

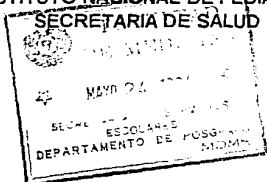
104

123456789  
12372je.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



## DIARREA PERSISTENTE EN NIÑOS SECUNDARIA A INFECCION POR Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA

TRABAJO DE INVESTIGACION QUE PRESENTA :

**RUBEN HUMBERTO MEYER GOMEZ**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:

**TESIS CON PEDIATRIA MEDICA**  
**FALLA DE CRISTAL**  
MEXICO, D.F.  
**TESIS CON**

1994



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

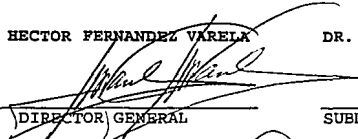
### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.



DR. HECTOR FERNANDEZ VARELA

  
DIRECTOR GENERAL

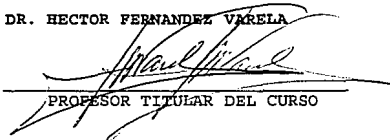
DR. RIGOBERTO MARTINEZ BENAVIDES

  
SUBDIRECTOR GENERAL DE ENSEÑANZA

DR. LUIS HESHIKI NAKANDAKARI

  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE  
ENSEÑANZA Y POSGRADO

DR. HECTOR FERNANDEZ VARELA

  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO

  
ASESOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACION

México, D.F., a 15 de febrero de 1994.

## RESUMEN

Se realizó un estudio clínico con 39 niños internados en la sala de nutrición de Instituto Nacional de Pediatría, para conocer la participación de Escherichia coli enteroagregativa en cuadros de diarrea persistente en niños desnutridos. A la vez se realizaron estudios experimentales para determinar que factores son los responsables de la patogenicidad en este grupo bacteriano. Con el estudio clínico se confirma la estrecha asociación entre diarrea y desnutrición. Al utilizar el suero obtenido de estos niños en pruebas de doble inmunodifusión se observó que estos reconocen componentes secretados al medio de cultivo por cepas EAggEC. Al analizar la especificidad de la respuesta por inmunotransferencia se encontró que los sueros identificaban preferentemente 2 proteínas (108 y 116kDa). Con un modelo animal estandarizado en el laboratorio se encontró que al inocular cultivos bacterianos de cepas EAggEC vivas, en el intestino el daño que se presentaba era similar al descrito en el estudio histopatológico realizado a los niños muertos durante el estudio. Este efecto se reprodujo al emplear el mismo modelo pero inoculando fracciones purificadas de proteínas secretadas por cepas EAggEC. Los resultados obtenidos permiten asegurar la participación de este grupo bacteriano en la patogénesis de la diarrea persistente. Este es uno de los pocos casos en que se cumplen ampliamente los postulados propuestos por Koch para las enfermedades infecciosas.

## SUMMARY

A clinical study was conducted with 39 hospitalized children in The National Institute of Pediatrics in Mexico City in order to determine the participation of enteroaggregative Escherichia coli (EAggEC) in cases of persistent diarrhea in malnourished children. Experimental studies were carried-out simultaneously to ascertain factors accounting for the pathogenesis of this bacterial group. A close link between diarrhea and malnutrition was evidenced in the study. Serum collected from these children revealed a response to proteins secreted by EAggEC into the culture media. When the specificity of this response was analyzed by Western blot, it was found that from sera infected children identified two proteins with molecular weights of 108 and 116 kDa, respectively. The proteins were purified by sequential chromatography and their effect on the intestine was tested in ligated rat gut loops. Severe hemorrhagic lesions were found in these assays, similar to those produced by live EAggEC in the same animal model and to those found in the intestine of children who had died as a consequence of EAggEC-associated persistent diarrhea. The results indicate that these secreted proteins are an important pathogenicity factor utilized by EAggEC strains to cause disease in humans.

