



Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena

Ana Elvira Farfán-García, Sandra Catherine Ariza-Rojas,
Fabiola Andrea Vargas-Cárdenas y Lizeth Viviana Vargas-Remolina

Universidad de Santander-
UDES, Bucaramanga, Santander,
Colombia.

Facultad de Ciencias de la Salud.
Programa de Bacteriología y
Laboratorio Clínico.

Financiamiento: Fondos de
Universidad de Santander.
Conflictos de interés: ausentes.

Nota del Editor: las siguientes siglas
han sido traducidas del inglés al
español, observando el estilo de
la revista, por su frecuente uso en
nuestro idioma:

EPEC = ECEP.
ETEC = ECET.
EIEC = ECEI.
STEC = ECST.
EAEC = ECEA.
DAEC = ECAD.
AIEC = ECAI.

Recibido: 16 de mayo de 2016
(2ª versión)
Aceptado: 26 de julio de 2016

Correspondencia a:
Ana Elvira Farfán-García
afarfana@udes.edu.co

Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*

Acute diarrheal disease (ADD) is a global public health problem, especially in developing countries and is one of the causes of mortality in children under five. ADD etiologic agents include viruses, bacteria and parasites in that order. *Escherichia coli* bacteria it is classified as a major diarrheagenic agent and transmitted by consuming contaminated water or undercooked foods. This review compiled updates on information virulence factors and pathogenic mechanisms involved in adhesion and colonization of seven pathotypes of *E. coli* called enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), shigatoxigenic *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and diffusely-adherent *E. coli* (DAEC). A final pathotype, adherent-invasive *E. coli* (AIEC) associated with Crohn's disease was also reviewed. The diarrheagenic pathotypes of *E. coli* affect different population groups and knowledge of the molecular mechanisms involved in the interaction with the human is important to guide research towards the development of vaccines and new tools for diagnosis and control.

Key words: *Escherichia coli*, virulence factors, pathogenicity, diarrhea.

Palabras clave: *Escherichia coli*, factores de virulencia, patogenicidad, diarrea.

Introducción

En los últimos años, las muertes de niños bajo cinco años de edad han disminuido; no obstante, las cifras aún son alarmantes. Entre las primeras causas de muerte por infecciones se encuentran la neumonía, seguida por diarrea y malaria¹⁻³. Datos obtenidos de análisis sistemáticos, demostraron que entre los años 2010 y 2011 se presentaron entre 7,6 y 6,9 millones de muertes de niños bajo cinco años de edad, respectivamente. El 9,9% de esas muertes fue a causa de la diarrea². Rotavirus, calicivirus, *Escherichia coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica causaron más de la mitad de los casos^{2,3}.

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es una problemática que afecta a adultos y niños y *E. coli* se encuentra entre las principales causas bacterianas de diarrea. Sus patotipos se han relacionado con mayor frecuencia a EDA en niños bajo cinco años de edad⁴.

Se han descrito seis patotipos de *E. coli* involucrados en procesos diarreicos, mediante la identificación de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad. *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasora (ECEI), *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* adherente difusa (ECAD)⁵ y *E. coli* adherente invasora (ECAI)⁶.

Escherichia coli enteropatógena es el patotipo más

asociado a diarrea en lactantes y algunas veces se asocia a vómito y fiebre⁷. *Escherichia coli* enteroinvasora es de importancia en niños sobre seis meses de edad, su manifestación general es diarrea y en ocasiones va acompañada de sangre y moco⁸. *Escherichia coli* enterotoxigénica tiene mayor frecuencia en niños bajo dos años, la diarrea puede acompañarse de fiebre y algunas veces vómito y es el principal agente causal de la diarrea acuosa del viajero seguido por ECEA y otras etiologías como *Salmonella* spp, *Shigella* spp o *Campylobacter jejuni*⁹. *Escherichia coli* enteroagregativa suele causar diarrea persistente de un color verde característico y con presencia de moco. La diarrea acuosa causada por ECAD se presenta sin sangre, en niños que van desde el año hasta los cinco años de edad⁸. Y por último, ECST, que causa dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y poca fiebre, es el principal agente etiológico asociado al síndrome hemolítico urémico (SHU), caracterizado por daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia¹⁰. En los casos más graves puede causar complicaciones del sistema nervioso central^{11,12}.

Dada la importancia clínica que tiene la enfermedad diarreica en el mundo, la presente revisión recopiló información actual sobre los factores de virulencia de los patotipos de *E. coli* como uno de los principales agentes diarreagénicos, con el propósito de que esta información proporcione datos de interés en el conocimiento de este patógeno.



Métodos

Para esta revisión se usaron las bases de datos EBS-CO, Science Direct, NCBI y Hinary, usando términos como “*Escherichia coli* virulence, virulence factors, enteropathogenic, enterohemorrhagic, enteroinvasive, enterotoxigenic, enteroaggregative, diffusely adherent y adherent invasive”. Se tomaron en cuenta investigaciones originales y revisiones con artículos completos disponibles, de los cuales se incluyeron en total 143 artículos.

Resultados y Discusión

Escherichia coli enteropatógena

Es el agente causal de diarrea en niños bajo dos años, que causa frecuentemente brotes epidémicos en lugares cerrados como guarderías y hospitales. La enfermedad puede ser moderada a grave y se ha asociado a alta mortalidad (10-40%), principalmente en los países en vías de desarrollo. En el año 2010 se notificaron 121.455 muertes por este patotipo¹³. El período de incubación es de 3 a 24 h y el cuadro diarreico puede tornarse persistente y acompañarse de fiebre y vómito.

Las cepas de ECEP se dividen en típicas y atípicas, por la presencia (típicas) o ausencia (atípicas) de un plásmido de virulencia llamado factor de adherencia de ECEP (EAF: *EPEC adherence factor*)¹⁴. La caracterización de las cepas atípicas ha cobrado importancia debido a que su aislamiento ha aumentado no sólo en niños asintomáticos sino también en niños con diarrea durante brotes epidémicos de diarrea.

En la infección intestinal por ECEP se producen cambios en la actividad fisiológica normal del enterocito debido al aumento de la secreción de electrolitos por parte de las células hacia el espacio extracelular, al aumento de la permeabilidad de las uniones intra e intercelulares y al cambio estructural, en la forma, de la región apical del enterocito. Éste pierde su capacidad absorbente y los solutos se acumulan en el lumen intestinal, lo que conduce a diarrea acuosa.

Los mecanismos fisiopatológicos que originan el cuadro diarreico se relacionan principalmente con la alteración de la célula intestinal debido a la lesión de adhesión y borrado (A/E: *attaching/effacing*) y a la formación de pedestales^{15,16}.

Para el **primer mecanismo**, ocurren tres eventos de forma prácticamente simultánea:

- **Adherencia inicial al enterocito.** La bacteria entra en contacto con la célula mediante un flagelo y el pili tipo IV (BFP: *bundle-forming pilus*), que tienen como función la auto-agregación bacteriana y la adherencia a la célula mediante la formación de microcolonias^{17,18}. Este pili es codificado por 14 genes, los cuales son

regulados por el operon *per* (*plasmid-encoded regulator*)¹⁹ y por una proteína DsbA que forma enlaces disulfuro para darle estabilidad²⁰. Estos genes se localizan en el plásmido de virulencia EAF²¹.

- **Translocación de señales intracelulares.** Ésta es facilitada por el sistema de secreción tipo 3 (T3SS: *type III secretion system*), mediante el cual diversas proteínas efectoras ingresan al enterocito^{22,23}. Este sistema macromolecular es codificado en la isla de patogenicidad locus de esfacemento del enterocito (LEE: *locus of enterocyte effacement*)²⁴, el cual se divide en cinco operones policistronicos (LEE1-LEE5). LEE1-LEE3 codifican los genes de las proteínas Esc (Esc: *E. coli secretion*) que conforman el T3SS¹⁸, LEE4 codifica los genes de las proteínas secretoras Esp (en inglés Esp: *EPEC-secreted proteins*) (EspA, EspB y EspD) y para algunas efectoras (EspF, EspG, EspH, EspZ y Map)²⁵. Finalmente, LEE5 codifica los genes *eae* para la adhesina bacteriana íntima y *tir* para el correspondiente Tir (Tir: *translocated intimin receptor*). La expresión génica de LEE, está regulada por *per*, Ler (*LEE-encoded regulator*), GrlA (*Global regulator of LEE activator*) y GrlR (*global regulator of LEE repressor*)²⁶. Estas proteínas efectoras contribuyen al daño celular mediante la formación de conductos o filamentos (EspA, EscF)²⁷ y poros para la translocación de proteínas en la membrana del enterocito (EspB, EspD)²⁸, cambios del potencial de membrana de la mitocondria (proteína asociada a la mitocondria Map: *mitochondria-associated protein*), formación transitoria de filopodios mediante la activación de GTPasas^{29,30}, reorganización y pérdida de la nucleolina para bloquear el proceso del ARNr (EspF)³¹ y la alteración de los microtúbulos en algunas células epiteliales (EspG)³² (Figura 1). Otra proteína efectora muy importante es EspC, secretada por el sistema de secreción tipo V, que está involucrada en la citotoxicidad celular durante la adhesión bacteriana, la formación de pedestales y poros^{33,34}.
- **Adherencia íntima bacteriana.** De forma simultánea a la unión de T3SS al enterocito y a la entrada de las proteínas efectoras a través de los poros, la bacteria ingresa la proteína Tir (receptor) que facilita la adherencia a la íntima bacteriana y es indispensable para la formación del pedestal y la lesión intestinal³⁵. Una vez dentro de la célula hospedera, la cabeza de Tir se proyecta a la superficie de la membrana del enterocito, donde actúa como receptor para la íntima y para la transmisión de señales después de la interacción³⁶. Esto contribuye al segundo mecanismo de polimerización de la actina y a la formación de pedestales.

