



ARTIGO ORIGINAL

Efeito dos sobrenadantes de culturas de amostras de Escherichia coli enteropatogênicas clássicas (EPEC) sobre o transporte transepitelial de sódio em mucosa jejunal de ratos submetidos a perfuração intestinal "in vivo"

The effect of the supernatants of enteropathogenic Escherichia coli strains on the intestinal transport of sodium in rats "in vivo"

Fernando Fernandes*, Olga M. Silvério Amancio**, Luis Rachid Trabulsi*** & Ulysses Fagundes Neto****

Resumo

Os efeitos dos sobrenadantes de 2 a 5 amostras de cada um dos seguintes sorotipos EPEC: 026:H-, 086:H34, 0111:H-, 0119:H6, 0126:H21, 0128ab:H35 e 0142:H-, isoladas em cultura de fezes de crianças com diarreia foram estudadas. Foram também estudadas 3 amostras do sorotipo 0157:HNT, produtora da citotoxina denominada Shiga-like. Foram selecionadas 3 soluções controles, a saber: 1-SC1 (solução glicosalina); 2-SC2 (solução do meio de cultura TSB); 3-SC3 (sobrenadante de cultura de amostra de E. coli K12711, bactéria reconhecidamente não enterotoxigênica). Essas soluções foram perfundidas no intestino delgado de ratos machos "in vivo" e o transporte transepitelial de sódio foi determinado. A análise comparativa entre as soluções controles revelou que sempre ocorreu absorção de sódio, porém houve diferenças significativas quanto à intensidade dos transportes entre elas (SC1 > SC2 e SC3). Os sorotipos 0111:H-, 026:H21 e 0142:H2, assim como o sorotipo 0157:HNT provocaram secreção de sódio, cujos valores mostraram-se significativamente diferentes das 3 soluções controles. Os sorotipos 0128ab:H35 e 0119:H6 induziram processo secretor significativo em relação às soluções SC1 e SC2, e SC1, respectivamente. Os sobrenadantes da cultura dos sorotipos de investigados, assim como o sorotipo 0157:HNT provocaram importante alteração no transporte transepitelial de sódio devido à ação de um princípio ativo produzido de forma homogênea, porém de grandeza variável, por estas bactérias.

J. Pediatr. (Rio). 1994; 70(2):95-99: transporte intestinal, E. coli enteropatogênica, sódio, infecção intestinal, toxina

Abstract

We studied the effect of the supernatants of 2 to 5 samples of one of the following serotypes of EPEC: 026:H-, 086:H34, 0111:H-, 0119:H6, 0126:H21, 0128ab:H35 and 0142:H-, isolated from the stools of infants with gastroenteritis. We also studied 3 samples of the serotype 0157:HNT, that produces the Shiga-like toxin. The following control solutions were selected 1-SC1 (glucose-saline solution); 2-SC2 (TSB broth culture solution); 3-SC3 (E. coli K12711 culture supernatant, a non enterotoxigenic serotype). These solutions were perfused in the small intestine of rats "in vivo" and sodium transport was determined. The comparison among the 3 control solutions revealed that there was always sodium absorption, but there was a difference in the intensity of the transport (SC1 > SC2 and SC3). The serotypes 0111:H-, 026:H-, 0126:H21, and 0142:H2, as well as the serotype 0157:HNT, induced sodium secretion and these values were significantly different in comparison with the 3 control solutions. On the other hand, the serotypes 0128ab:H35 and 0119:H6 induced sodium secretion but the differences were only significant in comparison with the SC1 and SC2, and SC1, respectively. The supernatants of the serotypes investigated provoked an important derangement in sodium transport probably due to the presence of an enterotoxin.

J. Pediatr. (Rio). 1994; 70(2):95-99: intestinal transport, enteropathogenic E. coli, sodium, intestinal infection, toxin.

Introdução

As cepas de EPEC são atualmente definidas como aquelas E. coli provocadoras de diarreia e pertencentes a sorogrupos epidemiologicamente incriminados com enteropatogenicidade, mas cujos mecanismos não estão relacionados à produção de toxinas termo-lábil (LT) ou termo-estável (ST) ou à invasão da célula epitelial colônica¹. A maioria das cepas de EPEC possui a propriedade de adesão às células

Disciplina de gastroenterologia, laboratório de pesquisas do Departamento de Pediatria & Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina (EPM).

* Doutor em medicina pela disciplina de gastroenterologia do Departamento de Pediatria da EPM.

