

111



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN QUÍMICA

## FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A ECEA Y ECEI

297 192

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN:  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA - BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LOURDES MARINA RAMÍREZ  
HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2001.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatorias

A la UNAM por enseñarme la universalidad de la vida, darme las armas para desarrollarme en un mundo de constantes retos y desafíos, y enseñarme a verlos como oportunidades para crecer. Espero nunca defraudarte!

A mi Madre y amiga: Marina, que me dió la libertad de elegir mi camino, no si antes dame las bases para disfrutar mi elección, afrontar los obstáculos y jamás arrepentirme de lo recorrido. Gracias por ser la mejor amiga, maestra y ante todo la mejor mamá; sin ti, éste libro que sostienes no sería realidad.

A mi hermano; por ser mi apoyo, mi cómplice, pero sobre todo el ejemplo a seguir. Gracias Bemy, por todo lo que me has ayudado desde que éramos hace ya bastantes años.

A mis abuelitos porque han sido la estructura y el pilar de apoyo, les dedico con mucho cariño, amor y respeto ésta, mi culminación de carrera.

A Raúl Garza, profesor y QFB. de corazón, que impulsa y apoya cada generación de químicos fármaco-biólogos que osamos entrar a la facultad de Química. Muchas gracias por su apoyo!

A Cristian, Gaby y Fer: desvelos, hambrunas, cansacios, risas, laboratorios, prácticas, peleas, chistes, tensiones y hasta algunas fiestas: Todas ellas valieron la pena, fue un gusto vivirlas con ustedes!

A los amigos Chendo, Poncho, Noemí, Paola, Gibrán, Sandra, Carol, Fidel, Lupita, David, Pedro, Uriel, su presencia en cada semestre fue agradable.

Y Finalmente a la química, porque su investigar su misterio es muy divertido.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	3
<b>PARTE I</b>	
<b>I. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECEA)</b>	
i. Características generales .....	4
ii. Antecedentes históncos.....	5
iii. Antecedentes epidemiológicos .....	8
<b>II. Factores de virulencia de ECEA</b>	
i. Características generales.....	16
ii. Histopatología.....	17
iii. Adherencia.....	20
iv. Enterotoxina Pet .....	22
v. Toxina EAST1 .....	24
vi. Plásmido codificador de los genes de virulencia .....	25
<b>III. Patología</b>	
i. Modelo de la patogénesis de ECEA .....	29
ii. Cuadro Clínico.....	31
iii. ECEA y Malnutrición.....	34
iv. Diagnóstico .....	35
<b>PARTE II</b>	
<b>I. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (ECEI)</b>	
i. Características generales .....	42
ii. Datos epidemiológicos .....	43
<b>II. Patogénesis</b>	
i. Invasividad .....	44
ii. Cuadro Clínico .....	46
<b>III. Factores de virulencia</b>	
i. Características generales.....	49
ii. Adherencia, invasión y liberación intracelular. ....	51
iii. Plásmido de Virulencia asociado a ECEI .....	53
iv. Diseminación intra e intercelular de ECEI .....	57
v. Invasión de la mucosa colónica .....	59
vi. Otros factores de patogenicidad de ECEI .....	62
vii. Organización y regulación de los genes de virulencia .....	64
<b>CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

## INTRODUCCIÓN

El síndrome diarreico constituye un severo problema de salud pública en los países en vías de desarrollo y, particularmente, la diarrea infantil representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el ámbito mundial ya que, al margen de las molestias y la discapacitación temporal que suele originar en el paciente pediátrico, a mediano plazo suele dar lugar a la malnutrición -con el subsiguiente retraso en el crecimiento y desarrollo- y provoca un estimado de 4 millones de muertes por año.

En México, la diarrea aguda es la primera causa de mortalidad en niños de 1 a 5 años, y se relaciona con diversas complicaciones, entre las cuales sobresalen la pérdida aguda de agua y electrolitos, así como el origen, la precipitación o la exacerbación de la desnutrición.