En el **segundo mecanismo**, la polimerización, se forman largas cadenas de actina que alteran la morfología

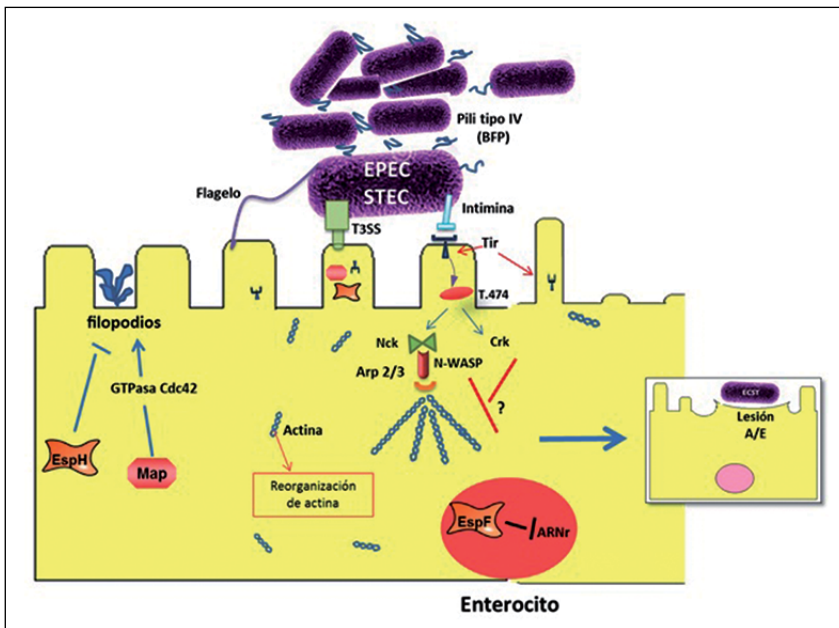


Figura 1. *E. coli* enteropatogénica. La adhesión de EPEC (EPEC en la figura) está mediada por un flagelo y por el pili tipo IV (BFP) que también une las bacterias entre sí formando microcolonias, permitiendo que éstas se separen y colonicen. EPEC y ECST (STEC en la figura) tienen un sistema de secreción (T3SS) que inyecta proteínas en la célula, dentro de ellas se encuentra EspF que se dirige al nucléolo donde bloquea el proceso del ARNr. Map que induce la formación de filopodios activando una GTPasa Cdc 42, aunque sólo es momentáneo porque después EspH interrumpe esta formación para que otra proteína llamada Tir unida a la intimina (proteína de la membrana externa de la bacteria) se fosforile en tirosina 474, el cual se une a proteínas adaptadoras como Nck o Crk. Nck activa a N-WASP que a su vez activa Arp 2/3, mediador de la polimerización de actina. La unión Tir-Intimina finalmente provoca la reorganización de la actina, alterando la morfología y formando las lesiones de adhesión y borrado (A/E).

del citoesqueleto, se dañan las microvellosidades y éstas pierden su función³⁷. Para la formación del pedestal, Tir es fosforilada en tirosina 474³⁷. Posteriormente, la tirosina 474 se une a las proteínas adaptadoras de la célula hospedera (Nck: *Non-catalytic tyrosine kinase*). Nck activa N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich-syndrome protein*) que a su vez activa el complejo Arp 2/3 mediador de la polimerización de actina³⁸. Otra proteína adaptadora es la Crk (Crk: *CT10 regulator of kinase*) que compite con Nck por la unión a la tirosina 474, con la diferencia que Crk inhibe la polimerización de actina³⁹, aunque no se ha entendido cuál función cumple al regularla negativamente (Figura 1). Este proceso es regulado por EspH y por Tir-intimina de manera independiente^{40,41}. Por último, EspZ bloquea la translocación de proteínas al finalizar la infección o durante ésta. Ésta se une a EspD mediante la inhibición del paso de EspF, Map y Tir⁴¹.

Escherichia coli shigatoxigénica

Este patógeno se caracteriza por producir una o más toxinas Shiga (Stx) similares a las producidas por

Shigella dysenteriae tipo 1, por lo que se les denomina shigatoxigénicas⁴². También se han descrito como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, del inglés *enterohemorrhagic E. coli*) y *E. coli* verotoxigénica (VTEC, del inglés *verotoxigenic E. coli*) debido a la producción de una toxina con efecto citotóxico sobre las células vero⁴³. ECST es un patógeno de carácter zoonótico de gran importancia en salud pública, que causa dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y poca fiebre. Es el principal agente etiológico del síndrome hemolítico urémico SHU^{10,11}, el cual ocurre aproximadamente en 5 y 10% de los casos y produce anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal.

Escherichia coli shigatoxigénica es prevalente en países desarrollados como Estados Unidos de América, Canadá, Australia y en algunos de Europa. En Latinoamérica, es endémica en Argentina con una prevalencia aproximada de 500 casos por año y una incidencia de 12 a 14 casos por cada 100.000 en niños bajo cinco años, presentándose el mayor número de casos de SHU en el mismo grupo etario, con una mortalidad entre 3 y 5%⁴⁴. Sin embargo, ECST puede afectar a todos los grupos de edad, en los cuales puede provocar enfermedad grave.

Más de 400 serotipos de ECST han sido implicados en los brotes esporádicos humanos que cursan desde enfermedad leve a colitis hemorrágica y SHU en los casos más graves. La colitis hemorrágica está mediada por las toxinas Stx, la que puede progresar a colitis gangrenosa, perforación del intestino, peritonitis o sepsis⁴⁵. El serotipo O157:H7 es el más importante en clínica.

A continuación se describen sus mecanismos de patogenidad más importantes:

- **Adherencia de ECST:** La interacción de ECST con los enterocitos está mediada por la intimina y el T3SS, descritos en EPEC. La unión de la intimina con su receptor Tir y a la nucleolina⁴⁶, contribuye en la fijación inicial de ECST a la célula, lo que produce lesiones A/E características de este patotipo (Figura 1)⁴⁷. Al igual que en EPEC, los factores que participan en la formación de la lesión se codifican en la isla de patogenidad LEE²⁴.
- **Toxina Stx:** Ésta tiene los subgrupos Stx₁ y Stx₂, inmunológicamente diferentes y cada cepa puede presentar uno o ambos. Stx₂ está más asociado a los casos de SHU^{48,49} y está compuesta por las subunidades A y B (Figura 2a). El ingreso a la célula y la distribución de la toxina hacia diferentes órganos son mediados por tres mecanismos principales: a) *Macropinocitosis* (MPC): permite la entrada de Stx cuando el receptor de las membranas globotriaosilceramida 3 (Gb3) no es expresado por la célula, como en el caso de los enterocitos. La MPC ocurre independientemente de T3SS y de la intimina, es decir, es estimulada por la reorganización de la actina mediante la proteína P secretada por *E. coli* (EspP: *E. coli* secreted protein



P)^{50,51}, que contribuye a la formación de microcolonias y a la adhesión a células epiteliales de colon T84⁵¹ (Figura 2b); b) *Transcitosis*: mediante vesículas la toxina pasa de un espacio extracelular a otro (Figura 2b)⁵². Este mecanismo aún está en estudio; no obstante, se conoce que aumenta debido a la MPC y facilita la propagación sistémica de la toxina hacia las células endoteliales que expresan Gb3, siendo el endotelio glomerular el que expresa los mayores niveles¹⁰. Le siguen en su orden las células endoteliales del intestino y cerebro^{50,52,53}; c) *Endocitosis*: una vez se une la subunidad B de la toxina al receptor Gb3 y posteriormente, mediante invaginación de la membrana celular, la toxina es introducida al citoplasma⁵⁴. Adicionalmente, el fragmento A₁ de la subunidad A, realiza actividad enzimática sobre el ARNr 28S, inhibe la síntesis proteica y conduce a la muerte celular⁵⁵ (Figura 2c).

- *Otros factores de virulencia de ECST*: Adicionalmente, el plásmido pO157 de ECST codifica genes para catalasa-peroxidasa (katP)⁵⁶, adhesina ToxB⁵⁷, metaloproteasa dependiente de zinc (StcE)⁵⁸⁻⁶¹ y para la enterohemolisina (Ehx)⁵⁹, cuyas funciones están principalmente enfocadas a mediar la unión a la célula hospedera, degradación de mucinas y glicoproteínas, regular mecanismos de inflamación y citotoxicidad, entre otras⁵⁶⁻⁶³.

Escherichia coli enterotoxigénica

Es uno de los agentes más frecuentemente identificados en diarrea aguda. Aproximadamente, cada año se presentan 280 millones de infecciones por ECET en niños bajo 4 años, de los cuales entre 300.000 a 500.000 mueren y se cree que más de 40 millones son asintomáticos⁶⁴. Se conoce como diarrea del viajero y tiene amplia distribución en países en vías de desarrollo. Sin embargo, es frecuente aislarla de personas asintomáticas. En algunos casos la diarrea por ECET puede ser leve, sin presencia de moco o sangre; en otros casos puede ser profusa causando deshidratación grave. Algunos casos presentan cefalea y vómito^{3,5,9}.