** Professor adjunto do Departamento de Pediatria da EPM

*** Professor titular da disciplina de Microbiologia da EPM

**** Professor titular da disciplina de Gastroenterologia do Departamento de Pediatria da EPM.

Este trabalho foi financiado pelo CNPq.

HeLa de forma localizada (LA), a qual, ao que tudo indica, é específica para enteropatogenicidade, sendo denominada EAF+ (*Escherichia coli* Adherence Factor)² e ³. A capacidade de produzir EAF+ está relacionada a um plasmídeo, o qual pode ser detectado por sondas genéticas DNA altamente sensíveis e específicas⁴. Entretanto, nem todas as EPEC são capazes de provocar adesão localizada em células HeLa ou possuir plasmídeos EAF+⁵ e ⁶.

As EPEC EAF+ produzem uma lesão característica que consiste de intensa adesão de micro-colônias bacterianas às microvilosidades do enterócito e destruição localizada das mesmas. Ocorre, concomitantemente, a formação de um pedestal na porção apical da membrana plasmática do enterócito imediatamente abaixo onde as bactérias estão aderidas^{6,7}. Este fenômeno foi reproduzido experimentalmente em animais de laboratório tendo sido denominado "Adesão-Desvanecência" (*Attaching-Effacing*) (AE)⁸. Além disso, há evidências de que alguns sorogrupos EPEC apresentam certas características comuns com as recentemente descritas *E. coli* enterohemorrágicas, quanto à produção de uma exotoxina, a qual possui propriedade secretora intestinal⁹.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se sobrenadantes de cultura de EPEC, isoladas das fezes de crianças com diarreia, são capazes de induzir efeito secretor de sódio no intestino de ratos submetidos à perfusão "in vivo".

Material e métodos

1 - Sobrenadantes de Cultura e Sorotipos de EPEC

Foram estudadas de 2 a 5 amostras de cada um dos seguintes sorotipos geralmente considerados EPEC:026:H; 086:H34; 0111:H-; 0119:H6; 0126:H21; 0128ab:H35 e 0142:H-¹⁰.

As amostras foram isoladas em cultura de fezes de crianças com diarreia, com idades que variaram de 2 dias a 5 anos. A identificação bioquímica e sorológica das *E. coli* foi realizada na Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina. Os sobrenadantes da cultura foram obtidos após cultivo de amostras de *E. coli* em 400 ml de Tryptic Soy Broth - TSB (Difco Labs., Detroit, Mich) a 37 °C por 20 horas em condições aeróbicas. As culturas foram centrifugadas sob refrigeração a 7000 rpm por 15 minutos, em centrífuga Sorvall, modelo RC2-B, e os sobrenadantes filtrados em membranas com porosidade igual a 0,45 µ de diâmetro (Millipore Corporation, Bedford, Mass) e mantidas a 5 °C por tempo não superior a 24 horas.^{11,12,13,14,15,16} Foram também estudadas 3 amostras do sorotipo 0157:HNT, cedido pelo Center of Diseases Control, Atlanta, Georgia, que é produtora de uma citotoxina denominada Shiga-like toxina.¹⁷

2 - Soluções controles

Os experimentos foram completados com a perfusão de 3 soluções controles, a saber:

A- Solução controle 1 (SC1) - solução glico-salina contendo (por litro de água) 7,0 g de NaCl, 0,382 g de KCl, 0,82 g de NaHCO₃, 0,5 g de CaCl₂, 0,2 de MgSO₄ e 1,440g de glicose.

B- Solução controle 2 (SC2) - TSB. Esta solução foi adotada como controle considerando-se a possibilidade de que várias substâncias presentes no caldo de cultura (TSB) pudessem interferir no transporte transepitelial de glicose, sódio e água.

C- Solução controle 3 (SC3) - Sobrenadante de cultura de amostra de *E. coli* K12 711, bactéria reconhecidamente não enteropatogênica, obtida de maneira idêntica à descrita para as amostras EPEC estudadas. Esta solução foi adotada como controle negativo, para testar a possibilidade de que substâncias liberadas durante o crescimento bacteriano pudessem interferir no transporte transepitelial de glicose, sódio e água.

Nas SC e nos sobrenadantes de cultura de sorotipos de EPEC, os valores de Sódio e Glicose foram ajustados a uma concentração final de 120 mEq/l e 180 mg%, respectivamente.

