

## Efecto citotóxico en colon humano de *Escherichia coli* enterohemorrágico aislado de terneros con diarrea sanguinolenta

V. PISTONE CREYDT<sup>1</sup>, A. VENZANO<sup>2</sup>, D.A. VILTE<sup>2</sup>, E.C. MERCADO<sup>2</sup>, C. IBARRA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. Paraguay 2155, 7mo piso, 1121 Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA, Los Reseros y Las Cabañas, 1686 Hurlingham, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: ibarra@fmed.uba.ar

### RESUMEN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es el patógeno emergente en alimentos de mayor impacto, siendo su principal reservorio el ganado bovino. STEC puede causar diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. El presente trabajo estudió la acción citotóxica de dos cepas de STEC aisladas de heces de terneros diarreicos en colon humano *in vitro*. Los fragmentos se montaron como un diafragma en una cámara de Ussing y se incubaron con las cepas patógenas. El flujo neto absorptivo de agua (Jw) disminuyó y la corriente de cortocircuito (Isc) aumentó significativamente ( $P < 0,01$ ) con respecto al control negativo. Los tejidos presentaron erosión de la mucosa, exfoliación del epitelio, y presencia de pseudomembranas en el lumen. A nivel de la lámina propia se observaron lesiones circulatorias leves. Una moderada infiltración de neutrófilos se observó en el lumen y en las células epiteliales. Las criptas colónicas no se vieron afectadas. El grado de lesión fue similar en ambas cepas experimentales. Este es el primer estudio que demuestra que cultivos de cepas de STEC aisladas de ganado bovino producen efectos citotóxicos en colon humano *in vitro*.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* enterohemorrágico, colon humano, diarrea sanguinolenta, terneros

### SUMMARY

**Cytotoxic effect in human colon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from calves with bloody diarrhea.** Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) is one of the most important emergent pathogen in foods, being its main reservoir bovine cattle. STEC can cause diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. The present work have studied the cytotoxic action in human colon of cultures of two STEC strains isolated from faeces of calves with bloody diarrhea. Colonic mucosa was mounted as a diaphragm in a Ussing chamber and incubated with the cultures of pathogenic strains. Net water flow (Jw) decreased and the short-circuit current (Isc) increased significantly ( $p < 0,01$ ) compared to negative control. Tissues showed an erosion of the mucose, epithelial exfoliation, and presence of pseudo-membranes in the lumen. Mild circulatory lesions were observed in the lamina propria. A moderate neutrophils infiltration was observed in the lumen and into the epithelial cells. Colonic crypts were not disrupted. Both experimental strains caused a similar lesion on colon tissues. This is the first study that shows that cultures of STEC strains isolated from bovine cattle produce cytotoxic effects *in vitro* in human colon.

**Key words:** enterohemorrhagic *Escherichia coli*, human colon, bloody diarrhea, calves

### INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es el patógeno emergente en alimentos de mayor impacto, siendo su principal reservorio el ganado bovino (5, 19-21). STEC puede causar diarrea acuosa o sanguinolenta, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (10). En Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años (25), y si bien el origen de estas infecciones se asoció al consumo de productos cárnicos y lácteos, la relación entre las cepas de STEC de origen humano y bovino no está totalmente dilucidada.

Estudios experimentales demuestran que cepas de STEC patógenas en humanos colonizan el tracto intestinal de terneros y pueden causar diarrea (1). Los daños

observados tanto en el intestino como en los riñones de niños infectados, son ocasionados por productos bacterianos potenciados por mediadores inflamatorios, siendo la toxina Shiga tipo 1 o 2 (Stx1, Stx2) necesaria para el desarrollo del SUH (15).

Stx está constituida, en sus diferentes isoformas, por una subunidad A y cinco subunidades B que forman una estructura pentamérica. Esta última une Stx a receptores globotriaosilceramida (Gb3), presentes en algunas células eucariotas, para luego ser endocitada siguiendo un camino de transporte retrógrado a la secreción de proteínas. En el interior de la célula, la subunidad A inhibe la síntesis de proteínas por inactivación de la subunidad ribosomal 60S (28) y la subunidad B puede desencadenar procesos apoptóticos (4, 28).