Cada cepa tiene estructuras en su superficie, necesarias para la adhesión, denominados factores de colonización (CFs: *colonization factors*) y que en ECET son llamados antígenos de superficie coli (CSs: *Coli surface antigens*), antígenos de los factores de colonización (CFAs: *colonization factor antigens*) o PCFs (*putative colonization factors*). De estas estructuras fimbriales, afimbriales, helicoidales o fibrilares, hasta la fecha se conocen aproximadamente 25, en su mayoría codificados en plásmidos de virulencia^{9,65-67}. Las toxinas y los perfiles de adhesinas son variables entre poblaciones y regiones geográficas.

En ECET son dos los principales mecanismos de patogenicidad: adherencia y toxinas.

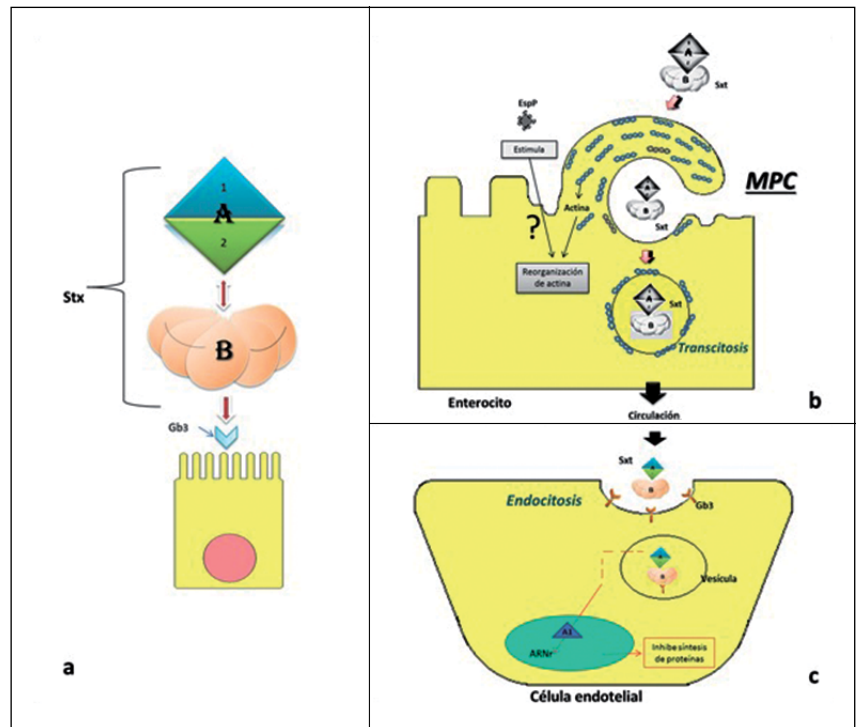


Figura 2. *E. coli* shigatoxigénica. **a.** La toxina Shiga (Stx) está compuesta por una subunidad A que tiene dos fragmentos: A1 con actividad enzimática y A2 que se une a la subunidad B, pentámero encargado de la unión al receptor Gb3 en la célula hospedera; **b.** Existen factores como EspP que estimulan la reorganización de actina en ausencia de receptores Gb3, que permiten la entrada de Stx al enterocito por medio de macropinocitosis (MPC) y se desplaza dentro de la célula por transcitosis para llegar a la circulación; **c.** Stx viaja hasta encontrar el receptor Gb3 que se une a la subunidad B de la toxina y permite la entrada a las células endoteliales por endocitosis, donde la subunidad A1 se dirige al ARNr para bloquear la síntesis de proteínas y producir la muerte celular.

- *Adherencia*: Los CFs se encargan de la adhesión de las bacterias a receptores (fibronectina, glicoesfingolípidos y glicoproteínas) de las células epiteliales del intestino delgado, lo que permite su colonización⁶⁵⁻⁶⁷. Algunos de estos CFs se han asociado a movilidad y auto-agregación bacteriana^{67,68}. Aproximadamente, en 50% de las cepas de ECET no se logran identificar los CFs⁶⁶. Para la adherencia de ECET a las células epiteliales, la bacteria expresa la EtpA, exoproteína de adhesión (TPS: *two-partner secretion*) situada al extremo del flagelo, para permitir que los CFs se adhieran a éstas. Inmediatamente después, el auto-transportador EatA (EatA: *autotransporter A*) incluida en el grupo de las serin-proteasas (SPATEs: *serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae*) inhiben la actividad de EtpA, lo que da origen a la adhesión de ECET a los enterocitos por el loci toxigénico de invasión A (Tia: *toxigenic invasion loci A*), una proteína de membrana externa y el loci toxigénico de invasión B (TibA: *toxigenic invasion loci B*) (Figura 3)⁶⁹⁻⁷².

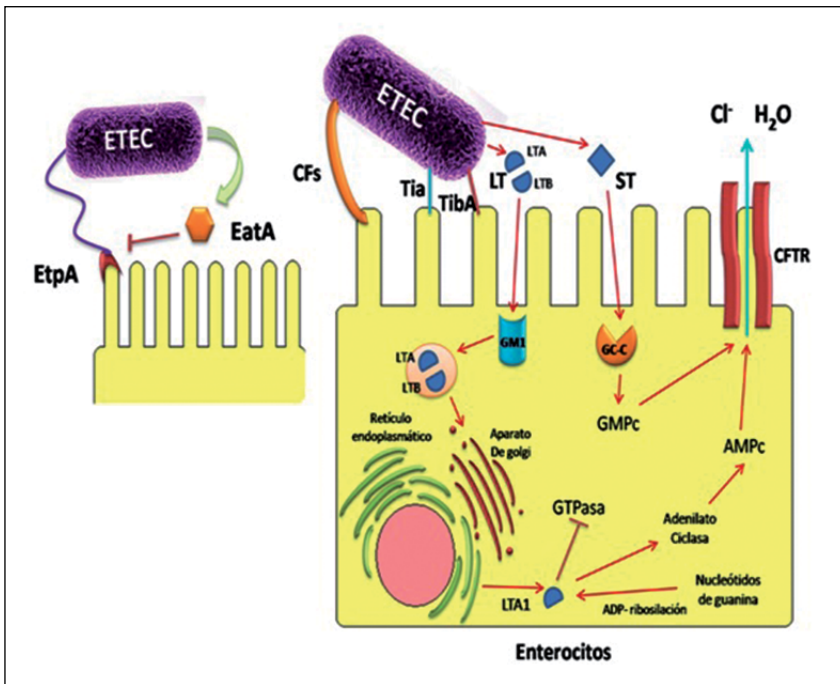


Figura 3. *E. coli* enterotoxigénica. ECET (ETEC en la figura) se une a los enterocitos por EtpA. EatA inhibe a EtpA para lograr la adhesión por CFs, Tia y TibA. LT se une al GM1 entrando por endocitosis y genera un aumento del AMPc. ST tiene como receptor a GC-C, donde origina altos niveles de GMPC para terminar los dos procesos con la secreción de cloruro y demás electrolitos por el canal CFTR.

Otro de los factores de colonización importantes es el *longus type IV pilus*, que actúa de manera semejante al BFP de ECEP e interviene en la auto-agregación bacteriana^{68,73,74}.

- **Toxinas:** El principal factor de virulencia de ECET es la secreción de enterotoxinas termoestables (ST: *heat-stable enterotoxin*) y enterotoxinas termolábiles (LT: *heat-labile enterotoxin*). Existen dos tipos de LT (LT-I y LT-II); las LT-I están directamente asociadas a cepas humanas. Cada toxina se divide en dos subunidades A y B⁷². ECET secreta, mediante el sistema de secreción tipo 2, la LT dentro de las vesículas de la membrana externa (OMVs: *outer membrane vesicles*)⁷⁵ y posteriormente con ayuda de la subunidad B de LT se une al gangliósido GM1, que por endocitosis permite que las OMV ingresen al citoplasma. Una vez allí, se dirige al aparato de Golgi y al retículo endoplasmático⁷⁶ (Figura 3). La subunidad LT-A1 presente en el citosol se une, mediante ribosilación del ADP, a los nucleótidos de guanina (Gs), inhibe la actividad de GTPasa y activa la adenilatociclasa⁷⁶. Estas reacciones producen un aumento del AMP cíclico, lo que estimula la secreción de cloruro y demás electrolitos a través del canal regulador transmembranal de la fibrosis quística

(CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) e impide la absorción del intestino y de esta forma ocasiona diarrea secretora de amplia intensidad⁷⁷ (Figura 3). En las ST, la unión está mediada por la guanilato-ciclasa-C (GC-C) y existe un aumento del GMP cíclico dependiente de la proteína quinasa II donde se produce el mismo efecto de la LT al aumentar la secreción por el CFTR⁷⁸. Además, las ST tienen la capacidad de controlar la proliferación celular. Según estudios, inhibe la síntesis de ADN en células de cáncer de colon, que depende de los niveles de calcio intracelulares (Figura 3)^{79,80}. La citolisina A (ClyA: *cytolysin A*) expresada del gen *clyA* también ha sido descrita como citotoxina de ECET cuyas funciones son la formación de poros, inducción de apoptosis en los macrófagos y actividad hemolítica⁸¹⁻⁸³.