Poli(etil)enoglicol (PEG) foi adicionado a todas as soluções à concentração de 0,6 g/l, e utilizado como marcador não absorvível para determinar o transporte transepitelial de água. Fixou-se o pH das soluções em 7,0, obtendo-se osmolaridade final de 320 mOsm/kg de água para a solução glico-salina e entre 325 e 350 mOsm/kg de água para as demais soluções.

3 - Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos cepas EPDM-1 Wistar, com 6 a 8 semanas de vida e peso corporal entre 160 e 255 gramas. Durante as 4 primeiras semanas de vida receberam aleitamento natural e após o desmame foram alimentados com ração padronizada "CATIV 1" (Agrovita, São Paulo, SP), ad libitum. Os animais foram mantidos em jejum nas últimas 18 horas prévias ao experimento, sendo permitida a ingestão hídrica.

4 - Técnica de perfusão intestinal

O transporte jejunal de sódio foi estudado "in vivo" de acordo com a técnica de Wapnir e Lifshitz¹⁸.

As soluções a serem perfundidas foram imersas em banho-maria a 40° para evitar a ocorrência de hipotermia no animal de experimentação. A extremidade distal de uma sonda de polietileno número 8 foi mergulhada na solução a ser testada, e seu corpo foi acoplado a uma bomba de infusão peristáltica Harvard (modelo 1210). Para que a solução atingisse a temperatura de 36° quando perfundida na alça jejunal, acoplou-se a extremidade proximal da sonda de polietileno a uma outra sonda espiralada, de polietileno número 6, a qual permaneceu imersa em banho-maria durante todo o experimento.

O período de perfusão estendeu-se por 110 minutos, sendo os primeiros 30 minutos destinados para que os solutos alcançassem um estado de equilíbrio com a mucosa jejunal. Durante este período de tempo as amostras do perfusado foram desprezadas, e, a partir de então, foram colhidas amostras a cada 10 minutos durante os 80 minutos restantes. Foram perfundidos pelo menos 2 ratos para cada amostra isolada, perfazendo um total, de no mínimo 4 e no

máximo 9 ratos, para cada biotipo de EPEC e as respectivas soluções controles.

5 - Determinações bioquímicas

Foram realizadas as seguintes dosagens em duplicata, nas amostras do perfusado e das soluções de perfusão: sódio, em fotômetro de chama - Instrumentation Laboratories modelo 143; PEG, de acordo com método descrito por Skoog¹⁹.

6 - Mensuração do transporte intestinal de sódio

Os fluxos de água foram calculados a partir das concentrações de PEG, determinados pela retração PEGi/PEGf=PEGr, onde "i" representa a concentração de PEG na solução de perfusão e "f" a concentração do mesmo nos perfusados. Os transportes de sódio foram determinados através da seguinte fórmula:

$$T = \frac{Ci - (Cf \times PEGr) \times RP \times 1000}{CI}$$

T = transporte transepitelial

PEGr = valor numérico da relação PEGi/PEGf

RP = ritmo de perfusão em ml/min

CI = comprimento do segmento intestinal perfundido em cm

Ci = concentração de sódio na solução de perfusão mEq/l

Cf = concentração de sódio no perfusado mEq/l

Os valores de T quando precedidos de sinal positivo, indicam absorção e, quando precedidos de sinal negativo, secreção, sendo expressos para o sódio em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{cm}$.

7 - Análise estatística

A análise de variância para postos de Friedman foi utilizada para a comparação, em cada período dos valores calculados e agrupados nos oito períodos de perfusão, para cada biosorotipo. Quando esta análise mostrou diferenças significativas foi complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas.

A análise de variância de postos de Kruskal-Wallis, para comparação entre os sorotipos e as soluções controles. Quando esta análise mostrou-se significativa foi complementada com o teste de Dunn²⁰.

