

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA EN UN PRODUCTO CÁRNICO

Characterization of Enteroinvasive *Escherichia coli* Strains in a Meat Product

Luz Bettina Villalobos de Bastardo

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias.
Departamento de Biología, Postgrado de Biología Aplicada.

RESUMEN

Para determinar la presencia de *E. coli* enteroinvasiva, agente causal de diarreas en adultos y niños, se recolectaron muestras para estudios bacteriológicos de carne molida en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. Para la identificación de las *Escherichia coli* enteroinvasivas (ECEI), se siguieron las recomendaciones de Pérez *et al.* [26]), Omura [25], Frampton y Restaino [14]. La serología de las cepas sospechosas de ser ECEI se realizó con antisueros polivalentes. La capacidad invasiva de los microorganismos se confirmó mediante el test de Sereny y la producción de toxina termoestable con el test de Dean. El perfil de susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el sistema automatizado Rapid ATB G. Se aislaron 290 cepas, de las cuales 32 (11.03%) fueron presuntivas ECEI (ONPG+, MUG+ INDOL +, ACETATO + LDC- M-) y de éstas, sólo 10 (3,44%) aglutinaron los antisueros, los serotipos predominantes fueron O144, O29, O143. Tres de estas cepas fueron positivas para el test de Sereny y todas negativas para el test de Dean. Las cepas aglutinables mostraron resistencia marcada contra Amoxicilina/Ac. Clavulónico, Gentamicina y Trimetropim/Sulfametaxol, mientras que 1 sola cepa presentó resistencia a la Tetraciclina. Este estudio demostró la presencia de la ECEI en el tipo de alimento examinado lo cual representa un peligro potencial si no hay una vigilancia sanitaria tanto de los manipuladores del producto como de la temperatura y tiempo de cocción de los subproductos

Palabras clave: *E. coli* enteroinvasiva, caracterización, cárnicos.

ABSTRACT

In order to determinate the presence of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), an agents which causes diarrhea in

adults and children, bacteriological samplings of ground beef were collected in the Cumaná municipal market, Venezuela. The identification of EIEC was carried out according to the method used by Pérez *et al.* [26], Omura [25], Frampton and Restaino [14]. The serology of suspicious strains was realized with polyvalent antiserum, the invasive property was confirmed by the Sereny test, and the heat-stable toxin production by the Dean test. The profile of anti-microbial susceptibility was determined by the automated system Rapid ATB G. A total of 290 strains were i⁺-isolated, of which 32 (11.03%) were presumptive EIEC (ONPG+, MUG+ INDOL +, ACETATE + LDC - M -) and from these, only 10 (3.44%) agglutinated the antiserum, the predominant serum types were O144, O29, O14. Three of these strains were positive in the Sereny test and all were negative in the Dean test. The agglutinable strains showed resistance against Amoxicilin/Clavulonic acid, Gentamicin and Trimetropim/Sulfametaxol antibiotics. Only one strain showed resistance to Tetracyclin. This study demonstrated the existence of ECEI strains in this product which represent a potential hazardous if there is no sanitary care and supervision of meat product handlers as well as of the temperature and cooking-time of sub-products.

Key words: *E. coli* enteroinvasive, characterization, meats.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli se conoce como un microorganismo que se ha visto implicado en diferentes cuadros y brotes diarréicos, cuyas particularidades en las propiedades de virulencia y síndromes intestinales han conducido a la diferenciación de 5 clases de *E. coli* causantes de la enfermedad diarrea: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteropatógena (ECEP), y *E. coli* enteroagregativa (ECEA_{agg}) [2,44], un sexto grupo está ahora en discusión por sus características de adherencia, la *E. coli* enteroadherente difusa [5, 7].

Las *E. coli* enteroinvasivas causan una enteritis por un mecanismo invasor semejante, si no idéntico, al de *Shigella* [27], son una causa importante de enfermedad diarreica y disentería en niños en los países menos desarrollados y de los brotes por alimento de enfermedad entérica en adultos de países industrializados [32, 34, 35], aunque en países en vías de desarrollo también se han aislado pero en menor número [23, 33].

La incidencia de ECEI como agente productor de enteritis es relativamente baja, aunque en América del Sur, Extremo Oriente y Europa Oriental, se aíslan con relativa frecuencia [3, 19, 23, 33].