Escherichia coli enteroagregativa

Causa diarrea aguda o persistente, tanto en niños como en adultos, en países en vías de desarrollo y se identifica con frecuencia en cuadros diarréicos de personas de países industrializados y en pacientes infectados por VIH. Este patotipo se adhiere a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico que causa diarrea de tipo acuosa sin fiebre, con secreción de moco^{84,85}. Entre las cepas de ECEA existe gran variabilidad en la presencia de factores de patogenicidad; por consiguiente, en los modelos estudiados aún no se ha encontrado relación entre un genotipo o fenotipo específico y el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, un estudio reciente describe la asociación entre las cepas ECEA y el grupo filogenético D, principalmente en pacientes sintomáticos⁸⁴.

- **Adherencia:** La patogénesis de esta bacteria exhibe en común, la formación de microcolonias⁸⁵ y un patrón de adherencia-agregativa (AA: *aggregative-adherence*) a células HEp-2 y HeLa descrito como “apilación de ladrillos⁸⁶. ECEA presenta plásmidos pAA, que codifican varios factores de virulencia, en los que se incluye un regulador AggR perteneciente a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, el que se encuentra en la mayoría de las cepas; se sugirió el término “ECEA típica” a aquellas que lo expresan^{87,88}. Algunos genes regulados por AggR son los factores necesarios para la expresión del patrón AA que implica las fimbrias AAF con variantes I, II, III y IV (este último también llamado adhesina Hda) codificadas por los genes *aggA*, *aafA*, *agg3A* y *agg4A*⁸⁹⁻⁹¹. Se han relacionado con la formación de microcolonias otros genes regulados por AggR, entre los que se incluyen una proteína Irp2 involucrada en la expresión de yersiniabactin (sideróforo) encontrada en especies de *Yersinia*, una enterotoxina de *Shigella* (*ShET1*: *shigella enterotoxin 1*) codificada por el gen *set1A*⁸⁵, y por último dos proteínas Fis y YafK junto con un sistema de



secreción tipo VI⁹². Sin embargo, se ha evidenciado la formación de microcolonias cuando están los factores regulados por AggR y también, cuando ninguno de ellos, incluyendo AggR, está presente, lo que indica la existencia de factores de virulencia aún no descritos⁸⁵. En la adhesión también están involucradas proteínas de la membrana externa como Hra-1 (Hra: *heat-resistant agglutinin 1*) con actividad aglutinina y adhesina, Hra-2 con actividad adhesina y Tia homóloga de Hra-1 con actividad invasora y adhesina, también relacionada con cepas de ECET⁹³. En la colonización bacteriana actúa un complejo denominado Aat que se requiere para el transporte de una dispersina codificada por el gen *aap*, juntos regulados por AggR y codificados en el plásmido pAA. Aat media la secreción de la dispersina desde la membrana externa de la bacteria para promover la colonización de la mucosa intestinal (Figura 4a)^{94,95}.

- **Enterotoxinas:** ECEA presenta factores no regulados por AggR como la enterotoxina 1 (EAST1: *enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1*) codificada por *astA*, que altera el transporte de iones e induce aumento del GMPC⁹⁶ y una variedad de SPATEs citotóxicos y no citotóxicos (Figura 4b)⁹⁷. Dentro de los SPATEs se encuentran la proteasa involucrada en la colonización intestinal (Pic: *protease involved in intestinal colonization*) y la toxina codificada en plásmidos (Pet: *plasmid-encoded toxin*). Pic (grupo no citotóxicos) es una proteasa que incrementa el número de células caliciformes y la producción de moco que atrapa las bacterias auto-aglutinándolas en el epitelio intestinal, aunque su mecanismo de acción aún está en estudio. También es responsable de la actividad mucinolítica que le abre paso a través de esta capa de moco⁹⁸. Pet es una SPATE citotóxica que se une a la espectrina en la membrana del complejo de Golgi, bloquea su función y causa el redondeamiento de la célula⁹⁹. Adicionalmente, pueden estar presentes otras SPATEs citotóxicas como EspP (de ECST) que escinde pepsina A y el factor V de coagulación¹⁰⁰, la toxina auto-transportadora secretada (Sat: *secreted autotransporter toxin*) y el homólogo de proteasa de *Shigella* tipo IgA (SigA: *Shigella* IgA-like protease homolog) descrita en cepas de *Shigella flexneri*^{100,101}. SPATEs no citotóxicas como la proteína extracelular de *Shigella* (SepA: *Shigella extracellular protein A*) también descrita en *Shigella flexneri*, contribuye a la inflamación intestinal¹⁰³.

Escherichia coli enteroinvasora

Los síntomas característicos en personas infectadas por ECEI son diarrea acuosa, con sangre, moco y dolor abdominal, pero en algunos casos sólo se presenta diarrea, lo cual la hace indiferenciable de la producida por ECET y menos grave que la causada por *Shigella*. Las cepas de

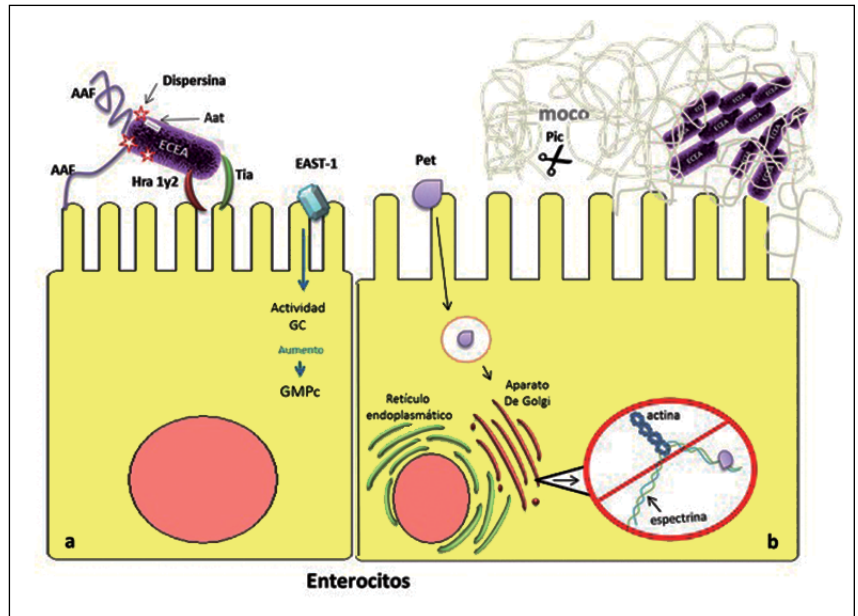


Figura 4. *E. coli* enteroagregativa. **a.** ECEA utiliza para la adhesión las fimbrias AAF además de una proteína Tia y unas aglutininas estables al calor (Hra 1-2). EAST es una toxina que tiene actividad guanilatociclasa (GC) e incrementa el GMPC. En la colonización actúa una dispersina transportada por el complejo Aat y una variedad de SPATEs; **b.** Una proteasa Pic, hace parte de SPATEs no citotóxicos. Pic es capaz de incrementar la secreción de moco, pero a su vez le abre paso a la bacteria gracias a su actividad mucinolítica. También tiene SPATE citotóxicos como Pet, que escinde una proteína llamada espectrina, unida a la actina, finalmente para bloquear su función y ocasionar el redondeamiento de la célula.

ECEI se asocian más a brotes que a casos aislados, en los que la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños sobre seis meses de edad^{2,29}. Existen pocos estudios epidemiológicos que demuestran la carga mundial de la diarrea por ECEI, debido a que estas cepas suelen ser identificadas como *Shigella* spp⁵. Evidencia científica demuestra la estrecha relación filogenética y bioquímica entre estas dos bacterias¹⁰⁴.

En los individuos infectados, ECEI evade la respuesta inmune porque entra fácilmente a las células epiteliales del colon por medio de adhesinas, moviéndose lateralmente para invadir otras células¹⁰⁵. *Escherichia coli* enteroinvasora, al igual que *Shigella* spp, posee un plásmido de virulencia pINV que codifica para el T3SS, 25 proteínas (entre ellas OscpB, VirA, OspG) y los antígenos de invasión de plásmidos (Ipa: *invasion plasmid antigens*) Ipa A, Ipa B, Ipa C, Ipa D, entre otros¹⁰⁶.

En la mucosa del colon, ECEI invade inicialmente las células M y en una vacuola fagocítica por transcitosis la bacteria atraviesa la barrera epitelial e invade los macrófagos. En éstos la proteína IpaB, lisa la vacuola en el citoplasma e induce apoptosis vía caspasa 1 para finalmente ser liberada y alcanzar el polo basolateral¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

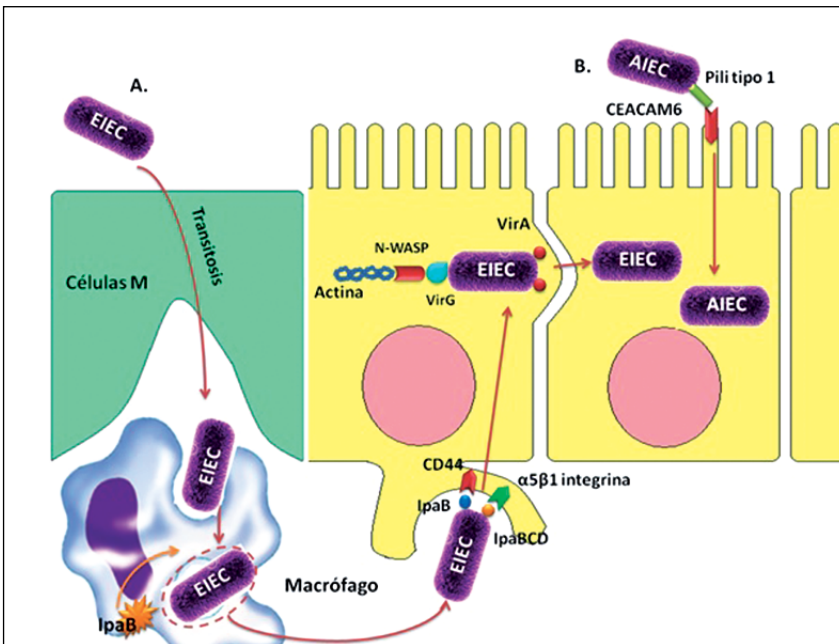


Figura 5. Mecanismos de *E. coli* enteroinvasora y *E. coli* adherente invasora. **A.** ECEI (EIEC en la figura) mediante transcitosis atraviesa las células M. Es fagocitada por los macrófagos y con ayuda de IpaB es liberada. Los receptores del hospedero CD44 y $\alpha 5\beta 1$ integrina se unen a los receptores de la bacteria IpaB y al complejo IpaBCD, respectivamente. Se forma el complejo VirG*N-WASP*actina y VirA favorece el proceso de invasión a células proximales; **B.** ECAI (AIEC en la figura) por medio del pili tipo 1 reconoce el receptor de la célula CEACAM6 e invade.