Los efectos deletéreos de la diarrea sobre el estado nutricional del niño se producen tienen lugar debido a la reducción en la ingestión dietética, a la disminución en la absorción de nutrientes, al aumento del catabolismo, a la pérdida directa de nutrientes por el intestino y/o a la ineficacia metabólica relacionada con deficiencias en micronutrientes. Todo ello resulta muy común



*Escherichia coli*

## OBJETIVOS

- Señalar las características clínicas y epidemiológicas asociadas a *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI).
- Describir los principales factores de virulencia de *Escherichia coli* enteroagregativa y *Escherichia coli* enteroinvasiva, relacionándolos con la patogenia y la patología implicadas.

## **PARTE I: *Escherichia coli* enteroagregativa**

### **I. GENERALIDADES**

#### **i. Características generales**

Se trata de un patógeno entérico con el distintivo de que manifiesta un patrón de adherencia que semeja "ladrillos apilados" sobre las células de la mucosa intestinal (1). Se asocia a diarreas persistentes en infantes, en una amplia y creciente cantidad de brotes localizados principalmente en los países del tercer mundo, si bien se le ha detectado prácticamente en todo el planeta.

Se considera que la naturaleza de la diarrea ocasionada por ECEA es predominantemente secretoria ya que, por lo general, las evacuaciones del paciente suelen contener moco y sangre pero no células polimorfonucleares (PMNs).

## ECEA y diarrea esporádica

Un trabajo realizado en Sao Paulo, Brasil (9), en el que se analizaron mamilas con leche destinadas a la alimentación de bebés, mostró que 26 de las 100 muestras estudiadas se encontraban contaminadas con cepas de *E. coli*, 3 de las cuales (11.5%) pertenecían a ECEA; es importante considerar que el inóculo correspondiente resultaba suficiente para causar enfermedad, de acuerdo con las cifras que se habían establecido previamente en voluntarios humanos.

En México, se analizaron 636 especímenes provenientes de 72 niños menores de 2 años de edad, encontrándose que 373 (59 %) contenían cepas de *E. coli* adherentes a células HEP-2; la mitad de éstas no pertenecían a ECEP y sólo un tercio de los niños infectados con ECEA presentaba diarrea sanguinolenta.

La importancia de ECEA en el síndrome diarreico parece variar geográficamente: en el subcontinente hindú, seis estudios que incluyeron individuos hospitalizados con diarrea persistente (11), pacientes de consulta externa en clínicas (12) y casos de diarrea esporádica detectados en consultorios particulares (13), demostraron consistentemente que ECEA ocasiona diarrea en niños (11,12,13,14,15,16).



En la Ciudad de México, dos brotes intrahospitalarios causaron la muerte de 5 pacientes, a pesar del agresivo tratamiento administrado a los pacientes (29). Las necropsias realizadas a los infantes implicados revelaron severas lesiones necróticas en las mucosas del ileon.

En enero de 1996, durante una epidemia de diarrea localizada en una villa del sur de la India, ECEA fue detectada en las heces fecales de 11 de las 20 personas afectadas; sólo 1 de las 11 muestras recolectadas como controles asintomáticos de la misma villa contenía al microorganismo (28).

En 1993, un brote masivo aparecido en Japón, 2,697 niños de 16 escuelas enfermaron después de consumir desayunos contaminados (24). La enfermedad se caracterizaba por dolor abdominal, náuseas y diarrea severa, el período de incubación promedio fue de 40 a 50 h y la cepa implicada pertenecía al serotipo O:H10.

En el Reino Unido se reportaron al menos 4 brotes durante 1994 (26): en el primero, 19 personas enfermaron después de comer en un restaurante; el segundo también se originó en un restaurante, en el que 10 de 14 comensales padecieron diarreas persistentes. En el tercer brote 51 adultos de 21 a 31 años de edad presentó diarrea y/o vómito durante 3 a 7 días, como consecuencia de la cena efectuada en un centro de conferencias.

## II. FACTORES DE VIRULENCIA

### i. Características generales

Si bien la patogénesis asociada a las enteropatías por ECEA aún no se establece completamente, diversos estudios llevados a cabo durante el último lustro reconocen una crítica etapa inicial (31):

- 1) La adhesión a la mucosa intestinal, mediada por fimbrias de adherencia agregativas.
- 2) La conformación de una capa delgada de *mucus* y bacterias sobre la superficie intestinal.
- 3) La exfoliación de células epiteliales del intestino, originada probablemente por la participación de toxinas.

