

La patogenia involucrada en las enfermedades diarreicas ocasionadas por ECET y ECEP

Raúl Garza-Velasco* y Ma. Begoña Guzmán-Solano*

*Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

INTRODUCCIÓN

En México, los padecimientos intestinales de origen infeccioso representan la segunda causa de enfermedad -superados únicamente por los de las vías respiratorias- y ocupan el catorceavo lugar entre los diversos motivos de defunción. Es decir, su importancia es definitiva desde el punto de vista socio-económico, ya que se trata de patologías que provocan la pérdida de numerosas horas-hombre, debido a que uno de sus principales síntomas, la diarrea, llega a resultar temporalmente discapacitante, e inclusive, genera al Estado la necesidad de prestar servicios médicos relativamente costosos a los individuos afectados (1).

Por lo que se refiere a la población infantil, dichas enfermedades se consideran aún más trascendentales, ya que ascienden al segundo sitio en cuanto a incidencia -se registran entre 5 y 18 episodios anuales en cada menor de 5 años- y ocupan la cuarta causa de mortalidad, independientemente de que también impactan en forma negativa al sector productivo, pues es común que los padres se vean obligados a interrumpir sus labores para cuidar de sus hijos durante los lapsos de mayor severidad (2).

Adicionalmente, es muy común que el 30 al 50 % de los turistas provenientes del primer mundo padezcan la denominada “diarrea del viajero” y/o algunas otras afecciones entéricas, debido a la ingestión de agua, bebidas y alimentos contaminados.

En tal contexto, los agentes causales del síndrome diarreico incluyen numerosos virus, bacterias y protozoarios, si bien sobresalen los *Rotavirus*, *Adenovirus*, virus de Norwalk, ECET, ECEP, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio sp*, *Campylobacter jejuni*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. En este sentido, un estudio relativamente reciente, realizado en nuestro país por la Organización Mundial de la Salud (OMS), propuso que, de acuerdo con su frecuencia, los principales agentes etiológicos de origen bacteriano son ECET, ECEP y *Shigella*, ya que sus cifras individuales fueron calculadas en 17, 10 y 11 %, respectivamente, para una suma total del 38 %¹ (3).

Por otra parte, aunque el estudio de la patogenia y los mecanismos de patogenicidad resulta por sí mismo muy interesante, lo cierto es que las investigaciones implicadas tienen una meta aún más trascendental: establecer mejores estrategias para prevenir y/o tratar las principales enfermedades infecciosas, e inclusive, diseñar nuevas pruebas que le aporten una mayor celeridad y confiabilidad al diagnóstico de laboratorio.

De acuerdo con todo lo antes comentado, el presente trabajo describe precisamente los más destacados factores de virulencia de ECET y ECEP y, en una segunda parte, publicada en el siguiente número de *Infectología*, se abordarán las mismas temáticas asociadas a *Shigella*. Incuestionablemente, el conocimiento de las funciones de esta clase de moléculas sustentará las futuras medidas preventivas, diagnósticas y terapéuticas, con las cuales se combatirán las enfermedades entéricas.

¹ En ese mismo estudio se estimó una frecuencia de 13 % para los *Rotavirus*; las cifras individuales asociadas al resto de los microorganismos detectados fluctuaron entre 0.7 y 5 %.

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)**

Importancia clínica

Los padecimientos entéricos debidos a ECET son muy frecuentes: previo período de incubación de 12 h a 2 días, este agente causal provoca diarreas acuosas muy voluminosas sin sangre ni material purulento, que en las zonas endémicas afectan principalmente a la población infantil² y a los turistas procedentes de países desarrollados³; evidentemente, la fiebre y el vómito son raros y las evacuaciones pueden ser moderadas o tan severas como cuando se trata del cólera (2).