Los brotes de diarrea asociados con consumo de alimentos o bebidas contaminados por *E. coli* enteropatógena, enterotoxigénica y las enteroinvasivas, en países desarrollados son raros; mientras que los provocados por la *E. coli* enterohemorrágica son relativamente frecuente y siguen una progresión alarmante.

Se ha calculado que *E. coli* enteroinvasiva provoca 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo [8]. El agua contaminada es el principal vehículo de transmisión de los microorganismos, por consumo directo o por su presencia en alimentos que son cocinados, lavados o regados con agua [12]. Personas sintomáticas y asintomáticas son el principal reservorio de estas cepas. ECEI tiene como único reservorio al hombre [15], por lo tanto la transmisión es directa o a través de alimentos o agua contaminada. Su distribución epidemiológica y los alimentos implicados no se conoce muy bien, sólo se estudia la presencia de la bacteria cuando aparecen brotes esporádicos en viajeros o brotes por consumo de alimentos o agua contaminada. Por los momentos se ha asociado con alimentos como los quesos blandos, leche no pasteurizada, carne para hamburguesas [14, 24] y también en frutas y vegetales [30].

Hasta donde tenemos información, en Venezuela no se han realizado trabajos que reporten la presencia de ECEI en alimentos, por lo cual se decidió llevar a cabo el siguiente trabajo con el fin de determinar la presencia de la bacteria en carne molida, caracterizarla y establecer en lo posible una metodología más sencilla para su identificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de las muestras

Las muestras fueron recolectadas al azar asépticamente en diferentes carnicerías en el mercado municipal de Cumaná. Cada muestra de aproximadamente 200 gramos de carne molida, se depositó en bolsas plásticas con cierre hermético y se trasladaron en cavas con hielo al laboratorio, donde fueron analizadas de inmediato para evitar la necesidad de congelarlas.

Procesamiento de las muestras

1. Enriquecimiento: La técnica utilizada para el enriquecimiento fue la descrita por Silva *et al.* [31] y Mehlman y Lovett [21]; según la cual a 25 gramos de carne molida se le añadieron 225mL de BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) estéril, permitiendo la homogeneización de la misma durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación periódica. Después se complementó su volumen a 500mL con BHI seguido por 3 horas a 35°C, posteriormente se añadieron 250mL de TP (Tryptone phosphate broth) doble concentración y se incubó a $44 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 20 horas.

2. Aislamiento e Identificación: Se tomaron azadas de las muestras enriquecidas y se cultivaron en placas de agar Mac Conkey (Difco) y sobre agar EMB-Levine (Merck; Darmstadt, Germany) con el fin de seleccionar sólo aquellas colonias sospechosas de ECEI, las cuales se sembraron en tubos de Agar Carne inclinado para su posterior identificación.

La identificación se realizó utilizando pruebas bioquímicas IMViC, la prueba de Oxidasa, motilidad en agar semisólido, fermentación de la lactosa en medio O/F (Merck), crecimiento en agar Tres Azúcares Hierro (Agar TSI, Merck), descarboxilación de la lisina en medio LIA (Lysine Iron Agar, Merck). Las cepas aisladas, negativas para la prueba de Lisina descarboxilasa, lactosa negativas o débilmente fermentadoras (+ de 48 horas) con motilidad negativa o positiva, se les realizó adicionalmente las pruebas de utilización del Acetato y la actividad MUG (producción de la enzima β -D-glucorinadasa) y pruebas confirmatorias con el empleo de las galerías ID32E (BioMérieux, France).

3. Caracterización serológica: La caracterización serológica de las *E. coli*, se realizó mediante la técnica de aglutinación en lámina con sueros polivalentes I, II y III para ECEI, de la Fundación Venezolana de Salud Infantil [13].

4. Producción de toxinas e invasividad de ECEI: A las cepas aisladas e identificadas como ECEI se les probó la producción de toxina termoestable [11]. Para determinar la capacidad invasiva de las cepas se les practicó test de Sereny [4, 40] utilizando como animales de ensayo cepas de ratones albinos (*Mus musculus*, cepa NMRI).