Otros factores de virulencia contribuyen a la patogenicidad de algunos STEC, los que reciben el nombre de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), como aquéllos codificados por el LEE (locus of enterocyte effacement) (18). El análisis de la secuencia del LEE reveló 41 marcos de lectura que comprenden al menos 3 regiones funcionales principales: una que codifica el sistema de secreción tipo III, otra que contiene el gen *eae* que expresa la intimina y una tercera que codifica los productos secretados Esp (*E. coli* secreted proteins) necesarios para la transducción de señales en la célula del huésped. Se sabe también que las proteínas EspA (13), EspB (6) y EspD (14) son exportadas por el sistema de secreción de tipo III. La intimina es determinante de la formación de la lesión A/E (attaching-and-effacing), característica de la interacción de STEC con las células intestinales. También se ha descrito como factor de virulencia una toxina con características de hemolisina, la cual está codificada por el operón *hly* de EHEC (27).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción citotóxica en colon humano *in vitro* de cepas STEC aisladas de heces de terneros con diarrea sanguinolenta.

Este trabajo fue presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología realizado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, del 17 al 21 de Octubre de 2004.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

Se estudiaron dos cepas de *E. coli* aisladas en nuestro laboratorio de heces de terneros diarreicos provenientes de rodeos de la provincia de Buenos Aires: *E. coli* cepa 97/23-A (O26:H11; *stx*<sub>2</sub>; *eae*-β; EHEC-*hlyA*+) y *E. coli* cepa 01/289-1 (O111:H; *stx*<sub>2</sub>; *eae*-θ; EHEC-*hlyA*+) (19). *E. coli* K12 DH5α (*stx*<sub>1</sub>-; *stx*<sub>2</sub>-; *eae*-; EHEC-*hlyA*-) fue usada como control negativo. Para los ensayos se utilizaron cultivos de las bacterias en fase de crecimiento exponencial (DO<sub>600</sub> = 0,5) en medio LB a 37 °C con agitación.

### Obtención y preparación de los fragmentos colónicos humanos

Los fragmentos de colon se extrajeron de piezas quirúrgicas obtenidas de operaciones a pacientes adultos con cáncer, bajo su consentimiento y con la aprobación del comité de ética del hospital. Inmediatamente después de la ablación, los tejidos de la zona macroscópicamente sana fueron trasladados al laboratorio en una solución Ringer-alto potasio (en mM: 120 KCl, 10 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 1,2 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 glucosa) a 4 °C para preservar las funciones de transporte. Luego la mucosa colónica fue separada del resto del tejido y montada como un diafragma en una cámara de Ussing modificada (8) de 1,76 cm<sup>2</sup> de superficie, la cual permitió registrar simultáneamente la corriente de cortocircuito (Isc) y el flujo neto de agua (Jw) a través del colon. El tejido se mantuvo a 37 °C bajo una presión hidrostática de 10 cm de agua y se burbujeó con una mezcla gaseosa de 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> para mantener las condiciones fisiológicas normales.

### Flujo neto de agua y parámetros eléctricos

El Jw (μl/min.cm<sup>2</sup>) a través de la mucosa colónica se registró automáticamente mediante un dispositivo puesto a punto en el laboratorio (2). Este dispositivo mide el desplazamiento de una

solución coloreada contenida en un capilar conectado al lado mucoso del tejido. La sensibilidad del instrumento es de ± 50 nl.

Simultáneamente se registró la Isc (μA/cm<sup>2</sup>) mediante un sistema de fijación de voltaje que anula la diferencia de potencial eléctrico entre los compartimentos mucoso y seroso del tejido.

Cuando los parámetros medidos se estabilizaron, se agregaron 200 μl de cultivo de las cepas en estudio o del control negativo al lado mucoso del tejido (tiempo 0) y se continuaron los registros durante 60 min. Los datos se presentan como ΔJw, donde ΔJw = Jw (a tiempo dado) - Jw (a tiempo 0) y ΔIsc, donde ΔIsc = Isc (a tiempo dado) - Isc (a tiempo 0).

### Estudios por microscopía óptica

Una vez finalizados los experimentos, los tejidos se fijaron en formaldehído 4% P/V en PBS durante 24 hs. Luego se cortaron longitudinalmente, deshidrataron e incluyeron en parafina. Cortes de 2-4 μm incluyeron con hematoxilina-eosina y se observaron mediante un microscopio óptico (400x y 1000x).