Por lo regular, los estudios epidemiológicos coinciden en establecer que el agua y los alimentos contaminados representan el principal vehículo de ECET, e inclusive, que 10^8 UFC del microorganismo -suspendidas en amortiguador- son suficientes para reproducir la enfermedad diarreica en voluntarios humanos. En este sentido, las medidas de prevención propuestas a los países en vías de desarrollo incluyen la apropiada sanitación del agua y los alimentos, sobre todo en los meses de mayor calor y/o humedad, cuando se ha comprobado que el microorganismo se reproduce más eficazmente (2).

Por otra parte, aunque la administración de antibióticos eficaces reduce relativamente la duración de la diarrea y la excreción de ECET, dichos antimicrobianos no suelen conseguirse en las áreas rurales endémicas⁴; por tal motivo, la oportuna y debida hidratación resulta

² ECET incide principalmente en los niños de algunas semanas a los 5 años de edad, pero su prevalencia es mayor entre 0 y 3 años; los habitantes adultos de las zonas endémicas suelen desarrollar inmunidad.

³ Las cepas de ECET se relacionan generalmente con dos síndromes clínicos: las diarreas deshidratantes que inciden en la población infantil de los países subdesarrollados y la “diarrea del turista”.

⁴ Actualmente, los antibióticos más recomendados son las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina u ofloxacina).

imprescindible -sobre todo para los infantes afectados-, y conviene acompañarla con dosis orales de subsalicilato de bismuto (1).

Cabe subrayar que la trascendencia de ECET es ampliamente reconocida a nivel mundial: hoy en día, diversas vacunas se encuentran en proceso de prueba y los viajeros provenientes de países desarrollados suelen llegar aleccionados a las zonas endémicas. Consecuentemente, no es raro que, como medida preventiva, los turistas se autoadministren una sola dosis diaria de doxiciclina, TMP-SMZ o norfloxacin -a partir de las 24 h anteriores a su visita y hasta el día de regreso a sus regiones de origen-, e inclusive, que eviten la ingestión de agua o alimentos sospechosos e ingieran cuatro dosis diarias de subsalicilato de bismuto (1).

Factores de virulencia

ECET elabora diversos factores de virulencia, entre los que destacan sus enterotoxinas y adhesinas, codificadas todas ellas por uno o más plásmidos no conjugativos.

Toxinas termolábiles (LT). Invariablemente, cada vez que se trata el tema de la toxina LT resulta ineludible apuntar que ésta manifiesta una muy estrecha relación con el colerágeno (CT o toxina del cólera), desde la perspectiva de su estructura y función: ambas presentan una secuencia de aminoácidos 80 % idéntica, comparten a su receptor primario en las células del hospedero y sus actividades enzimáticas son prácticamente iguales, si bien la CT resulta aún más virulenta. La LT presenta los serogrupos LT-I y LT-II, de los cuales sólo el primero predomina en los humanos y se encuentra constituido por una subunidad A y cinco subunidades idénticas B, pentámero capaz de enlazarse firmemente al gangliósido G_{M1} (su receptor primario) y a otras glicoproteínas intestinales. Además, tal como ocurre en otras exotoxinas A-B, la subunidad A es la responsable de la actividad enzimática (2, 5).

Una vez que la subunidad B de la LT se une a su receptor primario, la subunidad A penetra en la célula hospedera y es escindida proteolíticamente en los péptidos A₁ y A₂, el primero de los cuales provoca la activación permanente de la adenilato-ciclasa, localizada en la membrana basolateral de las células intestinales; bajo tales condiciones, ocurren la fosforilación supranormal de los canales de cloruro ubicados en las membranas apicales de las células epiteliales y, secuencialmente, la hipersecreción del ion Cl⁻ y la inhibición en la absorción de Na⁺, fenómenos que generan la pérdida de agua por parte de las células intestinales (2, 5).