Resultados

Os valores das medianas dos transportes transepiteliais de sódio, considerando-se cada uma das soluções controles (SC1, SC2, SC3) em separado, nos distintos períodos de tempo da perfusão, não mostram diferenças significativas quando comparados entre si (tabela 1). Diante desta evidência estatística pode-se agrupar todos os valores obtidos nos vários períodos de tempo da perfusão de cada solução controle, e utilizar o valor médio obtido, para efetuar as comparações pertinentes. A análise comparativa entre as diferentes soluções controles revelou, em primeiro lugar, que sempre ocorreu absorção de sódio e, por outro lado, que houve diferenças significativas quanto à intensidade do transporte de sódio (tabela 2). Os valores das medianas dos transportes transepiteliais de sódio, considerando-se cada uma das soluções dos sorotipos de EPEC em separado, nos distintos períodos de tempo da perfusão, não mostraram diferenças significativas quando comparadas entre si (tabela 3). Os valores do transporte de sódio com os sorotipos 0111:H-, 026:H-, 0126:H21 e 0142:H2 foram significativamente inferiores em relação ao ocorrido com as 3 soluções (SC1, SC2, SC3). Por outro lado, o valor do transporte de sódio com o sorotipo 0128ab:H35 mostrou-se significativamente inferior aos observados com as soluções controles SC1 e SC2, ao passo que para o sorotipo 0119:H6 houve diferença significativa apenas com a solução controle SC1. O transporte de sódio induzido pelo sorotipo 086:H34 não se mostrou diferente das soluções controles (tabela 4).

Discussão

As soluções controles escolhidas, SC1, SC2 e SC3, apresentaram valores significativamente diferentes entre si quanto ao transporte de sódio, embora nos 3 casos a resultante final tenha sido absorção. A SC1 revelou transporte de

Tabela 1 - Transportes transepiteliais de sódio ($\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{cm}$) produzidos pelas soluções controles em segmentos jejunais de ratos submetidos à perfusão intestinal "in vivo" em cada período de perfusão (minutos), mediana, número amostral () e resultado da análise estatística.

Soluções Controles	tempos (minutos)							
	10	20	30	40	50	60	70	80
SC1 (56)	+393,3	+393,0	+482,3	+416,1	+424,7	+502,9	+443,0	+472,2N.S.
SC2 (48)	+224,6	+247,4	+255,4	+318,2	+346,9	+288,1	+344,9	+267,6N.S.
SC3 (48)	+235,6	+261,9	+258,2	+234,0	+206,9	+238,6	+222,8	+246,1N.S.

N.S. Não significante

Tabela 2 - Estudo comparativo entre os valores do transporte transepitelial de sódio considerando-se as soluções controles empregadas (SC1-SC2-SC3).

Soluções	N	Mediana	D.P.	Variância
SC1	56	+441,4	96,1	9246,0
SC2	48	+227,3	156,1	24368,6
SC3	48	+210,3	103,0	10605,9

Análise de Variância - Teste de Kruskal-Wallis

SC1 SC2 SC3	p<0,0001
SC1>SC2	p<0,0001
SC1>SC3	p<0,001
SC2 vs. SC3	P<0,25 n.s.

sódio mais elevado em relação às outras duas, e esta diferença estatística confirma as observações de Crane²¹, de que a presença de várias substâncias no caldo de cultura TSB pode afetar negativamente o transporte transepitelial de sódio e água. Por esta razão, enfatizamos a importância de se escolher mais de um tipo de solução controle, neste modelo de investigação experimental, para que se possa eliminar a interferência de substâncias presentes no sobrenadante do caldo de cultura, evitando, assim, a possibilidade do surgimento de resultados falso-positivos. Por outro lado, a SC3 confirmou, como era esperado, que um sorogrupo reconhecidamente não enterotoxigênico não reverte o sentido do fluxo transepitelial de sódio, servindo como controle negativo. Estes dados reforçam a fidelidade deste modelo de perfusão intestinal "in vivo", conforme já observado em estudos de outra natureza^{22,23}. Os sorogrupos EPEC se constituem na principal causa de diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em vários países do mundo sub-desenvolvido^{24,25}. Embora sua capacidade de provocar diarreia tenha sido reconhecida há muitos anos por meio de estudos epidemiológicos bem conduzidos²⁶, os mecanismos patogênicos de ação destes microorganismos permaneceram obscuros até bem recentemente. A rigor durante muito tempo os sorogrupos EPEC eram definidos por exclusão, pela inexistência das características que são observadas em outros grupos de *E. coli* que apresentam patogenicidade, a saber: produção de enterotoxinas (termo-lábil e/ou termo-estável) e invasividade da mucosa colônica. Entretanto, atualmente alguns mecanismos de virulência que têm se mostrado comuns aos sorogrupos EPEC tornaram-se conhecidos, como: 1 - extensa adesão bacteriana ao enterócito, reduzindo a área total de superfície absorviva; 2 - característica lesão em pedestal das microvilosidades intestinais; 3 - redução da área de superfície das microvilosidades e diminuição da atividade das enzimas digestivas, provocando má absorção dos nutrientes; 4 - capacidade de induzir efeito secretor Shiga-like^{27,28}.