Los potenciales factores de virulencia asociados a dichas etapas son: el antígeno fimbrial de adherencia I ó II (AAF/I o AAF/II) y las enterotoxinas Pet y EAST, todos ellos codificados por un plásmido de 65 MDa conocido como pAA2. De hecho, el fenotipo de adherencia agregativa (AA) observado en

La AAF/I corresponde a una estructura flexible de 2 a 3 nm de diámetro que media la adherencia a células HEp-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos (38).

Los genes involucrados se localizan fundamentalmente en cepas ECEA 17-2 y se encuentran organizados en dos regiones del plásmido de 65 MDa separadas entre sí por 9 kb de DNA (39, 40, 41).

La región I codifica para la estructura fimbrial y su secuencia nucleotídica sugiere que la AAF/I está relacionada con la familia de adhesinas Dr (41); adicionalmente, dicha región está constituida por un racimo continuo de genes fimbriales estructurales.

El orden de dichos genes se ha logrado establecer con base en la secuencia de nucleótidos y en la homología organizacional de los miembros de la familia de adhesinas Dr, correspondientes a factores de adherencia fimbriales y afimbriales que reconocen al grupo sanguíneo Dr y cuyo papel resulta indispensable en las infecciones urinarias y diarreagénicas debidas a clonas de *E. coli*.

Por su parte, la región 2 codifica para un regulador de la transcripción AggR, uno de los miembros de la familia AraC de proteínas que enlazan DNA (40). Las fimbrias AAF/I son fimbrias formadoras de racimos pero no muestran homología con miembros de las fimbrias tipo 4 (42).

El plásmido pAA de 65 Mda aislado de la cepa patogénica 042 de ECEA se ha estudiado en detalle y ha sido designado como pAA2. Éste codifica para la fimbria AAF/II y también para Pet y EAST, y los genes implicados se ordenan dentro de una región de aproximadamente 25 kb. El mencionado plásmido es considerado como el prototipo de la familia pAA, ya que la mayoría de las cepas *E. coli* agregativas comparten al menos un gen con pAA2.

Esta observación fue sugerida en principio por Baudry y cols, quienes describieron un fragmento de aproximadamente 800 bp que está presente en pAA2 y que sirve como un marcador útil para los plásmidos pAA.

Aproximadamente el 18 % de las cepas de ECEA contienen el gen *pet* (50). La cepa 042 lo contiene entre dos regiones de genes, cada una de las cuales es requerida para la biogénesis del antígeno fimbrial AAF/II. Los genes de AAF/II aparecen en una organización única: el chaperón *aafD*, la subunidad fimbrial *aafA* y un regulador transcripcional (*aggR*) están presentes en la región 1. La región 2 codifica para el usher fimbrial *aafC* y para el producto de un gen más pequeño homólogo a los de las invasinas de la familia Dr, localizado a 13 kb de la región 1. Hacia arriba del *aafC* se encuentra un pseudogen con una significativa homología a los nucleótidos asociados a la familia de chaperonas. Es muy claro que los genes de la región 1 muestran gran homología con los que codifican para el antígeno fimbrial AAF/II y exhiben un contenido bajo en G-C, mientras que los de la región 2 están más

### III. PATOLOGÍA

#### i. Modelo de patogénesis

De acuerdo con las observaciones de numerosos autores, Nataro y cols. han propuesto un modelo de estudio de la patogénesis asociada a ECEA, en el cual se distinguen en tres etapas:

- Etapa I: Adherencia de las bacterias a la mucosa intestinal, mediada aparentemente por las fimbrias AAF.
  
- Etapa II: Producción y secreción de moco por parte de las células intestinales implicadas, el cual se acumula constituyendo una biocapa pegajosa “rellena” de bacterias agregativas. Dicha capa podría promover una colonización persistente que provocaría la mala absorción de nutrientes.
  
- Etapa III: Elaboración de toxinas y desencadenamiento de la inflamación, lo que se traduce en daño a la mucosa y secreción intestinal. Los

Las cepas ECEA exhiben una considerable heterogeneidad en relación con sus respectivas virulencias. Por ejemplo, en estudios realizados en la Universidad de Maryland se observó que, a dosis de  $10^{10}$  UFC, la cepa 042 (productora de AAF/II, EAST1 y Pet) generaba evacuaciones acuosas en 4 de cada 5 voluntarios adultos inoculados (35), lo cual difería radicalmente en relación con tres clonas AAF/I<sup>+</sup>, sólo una de las cuales era EAST1<sup>+</sup>: ninguna de ellas provocó la aparición de síntomas intestinales. Evidentemente, dichos hallazgos sugieren adicionalmente que la toxina *pet* podría resultar determinante en la patogenia.