Posteriormente, la bacteria ingresa a las células intestinales mediante el reconocimiento de los receptores CD44 y $\alpha 5\beta 1$ integrina gracias a IpaB y al complejo IpaBCD bacteriano. Después de su multiplicación en el citoplasma, se libera del fagosoma mediante IpgD y se desplaza lateralmente entre una y otra célula. Para esto, VirG, localizada al extremo de ECEI, promueve la aproximación de N-WASP y por medio de la polimerización de actina, se forma el complejo VirG*N-WASP*actina¹¹¹. Adicionalmente, VirA, localizada al otro extremo de la bacteria, favorece la generación de protuberancias y permite el traspaso a las células proximales¹¹¹ (Figura 5). En este proceso, la liberación de IL-1 por parte de los macrófagos apoptóticos y de IL-8 en los enterocitos infectados promueve la migración de polimorfonucleares, los que adicionalmente facilitan la entrada, vía luminal, de la bacteria al epitelio¹¹².

Escherichia coli adherente invasora

La enfermedad de Crohn (EC) es una de las enfermedades inflamatorias del intestino, asociada a la presencia en el lumen intestinal de ECAI. Es muy frecuente en el íleon; sin embargo, el proceso inflamatorio puede ocurrir en todo el tracto gastrointestinal. *Escherichia coli* adherente invasora se aísla con más frecuencia en la mucosa intestinal de pacientes con EC que en sanos^{6,8}. Dentro de

las principales características de la patogenicidad están la adhesión epitelial, la invasión, la supervivencia dentro de los macrófagos y la formación de biopelículas^{113,114}.

Invasión: Esta bacteria posee dos mecanismos de invasión a la célula. *Escherichia coli* adherente invasora se moviliza a través de los flagelos, los que la acercan a la célula epitelial y, por medio de la adhesina FimH localizada en el pili tipo 1, se une a los residuos oligomanósidos del receptor de superficie CEACAM6 de la célula hospedera (Figura 5). La invasión de los enterocitos intestinales conduce a un aumento de la estimulación de IFN- γ y FNT- α , lo que genera la sobre expresión de CEACAM6¹¹⁵. El segundo mecanismo es mediante la invasión de las células M. *Escherichia coli* adherente invasora posee una fimbria polar larga (LPF: *long polar fimbriae*) que permite la aproximación a las células M¹¹³. Utiliza el mismo proceso de ECEI donde atraviesa la célula por medio de transcitosis⁷². Es fagocitada por los macrófagos, donde se replica dentro de los fagosomas sin estimular la muerte celular^{6,116} e induce en el macrófago infectado la secreción de FNT- α , el cual causa la inflamación del íleon y conlleva la formación de granulomas^{6,8}.

Los pacientes que padecen de esta enfermedad también generan en las células epiteliales estrés del retículo endoplásmico. En respuesta a esto, el factor de transcripción XBP1 origina un aumento en la expresión de gp96 que sirve como receptor de la proteína transmembranal OmpA, generada por el factor de virulencia denominado vesículas de membrana externa (OMV: *outer membrane vesicles*). OmpA promueve la virulencia del patotipo al intervenir en la adhesión, invasión y la permanencia de bacterias intracelulares^{117,118}.

Para tratar la enfermedad de Crohn, se han descrito diferentes estrategias como anticuerpos anti-integrinas, anti-factor de necrosis tumoral alfa (anti-FNT α) y agentes inmunosupresores. Más recientemente, se han realizado estudios con antagonistas de FimH para evitar la adhesión de ECAI a la célula hospedera¹¹⁹.

Escherichia coli adherente difusa

Estas cepas se han asociado más a procesos diarreicos de tipo agudo y persistente en niños que en adultos. Los adultos, al igual que los niños, pueden ser portadores asintomáticos.

Se conoce poco de los mecanismos de patogenicidad de ECAD a pesar de su amplio estudio^{120,121}. Dentro de las principales características observadas en la patogénesis de ECAD están las siguientes:

- Unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal,
- Formación de microcolonias típicas en forma de ladrillos apilados,
- La producción de citotoxinas y enterotoxinas y finalmente,
- El desarrollo de una inflamación grave de la mucosa.



Las cepas de ECAD expresan adhesinas afimbriales (Afa) y adhesinas fimbriales (Dr). Estas adhesinas se encuentran en la superficie de la membrana externa de la bacteria, confiriendo el principal mecanismo de patogenicidad^{122,123}. Se subdividen en dos clases, la típica Afa/DrECAD y la atípica Afa/DrECAD que tienen como características la misma organización genética y la unión al factor de aceleración (hDAF: human *decay-accelerating factor*)¹²⁴. En la clase típica Afa/DrECAD se encuentran AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, Dr, Dr-II, F1845 y NFA-I, las cuales son codificadas por los genes *afa-*, *dra-*, *daa-*. Todas las adhesinas Afa/Dr se unen a hDAF (DAF, CD55), mientras que AfaE-III, Dr y las adhesinas F1845 se unen a CEACAM6¹²⁵. hDAF es una glicoproteína de 70 KDa que se encuentra distribuida en todas las células de la sangre, en el epitelio del intestino, tracto genito-urinario y células endoteliales. Tiene como función regular la cascada del complemento en el paso de la convertasa C3, cumple un papel importante en la interacción entre el patógeno y las células del hospedero para favorecer la infección¹²⁶.

Se conocen dos adhesinas principales de ECAD que permiten la adherencia al enterocito. Adhesina fimbrial 1845 (F1845) y la adhesina involucrada en la adherencia difusa (AIDA I: *adhesin involved in diffuse adherence*). F1845 es una adhesina fimbrial que pertenece a la cepa C1845 de tipo silvestre que tiene como receptor hDAF. Al originarse esta unión, ocurre un alargamiento de las microvellosidades¹²⁷. La otra adhesina es AIDA-I, que pertenece a la familia de autotransportadores de membrana externa de 100 kDa y se ha encontrado en la cepa 0:126H:2¹²⁸. Una vez Afa/Dr adhesina se une con los receptores de la membrana del enterocito hDAF o CEACAM6 se produce la activación de la quinasa Src, la cual es necesaria para la movilización y organización de hDAF alrededor de las bacterias¹²⁹. La lesión de la membrana celular inducida por la bacteria ocasiona elongación, daño en las microvellosidades y reordenamiento de las proteínas en el citoesqueleto, lo que genera aumento de la permeabilidad del enterocito^{130,131}. Luego de la asociación Afa/Dr, se activa la MAP quinasa (MAP: *mitogen-activated protein*) e induce la producción de IL-8 con la consecuente migración transepitelial de polimorfonucleares¹³¹. Esto favorece el daño de los enterocitos por la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como FNT- α e IL-1 β ¹³² (Figura 6).

Ensayos en vacunas

Desde hace varios años se han adelantado estudios en vacunas para reducir la exposición a los diferentes patotipos de *E. coli* en humanos. Se han diseñado y ensayado en diferentes modelos vacunas atenuadas, subunidades, toxoides, conjugados o fusión de antígenos múltiples, vacunas de vectores recombinantes y de

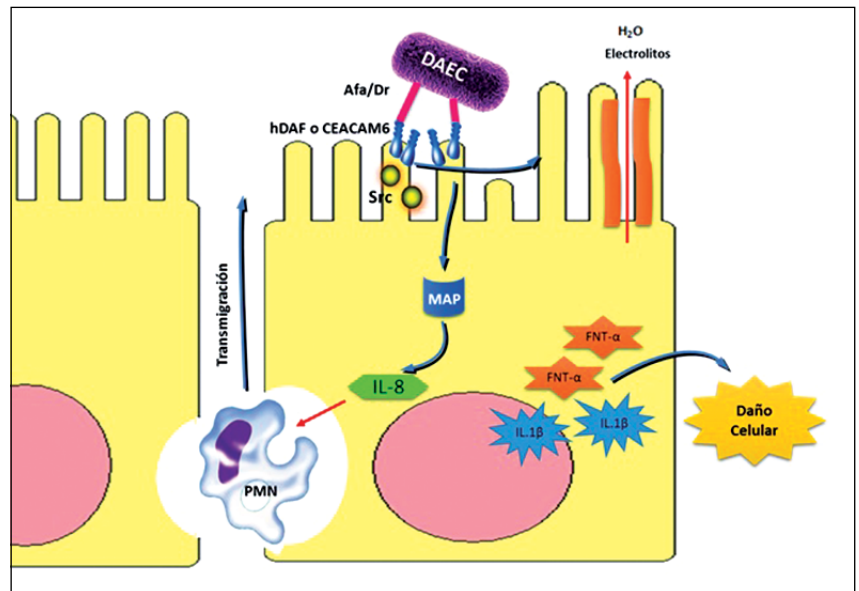


Figura 6. *E. coli* adherente difusa. Las adhesinas Afa/Dr de ECAD (DAEC en la figura) reconocen a hDAF o CEACAM6, activa la quinasa Src que ayuda a la movilización y organización de FAD alrededor de la bacteria y se produce elongación, pérdida de las microvellosidades y secreción de agua y electrolitos. La activación de la vía de señalización de MAP culmina en la síntesis de IL-8, que induce la trans migración de polimorfonucleares (PMN). Esto estimula la síntesis de FNT- α e IL1 β en los enterocitos, lo que causa daño celular.