Gupta e cols²⁹ descreveram alguns sorogrupos EPEC que eram capazes de produzir uma substância citotóxica, denominada verotoxina. O'Brien e cols³⁰ designaram esta substância de toxina Shiga-like pela sua semelhança com a

Tabela 3 - Estudo comparativo entre os valores do transporte transepitelial de sódio considerando-se as soluções controles e as soluções dos sobrenadantes dos diversos sorotipos de EPEC

Soluções EPEC	N	Mediana	D.P.	Variância
026:H-*	56	+83,6	579,1	335336,3
0111:H-*	72	-36,6	234,7	55109,5
0126:H*	32	-65,4	150,8	22734,9
0142:H2*		-22,3	145,9	21311,3
0128ab:H35**	64	+200,0	259,9	676539,3
0119:H6***	56	+288,3	309,1	95553,5
086:H34****	48	+176,8	357,5	127831,5
0157:HNT*	48	-49,7	80,6	6490,7

Análise de Variância - Teste de Kruskal-Wallis

* transporte de sódio<SC1,SC2,SC3	p<0,001
** transporte de sódio<SC1, SC2	p<0,001
*** transporte de sódio SC1	p<0,001
**** transporte de sódio vs SC1, SC2, SC3 n.s.	

exotoxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1. Atualmente, sabe-se que os sorogrupos de *E. coli* enterohemorrágica, em particular o sorotipo 0157:HNT, são capazes de produzir grandes quantidades desta toxina, compartilhando com os sorogrupos EPEC esta propriedade³¹. Nossos resultados mostraram que os sorogrupos 0111, 026, 0126 e 142 provocaram secreção intestinal em valores significativos em relação às 3 soluções controles, da mesma forma que o sorotipo enterohemorrágico 0157:HNT. Por outro lado, os sorogrupos 0128 e 0119 induziram processo secretor significativo em relação a soluções SC1 e SC2 e SC1, respectivamente. Tudo indica que algum princípio ativo elaborado pelas bactérias e comum aos sorogrupos estudados, presente no sobrenadante da cultura deste microorganismos, seja o responsável pelo processo secretor verificado. Entretanto, vale a pena assinalar que a intensidade do efeito secretor não se manifestou de maneira homogênea, mas sim apresentou comportamento variável dentre os sorogrupos investigados. Klipstein e cols.³² utilizando modelo similar de perfusão intestinal em ratos, com concentrações diversas de ultrafiltrados de sobrenadantes de culturas com os sorotipos 0142:H6, 0114:H2, 0128:H2 e 0127:H6, também verificaram a existência do mesmo efeito secretor. Ressalta-se que o sorotipo 0128 não provocou reação patogênica em voluntários, embora tenha induzido secreção de fluidos no modelo experimental. Na presente investigação, o sorotipo 0128 não apresentou resultados significativos de secreção de fluidos quando comparado com a SC3, demonstrando comportamento mais próximo daquele observado em voluntários humanos na experiência clínica.

Em conclusão, podemos afirmar que os sobrenadantes da cultura dos sorotipos de EPEC investigados, assim como o sorotipo 0157:HNT, reconhecidamente enterohemorrágico, foram capazes de provocar importante alteração no transporte transepitelial de sódio, devido à ação de um princípio ativo produzido de forma homogênea, embora de

grandeza variável, por estas bactérias. Ulteriores investigações devem ser realizadas com o objetivo de isolar este princípio ativo para uma definitiva elucidação de sua natureza.