## INTRODUCCION

Los criterios introducidos por Henle en 1840 pero conocidos como postulados Koch fueron propuestos como un procedimiento para tener elementos que permitiera establecer la asociación causal entre el aislamiento de un microorganismo con una enfermedad específica. Estos postulados consideran que los microorganismos se encuentra regularmente en las lesiones relacionadas con la enfermedad, lo cual permite su aislamiento y cultivo en forma pura en medios artificiales. La inoculación de estos microorganismos a animales de experimentación debe reproducir la enfermedad y permitir su recuperación de las lesiones que producen con el fin de darlos nuevamente a otros humanos susceptibles en quienes se reprodujera la enfermedad original. La falta de modelos animales adecuados en la época de Koch impidió la reproducción experimental de muchas enfermedades identificadas en humanos. A pesar de que en la actualidad este problema se ha resuelto, contándose con un gran número de animales de experimentación, son contados los padecimientos infecciosos en los que se ha podido cumplir con tales postulados.

Dentro del grupo de cepas de Escherichia coli capaces de producir diarrea en humanos, el de más reciente descripción se denomina como enteroagregativo (EAggEC), E.coli (1-3). Estas bacterias derivan su nombre del patrón de adherencia que presentan en cultivos de células HEp-2 (1-5). Diferentes estudios epidemiológicos han establecido una estrecha asociación entre EAggEC y diarrea en niños (2,3,6,7). Estudios prospectivos realizados en la India (2,6), México (3) y Brasil (7) han mostrado que existe relación entre el aislamiento de estas bacterias con la presencia de diarrea persistente en lactantes y niños menores de 5 años. Aunque se han descrito diversas propiedades de virulencia en EAggEC, hasta el momento se ha demostrado de manera precisa como produce daño al huésped. Utilizado diferentes modelos animales varios grupos de investigadores (8-10), han observado que estas bacterias se adhieren a las vellosidades intestinales en agregados semejantes a los descritos en cultivos de células HEp-2. Con un sistema in vitro que emplea intestino de conejo, Savarino y cols. (11), han identificado una proteína de bajo peso molecular con actividad enterotóxica elaborada por algunas cepas EAggEC. Esta proteína se ha denominado enterotoxina termoestable de E.coli enteroagregativa (EAST1). La proteína cuya expresión esta codificada por un plásmido, incrementa los niveles de GMP cíclico en los enterocitos (12). Esta actividad es semejante a la que produce la enterotoxina termoestable (STa) elaborada

por algunas cepas enterotoxigénicas de E.coli (ETEC). Recientemente Baldwin y cols. (13) han descrito una proteína termolábil de aproximadamente 120kDa secretada por algunas cepas EAggEC. Esta proteína muestra una reacción inmunológica cruzada con la hemolisina de E. coli e incrementa los niveles intracelulares de calcio de células HEp-2. Debido al efecto que produce esta proteína sobre el citoesqueleto de la célula en cultivo se ha propuesto que su presencia en el intestino pudiera ser otro determinante de virulencia de EAggEC. En nuestro laboratorio hemos identificado dos proteínas secretadas por cepas EAggEC al medio de cultivo, las cuales producen una lesión hemorrágica severa en el intestino de ratas utilizadas como un modelo animal de infección causada por estas bacterias (14). A pesar de estos hallazgos de laboratorio, a la fecha desconocemos cómo las cepas EAggEC producen diarrea ya que ninguno de los factores identificados satisface plenamente los postulados de Koch (15). En el presente trabajo se presentan datos referentes a la participación de cepas EAggEC en cuadros de diarrea persistente en niños internados en la Sala de Nutrición del Instituto de Pediatría (INP) de la Ciudad de México, así como la respuesta del suero de estos niños contra proteínas secretadas al medio de cultivo por diferentes cepas del mismo grupo, así como de voluntarios inoculados experimentalmente con estas bacterias. Se muestran además datos experimentales obtenidos en un modelo



del intestino de ratas infectadas con cepas EAggEC o sus productos y se comparan con observaciones realizadas en tejido intestinal de algunos niños muertos a consecuencia de diarreas persistentes causadas por estas bacterias, con lo cual se pretende cumplir con los postulados de Koch, para asegurar la participación de estos gérmenes en la patogénesis de la diarrea asociada con infección por EAggEC.