Aunque el incremento en los niveles intracelulares de AMPc y la consecuente pérdida de Cl⁻ representan los dos eventos que explican el clásico mecanismo de acción de la LT y la CT, la respuesta secretoria del hospedero también se debe a procesos tales como los siguientes (2, 5):

- La promoción del transporte electrolítico y la movilidad intestinal, como resultado de la liberación de prostaglandinas PGE1 y PGE2 -por parte de las células cebadas-.
- La desregulación de la movilidad intestinal y de la secreción iónica.
- La liberación de interleucina 6 (IL-6), ante una eventual respuesta inflamatoria disparada por la LT.
- La disminución en la absorción de fluidos y electrolitos a partir del lumen intestinal, por influencia de la TL.

Toxinas termoestables (ST). Las toxinas termoestables son de origen plasmídico y eventualmente transposónico, pequeñas, no inmunogénicas y monoméricas; a la fecha sólo se han detectado dos clases de ellas: STa y STb, que difieren en cuanto a estructura y mecanismo de acción (6).

El receptor natural de la STa es la enzima guanilato-ciclasa C (GCC), localizada en la membrana apical de las células epiteliales del intestino, y la unión de ambas da lugar a severas diarreas⁵, al dispararse la elevación de los niveles intracelulares de GMPc, la hipersecreción de Cl^- -al activarse el canal de dicho ión (conocido como CFTR)- y/o la inhibición de la absorción de Na^+Cl^- (3).

Cabe destacar que, contra lo que generalmente se piensa, los cuadros entéricos debidos a ECET incluyen mayoritariamente cepas productoras de ST (éstos llegan a alcanzar el 30 % del total); además, la STa actúa mucho más rápido que la LT, ya que ésta requiere de hasta 60 minutos para translocarse y activar a la adenilato-ciclasa (5).

Por último, en referencia a la STb, ésta se asocia principalmente a cepas de ECET provenientes de porcinos y, a diferencia de la STa, aquélla provoca la pérdida de células epiteliales vellosas y estimula la liberación de HCO_3^- en las células intestinales (1).

Adhesinas. Antes de ocasionar diarrea, ECET debe adherirse a la mucosa del intestino delgado, concretamente a los enterocitos, a través de sus numerosas fimbrias (*pili*) superficiales; de esta manera, evita ser eliminada por el moco y los movimientos peristálticos. Algunas fimbrias de este microorganismo evidencian cierta especificidad hacia su especie hospedera: las cepas que expresan *pili* K99 suelen ser patógenas para vacunos, corderos y cerdos, las que poseen K88 sólo lo son para los cerdos y, en cuanto a las cepas de origen humano, éstas presentan sus propios arreglos fimbriales, conocidos como CFAs (por *colonization factor antigen*), y conformados -a su vez- por distintos componentes antigénicos

⁵ Es oportuno recordar que la hormona guanilina funge como el estimulador endógeno de la GCC y que su papel es el de recuperar la homeostasia del intestino, lo cual resulta totalmente contrario en presencia de la STa.

denominados CS (por *coli surface antigens*). Con base en sus características morfológicas, los CFAs se subdividen de la siguiente manera (4, 6):

- Fimbrias o filamentos rígidos, tales como el CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS14, CS17 y CS19, que se integran por una proteína única, ensamblada en forma helicoidal.
- Fibrillas o paquetes de hilos flexibles.
- Filamentos individuales finos y flexibles.
- Proteínas superficiales no fimbriales.

Es importante destacar que los estudios epidemiológicos sugieren que, a nivel mundial, el 75 % de las cepas expresa la CFA/I, CFA/II o CFA/IV, u otra fimbria de reciente descubrimiento, denominada *Longus*. La detección de dichos factores de virulencia suele realizarse mediante técnicas inmunológicas tales como aglutinación en placa, inmunodifusión, inmunoblotting y ELISA (por *enzyme-linked immunosorbent assay*), o bien, a través de métodos moleculares, incluidas la hibridación con sondas marcadas y la PCR (por *polymerase chain reaction*) (2, 4).

***Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)**

Importancia clínica

Este microorganismo suele definirse como aquella categoría de *E. coli* que no sintetiza toxinas LT, ST o de Shiga y genera una histopatología característica, asociada a la “adherencia y efusión” (A/E, por *adherence and effacing*) del agente causal sobre la membrana de las células eucariotes implicadas. La infección por ECEP ocasiona síntomas tales como fiebre moderada, malestar, vómito y diarrea; esta última se clasifica como persistente –ya que suele durar más

de 14 días-, se atribuye a la lesión tisular A/E y se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas sin sangre ni moco. El cuadro clínico aparece después de un período de incubación de 4 a 12 h en voluntarios adultos sugiriendo, durante la infección, la participación de una gran variedad de mediadores intracelulares del transporte electrolítico (2, 7).

Por lo general, se trata de una infección autolimitada, que requiere de rehidratación constante sin la administración de antibióticos; sin embargo, cuando existe la necesidad de emplear algún antimicrobiano, el trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) suele ser el agente de primera elección; otras alternativas terapéuticas incluyen el empleo de la colistina y la gentamicina oral, cuya administración debe sujetarse a una estricta vigilancia médica, debido a sus severos efectos secundarios (5).

La edad representa el factor predisponente más notable en la gran incidencia de este microorganismo; los padecimientos debidos a ECEP afectan de manera primaria a los infantes menores de 2 años, si bien su relevancia es aún mayor en los menores de 6 meses. A partir de los 2 años, su aislamiento es muy común a partir de individuos sanos y enfermos (2, 3).

Factores de virulencia

A la fecha, continúa considerándose que el rasgo más destacado de las enfermedades intestinales debidas a ECEP, consiste en un signo histopatológico que se puede apreciar en las biopsias intestinales de los humanos o los animales infectados y que, adicionalmente, resulta reproducible a plenitud en ciertos cultivos celulares. Dicho fenotipo es denominado A/E y se origina cuando la bacteria se posa sobre la superficie celular del epitelio implicado, provocando que la membrana eucariote experimente notables modificaciones, que incluyen la acumulación de actina polimerizada, α -actinina, miosina, talina y serrina; de esta manera,

ECEP aparenta asentarse sobre estructuras semejantes a pedestales que, como si se tratara de pseudópodos, se extienden más de 10 μm hacia fuera de las células epiteliales (8).

Los mencionados pedestales son el resultado de un proceso muy dinámico, durante el cual aquéllos suelen tornarse curvos u ondulados desde su punto de anclaje a la superficie celular. Por su parte, el término “efusión” deriva del hecho de que cada bacteria involucrada se desplaza a lo largo de la superficie epitelial (y sobre los cultivos celulares), a velocidades aproximadas de 0.1 $\mu\text{m}/\text{seg}$, merced a la polimerización de la actina ubicada en la base del pedestal. Cabe señalar que si bien aún no se ha podido establecer con claridad el papel de las lesiones A/E, existe un consenso generalizado acerca de que dicho modelo representa gran parte del mecanismo asociado al origen de las enteropatías ocasionadas por ECEP (2).

Fimbrias BFP. Entre 1979 y 1983, Cravioto y Baldini reportaron un peculiar modelo de adhesión de ECEP en células HEp-2⁶, al que se asignó el nombre de “adherencia localizada”, concluyéndose que el genotipo involucrado residía en un plásmido de 60 Mda: su pérdida o inserción en las cepas estudiadas correlacionaban respectivamente con la ausencia o presencia de dicho modelo; en consecuencia, dicho plásmido recibió el nombre de EAF (por *EPEC adherence factor*) (7).

En la “adherencia localizada” se observan microcolonias tridimensionales de ECEP, ubicadas en zonas particulares de la célula eucariote; en tal sentido, desde 1991 se sabe que el producto responsable de dicho patrón de adherencia es una fimbria de 7 nm de diámetro, conocida como BFP (por *bundle-forming pilus*), ya que suele agruparse en paquetes de 50-500 nm por 15-20 μm , los cuales se retuercen y forman lazos (8).