Referências bibliográficas

01. Sherman P, Drumm B, Karmali M & Cutz E. Adherence of bacteria to the intestine in sporadic cases of Enteropathogenic Escherichia coli-associated diarrhea in infants and young children: a prospective study. *Gastroenterol*, 1989;96:86-94
02. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of escherichia coli belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*, 1979;3:95-9.
03. Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. *Infect. Immun.*, 1984;45:534-6.
04. Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Bravo N, Levine M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. *Infect. Dis.* 1985;152:560-5
05. Scaletsky ICA, Silva MLM, Toledo MRF, Davis BR, Blake PA, Trabulsi LR. Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotypes, and bioserotypes of Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 1985;49:528-32.
06. Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levis MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 1985;48:378-83.
07. Clause CR, Christie DL. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic Escherichia coli. *J.Pediatr*, 1982;100:358-61.
08. Laroux J, Delage G, Gosselin F, Chicoine L. Severe protracted diarrhea due to multiresistant adherent Escherichia coli. *Am. J.Dis. Child*, 1984;138:693-6.
09. Levine M.M, Nataro JP, Karch H et al. 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.
10. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. *J. Infect. Disl*, 1982; 146:763-9.
11. Rowe B. The role of Escherichia coli in gastroenteritis. *Clin. Gastroenterol.*, 1979;8:625-44.
12. Evans DG & Evans Jr. DJ. New surface - associated heat-labile colonization factor antigen (VFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, 1978; 21:638-47.
13. Ewing WH, Tatu, HW, Davis BR & Reavis RW. Studies on the serology of the Escherichia coli group. *CDC Publ. Centers for Disease Control. Atlanta, GA.*, 1956.
14. Fagundes Neto U, Patrício FRS, Wehba J, Reais MHL, Gianotti OF & Trabulsi LR. An Escherichia coli strain that causes diarrhea by invasion of the small intestinal mucosa and indol intolerance. *Arq. Gastroenterol.*, S.Paulo, 1979;16:205-8.
15. Ulshen MH & Rollo JL. Pathogenesis of Escherichia coli gastroenteritis in man - another mechanism. *New England J. Med.* 1980;302:99-101.
16. Toledo MRF, Fontes CF & Trabulsi LR. EPM - modificação do meio Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes da produção de gás a partir de glucose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 1982;13:309-315.
17. O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. Escherichia coli 0157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin (letter). *Lancet* 1983;1:702.
18. Wapnir RA, Lifschitz F. Absorption of amino acids in malnourished rats. *J. Nutr.* 1974;104:843-9.
19. Skoog, B. Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. *Vox. Sang (basel)* 1979;37:345-9.
20. Siegel S. *Estadística no paramétrica*. Trillas, México.
21. Crane RK. Absorption of sugar. In: Code CF et al. *Handbook of physiology*, Washington, American Physiological Society, 1968, v.e, p.1323-51.
22. Teichberg S, Fagundes Neto U, Baune MA & Lifschitz F. Jejunal macromolecular absorption and bile salt deconjugation in protein-energy malnourished rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1981;34:1281-91.
23. Fernández H, Fagundes Neto U, Fernandes F, Pedra MA & Trabulsi LR. Culture supernatants of Campylobacter jejuni induce a secretory response in jejunal segments of adult rats. *Infect. Immunity*, 1983;40(1):429-31.
24. Black RE, Lopez de Romana G, Brown KH, Bravo N, Grados Bazalar, Creed Kanashiro H. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission of Huascar. *Peru. Am. J. Epidemiol.*, 1989; 129:785-99.
25. Sen DS, Balakrishna NG et al. Etiological spectrum of acute diarrhoea in hospitalised patients in Calcutta. *Indian J. Med. Res.*; 1985; 82:286-91.
26. Trabulsi LR, Toledo MRF, Ceballos BSO, Candeias JAN. Epidemiology of diarrheal diseases in South America. In: Tzipori, S. ed. *Infectious diarrhoea in the young*. New York: Elsevier Science Publishers, 1985:121-5.
27. Albert MJ, Faruque SM, Neogi PK et al. An Elisa for the detection of localized adherent classic enteropathogenic E. coli serogroups. *J. Infect., Dis.*, 1991; 164:986-9.
28. Ghosh AR, Nair GB, Naik TP et al. Entero-adherent E. coli as an important diarrhoeagenic agents infants aged below 6 months in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.*, 36:264-8, 1992.
29. Gupta S, Soni NK, Kaur P, Sood DK. Verocytotoxic activity of E. coli 0157 and other "O" serogroups isolated from patients of diarrhea. *Indian J. Med. Res.* 1992; 95:71-6.
30. O'Brien, AD, Chen ME, Holmes RK, Kapper J, Levine MM. Environmental and human isolates of Vibrio cholerae and Vibrio parahemolyticus produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet* 1984;1:77-8.
31. Cantey JR. Shiga toxin - an expanding role in the pathogenesis of infectious diseases. *J. Infect. Dis.*, 1985; 151:766-71.
32. Klipstein FA, Rowe B, Engert RF, Short HB, Gross RJ. Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of Escherichia coli isolated from infants with epidemic diarrhea. *Infect. Immun.*, 1978;21:171-8.