## MATERIALES Y METODOS

### Estudio clínico

Se estudiaron 39 niños internados en la sala de Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría (INP) durante 1985-1986. Para el estudio clínico se revisaron los expedientes y para el estudio histopatológico de los niños que fallecieron se revisaron los reportes del Servicio de Patología de dicha Institución.

### Cultivo de heces

Se realizaron cultivos de las heces de los niños cada semana durante su estancia en el hospital, iniciando al momento de su ingreso. Las muestras fueron analizadas para la búsqueda de rotavirus, parásitos, Shigella, Salmonella, Campylobacter jejuni, y Escherichia coli de los grupos diarreogénicos (16). Cada vez que el niño presentaba

diarrea, se tomaba una segunda muestra de materia fecal, independientemente del tiempo transcurrido a partir del cultivo anterior. Se guardaron para estudio 10 cepas de E.coli de cada cultivo, con el fin de determinar su serotipo y su capacidad de adherencia a células HEp-2 (17).

#### Experimentos en animales

Para la técnica de asa ligada de intestino se utilizaron ratas Srague-Dawley de 3 meses de edad (18). Previa anestesia se abrió el abdomen de los animales y se prepararon segmentos de intestino de aproximadamente 10 cms de longitud. Se inocularon con 1.0 ml de una suspensión que contenía  $10^8$  bacterias/ml, crecidas previamente en caldo nutritivo e incubadas a 37°C durante 18 hrs. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente durante toda la noche y se sacrificaron por sección medular previa anestésia. Se midió la acumulación de líquido en cada segmento de intestino y se obtuvieron fragmentos para estudio histológico, las muestras se fijaron con formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina. La presencia de bacterias en las muestras de tejido se determinó por tinción con plata.

Las asas ligadas de intestino de un segundo grupo de animales se inocularon con 1.0 ml de los sobrenadantes de cultivos de cepas EAggEC precipitados con sulfato de amonio, ajustándose cada uno a 100 ug de proteína total resuspendida

en solución de cloruro de sodio 0.15M. Los animales se sacrificaron seis horas después y se analizó el intestino para determinar la acumulación de líquido y la presencia de cambios macroscópicos. Para el estudio histológico se cortaron segmentos de aproximadamente 1cm y se procedió como en el caso anterior. La tinción para este caso se realizó con hematoxilina y eosina. Preparaciones de control fueron obtenidas inoculando asas ligadas de diferentes animales únicamente con solución salina 0.15M. El exámen histológico fué realizado en forma independiente por dos patólogos expertos, quienes no conocían el tipo de muestra inoculada en cada segmento de intestino.

Se realizaron experimentos similares en un tercer lote de animales. En estos segmentos intestinales se inocularon proteínas secretadas por cepas EAggEC obtenidas de los sobrenadantes y purificadas secuencialmente por cromatografía en DEAE celulosa y Sephadex G100 (LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia).

#### **Muestras de suero humano**

Se tomaron 120 muestras de suero de los 39 niños estudiados. Estas se analizaron primeramente por doble inmunodifusión (19), para conocer si existía una respuesta inmune sistémica contra proteínas secretadas al medio de cultivo por diferentes cepas EAggEC. La respuesta específica

contra ciertas proteínas se analizó por inmunotransferencia por el método de Towbin y cols.(20). Las proteínas transferidas a nitrocelulosa e identificadas por los sueros humanos se revelaron con antiIgG humana obtenida en cabra conjugada con peroxidasa de rabano (Kirkeegard and Perry, Laboratories, Gaithersburg, MD).

#### **Adherencia a células.**

La adherencia de las bacterias a células HEP-2 se estudió de acuerdo al procedimiento descrito por Cravioto y cols (17). Para esta prueba las bacterias se crecieron en caldo peptonado con 1% de D-Manosa y se incubaron a 37°C durante toda la noche. De este cultivo se inocularon 25 ul y se inocularon sobre monocapas de células HEP-2 previamente preparadas en placas de 24 pozos. Las placas se incubaron durante 3 horas y las preparaciones se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa.