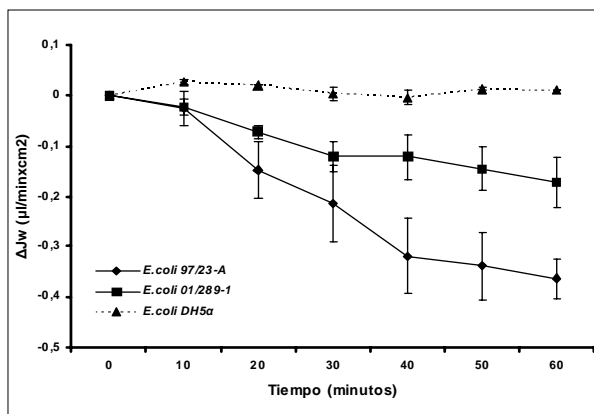
### Análisis estadístico

Los resultados se informaron como la media ± 1 error estándar. La significancia estadística entre dos valores medios obtenidos para dos condiciones experimentales se calcularon mediante la prueba "t" de Student. Para el análisis estadístico de las diferentes curvas se utilizó ANOVA de un factor, para evaluar los cambios de Jw e Isc de cada una de las cepas en función del tiempo, y ANOVA de 2 factores para estudiar el comportamiento de las cepas experimentales y controles entre sí (24). Valores de P < 0,05 se consideraron significativos.

## RESULTADOS

### Efecto citotóxico de las cepas en estudio sobre la absorción intestinal de agua e iones

En los fragmentos de colon humano montados en la cámara de Ussing se observó un Jw neto absorbivo de 0,38 ± 0,08 μl/min.cm<sup>2</sup> y una Isc de 13,7 ± 4,1 μA/cm<sup>2</sup> en condiciones basales.



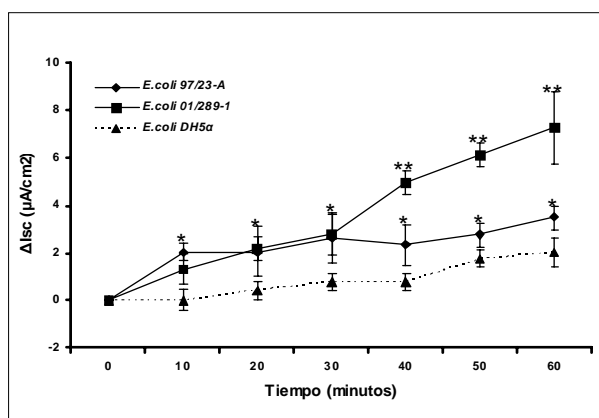
**Figura 1.** Efecto de las cepas *E. coli* 97/23-A, *E. coli* 01/289-1 y *E. coli* DH5α (control negativo) sobre la absorción de agua (Jw) en fragmentos de colon humano durante una incubación de 60 minutos.

Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=5 para cada situación experimental).

\* P < 0.01 vs control; \*\* P < 0.05 entre cepas experimentales.

La incubación posterior de la mucosa colónica con el cultivo de la cepa experimental, *E. coli* 97/23-A mostró una inhibición del Jw neto absorbivo dependiente del tiempo de incubación (Figura 1). Esta inhibición resultó significativa a partir de los 10 min de incubación ( $P < 0,001$  vs control). El mismo efecto se obtuvo con el cultivo de la cepa *E. coli* 01/289-1 ( $P < 0,01$  vs control) aunque la inhibición del Jw fue menor que la observada con la cepa *E. coli* 97/23-A. La comparación de las curvas obtenidas con ambas cepas mostró una diferencia significativa a partir de 30 minutos de incubación ( $p < 0,05$ ). La cepa usada como control negativo no modificó el Jw durante el transcurso de la experiencia (Figura 1).

Con respecto a la Isc se observó un aumento en función del tiempo de incubación con ambas cepas experimentales (Figura 2). Las curvas obtenidas fueron significativa-



**Figura 2.** Efecto de las cepas *E. coli* 97/23-A, *E. coli* 01/289-1 y *E. coli* DH5α (control negativo) sobre la corriente de corto circuito (Isc) en fragmentos de colon humano durante una incubación de 60 minutos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n=5$  para cada situación experimental).

\*  $P < 0.01$  vs control; \*\*  $P < 0.01$  entre cepas experimentales.