### iii. ECEA y malnutrición

Otro de los principales aspectos de las enteropatías debidas a ECEA alude a interesantes observaciones realizadas recientemente en Fortaleza, Brasil (63), las cuales proponen la correlación entre la colonización intestinal por parte del microorganismo y el retraso en el crecimiento de los infantes: numerosos niños a partir de cuyas heces fecales se aisló a ECEA, presentaban bajos valores de peso y estatura, independientemente de la presencia o ausencia de síntomas gastrointestinales<sup>1</sup>. (63)

---

<sup>1</sup>Asociaciones similares se han planteado para *Cryptosporidium*

cabalidad. En este sentido, Baudry y cols (56) examinaron fragmentos derivados de plásmidos obtenidos de las cepas 17-2 y 042, comprobando que un plásmido de 1.0 kb derivado del segmento *Sau3a* hibridaba con el 89 % (56/63) cepas enteroagregativas previamente definidas por el ensayo en células HEP-2; adicionalmente, sólo 2 de las 376 cepas pertenecientes a la flora habitual o a otras categorías diarreagénicas hibridaron con la sonda correspondiente.

Lógicamente, la sensibilidad de la prueba varía de acuerdo con los grupos de investigadores, aunque en general aquélla se considera aceptable.

Por otra parte y obedeciendo a la tendencia mundial en cuanto a técnicas moleculares, ya existen ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basados en el empleo de *primers* dirigidos contra las secuencias asociadas a la adherencia agregativa; esta clase de métodos muestra una sensibilidad y especificidad máximas (60), pero requiere de que el laboratorio cuente con el termociclador y el resto de los reactivos necesarios (dNTPs, Taq polimerasa, primers, etc.), lo cual desafortunadamente representa una condición muy escasamente cubierta en México y el resto de los países en vías de desarrollo.

## Parte II: *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)

### I. GENERALIDADES

#### i. Características generales

ECEI es capaz de ocasionar diarrea en voluntarios humanos y se encuentra muy relacionada genéticamente con *Shigella* (64,67,75,84), tal como lo demuestra el hecho de que aquélla también es lisina-descarboxilasa negativa, inmóvil y lactosa negativa. Dicha relación no sólo incluye al tipo de enfermedad que causan ambos microorganismos (81), sino en la reactividad cruzada entre sus antígenos O: los anticuerpos inducidos por *E. coli* enteroinvasiva reaccionan con las diversas especies de *Shigella*. (78)

Si bien el esquema de patogenia en este microorganismo aún no ha logrado establecerse con exactitud, diversos estudios sugieren que sus rasgos patogénicos son virtualmente idénticos a los observados en *Shigella*: invade el epitelio colónico bajo un fenotipo originado por dos *locus* (65,66), uno localizado en un plásmido y, el otro, dentro del cromosoma.



## II. PATOGÉNESIS

### i. Invasividad

El modelo de patogenicidad comprende los siguientes procesos (70,73,79):

- a) Penetración en las células epiteliales.
- b) Lisis de la vacuola endocítica.
- c) Multiplicación intracelular.
- d) Movilidad direccional a través del citoplasma hospedero.
- e) Diseminación hacia las células epiteliales adyacentes.

Lógicamente, cuando la infección resulta muy severa, dicha secuencia de eventos origina una intensa respuesta inflamatoria que conduce a ulceraciones en la mucosa colónica (73).

Los genes involucrados en la invasión residen en un plásmido de 120 a 140 Mda, conocido como *plnv* y se suman al *mxi* y *spa* cromosómicos (70,76), los cuales codifican para la síntesis del denominado "sistema de secreción

### III. FACTORES DE VIRULENCIA

#### i. Características generales

ECEI elabora diversos factores de virulencia, los cuales la capacitan para adherirse a las células colónicas e ingresar en ellas, a fin de crecer y diseminarse a lo largo del tejido intestinal, sin que el sistema inmunológico del hospedero pueda detener su curso.

