocasiones se han utilizado también como parte de este esquema de identificación de antígenos, los polisacáridos de origen capsular («K») (Cuadro 2).

Cepas EPEC

La capacidad patógena de cepas de *E. Coli* aisladas de niños con diarrea en los años 40 se comprobó experimentalmente cuando se inocularon oralmente voluntarios humanos con dosis elevadas de estas bacterias (108-109/mL). Observándose que no sólo eran capaces de causar diarrea en dichos individuos²⁴⁻²⁵ sino además éstos desarrollaron una respuesta inmune sistémica específica contra los antígenos somáticos de las cepas con las que habían sido desafiados. Neter²⁶ propuso el término de *E. Coli* enteropatógena (EPEC) para designar a un grupo de bacterias de esta especie aisladas de niños con diarrea, capaces de reproducir el cuadro clínico cuando se administraban a voluntarios humanos adultos.

Estudios de necropsias de niños fallecidos a consecuencia de diarrea asociada con el aislamiento de cepas EPEC, mostraron la presencia de esfacelamiento en grandes porciones del intestino delgado²⁷. Investigaciones posteriores, incluyendo estudios con microscopía electrónica, revelaron

que las cepas EPEC se encontraban adheridas íntimamente a la membrana del enterocito con destrucción importante de las microvellosidades intestinales²⁸.

Cravioto et al.²⁹ publicaron en 1979 un estudio sobre la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma de microcolonias a células eucariotes en cultivo. Estos autores encontraron que 80% de una colección importante de cepas EPEC formaban microcolonias sobre el citoplasma de células HEp-2, característica que no era compartida por otros grupos de *E. Coli* asociadas también con la producción de diarrea. A la adherencia de EPEC a células HEp-2 se le llamó posteriormente de tipo localizado.

Knutton et al.²⁸ propusieron que la adherencia de tipo localizado de cepas EPEC al enterocito tenía dos fases: una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbriado que permitía a las bacterias acercarse a sus receptores celulares y una segunda de adherencia íntima a la membrana del enterocito. Esta última se relacionaba con el esfacelamiento del epitelio, la pérdida de microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal en la célula epitelial.

Hasta fecha reciente, no existía confirmación morfológica en relación a la primera fase de adherencia. Girón et al.³⁰ encontraron que una cepa EPEC, cultivada repetidas veces en agar sangre, expresaba haces de fimbrias parecidos a los que elaboraban *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*. La codificación genética para la producción de estos haces estaba controlada por genes presentes en un plásmido denominado EAF, previamente relacionado, tanto con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada a células HEp-2, como causar diarrea en voluntarios humanos³¹.

Estudios complementarios revelaron que la fase íntima de adherencia, posterior al esfacelamiento de las microvellosidades intestinales, estaba relacionada con la producción de una proteína de membrana externa de 94 kilodaltones (kDa) denominada intimina³²⁻³⁴. La producción de esta proteína estaba controlada genéticamente por varios *loci* en el cromosoma de la bacteria denominados *eae*³⁴. Para la expresión de estos *loci* se requerían ciertos genes presentes en el plásmido EAF, ya mencionado, el cual poseía información para la codificación de adherencia localizada y para la producción de haces de fimbrias en algunas cepas EPEC.

Estudios realizados por Baldwin et al.³⁵⁻³⁶ mostraron que la adherencia íntima de cepas EPEC daba lugar a que se

Cuadro No. 2. Aspectos epidemiológicos de la transmisión de *E. Coli*.

CEPA	RESERVORIO	MODO DE TRANSMISIÓN	PERÍODO DE INCUBACIÓN	TRATAMIENTO
EPEC	Hombre	Fórmulas lácteas Alimentos utilizados para la ablactación y el destete Fomites y manos contaminadas	9 a 12 horas en voluntarios	Cotrimoxazol
ETEC	Hombre	Alimentos contaminados, en particular aquellos utilizados para el destete Con menor frecuencia a través del agua y por contacto directo	10 a 12 horas con cepas productoras de una sola toxina. 24 a 72 horas con cepas LT/ST	Cotrimoxazol Doxicilina Ciprofloxacina Durante 5 días
EIEC	Hombre	Alimentos contaminados	10 horas en voluntarios 18 horas en brotes	Ampicilina
EHEC	Ganado vacuno Hombre	Alimentos contaminados en especial carne de res mal cocida, leche cruda, contacto directo	12 a 60 horas	
EAggEC	Hombre		20 a 48 horas	