## RESULTADOS

### Estudio clínico e histopatológico.

De los 39 niños incluidos en el estudio 20 fueron del sexo masculino y 19 del femenino, todos menores de 2 años incluidos (26). El diagnóstico de ingreso en 28 de ellos fué de un cuadro enteral asociado a desnutrición de tercer grado de tipo marasmo. Once restantes ingresaron por desnutrición asociada a otros padecimientos infecciones no intestinales. La biometria hemática practicada a su ingreso reportaba anemia normocítica hipocrómica en 37 de los 39 niños, asociada con leucocitosis en 14 casos. El estudio coproparasitológico inicial sólo fué positivo en 4 de los niños, reportandose en todos ellos quistes de Giardia lamblia. En el coprocultivo inicial, además de las cepas de E.coli aisladas en todos los casos, se identificaron Campylobacter jejuni en 4 niños, Shigella flexneri en uno y rotavirus en dos casos.

Siete de los 39 niños fallecieron durante su estancia en el Instituto, en cuatro de ellos el diagnóstico final fué de diarrea persistente agudizada, y en tres el de enteritis aguda. Cinco de los niños que fallecieron presentaron septicemia clínica y bacteriológica. Los siete niños fallecidos tenían desnutrición de tercer grado tipo marasmo.

En tres de estos siete niños con diarrea persistente se realizó estudio postmortem. La descripción tanto macroscópica como microscópica de estado del intestino de estos niños fue muy semejante. Se encontraron cambios inducidos por la lisis, presencia de congestión en ileón, mucosa congestiva, vellosidades planas, múltiples úlceras, colon con puntilleo hemorrágico y presencia de múltiples úlceras. La descripción microscópica se describe como tejido linfático abundante y organizado en folículos, mucosa infiltrada densamente por linfocitos, histiocitos y escasas células plasmáticas, estructuras glandulares con zonas de necrosis de mucosa y submucosa con abundantes neutrófilos.

En todos los niños fallecidos a consecuencia de diarrea persistente se aislaron de heces cepas EAggEC en varios coprocultivos durante su estancia hospitalaria y en el momento del estudio postmortem.

#### **Respuesta del suero humano**

Por inmunodifusión se identificaron veintiseis muestras de suero de 15 niños capaces de reconocer protefinas secretadas por cepas EAggEC presentes en el sobrenadante del medio de cultivo donde se habían crecido (figura 1). Esta respuesta no se observó en las pruebas de inmunodifusión realizadas con proteínas producidas en el cultivo por cepas de E. coli incapaces de adherirse in vitro a células HEp-2.

Para determinar la especificidad de esta respuesta se realizaron ensayos de inmunotransferencia contra proteínas secretadas por una cepa EAggEC (049766) (figura 2). En dos de los niños se observó respuesta únicamente contra proteínas de bajo peso molecular; las muestras de otros 6 niños reconocieron una banda tanto de proteína de 116kDa; mientras que las muestras de los 7 niños restantes reconocieron tanto de la proteína de 116 como otra de 108kDa.

La presencia de esta respuesta inmune específica contra proteínas secretadas por cepas EAggEC se encontró únicamente en niños de cuyas heces se habían aislado cepas de E. coli con adherencia agregativa a células HEp-2, todas ellas capaces de secretar al medio de cultivo proteínas de 108 y 116 kDa (figura 3).

#### **Experimentos en animales**

La figura 4 muestra la capacidad de adherencia de las cepas agregativas de E. coli a la mucosa del intestino de rata, respuesta que no fué observada cuando se inocularon cepas no agregativas utilizadas como control.

La inoculación de las asas ligadas del intestino de rata con los precipitados protéicos de sobrenadantes de cultivo de la cepa 049766 no produjo producción acumulación detectable de líquido. Sin embargo, los estudios histopatológicos