5. Antibiograma: La susceptibilidad de las ECEI frente a quince 15 diferentes antibióticos se realizó utilizando "Rapid ATB G", un sistema computarizado para antibiogramas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación

Entre noviembre de 1998 y mayo de 1999 se analizaron 124 muestras de carne molida, provenientes de carnicerías ubicadas en el mercado municipal de Cumaná. De estas muestras se aislaron 290 cepas bacterianas con las caracte-

rísticas sospechosas de *E. coli*, de las cuales 32 (11,03%) cepas se confirmaron bioquímicamente como ECEI, las cuales fueron ONPG + MUG + Indol + Acetato +, LDC -, M- [25,27]. La utilización de la prueba de MUG adquiere mayor importancia en la caracterización, dado que las *Escherichia coli* a excepción del serotipo O157:H7, utilizan la enzima 4-metilumbilifero-B-D-glucosidasa y por lo tanto muestran la fluorescencia típica ante la luz ultravioleta, permitiendo la identificación rápida del género *Escherichia*. *Shigella*, es por el contrario, MUG negativa [14].

La utilización en conjunto de pruebas rápidas de identificación bacteriana con una prueba adicional como la de MUG, ayudó eficientemente en la identificación de cepas sospechosas de ser *E. coli* enteroinvasivas. Estos resultados corroboran los presentados por otros autores quienes utilizaron el sistema de galerías de identificación y antisueros monovalentes para la caracterización de cepas de *Escherichia coli* en alimentos marinos y muestras clínicas humanas [9, 10, 14, 25, 26].

Caracterización serológica

La técnica de aglutinación en lámina con antisueros polivalente para ECEI [13], permitió la aglutinación de 10 cepas solamente, 3 cepas aglutinaron con el polivalente I (O112ac, O152, O164), 5 con el polivalente II (O29, O143, O144) y 2 con el polivalente III (O28, O124, O156).

En general, la detección de *E. coli* enteroinvasiva en alimentos, raramente se realiza como rutina en los laboratorios de microbiología, salvo que un brote se manifieste y el alimento involucrado pueda ser detectado y analizado. Por el contrario, en los laboratorios clínicos, los cuadros diarreicos disintéricos motivan a la detección e identificación de los microorganismos involucrados. La predominancia de un serogrupo varía de país a país [1, 6, 18, 22, 33, 36] e inclusive se ha determinado una fluctuación estacional de la diarrea producida por esta bacteria [29].

En Venezuela, en un estudio en niños diarreicos [39] identificaron los serogrupos O28, O29, y O143. En el mismo tipo de pacientes en Cumaná, se encontró que los serogrupos predominantes fueron O29, O143 y O144 Polivalente II [41]. Siendo el hombre el principal reservorio para la bacteria, explica el porque los alimentos excesivamente manipulados, representan una muestra de las bacterias que circulan en el ambiente habitual donde estos se expenden y de los manipuladores que los manejan, lo que permite inferir que el serogrupo predominante en un alimento es el reflejo de lo que probablemente ocurra en las muestras clínicas.

La utilización de los antisueros en el diagnóstico de *E. coli* enteroinvasiva, provee de una herramienta de laboratorio eficaz, y su empleo está avalado por numerosos laboratorios de diagnóstico microbiano [38].

Prueba de Invasividad

Las dos metodologías empleadas para realizar el test de Sereny fueron útiles para la determinación de la capacidad de

invasión de las cepas de *Escherichia coli* que aglutinaron los antisueros. Sin embargo, sólo 2 cepas que aglutinaron el antisuero polivalente II y 1 del polivalente I, fueron positivas para la prueba.

Esto se explicaría por una pérdida o inactivación de los genes que codifican la invasividad, específicamente del gen ipaB, que puede ser originada por una delección [43] o inactivación para el mantenimiento de linajes no invasivos como una estrategia evolutiva en la sobrevivencia de estas cepas de *E. coli* [20].

La metodología que finalmente se siguió para la ejecución de esta prueba [40], fue de más fácil aplicación. Si bien es posible que cepas estresadas no logren recuperar su potencial patogénico, sobre todo si provienen de alimentos tratados, dada la facilidad con la que pierden el plásmido que regula las características virulentas [16, 17]. Todas las cepas que mostraron positividad para el test de Sereny carecían de actividad Lissina Descarboxilasa, estos resultados son similares a los presentados por otros investigadores [41].