Fuente: Benenson AS. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Publicación científica No. 538. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud. 1992. pp. 97-106.

polimerizar la actina del citoesqueleto de la célula epitelial, como respuesta a un incremento en los niveles intracelulares de calcio y de la enzima proteína C cinasa. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, se denominó como adherencia y esfacelamiento (A/E)³⁷⁻³⁹. Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio) al espacio intraluminal. El efecto fisiológico secundario a estas alteraciones, así como la deficiente absorción de líquidos por la falta de microvellosidades en segmentos importantes del intestino, son los principales responsables del cuadro de diarrea severa. Los cambios celulares ocasionados en la fase de adherencia íntima se han podido evidenciar *in vitro* mediante un sistema de marcaje fluorescente denominado FAS el cual utiliza faloidina, que permite visualizar los acúmulos de actina polimerizada asociados con las lesiones de adherencia y esfacelamiento³⁵⁻⁴⁰.

Las cepas EPEC con adherencia de tipo localizado se

han aislado significativamente con mayor frecuencia de niños con diarrea aguda de tipo secretor^{4,14,41}. Es probable que los cambios bioquímicos intracelulares producidos por cepas EPEC se relacionen con la elaboración de exotoxinas aún no identificadas, las cuales para localizar sus receptores en la superficie de la membrana requieren de una interacción estrecha entre la bacteria y la célula epitelial.

Cepas ETEC

A partir de los estudios en 1956 por De et al.⁴², en los cuales se reportó que la inoculación de asas ligadas de intestino de conejos con ultrafiltrados de cultivos bacterianos de cepas de *E. Coli* producían distensión por acumulación de líquido intestinal, similar a la que producían cepas de *Vibrio cholerae* 01. Se demostró que algunas cepas de *E. Coli* tenían

la capacidad para producir exotoxinas, las cuales al interactuar con las células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero, inducían un aumento de la secreción de agua y electrolitos hacia el lumen intestinal. A este grupo de cepas se les denominó como *E. Coli* enterotoxigénica o ETEC.

Las cepas de ETEC elaboran dos tipos de toxinas. La primera es una proteína dimérica de alto peso molecular (86,500) similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *Vibrio cholerae* 01. Por su labilidad al calor (se inactiva a 100°C durante 10 minutos) se le denominó como enterotoxina termolábil de *E. Coli* (LT). Estructuralmente la toxina está compuesta por dos subunidades; la subunidad A, que posee la actividad enzimática constituida por dos fracciones, una A1, que tiene como función principal inducir una ribosilación del ADP que da lugar al incremento en los niveles de AMP cíclico (AMPc) intracelular y una fracción A2, la cual participa en la unión de la subunidad A1 con la subunidad B, así como en el proceso de internalización de A a la célula intestinal. La subunidad B es un pentámero que tiene la

propiedad de unir la toxina a un gangliósido (GM1) presente en la superficie de la célula epitelial intestinal, el cual actúa como su receptor para facilitar la internalización de la subunidad A⁴³. El incremento de los niveles de AMPc intracelular ocasiona un aumento en la secreción de agua y electrolitos en las células de las criptas intestinales, con una disminución concomitante en la absorción de agua en células de la punta de las vellosidades intestinales. Ambos eventos conducen a un incremento en la secreción de líquidos hacia el lumen intestinal, el cual se manifiesta clínicamente como diarrea.

La otra familia de enterotoxinas producidas por cepas ETEC son las denominadas termoestables (ST). Estas enterotoxinas son estructuralmente péptidos pequeños formados por 18 a 20 aminoácidos, no inmunogénicos, solubles o no en metanol y, como su nombre lo indica, resistentes al calentamiento^{44,45}. Estudios recientes han mostrado que esta toxina se sintetiza en forma de pretoxina, la cual se activa intracelularmente antes de ser secretada por la bacteria⁴⁵. No ha sido posible evidenciar como es que la ST se pega a la membrana celular para penetrar al citoplasma del enterocito; lo que si es conocido es su capacidad para incrementar los niveles de GMP cíclico (MPc) al estimularse la enzima guanilato ciclasa⁴⁴.