mostraron claramente que las proteínas secretadas por esta cepa eran capaces de producir cambios importantes en la mucosa intestinal y en la lámina propia del intestino (figura 5). Para conocer si las lesiones antes descritas eran causadas por alguna de estas proteínas contra las cuales se había detectado una respuesta específica en los sueros de niños infectados en forma natural con cepas EA<sub>g</sub>gEC se inocularon asas ligadas del intestino de rata con fracciones protéicas sobrenadante purificadas a partir de precipitados con sulfato de amonio del de un cultivo de la cepa 049766. En la figura 6 se puede apreciar que la inoculación de las fracciones que contenían las proteínas de 108 y 116kDa produjeron lesiones hemorrágicas en el intestino de los animales, acompañados de una respuesta inflamatoria severa y de proliferación de tejido linfoide. Para comparación se muestra una preparación del intestino de uno de los niños muertos de diarrea persistente durante el estudio, en la cual se puede apreciar que las lesiones encontradas eran muy parecidas a las producidas por la cepa 49766 en el modelo animal (figura 8). Es importante señalar que esta cepa EA<sub>g</sub>gEc 49766 había sido aislada del contenido intestinal de este mismo niño en el momento de la autopsia.



## Discusión

Los resultados del estudio clínico confirman la estrecha asociación entre diarrea y desnutrición. Los resultados muestran también que la diarrea o persistente conduce a etapas de desnutrición más severas que agravan el estado de los pacientes, e incluso pueden llevar a la muerte lo cual se pudo corroborar por lo observado en un grupo importante de los niños estudiados.

Aunque no en todos los casos se identificaron cepas EAggEC en las heces de los mismos, la respuesta del suero de 13 de estos niños contra proteínas que secretan cepas EAggEC, indica que fueron colonizados por este tipo de microorganismos con lo cual y de acuerdo a lo propuesto por Falkow (15) se cumple con los postulados moleculares de Koch. En estudios previos en el laboratorio (14), se ha observado el efecto que producen sobre el intestino de ratas fracciones purificadas de proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo de cepas EAggEC. El hecho de que en el ensayo de inmunotransferencia la mayoría de los sueros reconocieran preferentemente las proteínas de 108 y 116kDa nos permite plantear que una o ambas son responsables del daño observado. La evidencia epidemiológica que existe hasta el momento asegura la participación de EAggEC en la etiología de la diarrea persistente y/o con sangre (2,3,6,7), los modelos animales empleados muestran el potencial diarreogénico de

este grupo de cepas, sin embargo los diferentes estudios en voluntarios realizados (21, Tacket manuscrito en preparación) han resultado poco satisfactorios ya que solo un escaso número de los individuos desafiados desarrollan diarrea después de recibir un inóculo grande de cepas EAggEC. En un trabajo en colaboración con un grupo de investigadores del Centro para el Desarrollo de Vacunas en Baltimore se probó la respuesta del suero de diferentes voluntarios norteamericanos inoculados con la cepa EAggEC 17-2, se observó que todos los sueros obtenidos incluso antes del desafío reconocían las proteínas de 108 y 116kDa. La falta de respuesta de los voluntarios ante el desafío con cepas EAggEC se debe probablemente a la inmunidad que tienen contra estas proteínas. La respuesta de los niños ante la infección por EAggEC es diferente ya que algunos sólo presenecen un cuadro de diarrea leve y otros desarrollan diarrea persistente, una de las razones indudablemente son las características del huésped, sin embargo, la bacteria juega un papel importante. Utilizando el modelo de cámaras de Ussing (11) [datos no mostrados], se ha mostrado que al emplear concentraciones altas de las proteínas secretadas por las cepas EAggEC se induce un efecto citotóxico, por el contrario concentraciones bajas producen únicamente un efecto secretor. Esta puede ser la explicación con respecto a la evolución clínica que puede tener un niño. El ensayo en asa ligada en rata empleando cultivos vivos de diferentes cepas

EAggEC confirmo las observaciones previamente realizadas por Vial (1) y Tzipori (8). Para el propósito de la investigación fué útil ya que se pudo contar con un sistema para comparar el daño ocasionado al intestino en un modelo animal el que presentaron los niños muertos durante el estudio. Las lesiones descritas en ambos casos son similares y lo que ha resultado de enorme aporte es haber reproducido el efecto con las fracciones proteicas en las que se encuentran las proteínas reconocidas por el suero de los niños. Los resultados obtenidos son contundentes para asegurar que en este cuadro clínico se cumplen ampliamente los postulados propuestos por Henle-Koch. El siguiente paso es la purificación de las proteínas identificadas para implementar sistemas para diagnóstico rápido y empezar a estudiar la respuesta inmune con el propósito fundamental de evaluar su posible uso como inmunógenos protectores.