⁶ Línea celular de carcinoma de epitelio humano.

Más recientemente, otros diversos estudios han revelado que los sueros anti-BFP reducen significativamente la “adherencia localizada” a las células HEP-2, y que el operón *Bfp* (situado en el plásmido EAF) resulta indispensable para la expresión y el ensamble de los BFPs. A este último respecto, el gen *bfpA* codifica para la subunidad principal –bundilina-, el *bfpP* para una peptidasa que procesa a la probundilina y el *bfpF* para una proteína contráctil que permite la retracción del BFP –una de cuyas finalidades es la dispersión intestinal de las bacterias- (8).

La relevancia del plásmido EAF fue confirmada por Levine, quien logró reproducir la patología en nueve de diez voluntarios humanos inoculados oralmente con una cepa EAF⁺ (2).

Otras determinantes de virulencia. La isla cromosómica de patogenicidad LEE (por *locus of enterocytes effacement*) desempeña un trascendental papel en la virulencia de ECEP, ya que codifica para la síntesis de las siguientes proteínas: **a)** una adhesina bacteriana conocida como “intimina”; **b)** el propio receptor de la intimina: Tir (por *translocated intimin receptor*); y **c)** los componentes del sistema de secreción proteica tipo III⁷ (9).

En cuanto a la intimina, ésta corresponde a una proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa, está codificada por el gen *eae* (por *E. coli attaching and effacing*)⁸ y su principal función es la de promover una adherencia más estrecha de ECEP a las células epiteliales, mediante su unión a las integrinas $\beta 1$ ⁹ o a la proteína receptora Tir (9, 10).

⁷ El sistema de secreción proteica tipo III caracteriza a las bacterias Gram negativas; su función es la de exportar factores de virulencia, a través de un canal integrado por diversas proteínas bacterianas.

⁸ El gen *eae* representa una constante en casi todas las cepas de ECEP, ECEH, *C. rodentium* y *H. alvei*, las cuales por ello comparten la capacidad para originar lesiones A/E.

⁹ Las integrinas $\beta 1$ son sustancias presentes en las células intestinales que funcionan como receptores de las intiminas de diversas bacterias patógenas; sin embargo, sólo se encuentran ubicadas en la parte posterior de dichas células, por lo que el agente etiológico está obligado a atravesar la mucosa para poder interactuar con ellas.

Aparentemente, la intimina podría desempeñar un importante papel en la inducción de inmunidad protectora contra el microorganismo, ya que se han encontrado elevadas concentraciones de anticuerpos (Acs) de la clase IgAs en la leche materna de numerosas mujeres que habitan en pequeñas poblaciones mexicanas (2).

Por lo que se refiere a la proteína Tir, es claro que su descubrimiento representa uno de los hallazgos más destacados acerca de la evolución bacteriana, pues demuestra que ECEP puede elaborar su propio receptor y transferirlo a la membrana de la célula hospedera “blanco”: previa adhesión del microorganismo a la célula eucariote –mediada por los BFPs-, aquél promueve la translocación de la Tir -desde su propio citoplasma hasta la superficie “blanco”, lo cual le capacita para concretar una adherencia más sólida e inducir la generación de señales de transducción en las células infectadas. A este respecto, cabe subrayar que, merced a dichas señales, se generan los siguientes fenómenos (11, 12, 13, 14, 15, 16):

- El incremento en los niveles de calcio intracelular, que acompaña a los cambios del citoesqueleto destinados a formar los pedestales. Ello podría relacionarse con la inhibición de la absorción intestinal de Na^+ y con la secreción de Cl^- por parte de los enterocitos, -lo que contribuiría a la generación de la diarrea-.
- La fosforilación de los residuos de serina, treonina y tirosina en varias proteínas de las células epiteliales, incluida la cadena ligera de miosina. Ello conduce a la generación de canales de Cl^- y al aumento de la permeabilidad al Na^+ -modificándose la secreción intestinal de agua y electrolitos-, pero también a la alteración de las uniones célula-célula (lo que potencia los mecanismos diarreagénicos).