El control genético de la producción de LT y ST reside en plásmidos transferibles^{46,48}. Además de la elaboración de estas toxinas, las cepas ETEC producen proteínas fimbriadas por medio de las cuales se adhieren a receptores celulares específicos. Hasta la fecha se han descrito cuando menos 15 diferentes tipos de estos factores adhesivos. Los más importantes son K88, K99, 987P y F41 producidos por cepas de origen animal y los factores de colonización CFA/I, CFA/II, CFA/III Y CFA/IV^{49,50} producidos por cepas aisladas de humanos.

Al igual que las enterotoxinas, la producción de los factores de adherencia está controlada genéticamente por plásmidos⁵¹. La elaboración de los factores adhesivos está restringida a ciertos serotipos de *E. Coli*, en los cuales coexisten genes estructurales y reguladores que controlan la producción de fimbrias y fibrilas^{52,54}.

Cepas EIEC

Las cepas de *E. Coli* cuyo mecanismo de patogenicidad es la capacidad para invadir y reproducirse dentro del citoplasma celular, se caracterizan por pertenecer a un número relativamente pequeño de serotipos (Cuadro 2). Desde el punto de vista de su metabolismo presentan características intermedias con el género *Shigella*⁵⁵, destacando su falta de capacidad para utilizar la lactosa y la carencia de flagelos, por lo cual, al igual que las shigelas, son inmóviles. La relación entre EIEC y *Shigella* no se manifiesta sólo en cuanto a su comportamiento bioquímico, sino también a sus características antigénicas y genéticas.

Diversos estudios han concluido que además de genes

cromosómicos, involucrados en la virulencia de estas bacterias son necesarios *loci* extracromosomales⁵⁶. Se ha podido establecer que en las cepas EIEC y de *Shigella* un plásmido de 140 megadaltones (MDa) junto con genes cromosómicos son indispensables para conferir el fenotipo invasivo a estos microorganismos^{57,58}.

La participación patogénica de la toxina de Shiga en el caso de *S. Dysenteriae* tipo 1 o de toxinas semejantes, en el caso de *S. flexneri* y EIEC no es muy clara; sin embargo, es evidente que los factores involucrados en la alta virulencia de estos microorganismos son diversos y es probable que todos ellos actúen coordinadamente. Esto último se supone principalmente por el pequeño número de bacterias (10-100) que se requieren para producir un cuadro clínico de disentería bacteriana.

El primer paso en el proceso de patogénesis de cepas EIEC es la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa intestinal y posteriormente al borde en cepillo del enterocito, en el cual se comienza a formar una vesícula en su membrana; lo anterior da lugar a que se facilite la penetración de la bacteria, la cual se establece y multiplica en el interior de la célula intestinal para de ahí invadir otras células a través de su migración por el citoesqueleto⁵⁸.

Cepas EHEC

El término EHEC propuesto inicialmente por Levine⁵⁹, incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas que aquellas pertenecientes al serotipo O157:H7, considerado como prototipo del grupo. Tzipori⁶⁰ ha utilizado un criterio más amplio para definir a este grupo bacteriano, señalando la asociación de EHEC con la etiopatogenia de colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico. Las cepas responsables de estos cuadros además de poseer la capacidad para elaborar una o más citotoxinas, son portadoras de un plásmido de entre 50 y 70 mDa el cual es responsable de inducir una lesión de adherencia y esfacelamiento en la mucosa intestinal observada en modelos animales^{37,39}.

Por sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares las citotoxinas que produce el grupo EHEC reciben la denominación de citotoxinas tipo Shiga (SLT). Este nombre se debe a la característica de una de estas proteínas de presentar una reacción antigénica cruzada con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Las SLT se conocen también como Verotoxinas (VT), por el efecto citotóxico de estas proteínas sobre monocapas de células VERO en cultivo, derivadas de riñón de mono verde africano.