ADN y, recientemente, una mezcla celular completa inactivada de patotipos de *E. coli*¹³³⁻¹³⁷. Algunos de estos estudios están en la fase preclínica y otros con un grado de avance mayor en los estudios clínicos. Los mayores avances en vacunas han sido en ECET. Se han investigado diferentes modelos con resultados variables en su efectividad, proteínas de algunos factores de virulencia expresados por ECET como CFs, subunidades de LT, ST, entre otros^{133,137,138}. Para el control de las cepas de ECEP, desde hace varios años, con algunas de estas moléculas más conservadas, entre éstas la intimina, EspB, EspA y BfpA se han adelantado estudios para el desarrollo de vacunas en diversos modelos. A pesar de estos avances, aún no existen productos disponibles para el control de la infección por ECEP^{8,135,136,139,140}.

Recientemente, se desarrolló una vacuna combinada contra cinco patotipos de *E. coli*. Se probó en modelos murinos una mezcla celular completa de cinco patotipos de *E. coli* (ECEP, ECEA, ECEI, ECST y ECET) inactivados con formol y aplicados en forma subcutánea. La vacuna combinada mostró 100% de supervivencia de los ratones, independiente del sistema de adyuvante utilizado, ofreciendo protección contra los cinco patotipos en una sola dosis e indujo una buena respuesta humoral¹⁴¹. Algunas de las proteínas implicadas en la virulencia de ECST, principalmente en algunas del T3SS, las subuni-



dades de la toxina STx y la íntima, han sido blanco para el diseño de vacunas. Actualmente, existen dos vacunas disponibles comercialmente, que tienen como función disminuir la colonización por ECST en el ganado^{142,143}, lo que eventualmente podría disminuir el contacto de los humanos con cepas de esta variedad.

Últimamente, mediante estudios de genómica comparativa y de análisis inmunoinformático se han identificado nuevos candidatos vacunales que generan respuesta inmune y reducción de la colonización por ECST en modelos murinos¹³⁴.

Los estudios en vacunas para prevenir las infecciones entéricas por *E. coli* y por otros microorganismos están mostrando resultados que a corto y mediano plazo permitirán plantear nuevos enfoques para generar vacunas de amplio espectro, evaluar respuesta inmune y su eficacia en las poblaciones y evaluar el papel de la inmunidad materna como mecanismo de prevención de las infecciones entéricas.

Conclusiones

Escherichia coli, por ser uno de los principales agentes causales de enfermedad diarreica infecciosa, ha sido motivo de interés en la realización de un gran número de investigaciones que contribuyen a su entendimiento. Se recopiló y analizó información actualizada sobre su patogenicidad, lo que permitió ampliar el conocimiento de los factores de virulencia y sus mecanismos de acción en el hospedero. Algunos de estas moléculas son candidatas potenciales para el desarrollo de vacunas y herramientas útiles para la caracterización molecular de las cepas de *E. coli*. Se debe avanzar en estudios moleculares para determinar la prevalencia específica de patógenos en las diferentes áreas geográficas y en diferentes grupos

poblacionales. Así mismo, es necesario diseñar métodos que incluyan modelos inmunológicos para ampliar el conocimiento de la evolución epidemiológica de patógenos específicos.

Agradecimientos: A la Universidad de Santander, al Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. A Claudia Pilar Lozano y Liliana Benítez por sus valiosos aportes y la revisión de este trabajo.

Resumen

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema de salud pública mundial, especialmente en los países en vía de desarrollo y es una de las causas de mortalidad en niños bajo cinco años de edad. Los agentes etiológicos de EDA incluyen virus, bacterias y parásitos, en ese orden. Dentro de las bacterias, *Escherichia coli* está clasificada como uno de los principales agentes diarreagénicos y se transmite por el consumo de agua y alimentos contaminados o mal cocidos. Esta revisión recopiló información actualizada sobre los factores de virulencia y los mecanismos de patogenicidad implicados en la adhesión y colonización de siete patotipos de *E. coli* denominados, *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasora (ECEI), *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Un último patotipo, *E. coli* adherente invasor (ECAI) asociado a la enfermedad de Crohn también fue revisado. Los patotipos diarreagénicos de *E. coli* afectan a diferentes grupos poblacionales y el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la interacción con el humano es importante para orientar las investigaciones hacia el desarrollo de vacunas o nuevas herramientas para su diagnóstico y control.

Referencias bibliográficas

- 1.- Black R, Cousens S, Johnson H L, Lawn J E, Rudan I, Bassani D G, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010; 375: 1969-87.
- 2.- Liu L, Johnson H L, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn J E, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012; 379: 2151-61.
- 3.- Lanata C F, Fischer-Walker C L, Olascoaga A C, Torres C X, Aryee M J, Black R E. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8: e72788.
- 4.- Pérez C, Gómez-Duarte O G, Arias M L. Diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83: 292-7.
- 5.- Nataro J P, Kaper J B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
- 6.- Small C L, Reid-Yu S A, McPhee J B, Coombes B K. Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nat Commun* 2013; 4: 1957
- 7.- Spears K J, Roe A J, Gally D L. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 187-202.
- 8.- Croxen M A, Law R J, Scholz R, Keeney K M, Wlodarska M, Finlay B B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 822-80.
- 9.- Qadri F, Svennerholm A M, Faruque A S G, Sack R B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 465-83.
- 10.- Nguyen Y, Sperandio V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 12: 2-90.
- 11.- Obata F, Tohyama K, Bonev A D, Kolling G L, Keepers T R, Gross L K. Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor Gb3 localized to neurons. *J Infect Dis* 2008; 198: 1398-406.



- 12.- Pape L, Hartmann H, Bange F C, Suerbaum S, Bueltmann E, Ahlenstiel-Grünow T. Eculizumab in typical hemolytic uremic syndrome (HUS) with neurological involvement. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94 (24): e1000.
- 13.- Pires S M, Fischer-Walker C L, Lanata C F, Devleeschauwer B, Hall A J, Kirk M D, et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One* 2015; 10 (12): e0142927.
- 14.- Trabulsi L R, Keller R, Tardelli Gomes T A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 508-13.
- 15.- DeVinney R, Puente J L, Gauthier A, Goosne D. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* 2001; 41: 1445-58.
- 16.- Golan L, Gonen E, Yagel S, Rosenshine L L, Shpigel N Y. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induce attaching and effacing lesions and hemorrhagic colitis in human and bovine intestinal xenograft models. *Dis Model Mech* 2011; 4: 86-94.
- 17.- Girón J A, Torres A G, Freer E, Kaper J B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* 2002; 44: 361-79.
- 18.- Vidal J E, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Publica Mex* 2007; 49: 376-86.
- 19.- Gómez-Duarte O G, Kaper J B. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995; 63: 1767-76.
- 20.- Zhang H Z, Donnenberg M S. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1996; 21: 787-97.
- 21.- Sohel I, Puente J L, Ramer S W, Bieber D, Cheng-Yeng W U, Schoolnik G K. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* 1996; 178: 2613-28.
- 22.- Daniell S J, Takahashi N, Wilson W, Friedberg D, Rosenshine L, Booy F P, et al. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 2001; 3: 865-71.
- 23.- Jarvis K G, Kaper J B. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type iii secretion system. *Infect Immun* 1996; 64: 4826-9.
- 24.- McDaniel T K, Jarvis K G, Donnenberg M S, Kaper J B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci EEUU* 1995; 92: 1664-8.
- 25.- Gauthier A, Puente J L, Finlay B B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 2003; 71: 3310-9.
- 26.- Garmendia J, Frankel G, Crepin V F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 2005; 73: 2573-85.
- 27.- Delahay R M, Knutton S, Shaw R K, Hartland E L, Pallen M J, Frankel T. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1999; 274: 35969-74.
- 28.- Luo W, Donnenberg M S. Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. *J Bacteriol* 2011; 193: 2972-80.
- 29.- Papatheodorou P, Domańska G, Oxle M, Mathieu J, Selchow O, Kenny B, et al. The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology. *Cell Microbiol* 2006; 8: 677-89.
- 30.- Kenny B, Ellis S, Leard A D, Warawa J, Mellor H, Jepson M A. Co-ordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* 2002; 44: 1095-107.
- 31.- Dean P, de Scott JA, Knox AA, Quitard S, Watkins NJ, Kenny B. The enteropathogenic *E. coli* effector EspF targets and disrupts the nucleolus by a process regulated by mitochondrial dysfunction. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000961.
- 32.- Tomson F L, Viswanathan V K, Kanack K J, Kanteti R P, Straub K V, Menet M, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Mol Microbiol* 2005; 56: 447-64.
- 33.- Navarro-García F, Serapio-Palacios A, Vidal J E, Salazar M I, Tapia-Pastrana G. EspC promotes epithelial cell detachment by enteropathogenic *Escherichia coli* via sequential cleavages of a cytoskeletal protein and then focal adhesion proteins. *Infect Immun* 2014; 82 (6): 2255-65.
- 34.- Guignot J, Segura A, Tran Van Nhieu G. The serine protease EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* regulates pore formation and cytotoxicity mediated by the type III secretion system. *PLoS Pathog* 2015; 11 (7): e1005013.
- 35.- Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmid M A. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2001; 3: 669-79.
- 36.- Cleary J, Lai L, Shaw R K, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg M S, Frankel G, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 2004; 150: 527-38.
- 37.- Kenny B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1229-41.
- 38.- Lommel S, Benesch S, Rohde M, Wehland J, Rottner K. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol* 2004; 6: 243-54.
- 39.- Nieto-Pelegrín E, Meiler E, Martín-Villa J M, Benito-León M, Martínez-Quiles N. Crk adaptors negatively regulate actin polymerization in pedestals formed by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) by binding to Tir effector. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004022.
- 40.- Tu X, Nisan I, Yona C, Hanski E, Rosenshine L I. EspH, a new cytoskeleton modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003; 47: 595-606.
- 41.- Berger C N, Crepin VF, Baruch K, Mousnier A, Rosenshine LI, Frankel T. EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation. *MBIO* 2012; 3: e00317-12.
- 42.- O'Brien A D, LaVeck G D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983; 40: 675-83.
- 43.- Konowalchuk J, Seirs J I, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977; 18: 775-9.
- 44.- Rivero M, Passucci J, Lucchesi P, Signorini M, Alconcher L, Rodríguez E, et al. Epidemiology of hemolytic uremic syndrome in two regions of Buenos Aires Province. *Medicina (B Aires)* 2013; 73 (2): 127-35.
- 45.- Canpolat N. Hemolytic uremic syndrome. *Turk Pediatri Ars*. 20151; 50 (2): 73-82.
- 46.- Sinclair J F, O'Brien A D. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 2002; 277: 2876-85.
- 47.- Fitzhenry R J, Pickard D J, Hartland E L, Reece S, Dougan G, Phillips A D, et al. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonization by enterohaemorrhagic