Otra particularidad que se debe tomar en cuenta en este grupo de bacterias, es la posibilidad de ser positivas en la aglutinación de los antisueros polivalentes y negativos para la prueba de invasividad [19, 28, 42].

El test de Dean (prueba en ratones lactantes), demostró la no formación de una enterotoxina termoestable, al no superar el porcentaje de Dean de 0,074.

Los intestinos mostraron edema, tumefacción y acumulación de fluido, debido a la acción invasiva de la bacteria lo cual ayuda en la diferenciación de la cepas de *Shigella* de las *Escherichia coli* enteroinvasiva, dado que las ECEI no producen este tipo de toxina.

Antibiograma

El antibiograma se realizó a las cepas que aglutinaron los antisueros y fueron positivas o no para la prueba de invasividad o test de Sereny.

Los resultados obtenidos demostraron que todas las cepas eran resistentes a la Amoxicilina/Ac Clavulánico, Gentamicina y a Trimetropin/ sulfametaxol. Una de ellas, perteneciente al polivalente II a Tetraciclina. Se ha establecido que hay diferencias en los patrones de resistencia a los antibióticos dependiendo si son cepas ECEI o no [10]. Así mismo, otros autores observaron resistencia a la ampicilina en dos cepas de *E. coli* enteroinvasiva y demostraron que la resistencia a dicho antibiótico fue codificada por un plásmido conjugativo [23].

CONCLUSIONES

La detección de *Escherichia coli* enteroinvasiva en las muestras analizadas demuestra que no hay vigilancia de las condiciones sanitarias en las que se venden estos productos en el mercado municipal de Cumaná. Siendo el hombre el único reservorio de ECEI y, en consecuencia, la fuente principal de contaminación de los productos que manipula, se hace imprescindible la