Lógicamente, el estudio de la patogenia asociada a ECEI ha representado todo un desafío para los investigadores, en virtud de que el agente etiológico no reproduce las clásicas lesiones humanas en los principales animales de laboratorio. No obstante, los nuevos recursos de los infectólogos han permitido concretar la detección de numerosos factores de patogenicidad -y de sus respectivas funciones-, los cuales recientemente se han significado como elementos "clave" para explicar el sorprendente potencial invasivo del microorganismo.

De acuerdo con estudios experimentales realizados *in vitro*, ECEI se adhiere a las células HeLa --neoplásicas de cáncer de cérvix humano-, provoca que

entre el mismo plásmido de 220 kp, el cromosoma bacteriano y, posiblemente, en algunos otros plásmidos. (81)

Lógicamente, el control génico depende de señales fisicoquímicas que se generan o predominan en el ambiente, tales como la concentración de ciertos iones, el pH y la temperatura; por ejemplo, se ha demostrado ampliamente que ésta variedad de *E. coli* manifiesta su capacidad patogénica a 37°C, pero pierde dicha característica a 30°C, e inclusive, la recupera al incrementarse nuevamente la temperatura de incubación.

Por otra parte, la región plasmídica que determina la entrada bacteriana a la célula hospedadora contiene 33 genes unidos en dos *loci*, mismos que se transcriben en direcciones opuestas; el primero de ambos codifica para la síntesis de las proteínas Ipa (por *invasion plasmid antigens*) y de su chaperón molecular IpgC en tanto que, el restante, lo hace para la producción de un aparato especializado en la secreción de las Ipa, conocido como translocón *mxi-spa* (por *membrane excretion of Ipa and surface presentation of Ipa*). (82)

Los genes *ipa* codifican para la síntesis de cuatro proteínas: IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, de las cuales las tres últimas son indispensables para que ocurran la adherencia e invasión; de hecho, IpaD es considerada como adhesina, en tanto que IpaB e IpaC se clasifican como invasinas. Además, la secreción de las Ipa se ve estimulada por el contacto entre el invasor y la célula epitelial: estudios realizados *in vitro* han mostrado que la adhesión de ECEI a las

ECEI: después de la internalización primaria, las monocapas HeLa se bañan con gentamicina, a fin de que dicho antimicrobiano provoque la muerte de los bacilos que permanezcan extracelularmente (dicho antibiótico es incapaz de afectar a las bacterias que hayan alcanzado su localización intracelular debido a que la gentamicina no penetra las células HeLa); bajo tales condiciones, la diseminación no tendría lugar si el microorganismo sostuviera algún tipo de contacto con el medio externo antes de invadir a otras células del cultivo. (76)

Una vez que *E. coli* enteroinvasiva se desplaza a la superficie de la célula infectada (después de realizar un cierto recorrido dentro del citoplasma), al parecer ejerce una considerable presión sobre la membrana correspondiente y la "empuja" hasta formar una "protrusión" (protuberancia que se inserta en la célula hospedera vecina); posteriormente, ésta es englobada por la célula adyacente, con vistas a generar un fagosoma con dos membranas -la más interna de las cuales proviene de la célula anterior-, lo que finalmente ocurre merced a la lisis de la protusión por parte de otra proteína bacteriana: IcsB. Más tarde, el bacilo se reproducirá en el citoplasma de la segunda célula invadida cuando, por mediación de IpaB, logre escapar del fagosoma de doble membrana. (77,80)

#### **v. Invasión de la mucosa colónica**

Dado que gran parte de las afirmaciones anteriores ha surgido de observaciones *in vitro* realizadas en células HeLa, es claro que el proceso

tanto a los pocos microorganismos que persisten en el medio extracelular como a las células invadidas.