- La reducción de la resistencia transepitelial de las capas que recubren las células de la mucosa, lo cual también afecta el transporte de electrolitos.
- La expresión de IL-8, quimiotáctica para leucocitos polimorfonucleares (PMNs). En tal contexto, estos últimos cruzan la monocapa epitelial y provocan el aumento de la permeabilidad paracelular y la estimulación de los canales de Cl^- .

Finalmente, con respecto al sistema de secreción proteica del tipo III, diversos trabajos han demostrado que aquél se encuentra integrado por alrededor de veinte proteínas (situadas en las membranas bacterianas externa e interna) y que se dispara hasta que el patógeno entra en contacto con su tejido “blanco”. Las moléculas del sistema de secreción tipo III de ECEP se encuentran codificadas por cuatro operones localizados en el LEE y una de sus principales funciones consiste precisamente en exportar a la Tir. De hecho, el operón LEE4 controla la síntesis de ciertas proteínas Esp (por *EPEC secreted proteins*), de las cuales EspA y EspD forman un puente de unión ECEP–célula hospedera para transportar a la Tir (10, 17, 18).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guerrant RL, Hugues JM, Lima NL, and Crane J.: Diarrhea in developed and developing countries: Magnitude, special settings, and etiologies, *Rev Infect Dis*, 1990; 12(1): S41-S50.
2. Nataro JP and Kaper JB.: Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11: 142-201.
3. Torregrosa L, Santos JI, Rodríguez RS, Velásquez L, García JA y Alpuche CM.: *Enfermedades diarreicas en el niño*; Interamericana Mc-Graw-Hill, 10a. ed.; México, D.F., 1996.
4. Gaastra W, and Svennerholm A.: Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), *Trends in Microbiology*, 1996; 4(11): 444-452.
5. Banwell JG.: Pathophysiology of diarrheal disorders, *Rev Infect Dis*, 1990; 12(1): S30-S35.
6. Qadri F, Das SK, Fauque ASG, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, and Svennerholm A.: Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli*

- isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh, *J Clin Microbiol*, 2000; 38(1): 27-31.
7. Donnenberg MS and Kaper JP.: Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1992; 60(10): 3953-3961.
 8. Knutton S, Shaw RK, Anantha RP, Donnenberg MS, and Zorgani AA.: The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal, *Mol Microbiol*, 1999; 33(3): 499-509.
 9. Agin TA and Wolf MK.: Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine, *Infect Immun*, 1997; 65(1): 320-326.
 10. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, and Finlay BB.: A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation, *EMBO J*, 1996; 15(11): 2613-2624.
 11. Abe A, de Grado M, Pfuetzner RA, Sanchez-Sanmartin C, Devinney R, Puente JL, Strynadka NC, and Finlay BB.: Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion, *Mol Microbiol*, 1999; 33(6): 1162-1175.
 12. Frankel G, Philips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, and Knutton S.: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements, *Mol Microbiol*, 1998; 30(5): 911-921.
 13. Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, Hale C, Matthews S, Dougan G, Knutton S, Connerton I, and Frankel G.: Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells, *Mol Microbiol*, 1999; 32(1): 151-158.
 14. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, and Finlay BB.: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptors for intimate adherence into mammalian cells, *Cell*, 1997; 91: 511-520.
 15. Collington GK, Booth IW, Donnenberg MS, Kaper JB, and Knutton S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes encoding secreted signaling proteins are essential for modulation of Caco-2 cell electrolyte transport, *Infect Immun*, 1998; 66(12): 6049-6053.
 16. Crane JK and Oh JS.: Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1997; 65(8): 3277-3285.
 17. Taylor KA, Luther PW, and Donnenberg MS.: Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology, *Infect Immun*, 1999; 67(1): 120-125.
 18. Warawa J, Finlay BB, and Kenny B.: Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1999; 67(10): 5538-5540.