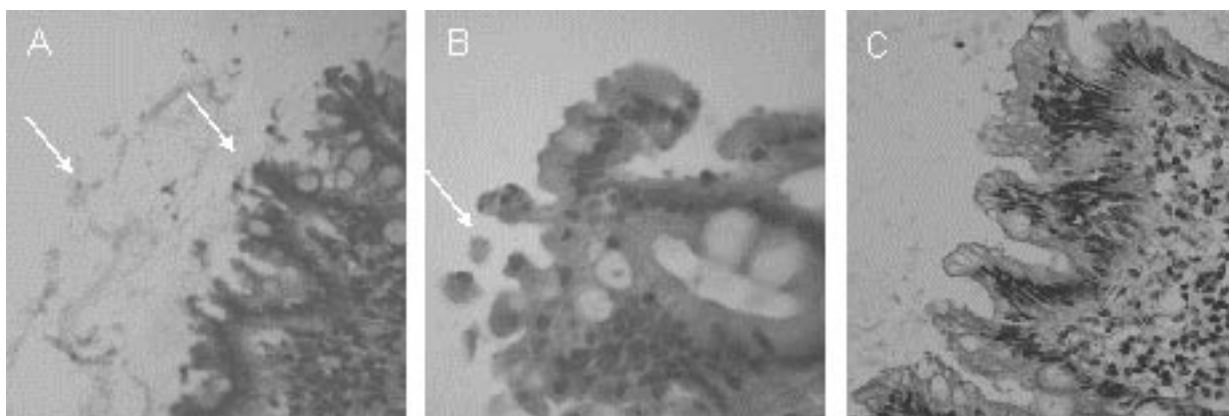
mente diferentes respecto de la cepa control negativo ( $P < 0,01$ ). El aumento de Isc fue mayor cuando el tejido se incubó con cultivo de *E. coli* 01/289-1. A partir de los 40 min de incubación la diferencia en los valores de Isc entre las cepas patógenas se hizo significativa ( $P < 0,05$ ).

### Estudios histológicos

En los tejidos incubados 30 min con *E. coli* 97/23-A y *E. coli* 01/289-1 se observó daño histológico consistente en segmentos de tejidos con erosión de la mucosa, exfoliación del epitelio, y presencia de pseudomembranas en el lumen compuestas por células epiteliales necróticas, moco, neutrófilos y bacilos (Figura 3A y 3B). A nivel de la lámina propia sólo se observaron lesiones circulatorias leves, consistentes en edema e hiperemia, sin hemorragias. Las criptas colónicas no se vieron afectadas. En el lumen y en la superficie intestinal se observó una moderada infiltración de neutrófilos. El grado de lesión fue similar en el caso de la cepa 01/289-1 (datos no mostrados). En los tejidos incubados con el cultivo de la cepa control negativo se observó la mucosa con la histoarquitectura conservada (Figura 3C).

### DISCUSIÓN

La interacción de STEC con la mucosa intestinal ha sido estudiada en modelos animales y líneas celulares, empleando técnicas *in vivo* e *in vitro*. El empleo de la cámara de Ussing nos permitió observar y cuantificar el efecto fisiológico de cultivos de cepas STEC aisladas de terneros diarreicos sobre tejido colónico humano. El efecto inhibitorio sobre el Jw neto absorbivo registrado con ambos cultivos de STEC podría ser atribuido a la Stx presente en el medio de cultivo. En estudios previos se demostró que Stx2 inhibe la absorción neta de agua en colon humano *in vitro* y que factores adicionales presentes en



**Figura 3.** Secciones de mucosa colónica humana incubadas 30 minutos con cultivos de la cepa *E. coli* 97/23-A (A, 400 $\times$  y B, 1000 $\times$ ). Se observan zonas de erosión de la mucosa y exfoliación del epitelio (flecha en A y B) así como la formación de una pseudomembrana en el lumen (asteriscos en A). En el tejido incubado con el cultivo de la cepa *E. coli* DH5α (control negativo) no se observan modificaciones histológicas (C, 400 $\times$ ).

los preparaciones crudas de Stx2 incrementaron el efecto de la toxina (8). La comparación de las curvas de absorción en este trabajo demostró una diferencia significativa entre ambas STEC a partir de los 30 min de incubación. Esta diferencia podría deberse al tipo de Stx expresada por las cepas en estudio a partir de que Stx2 fue descrita como más potente que Stx1 en células endoteliales (12). También podría ser consecuencia de la concentración de Stx en los cultivos utilizados teniendo en cuenta que el efecto de Stx2 sobre Jw es función directa de su concentración en el medio (24) o de la eventual presencia de factores bacterianos que ejerzan una acción sinérgica con Stx (17).