realización de estudios para verificar la presencia de este patógeno en los manipuladores de alimentos. La resistencia a los antimicrobianos de mayor uso clínico que mostraron algunas de las cepas caracterizadas, revela que la bacteria ha circulado entre la población ejerciendo una presión selectiva que en nada favorecería su erradicación en caso de brotes. La dificultad de diferenciar cepas de *Shigella*, de cepas de ECEI puede solventarse con la utilización de la prueba de MUG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGBOULAHOR, D.; ODUGBEMI T.O. Enteropathogenic, enterotoxigenic, and enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from acute gastroenteritis patients in Lagos, Nigeria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 76 (2): 265-267.1982.
- [2] ALBERT, J.; FARRUQUE, S.; FARRUQUE, A.; NEOGI, P.; ANZARUZZMAN, M.; BHUIYAN, N.; ALAM, K.; AKBAR, M. Controlled Study of *Escherichia coli* diarrheal infectious in Bangladesh children. **J. Clin. Microbiol.** 33 (4): 973-977.1995.
- [3] ALTWEGG, M.; PERSCHIL, I.; GRUNNER, E. Molecular biology detection and antibiotic sensitivities of *Shigella spp.* and entero-invasive *Escherichia coli* (EIEC) in patients returning from the tropics. **Schweitz Rundsh. Med. Prax.** 86(9): 348-351. 1997.
- [4] BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). 6th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington Virginia. USA. 1984.
- [5] BAUDRY, B.; SAVARINO, S.J.; VIAL, P.; KAPER, J.P.; LEVINE, M.M. Sensitive and specific DNA probe to identify Enteroaggregative *Escherichia coli* a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.** 161: 1249-1251. 1990.
- [6] BEUTIN, L.; GLEIER, K.; KOTNY, I.; ECHEVERRÍA, P.; SCHEUTZ, F. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. **Epidemiol. Infect.** 118(3): 199-205. 1997.
- [7] BHAN, M.K.; RAJ, P.; LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BHANDARI J.B.; SRIVASTAVA, N.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.** 159: 1061-1064. 1989.
- [8] BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. *Escherichia coli* enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. **Microbiología SEM II.** 97-110. 1995.
- [9] BOUHADDIUI, B.; AISSA, B.; BOUDABOUS, A. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from man and seafood. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** 91(4): 283-286. 1998.
- [10] CHINEN, I., RIVAS, M.; CAFFER, M.I.; CINTO, R.O.; BINSZTEIN, N. Diagnosis of entero-invasive *Escherichia coli* associated with diarrhea. **Rev. Arg. Microbiol.** 25 (1): 27-35. 1993.
- [11] DEAN, A.G.; CHING, Y.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxins using infant mice: application in a diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.** 125: 407-411. 1972.
- [12] DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. *Escherichia coli* In **Food-borne Diseases.** D.O. Cliver (eds.). Academic Press. 210-215 pp. 1990.
- [13] FUVESIN. Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil. Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.
- [14] FRAMPTON, E.W.; RESTAINO, I. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidasa detection. **J. Appl. Bacteriol.** 74(3): 223-33. 1993.
- [15] HARRIS, J.R.; MARIENO, J.; WILLS, J.G.; PAYNE, B.J.; DONNELL, H.D.; COHEN, M.L. Person to person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Am. J. Epidemiol.** 122:245-252. 1985.
- [16] HILL, W.; CARLISLE, C.L. Loss of plasmids during enrichment for *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 41 (4): 1046-8. 1981
- [17] HILL, W.E.; FERREIRA, J.L.; PAYNE, W.L.; JONES, V.M. Probability of recovering pathogenic *Escherichia coli* from foods. **Appl. Environ. Microbiol.** 49(6): 1374-1378. 1985.
- [18] KETYI, I. Epidemiology of enteroinvasive *Escherichia coli*. Observations in Hungary. **J. Hyg. Epidemiol Microbiol. Immunol.** 33(3): 261-267. 1989.
- [19] LHOTOVA, H.; SOBOTKOVA, J.; LADENOVA, L.; DAN-EVA, M.; STANKOVA, J.; BRATOEVA, M. Characteristics of virulence signs of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) isolated in CSFR and Bulgaria in 1988-1990. **Cent Eur. J. Public. Health** 2(1): 6-8. 1994.
- [20] MARTÍNEZ, M.B.; WHITTAN, T.S.; MCGRAW, E.A.; RODRIGUES, J.; TRABULSI, L.R. Clonal relationship among invasive and non-invasive strains of enteroinvasive *Escherichia coli* serogroups. **FEMS Microbiol. Lett.** 172 (2): 145-151. 1999.
- [21] MEHLMAN, J.; LOVETT, J. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In **Bacteriological Analytical Manual. Association of Official Analytical Chemists.** Arlington. USA. Chapter 6.1984.
- [22] NICOLETTI, M.; SUPERTI, F.; CONTI, C.; CALCONI, C.; ZAGAGLIA, C. Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolates from children with diarrhea in Somalia. **J. Clin. Microbiol.** 26(3): 524-529. 1988.