- Escherichia coli* O157:H7. Gut Microbes 2002; 50: 180-5.
- 48.- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W L, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis 2002; 185: 74-84.
- 49.- Boerlin P, Mcewen S A, Boerlin-Petzold F, Wilson J B, Johnson R P, Gyles C I. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J Clin Microbiol 1999; 37: 497-503.
- 50.- Malyukova I, Murray K F, Zhu C, Boedeker E, Kane A, Patterson K, et al. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009; 296: G78-92.
- 51.- Puttamreddy S, Cornick N A, Minion F C. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. Infect Immun 2010; 78: 2377-84.
- 52.- In J, Lukyanenko V, Foulke-Abel J, Hubbard A L, Delannoy M, Hansen A M, et al. Serine protease EspP from enterohemorrhagic *Escherichia coli* is sufficient to induce Shiga toxin macropinocytosis in intestinal epithelium. PLoS One 2013; 8:e69196.
- 53.- Lukyanenko V, Malyukova I, Hubbard A, Delannoy M, Boedeker E, Zhu C, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection stimulates Shiga toxin 1 macropinocytosis and transcytosis across intestinal epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 2011; 301: C1140-9.
- 54.- Yosief H O, Iyer S S, Weiss A A. Binding of Pk-trisaccharide analogs of globotriaosylceramide to Shiga toxin variants. Infect Immun 2013; 81: 2753-60.
- 55.- Lee S Y, Cherla R P, Caliskan I, Tesh V L. Shiga toxin 1 induces apoptosis in the human myelogenous leukemia cell line THP-1 by a caspase-8-dependent, tumor necrosis factor receptor-independent mechanism. Infect Immun 2005; 73: 5115-26.
- 56.- Brunder W, Schmidt H, Karch H, Kat P A. A novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiology 1996; 142: 3305-15.
- 57.- Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, et al. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. Infect Immun 2001; 69: 6660-9.
- 58.- Latham W W, Bergsbaken T, Welch R A. Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. J Exp Med 2004; 199: 1077-87.
- 59.- Bauer M E, Welch R A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 1996; 64: 167-75.
- 60.- Grys T E, Siegel M B, Latham W W, Welch R A. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. Infect Immun 2005; 73: 1295-303.
- 61.- Grys T E, Walters L L, Welch R A. Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol 2006; 188: 4646-53.
- 62.- Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich A W, Kim K S, et al. Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. Microbes Infect 2007; 9: 282-90.
- 63.- Zhang X, Cheng Y, Xiong Y, Ye C, Zheng H, Sun H, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* specific enterohemolysin induced IL-1 β in human macrophages and EHEC-induced IL-1 β required activation of NLRP3 inflammasome. PLoS One 2012; 7: e50288.
- 64.- Anonymous. Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. Wkly Epidemiol Rec 2006; 81: 97-107.
- 65.- Gastra W, Svennerholm A N. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trends Microbiol 1996; 4: 444-52.
- 66.- Sjöling A, Wiklund G, Savarino S J, Cohen D I, Svennerholm A M. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. J Clin Microbiol 2007; 45: 3295-301.
- 67.- Mazariego K, Cruz A, Ledesma M A, Ochoa S A, Xicohtencatl J. Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. J Bacteriol 2010; 192: 2791-800.
- 68.- Clavijo A P, Bai J, Gómez-Duarte O G. The longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) mediates bacterial self-aggregation and protection from antimicrobial agents. Microb Pathog 2010; 48: 230-8.
- 69.- Roy K, Kansal R, Bartels S R, Hamilton D J, Shaaban S, Fleckenstein J M. Adhesion degradation accelerates delivery of heat-labile toxin by enterotoxigenic *E. coli*. J Biol Chem 2011; 286: 29771-9.
- 70.- Elsinghorst E A, Kopecko D J. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1992; 60: 2409-17.
- 71.- Roy K, Hilliard G M, Hamilton D J, Luo J, Ostmann M M, Fleckenstein J M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. Nature 2009; 457: 594-8.
- 72.- Clements A, Joven J C, Constantinou N, Frankel T. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes 2012; 3: 71-87.
- 73.- Gómez O G, Chattopadhyay S, Weissman S J, Giron J A, Kaper J B, Sokurenko E V. Genetic diversity of the gene cluster encoding longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 2007; 189: 9145-9.
- 74.- Giron J A, Viboud G I, Sperandio V, Gómez O G, Maneval D R, Albert M J, et al. Prevalence and association of the longus pilus structural gene (*lngA*) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1995; 63: 4195-8.
- 75.- Tauschek M, Gorrell R J, Strugnell R A, Robins-Browne R M. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. PNAS 2002; 99: 7066-71.
- 76.- Spangler B D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol Rev 1992; 56: 622-47.
- 77.- Johnson A M, Kaushik R S, Francis D H, Fleckenstein J M, Hardwidge P R. Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. J Bacteriol 2009; 191: 178-6.
- 78.- Sato T, Shimonishi Y. Structural features of *Escherichia coli* heat stable enterotoxin that activates membrane associated guanylyl cyclase. J Peptide Res 2004; 63: 200-6.
- 79.- Pitari G M, Zingman L V, Hodgson D M, Alekseev A E, Kazeronian S, Bienengraeber M, et al. Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. PNAS 2003; 100: 2695-9.
- 80.- Sears C L, Kaper J B. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev 1996; 60: 167-215.
- 81.- Ludwig A, Bauer S, Benz R, Bergmann B, Goebel W. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. Mol Microbiol 1999; 31: 557-7.
- 82.- Söderblom T, Oxhamre C, Wai SN, Uhlén P, Aperia A, Uhlén BE, et al. Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immune stimulation via epithelial Ca²⁺ signalling and Toll-like receptor 4. Cell Microbiol 2005; 7: 779-88.
- 83.- Oscarsson J, Mizunoe Y, Li L, Lai X H, Wieslander A, Uhlén B E. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1999; 32: 1226-38.
- 84.- Franca F L, Wells T J, Browning D J, Tayar Nogueira R, Silva Sarges F, Pereira A C, et al. Genotypic and phenotypic characterisation