En la actualidad se conocen tres tipos antigénicos de citotoxinas producidas por cepas EHEC, dos de ellas que afectan específicamente a humanos, llamadas como VT1 o SLT-I y VT2 o SLT-261, y una variedad antigénica de

VT2 que afecta a animales, denominada VTe o SLT-IIv62. Todas estas toxinas tienen estructura similar y son capaces de inhibir la síntesis de proteínas.

Scotland et al.⁶⁵, y posteriormente otros investigadores⁶⁴⁻⁶⁵, han observado que los genes que controlan la expresión de la VTI se localizan en bacteriófagos en estado lisogénico. En México, Eslava et al.⁶⁶⁻⁶⁷ han identificado fagos similares en diferentes cepas de *E. Coli* productoras de citotoxina.

Como ya se mencionó, otra propiedad de virulencia observada en este grupo de microorganismos es su capacidad para adherirse y esfacelar el intestino delgado a través de la presencia de genes plasmídicos y cromosómicos que codifican la producción de proteínas de membrana externa, similares a las que se asocian con este mismo proceso en cepas EPEC^{37,39}.

Cepas EAggEC

Estudios sobre la capacidad adherente de cepas de *E. Coli* a células HEp-2 han mostrado que además de la adherencia de tipo localizado existen cuando menos otros dos patrones, uno denominado difuso, cuando las bacterias se pegan a todo el citoplasma celular y, otro llamado agregativo, cuando las bacterias forman cúmulos en forma de «palizadas», tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación⁶⁸⁻⁶⁹.

A diferencia de lo observado en cepas con adherencia localizada, fuera de un estudio realizado en niños en el Estado de Chiapas en México⁷⁰, las cepas con adherencia difusa se han aislado con frecuencia similar en niños con diarrea y en controles apareados por sexo y edad^{71,72}. En relación con las cepas que presentan adherencia agregativa, estudios en la India, México y Brasil, han mostrado que su aislamiento se relaciona significativamente con la presencia de diarrea persistente en niños^{14,71,72}.

Los mecanismos por medio de los cuales las cepas EAggEC causan diarrea con duración superior a los 14 días no se conocen aún. Tanto cepas con adherencia difusa como con adherencia agregativa presentan fimbrias cuya codificación genética se encuentra presente en plásmidos^{69,73,74}. Se desconoce cual es la participación de las fimbrias en el proceso patogénico de estas cepas en el humano. De la misma forma se ha reportado que las cepas EAggEC son capaces de producir cuando menos dos toxinas, una responsable de inducir secreción intestinal en modelos experimentales y la otra que favorece la expresión de proteínas fosforilantes responsables del movimiento de calcio extracelular⁷⁵⁻⁷⁶. No existe evidencia, sin embargo, de la producción de estas toxinas en el intestino humano y por ende de su participación en la producción de diarrea.

La primera aportación en este sentido ha sido realizada por Eslava, et al.⁷⁷, al reportar que el suero de niños infectados en forma natural por cepas EAggEC, reconocen una toxina de 108 kDa secretada al medio de cultivo por estas bacterias. Dicha proteína pudiera ser similar a la descrita con actividad fosforilante por Baldwin et al.⁷⁶. La capacidad de

cepas EAggEC para sobrevivir por tiempo prolongado en el intestino humano y la producción constante de una o varias de las toxinas descritas⁷⁵, pudiera ayudar a explicar la persistencia de la diarrea en individuos infectados por estos gérmenes.

Se han aislado también cepas EAggEC de niños con diarrea con sangre⁷⁸. Se desconoce aún si existen diferentes tipos de cepas agregativas, unas relacionadas con diarrea persistente y otras con diarrea con sangre. Estudios recientes muestran que la toxina encontrada por Eslava et al.⁷⁷ es capaz de producir lesiones hemorrágicas severas cuando se inyecta en forma purificada en asas ligadas de intestino de ratas. Estos resultados pudieran apoyar la capacidad de cepas EAggEC para causar diarrea con sangre en humanos.