- [23] OHNO, A.; MARUI, A.; ZANZENETENE, E.; BENITEZ, A.A.; ELIO-CALVO, D.; KASITANI, H.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Enteropathogenic bacteria in the La Paz River of Bolivia. **A. J. Trop. Med. And Hyg.** 57 (4): 438-444. 1997.
- [24] OLSVIK, O.; WASTESON, Y.; LUND, A.; HORNES, E. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. **Int. J. Food Microbiol.** 12(1): 103-113. 1991.
- [25] OMURA, K.; YOSHIDA, A.; SUZUKI, N.; TAKAI, S.; KUSUI, Y.; NAKANO, Y.; MIYATA, Y. Rapid differentiation method for *Shigella* and *Escherichia coli* application of Indole (tryptophanase), PGUA (beta-glucuronidasa) and ONPG (beta-galactosidasa) test. **Zasshi. Kansenshogaku** 66(4): 456-464. 1992.
- [26] PEREZ, J.L.; BERROCAL, C.I.; BERROCAL, L. Evaluation of a commercial beta-glucuronidasa test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. **J. Appl. Bacteriol.** 61(6): 541-545. 1986.
- [27] PRATS, G.; LLOVET, T. *Escherichia coli* enteroinvasiva. Patogenia y epidemiología. **Microbiología Sem II.** 91-96. 1995.
- [28] PUMAROLA, A.G.; PRATS, B.; MIRELIS, A.; CALAF, T.; TORRUELLA, M.T.; JIMÉNEZ DE ANTA, M.; SALAVADO, M.; LLORENS, E. Incidence of enteroinvasive *Escherichia coli* in Spain. A month prospective study. **Microbiologica** 9(2): 215-220. 1986.
- [29] RAM, S.; KHURANA, S.; KHURANA, S.B.; SHARMA, S.; VADEHRA, D.V. Seasonal fluctuations in the occurrence of enteroinvasive *Escherichia coli* diarrhoea. **Indian J. Med. Res.** 91:258-262. 1990.
- [30] SHEWMAKE, R.A.; DILLON, B. Food poisoning. **Postgraduate Medicine: Summer Emergencies Symposium.** 103(6) 9 p. The McGraw-Hill Companies, 1998.
- [31] SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.; TRABULSI, R. Biochemical characteristics of invasive *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 11: 441-444. 1980.
- [32] SNYDER, J.; YASHUIA, J.; PUHR, N.; BLAKE, P. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 33: 281-284. 1984.
- [33] TAMURA, K.; SAKAZAKI, R.; MURASE, M.; KASAKO, Y. Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains between 1858-1992 from diarrhoeal diseases in Asia. **J. Med. Microbiol.** 45:353-358. 1996.
- [34] TAYLOR, D.N.; ECHEVERRIA, P.; PAL, T.; SATHABUTR, O.; WANKIT, S.; CHAROEN, S.; SRICHAMORN, S.; ROWE, B.; CROSS, H.J. The role of *Shigella* ssp., enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogenics as causes of childhood dysentery in Thailand. **J. Infect. Dis.** 153: 1132-1138. 1986.
- [35] TAYLOR, D.P.; ECHEVERRIA, P.; SETHABUTR, O.; PITARANGASI, C.; LEKSOMBOON, U.; BLACKLOW, N.; ROWE, B.; GROSS, R.; GROSS, J. Clinical and microbiologic futures of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Infectious detected by DNA hybridization **J. Clin. Microbiol.** 26:1362-1366. 1988.
- [36] TODOROVA, K.; BRATOEVA, M.; DANEVA, M. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* serotype 0164 by means of plasmid analysis and virulence assay. **J. Basic. Microbiol.** 30 (6):451-454. 1990.
- [37] TOLEDO, M.R.; TRABULSI, L.R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. **J. Clin. Microbiol.** 17 (-):419-421. 1983.
- [38] TONCIU, M.; MIHAI, I.; PENCU, E.; CIUDIN, L. Study of strains agglutinable with enteroinvasive anti *E. coli* polyvalente sera isolated from ill and healthy subjects for optimizing the laboratory diagnosis of diarrhoea. **Roum. Arch. Microbiol. Immunol.** 51 (3):183-191. 1992.
- [39] URRESTARAZU, M.I.; DARRICARE, T.R.; PÉREZ, M. Frecuencia de *Campylobacter jejuni* y otros agentes patógenos en un grupo de lactantes venezolanos con diarrea aguda. **Bol. of Sanit. Panam.** 104:225-234. 1988.
- [40] URRESTARAZU, M.I.; GONZÁLEZ, R. 1993. **Taller sobre procedimientos para la investigación bacteriológica.** Instituto de Biomedicina. Sección de Enfermedades Entericas de la Infancia. Sección de Microbiología. Universidad Central de Venezuela Caracas. 10pp. 1993.
- [41] VILLEGAS, A. **Identificación de serotipos de Escherichia coli enteroinvasiva en heces de niños con y sin diarrea aguda en Cumaná Estado Sucre.** Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias. Trabajo de Grado. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. 42 pp. 1995.
- [42] WOOD, PK.; MORRIS, J.G.; SMALL, P.L.; SETHABUTR, O.; TOLEDO, M.R.; TRABULSI, L.; KAPER, J.B. Comparison of DNA probes and Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 24 (3): 498-500. 1986.
- [43] XU, J.G.; CHENG, B.Q.; WU, Y.P.; HUANG, L.B.; LAI, X.H.; LIU, B.Y.; LO, X.Z.; LI, H.F. Adherence patterns and DNA probe types of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal patients in China. **Microbiol. Immunol.** 40(2): 89-97. 1996.
- [44] YAMAMOTO, T.; KANEKO, M.; CHANGEHAWALI, S.; SERICHANTAERS, O.; IJUIN, S.; ECHEVERRÍA, P. Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **Infect. Immun.** (2): 2917-2924. 1994.