En cuanto a la adherencia entre los PMNs y las células eucariotes implicadas, es importante subrayar que el proceso induce que los primeros liberen elastasa (una serín-proteasa) y diversos radicales de oxígeno -altamente oxidantes-, cuya acción citotóxica suele resultar sinérgica y da lugar a la lisis de las células epiteliales. (88)

En este sentido, se ha demostrado que el fenotipo más invasivo de ECEI (que contiene a los genes *ipa*), aumenta la mencionada interacción de los PMNs con la bacteria y los tejidos involucrados en la invasión, por lo que la liberación de elastasa y del contenido lisosomal conducen a la destrucción bacteriana pero, también, a una lisis tisular masiva. De hecho, evidencias recientes parecen confirmar que la interacción del microorganismo con las células fagocitarias representa un paso primordial en el origen de la infección y que la invasión bacteriana del epitelio intestinal no provocaría lesiones tisulares mayores en ausencia de macrófagos y PMNs. (88)

### **vii. Organización y regulación de los genes de virulencia**

Como se ha comentado con anterioridad, numerosos genes de virulencia se encuentran distribuidos en plásmidos de diferentes tamaños y en el cromosoma bacteriano (consultar la tabla 4).

## CONCLUSIONES

- *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) representa un patógeno intestinal emergente, tanto en los países en vías de desarrollo como en los industrializados, en los que recientemente ha venido ocasionando numerosos casos individuales y brotes epidémicos de diarrea.
- Los mecanismos de patogénesis asociados a ECEA aún están siendo estudiados; sin embargo, todo indica que las diversas cepas no son igualmente virulentas y que en los pacientes pediátricos existe una consistente relación de la invasividad y toxigenicidad de este microorganismo, con la diarrea persistente, la malnutrición y el retraso del crecimiento del enfermo.
- Los principales factores de virulencia de ECEA son codificados por el plásmido pAA de aproximadamente 65 MDa y corresponden tanto a las fimbrias AAF I y II, así como a las exotoxinas Pet y EAST1. Las primeras participan en la adherencia del bacilo al tejido intestinal y, las segundas, provocan el daño celular a la mucosa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vial PA, Robins Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB and Nataro JP: Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrheal disease, J. Infect. Dis., 1988; 158: 70-9.
2. Lior H: Classification of *Escherichia coli* "in" Gyles CL, *Escherichia coli* in domestic animals and humans, Wallingford, United Kingdom: CAB International 1996: 31-72.
3. Scaletsky ICA, Silva MLM and Trabulsi LR: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells, Infect. Immun., 1984; 45: 534-6.
4. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB and Levine MM: Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*, Infect. Immun., 1985; 48: 378-83.
5. Nataro JP, Kaper JB, Robins Browne R, Prado V, Vial P and Levine MM: Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells, Pediatr. Infect. Dis. J., 1987; 6: 829-31.
6. Mathewson JJ, Johnson PC, DuPont HL, Morgan DR, Thornton SA and Wood LV: A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*, J. Infect. Dis., 1985; 151: 471-5.
7. Mathewson JJ, Johnson PC and DuPont HL: Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers, J. Infect. Dis., 1986; 154: 524-7.
8. Vial PA, Robins Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB and Nataro JP: Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis., 1988; 158: 70-9.
9. Morais TB, Gomes TA and Sigulem DM: Enteroadherent *Escherichia coli* in infant feeding bottles, Lancet, 1997; 349: 1448-9.

53. Madara JL, Patapoff TW, Gillece-Castro B, Colgan SP, Parkos CA and Delp C: 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers, *J. Clin. Invest.*, 1993; 91: 2320-5.
54. Rocha MFG, Maia MET and Bezerra L: *Clostridium, difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1', tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes, *Infect. Immun.*, 1997; 65: 2740-6.
55. Mahida YR, Makh S and Hyde S: Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment, *Gut*, 1996; 38: 337
56. Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB and Levine MM: A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrhea pathogen, *J. Infect. Dis.*, 1990; 161: 1249-51.
57. Vial PA, Mathewson JJ, DuPont HL, Guers L and Levine MM: Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea, *J. Clin. Microbiol.*, 1990; 28: 882-5.
58. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM and Rowe B: An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes, *Current Microbiology*, 1979; 3: 95-9.
59. Fang GD, Lima AAM, Martins CV, Nataro JP and Guerrant RL: Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1995; 21: 137-44.
60. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heeseman J and Karch H: Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*, *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 701-5.
61. Baldwin TJ, Knutton S, Sellers L, Hernandez HAM and Aitken A, Williams Ph.: Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli*., *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2092-5.
62. Guerrant R, Schorling J, McAuliffe J and Souza MD: Diarrhea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992; 47: 28-35.