- of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One 2013; 8:e69971.
- 85.- Mohamed J A, Huang D B, Jiang Z D, DuPont H L, Nataro J P, Belkind-Gerson J, et al. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. J Clin Microbiol 2007; 45: 121-6.
- 86.- Hicks S, Frankel G, Kaper J B, Dougan G, Phillips A D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. Infect Immun 1998; 66: 1570-8.
- 87.- Nataro J P, Yikang D, Yingkang D, Walker K. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Bacteriol 1994; 176: 4691-9.
- 88.- Morin N, Santiago A E, Ernst R K, Guillot S J, Nataro J P. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 2013; 81: 122-32.
- 89.- Nataro, J P, Deng Y, Maneval D R, German A L, Martin W C, Levine M M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect Immun 1992; 60: 2297-304.
- 90.- Czczulin J R, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary M H, et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 1997; 65: 4135-45.
- 91.- Bernier C, Gounon P, Bouguenec C L. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. Infect Immun 2002; 70: 4302-11.
- 92.- Douzy B, Spinelli S, Blangy S, Roussel L, Durand E, Brunet Y R, et al. Crystal structure and self-interaction of the type VI secretion tail-tube protein from enteroaggregative *Escherichia coli*. PLoS One 2014; 9: e86918.
- 93.- Mancini J, Weckselblatt B, Chung Y K, Durante J C, Andelman S, Glaubman J, et al. The heat-resistant agglutinin family includes a novel adhesin from enteroaggregative *Escherichia coli* strain 60^a. J Bacteriol 2011; 193: 4813-20.
- 94.- Sheikh J, Czczulin J R, Harrington S, Hicks S, Henderson I R, Bouguenec C L, et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Invest 2002; 110: 1329-37.
- 95.- Nishi J, Sheikh J, Mizuguchi K, Luisi B, Burland V, Boutin A, et al. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. J Biol Chem 2003; 278: 45680-9.
- 96.- Savarino S J, Fasano A, Watson J, Martin B M, Levine M M, Guandalini S, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3093-7.
- 97.- Dautin N. Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and function. Toxins 2010; 2: 1179-206.
- 98.- Navarro-García F, Gutiérrez-Jiménez J, García-Tovar C, Castro L A, Salazar-González H, Cordova V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the *Enterobacteriaceae* family, is a potent mucus secretagogue. Infect Immun 2010; 78: 4101-9.
- 99.- Eslava C, Navarro-García F, Czczulin J R, Henderson I R, Cravioto A, Nataro J P. Pet, an Autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 1998; 66: 3155-63.
- 100.- Dutta P R, Cappello R, Navarro-García F, Nataro J P. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. Infect Immun 2002; 70: 7105-13.
- 101.- Nuñez L F, Boisen N, da Silva J, Havt A, Bobo E, Melo A, et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. J Med Microbiol 2013; 62: 683-93.
- 102.- Al-Hasani K, Henderson I R, Sakellaris H, Rajakumar K, Grant T, Nataro J P, et al. The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. Infect Immun 2000; 68: 2457-63.
- 103.- Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt K A, Nataro J P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. Infect Immun 2008; 76(7): 3281-92.
- 104.- Pettengill E A, Pettengill J B, Binet R. Phylogenetic analyses of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* for the identification of molecular epidemiological markers: whole-genome comparative analysis does not support distinct genera designation. Front Microbiol 2016; 6: 1573.
- 105.- Cossart P, Sansonetti P J. Bacterial invasion: The paradigms of enteroinvasive pathogens. Science 2004; 304: 242-8.
- 106.- Schroeder G N, Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev 2008; 21:134-56.
- 107.- Sansonetti P J, Arondel J, Cantej J R, Prevost M C, Huerre M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: Effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. Infect Immun 1996; 64: 2752-64.
- 108.- Hilbi H, Moss J E, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, et al. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. J Biol Chem 1998; 273: 32895-900.
- 109.- Ogawa M, Handa Y, Ashida H, Suzuki M, Sasakawa C. The versatility of *Shigella* effectors. Nature reviews 2008; 6: 11-6.
- 110.- Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti, et al. CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. Cell Microbiol 2000; 2:19-33.
- 111.- Egile C, Loisel T P, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti P J, et al. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. J Cell Biol 1999; 146: 1319-32.
- 112.- Parsot C. *Shigella* spp and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. FEMS Microbiology Letters 2005; 252: 11-8.
- 113.- Chassaing B, Rolhion N, Vallée A, Salim S Y, Prorok-Hamon M, Neut C, et al. Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. J Clin Invest 2011; 121: 966-75.
- 114.- Cieza R J, Hu J, Ross B N, Sbrana E, Torres A G. The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. Infect Immun 2015; 83(5): 1904-18.
- 115.- Barnich N, Carvalho F A, Glasser A L, Darcha C, Jantschke P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. J Clin Invest 2007; v117: 1566-74.
- 116.- Bringer M A, Barnich N, Glasser A L, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA Stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. Infect Immun 2005; 73: 712-21.
- 117.- Kaser A, Lee A H, Franke A, Glickman J N, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. Cell 2008; 134: 743-56.
- 118.- Rolhion N, Barnich N, Bringer M A, Glasser A L, Ranc J, Hebuterne X, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. Gut 2010; 59: 1355-62.
- 119.- Sivignon A, Yan X, Álvarez Dorta D, Bonnet R, Bouckaert J, Fleury E, et al. Development of heptylmannoside-based glycoconjugate antiadhesive compounds against



- adherent-invasive *Escherichia coli* bacteria associated with Crohn's Disease. *MBio* 2015; 6 (6): e01298-15.
- 120.-Forestier C, Meyer M, Favre-Bonte S, Rich C, Malpuech G, Le L, et al. Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2897-903.
- 121.-Poitrineau P, Forestier C, Meyer M, Jallat C, Rich C, Malpuech G, et al. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *Clin Microbiol* 1995; 33: 1961-2.
- 122.-Hudault S, Spiller O B, Morgan B P, Servin A L. Human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins that use human CD55 (Decay-Accelerating Factor) as a receptor does not bind the rodent and pig analogues of CD55. *Infect Immun* 2004; 72: 4859-63.
- 123.-Bouguenec C L, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, et al. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1738-45.
- 124.-Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis* 2001; 183: S24-7.
- 125.-Guignot J, Hudault S, Kansau I, Chau I, Servin A L. Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect Immun* 2009; 77: 517-31.
- 126.-Zalewska B, Stangret J, Bury K, Wojciechowski M, Kur J, Piatek R. DAF- and collagen-binding properties of chimeric Dr fimbriae. *Microbiology* 2007; 153: 2733-42.
- 127.-Bilge S S, Clausen C R, Lau W, Moseley S L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Bacteriol* 1989; 171: 4281-9.
- 128.-Benz I, Schmidt M A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* 1992; 60: 13-8.
- 129.-Queval C J, Nicolas V, Beau I. Role of Src kinases in mobilization of glycosylphosphatidylinositol-anchored decay-accelerating factor by Dr fimbria-positive adhering bacteria. *Infect Immun* 2011; 79: 2519-34.
- 130.-Bernet-Camard M F, Coconnier M H, Hudault S, Servin A L. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1996; 64: 1918-28.
- 131.-Bétis F, Brest P, Hofman V, Guignot J, Bernet-Camard M F, Rossi B, et al. The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infect Immun* 2003; 71: 1068-74.
- 132.-Meraz I M, Arikawa K, Nakamura H, Ogasawara J, Hase A, Nishikawa Y. Inducing strains of diffusely adherent *Escherichia coli* with sporadic diarrheal patients with less than 5 years of age. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 44-9.
- 133.-Deng G, Li W, Wu X, Bao S, Zeng J, Zhao N, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant adenoviral based vaccine expressing heat-stable enterotoxin (STa) and K99 adhesion antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* in mice. *Mol Immunol* 2015; 68 (2 Pt C): 684-91.
- 134.-García-Angulo V A, Kalita A, Kalita M, Lozano L, Torres A G. Comparative genomics and immunoinformatics approach for the identification of vaccine candidates for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 2014; 82 (5): 2016-26.
- 135.-Vasconcellos H L, Scaramuzzi K, Nascimento I P, Da Costa Ferreira J M Jr, Abe C M, Piazza R M, et al. Generation of recombinant bacillus Calmette-Guérin and *Mycobacterium smegmatis* expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vaccine* 2012; 30 (41): 5999-6005.
- 136.-Durand D, Ochoa T J, Bellomo S M, Contreras C A, Bustamante V H, Ruiz J, et al. Detection of secretory immunoglobulin A in human colostrum as mucosal immune response against proteins of the type III secretion system of *Salmonella*, *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32 (10): 1122-6.
- 137.-Luiz W B, Rodrigues J F, Crabb J H, Savarino S J, Ferreira L C. Maternal vaccination with a fimbrial tip adhesin and passive protection of neonatal mice against lethal human enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge. *Infect Immun* 2015; 83 (12): 4555-64.
- 138.-Norton E B, Branco L M, Clements J D. Evaluating the A-subunit of the heat-labile toxin (LT) as an immunogen and a protective antigen against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *PLoS One* 2015; 10 (8): e0136302.
- 139.-Chakraborty S, Harro C, DeNearing B, Ram M, Feller A, Cage A, et al. Characterization of mucosal immune responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine antigens in a human challenge model: response profiles after primary infection and homologous rechallenge with strain H10407. *Clin Vaccine Immunol* 2015; 23 (1): 55-64.
- 140.-Ruan X, Sack D A, Zhang W. Genetic fusions of a CFA/II/IV MEFA (multiepitope fusion antigen) and a toxoid fusion of heat-stable toxin (STa) and heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) retain broad anti-CFA and antitoxin antigenicity. *PLoS One* 2015; 10 (3): e0121623.
- 141.-Gohar A, Abdeltawab N F, Fahmy A, Amin M A. Development of safe, effective and immunogenic vaccine candidate for diarrheagenic *Escherichia coli* main pathotypes in a mouse model. *BMC Res Notes* 2016; 9 (1): 80.
- 142.-Varela N P, Dick P, Wilson J. Assessing the existing information on the efficacy of bovine vaccination against *Escherichia coli* O157:H7: a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 2013; 60: 253-68.
- 143.-Snedeker K G, Campbell M, Sargeant J M A. A systematic review of vaccinations to reduce the shedding of *Escherichia coli* O157 in the faeces of domestic ruminants. *Zoonoses Public Health* 2012; 59: 126-38.