## REFERENCIAS

- 1.- Vial PA, R Robins-Browne H Lior, V etal, A. Elsayed. Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 1988; 158: 70-79
- 2.- Bhan, M.K., P. Raj, M.M. Levine, J.B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal. 1989. Enteroadgregative Escherichia coli associated with persistent diarrhea ia a cohort of rural children in India. J. Infect. Dis. 159: 1061-1064
- 3.- Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, and C. Eslava. 1991. association of Escherichia coli HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet 337: 262-264
- 4.- Nataro J.P., J.B. Kaper, R. Robins-Browne, V.Prado, P.A. Vial, and M.M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheogenic Escherichia coli to HEp-2 cells. J. Ped. Infect. Dis. 16: 829-831

- 5.- Nataro, J.P., D. Yikang, D.R. Maneval, A.L. German, W.C. Martin, and M.M. Levine. 1992. Agregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect. Immun. 60:2297-2304
- 6.- Bhan, M.K., V. Khoshoo, H. Sommerfelt, P. Raj, S. Sazawal, and R. Srivastava. 1989. Enteroaggregative Escherichia coli and Salmonella associated with nondysenteric persistent diarrhea. Pediatr. Infect. Dis. J. 8: 499-502
- 7.- Wanke, C.A., J.B. Schorling, L.J. Barret, M.A. De Souza, and R.L. Guerrant. 1991. Potential role of adherence traits of Escherichia coli in persistent diarrhea in a urban Brazilian slum. Pediatr. Infect. Dis. J. 10:746-751
- 8.- Tzipori, S., J. Montanaro, R.M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M.M. Levine. 1992. Studies with enteroaggregative Escherichia coli in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect. Immun. 60:5302-5306

- 9.- Yamamoto T., S. Endo, T. Yokota, and P. Echeverria. 1991. Characteristics of adherence of enteroaggregative Escherichia coli to human and animal mucosa. Infect Immun. 59:3722-3739
- 10.- Knutton S., R.K. Shaw, M.K. Bhan, H.R. Smith, M.M. McConnell, T. Cheasty, P.H. Williams, and T. Baldwin. 1992. Ability of enteroaggregative Escherichia coli strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. Infect Immun. 60:2083-2091
- 11.- Savarino S.J., A. Fasano, D.C. Robertson, and M.M. Levine. 1991. Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. J. Clin. Invest. 87:145-1455
- 12.- Savarino S.J., A. Fasano, J. Watson, B.M. Martin, M.M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E.coli heat-stable toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:3093-3097

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 13.- Baldwin, T.J., S. Knutton, L. Sellers, H.A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams. 1992. Enteroaggregative Escherichia coli strains secrete a Heat labile toxin antigenically related to E.coli hemolysin. Infect. Immun. 60:2092-2095
- 14.- C. Eslava, J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto. 1993 Identification of a protein with toxigenic activity produced by Enteroaggregative Escherichia coli. Proccidings 93rd General Meeting, Atlanta, Georgia.
- 15.- Falkow S. 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. Rev. Infect. Dis. 10(suppl):274-276
- 16.- A. Cravioto, R.E. Reyes, R. Ortega, G. Fernández, R. Hernández, and D. López. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort rural mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidem Inf 101:123-134.
- 17.- Cravioto, A., R.J. Gross, S.M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3: 95-99

- 18.- Lange, S.A. 1982. A rat model for an in vivo assay of enterotoxic diarrhea. FEMS Microbiol LETT. 15: 239-242
- 19.- Ouchterlony, O. 1968. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Harbor Science, Publisher, Mich.
- 20.- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4530-4534
- 21.- Mathewson J.J., P.C. Johnson, H.L. Dupont, T.K. Satterwhite, and D.K. Winsor. 1986. Pathogenicity of enteroadherent Escherichia coli in adult volunteers. J. Infect. Dis. 154:524-527