Por otra parte, el aumento en la Isc obtenido con ambos cultivos de STEC no podría adjudicarse a la acción de Stx ya que se ha demostrado que la toxina, contrariamente a lo que ocurre con muchas enterotoxinas, no modifica por sí sola la Isc (24). La Isc es una medida de la resistencia transepitelial y aumenta cuando se produce un aumento de la actividad aniónica secretoria y/o la ruptura de la integridad de la barrera epitelial, ya sea por mecanismos específicos o como resultado de la respuesta inflamatoria. El aumento de la Isc podría ser entonces consecuencia de la interacción de STEC con las células epiteliales, aunque la presencia de otras toxinas no puede ser descartada. Philpott y col. (23) demostraron que la adherencia de *E. coli* O157:H7 a la línea celular intestinal T84 resulta en una activación de la proteínquinasa C que modifica la integridad de la barrera epitelial y conduce a la caída de la resistencia transepitelial y el aumento de la Isc. También se informó un aumento de la secreción de cloruros por adenosina, un potente mediador de la secreción intestinal, asociado a la respuesta inflamatoria (16). La adenosina se formaría a partir de 5'AMP liberado al lado luminal por los polimorfonucleares que migran estimulados por interleuquina 8 (IL-8) (7). Recientemente se demostró que las Stxs estimulan la secreción de IL-8 por las células epiteliales (29). Nuevos experimentos serán necesarios para establecer la interacción de Stx con los eventos que llevan a la adhesión bacteriana y determinar su relación con las alteraciones en el movimiento de iones y agua que conducen a la diarrea acuosa observada en los niños infectados con STEC.

Las observaciones microscópicas de los tejidos expuestos a los cultivos de STEC mostraron una histopatología similar a la observada en íleon y colon de terneros infectados por EHEC (11, 26) y en biopsias de colon en casos de colitis asociada a *E. coli* O157:H7 en humanos (9). En nuestras experiencias no se observó adhesión bacteriana extensa o focalizada al epitelio colónico al cabo de 1 hora de incubación. Recientemente, Philips y col. (22) demostraron que *E. coli* O157:H7 que expresa intimina gama puede unirse y causar lesión tipo A/E especialmente a nivel del epitelio superficial a las placas de Peyer del intestino delgado. La colonización podría

extenderse a partir de los sitios de adherencia inicial a otros sectores de la mucosa intestinal, como se demostró con una cepa enteropatógena en conejo (3). Estos resultados explicarían por qué estudios histológicos de biopsias de pacientes con colitis hemorrágica por *E. coli* O157:H7 han mostrado un daño extensivo de la mucosa colónica (9). Sin embargo, aún no se conocen los sitios de adhesión intestinal de las intiminas beta y theta, expresadas por las STEC empleadas en este trabajo.

Los estudios de adhesión de STEC a cultivo de líneas celulares intestinales como la T84 demuestran que menos del 5% de bacterias se adhieren a la célula huésped luego de 1 hora de infección (30). En consecuencia, la destrucción del tejido que observamos al poner en contacto las bacterias con el tejido colónico *in vitro* al cabo de 1 hora de incubación podría responder a la rápida acción de Stx1 o Stx2 secretada por las STEC al medio de cultivo más que a la adhesión bacteriana. Sin embargo, la contribución a esta patología de la Stx circulante y de la capacidad de desarrollar la lesión A/E aún no está bien dilucidada.

Los resultados obtenidos demuestran que cepas de STEC aisladas de diarreas sanguinolentas en terneros, son capaces de producir daños funcionales y estructurales en colon humano *in vitro*.