Referencias

22. Keusch GT. Enteric Bacteria: "Secretory (Watery) Diarrhea. In: Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B. (de) Mechanisms of Microbial Disease. United States of America: Williams and Wilkins 1993;251-63.
23. Kauffman F. The serology of the coli group. J Immunol 1947;57:71-100.
24. Ferguson WW, June RC. Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia Coli* 111,B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. Am J Hyg 1952;55:155-69.
25. Koya G, Kosakai N, Fukawara Y. Supplementary studies on the multiplication of *Escherichia Coli* B4 in the intestinal tract of adult volunteers and its relation to manifestations of coli enteritis. Jpn J Med Sci Biol 1954;7:655-61.
26. Neter E, Shuymway C. *Escherichia Coli* d 433: Occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics. Proc Soc Expe Biol Med 1950;75:504-7.
27. Varela C, Aguirre A, Carrillo J. *Escherichia Coli* Gómez, nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Med Hosp Inf Mex 1946;3:623-7.
28. Knutton S, Lloyd DR, Mcneish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia Coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect Immun 1987;55:69-77.
29. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia Coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 1989;3:95-9.
30. Girón JA, Ho Sy, Schoolnick GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia Coli*. Science 1991;254:710-3.
31. Sohel Y, Puente JL, Murray WJ y col. Cloning and characterization of the bundle-forming pili gene of enteropathogenic *Escherichia Coli* and its distribution in Salmonella serotypes. Molec Microbiol 1993;7:563-75.
32. Levine MM, Nataro JP, Karch H y col. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of

- enteropathogenic *Escherichia Coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 1985;152:550-9.
33. Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB y col. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia Coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* 1985;152:560-5.
34. Jerse AE, Kaper JB. The eae gene of enteropathogenic *Escherichia Coli* encodes a 94 kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* 1991;59:4302-9.
35. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, Mcneish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia Coli*. *Infect Immun* 1989;57:1290-8.
36. Baldwin TJ, Brooks SF, Knutton S y col. Protein phosphorylation by protein kinase C in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia Coli*. *Infect Immun* 1991;58:761-5.
37. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA y col. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia Coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 1983;41:1340-51.
38. Jerse AE, YU J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia Coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7839-43.
39. Jerse AE, Gicquelais KG, Kaper JB. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia Coli*. *Infect Immun* 1991;59:3869-75.
40. Knutton S, Phillips AD, Smith HR y col. Screening for enteropathogenic *Escherichia Coli* in infants with diarrhea by the fluorescent actin staining test. *Infect Immun* 1991;59:365-71.
41. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia Coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 1984;6:31-51.
42. De SN, Bhattacharya K, Sarkar JK. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J Pathol Bacteriol* 1956;71:201-6.
43. Sprangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia Coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622-47.
44. Yoshimura S, Ikemura H, Watanabe H y col. Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia Coli*. *FEBS*.
45. Kupersztoch YM, Tachias K, Mooman CR y col. Secretion of methanol insoluble heatstable enterotoxin (Stb): energy-and-secA-dependent conversion of pre Stb to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J Bacteriol* 1990;172:2427-32.
46. Pickett CL, Twiddy EM, Coker C y col. Cloning, nucleotide sequence and hybridization studies of the type Iia heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 1989;171:4945-52.
47. Moseley SL, Hardy JW, HUQ MI y col. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983;39:1167-74.
48. SO M, Mccarthy BJ. Nucleotide sequence of a bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia Coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4010-5.
49. Klemm P. Fimbrial adhesins of *Escherichia Coli*. *Rev Infect Dis* 1985;7:321-40.
50. Knutton S, Mcconnell MM, Rowe B, Mcneish A. Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic *Escherichia Coli* producing CFA/III and CFA/IV. *Infect Immun* 1989;57:3364-71.
51. De Graff FK. Genetic of adhesive fimbrias of intestinal *Escherichia Coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;151:29-53.
52. Willshaw GA, Mcconnell MM, Smith HR, Rowe B. Structural and regulatory genes for coli surface associated antigen 4 (CS4) are encoded by separate plasmids in enterotoxigenic *Escherichia Coli* strains of serotype 025:H42. *FEMS Microbiol Lett* 1990;68:225-60.
53. Caron J, Coffield LM, Scott JR. A plasmid-encoded regulatory gene, rns required for expression of CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia Coli*. *Proc Natl Acad*.
54. Gaastra W, Jordi BJAM, Mul EMA y col. A silent regulatory gene cfaD' on region 1 of the CFA/I plasmid NTP113 of enterotoxigenic *Escherichia Coli*. *Microbial pathogen* 1990;9:285-91.
55. Formal S, and Hornick RB. Invasive *Escherichia Coli* *J Infect Dis* 1978;137:641-7.
56. Sansonetti P, Kopecko DA, and Formal SB. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1982;35:852-60.
57. Sasakawa C, Kamata K, Sakai T, Murayama S, Makmo S, and Yoshikawasyama S, Makmo S, and Yoshikawas. Molecular alteration of the megadalton plasmid with loss of virulence and Congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1986;51:470-5.
- Binns MM. Molecular genetics of virulence in *Shigella*. *Microbiol Sci* 1985;2:275-8.
- Levine MM. *Escherichia Coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, entero invasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Di* 1987;155:377-89.
- Tzipori S, Robins-Brown RM, Ganis G y col. Enteropathogenic *Escherichia Coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut* 1985;26:570-8.
- Scotland SM, Smith HR, Rowe B. Two distinct toxins

- active on Vero cells from *Escherichia Coli* Brien AD. *Escherichia Coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol Lett 1987;44:33-8.
- Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. Verocytotoxin production in strains of *Escherichia Coli* is determined by genes carried on a bacteriophage. Lancet 1983;ii:216.
- 'Brien AD, Newland JW, Miller SF y col. Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia Coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 1984;226:694-6.
- Smith HR, Day NP, Scotland y col. Phage-determined production of verocytotoxin in strains of *Escherichia Coli* of serogroup O157. Lancet 1984;i:1242-3.
- Eslava CA, Zepeda HM, Herrera MP y col. Phage detection of cytotoxic *Escherichia Coli* strains. Rev Lat-amer Microbiol 1990;32:95-7.
- CA, Cano P, Cravioto A, Giono S. Characterization of phages obtained from Shiga-like toxin-producing *Escherichia Coli* isolated from Mexican children. Abstracts 90th Annual Meeting. Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1990:106.
- .Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia Coli* to HeLa cells. Infect Immun 1984;45:534-6.
- PA, Robins-Brown RM, Lior H y col. Characterization of enteroadherent aggregative *Escherichia Coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 1987;155:377-89.
70. Giron JA, Jores T, Millan-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zarate L, Fry J, Frnakel G, Moseley SL, Baudry B, Kaper JB. Diffuse adhering *Escherichia Coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. J Infect-Dis. 1991;163: 507-13.
71. Gomez TAT, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia Coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J Clin Microb 1989; 27:266-9.
72. Bhan MK, P. Raj MM, Levine JB, Kaper N, Bhandari R, Srivastava R, Kumar, and S. Sazawal. Enter *Escherichia Coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India Infect Dis 1989;159:1061-4.
73. Baldini MM, Kaper JB, Levine MM y col. Plasmid-mediated adherence in enteropathogenic *Escherichia Coli*. Pediatr Gastroenterol Nutr 1983;2:534-8.
74. Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB y col. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia Coli*. Infect Immun 1985;48:378-83.
75. Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM. Enteroggregative *Escherichia Coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. J Clin Invest 1991;87:
76. Baldwin TJ, Knutton S, Sellers Ly co Entero aggregative *Escherichia Coli* strains secrete a heat -labile toxin higenically related to *E. Coli* hemolysin. Infect Immun 1991;60:2092-5.
77. C, Villaseca J, Morales R y col. Identification of a protein with toxigenic activity produced by entero aggregative *Escherichia Coli*. Abstract B105. Abstracts 93rd. General Meeting. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1993:en prensa.
78. Benítez O. Uribe F, Navarro A. y col. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. Bol Med Hosp Inf Mex 1991;48:65-70.