Estos estudios permiten comparar la citotoxicidad en tejidos humanos de cepas de STEC aisladas de bovinos y contribuyen a establecer una relación epidemiológica funcional entre el ganado bovino sospechado de ser la fuente de STEC y el humano susceptible de ser infectado.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen al Dr. Alfredo Graziano y a la Sra. Patricia Faciano por su asistencia en la obtención de los fragmentos de colon humano en el Hospital de Gastroenterología "Carlos B. Udaondo", a la Sra. Ana M. Elizondo y al Sr. Daniel Funes, del Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA, por su asistencia técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Besser T, Hancock D, Pritchett L, McRae E, Rice D, Tarr P (1997) Duration of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Infect. Dis.* 175: 726-729.
2. Burgos JM, Pérez JL, García L, Gonzalez GS, Benitez JA, Galindo F, *et al* (1999) Diarrheagenicity evaluation of attenuated *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in the human intestine *ex-vivo*. *Vaccine* 17: 949-956.
3. Cantey JR, Inman LR (1981) Diarrhea due to *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: the Peyer's patch as the initial site of attachment and colonization. *J. Infect. Dis.* 143: 440-446.
4. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL (2003) Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 159-166.
5. Cobbold R, Desmarchelier P (2000) A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herd. *Vet. Microbiol.* 71: 125-137.
6. Donnenberg MS, Yu J, Kaper JB (1993) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175: 4670-4680.
7. Elliott E, Li Z, Bell C, Stiel D, Buret A, Wallace J, *et al* (1994) Modulation of host response to *Escherichia coli*

- O157:H7 infection by anti-CD18 antibody in rabbits. *Gastroenterology* 106: 1554-1561.
8. Fiorito P, Burgos JM, Fernández Miyakawa, Rivas M, Chillemi G, Berkowski D, *et al* (2000) Effect of Shiga toxin 2 on water and ion transport in human colon *in vitro*. *Dig. Dis. Sci.* 45: 480-486.
  9. Griffin PM, Olmstead LC, Petras RE (1990) *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* 99: 142-149.
  10. Griffin PM, Tauxe RV (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13: 60-98.
  11. Hall GA, Reynolds DJ, Chanter N, Morgan JH, Parsons KR, Debney TG, *et al* (1985) Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet. Microbiol.* 22: 156-163.
  12. Jacewicz MS, Acheson DW, Binion DG, West GA, Lincicome LL, Fiocchi C, *et al* (1999) Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infect. Immun.* 67: 1439-1444.
  13. Kenny B, Lai L, Finlay B, Donnenberg M (1996) EspA, a protein secreted by enteropathogenic *E. coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 20: 313-323.
  14. Lai L, Wainwright L, Stone K, Donnenberg M (1997) A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *E. coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect. Immun.* 65: 2211-2217.
  15. Lindgwood CA (1996) Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol.* 4: 147-153.
  16. Madara JL, Patapoff TW, Gillece-Gastro B, Colgan SP, Parkos CA, Delp C, *et al* (1993). 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J. Clin. Invest.* 91: 2320-2325.
  17. Martin F, Fernández Miyakawa M, Zotta E, Silberstein C, Ibarra C (2000) Efecto del LPS sobre la acción citotóxica de la toxina Shiga en colon de rata. XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina. *Medicina* vol 60, Nro 5/2, p 803.
  18. McDaniel T, Jarvis K, Donnenberg M, Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1664-1668.
  19. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, *et al* (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *I. J. Food Microbiol.* 96: 189-198.
  20. Mercado EC, Gioffre A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, Elizondo AM, *et al* (2004) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J. Vet. Med.* 51: 82-88.
  21. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, *et al* (2000) Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 757-762.
  22. Philips AD, Navabpour S, Hicks S, Dougan G, Willis T, Frankel G (2000) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* 47: 377-381.
  23. Philpott DJ, McKay DM, Mak W, Perdue MH, Sherman PM (1998). Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infect. Immun.* 66: 1680-1686.
  24. Pistone Creydt V, Martín F, Fernández Miyakawa M, Zotta E, Silberstein C, Ibarra C (2004) Shiga toxin 2 B subunit inhibits net fluid absorption in human colon and elicits fluid accumulation in rat colon loops. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37: 799-808.
  25. Rivas M, Balbi L, Milliwebsky E, García B, Tous M, Leardini N, *et al* (1998) Síndrome urémico hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: Su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Medicina* 58: 1-7.
  26. Sandhu KS, Gyles CL (2002) Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves. *Can. J. Vet. Res.* 66: 65-72.
  27. Schmidt H, Beutin L, Karch N (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63: 1055-61.
  28. Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, Mori T, Sato N, Horie H, *et al* (1998) Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int.* 53: 1681-1688.
  29. Thorpe CM, Hurley BP, Lincicome LL, Jacewicz MS, Keusch GT, Acheson DWK (1999) Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 67: 5985-5993.
  30. Viswanathan VK, Koutsouris A, Lukic S, Pilkinton M, Simonovic I, Simonovic M, *et al* (2004) Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. *Infect. Immun.* 72: 3218-3227.