

DETECCIÓN DE POSIBLE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATÓGENA EN EL BIVALVO *PINCTADA IMBRICATA* COMERCIALIZADO EN CUMANÁ VENEZUELA

¹ L. B. VILLALOBOS & ² L. ELGUEZABAL A.

¹ Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias. Postgrado de Biología Aplicada.

² Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná. Laboratorio de Alimentos de Humedad Intermedia.

RESUMEN: Se recolectaron entre los meses de junio de 1994 a junio 1995, 120 muestras del bivalvo directamente de los botes de pesca y 120 muestras después de ser manipulados por los expendedores a un mismo tiempo. A ambos tipos de muestra se les determinó coliformes fecales (CF) y de *E. coli*. La búsqueda de ECEP se realizó por enriquecimiento en BHI y posterior siembra por estría en placas de agar Mc Conkey y L-EMB. Las colonias identificadas como *E. coli*, fueron investigadas como posibles ECEP por serología mediante la técnica de aglutinación en lámina con antiseros polivalentes. Los valores del NMP/g de las muestras tomadas de los botes de pesca fueron las siguientes: CF ($<3 - 2 \times 10^2$), *E. coli* ($<3 - 2,2 \times 10$). El 18,2% de las cepas de *E. coli* aisladas de estas muestras fueron positivas para los antiseros de ECEP. Los valores de NMP/g de las muestras una vez manipuladas por los expendedores fueron más elevados: CF ($4 - 4,6 \times 10^2$), *E. coli* ($9 - 2,1 \times 10^2$) y el 78,6% de las cepas de *E. coli* de estas muestras fueron positivas para la prueba serológica. El elevado NMP/g de coliformes en ambos tipos de muestra, evidencia que el molusco se cosechó en aguas con una ligera contaminación fecal directa pero que la manipulación inadecuada del molusco desbullado por los expendedores aumentó claramente la peligrosidad de su consumo.

ABSTRACT: Between June 1994 to June 1995, we collected, 120 samples of oyster directly from the fishing boat and 120 samples after being handled by salesman. The MPN/g fecal coliforms (FC) and *E. coli* were investigated for two kind of samples and the same time. EPEC was assignment by enrichment in BHI and streak on L-EMB and Mac Conkey Agar, the suspicious colony were identified and were assuagement by agglutination with polyvalent antiserum. Samples from the fishing boat showed the following MPN/g: FC ($<3 - 2 \times 10^2$), *E. coli* ($<3 - 2.2 \times 10$). 18.2% of *E. coli* strains isolated were suspicious EPEC. Whereas values of MPN/g of the shucked samples for the salesman were higher: FC ($4 - 4.6 \times 10^2$), *E. coli* ($9 - 2.1 \times 10^2$) and 78.6% of the isolated strains of *E. coli* were possible EPEC. The higher MNP/g values for both samples, suggesting that this mollusk were collected in lightly fecal contaminated water and the handling increase the hazard of its consumption.

INTRODUCCIÓN

La utilización del grupo coliaerógenos como indicadores de contaminación fecal del agua y de los alimentos es una práctica establecida desde hace muchos años. La idea estaba basada en el descubrimiento de Escherich de la procedencia fecal de *Escherichia coli* (MOSSEL & MORENO, 1985).

El grupo de coliformes fecales está restringido a organismos que crecen en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y humanos. Incluye a los miembros de tres géneros de la familia *Enterobacteriaceae*; *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Debido a la evidencia de la existencia de *E. coli* patógenas, y la comprobación de la ubicuidad de *Klebsiella* es mayor de los que se suponía, algunos investigadores han sugerido que se utilice solo la enumeración de *E. coli*

como índice de contaminación fecal directa o indirectamente (FRAMPTON & RESTAINO, 1992; HITCHINS *et al.*, 1992).

Algunas cepas de *E. coli* que causan enfermedades gastrointestinales en los humanos se denominan de manera general enteropatógenas. Estas *E. coli* que causan enfermedades diarreicas son reconocidas actualmente y se agrupan en cinco categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteropatógena (ECEP) y *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg). Cada clase con sus propios serogrupos y distintos patrones de patogenicidad. La *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) que ha emergido como agente de la Colitis Hemorrágica en los humanos y de dos enfermedades severas el Síndrome Urémico Hemolítico y la Púrpura Trombocitopénica Trombótica, la cual ha sido aislada de distintos

alimentos (DOYLE *et al.*, 1997) Más recientemente se ha descrito un sexto grupo llamado *E. coli* enterogregativa difusa (ECEAD) pero sus propiedades virulentas no están esclarecidas (MATHEWSON *et al.*, 1985, 1986; BHAN *et al.*, 1989).

Los biotipos toxigénicos, invasivos y patógenos infantiles han estado implicados con alimentos y aguas como vía de transmisión (REYES & NAVARRO, 1993; PRATTS & LOVETT, 1995).

EDELMAN & LEVINE (1983), definen a *E. coli* enteropatógena como aquellos miembros de serogrupos incriminados epidemiológicamente en enfermedades diarreicas, pero no producen enterotoxinas LT (termolábiles) o ST (termorresistentes) y no son invasivas como *Shigella*. En esta definición se excluyó a la *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) que produce una verotoxina y fue descrita después (DOYLE & PADHYE, 1989).

ECEP produce una diarrea acuosa similar a la ECTEC y produce una adhesina no fimbrial llamada intimina, que media su estado final adherente. Este patógeno ha sido confirmado como agente etiológico de diarrea infantil en los países menos desarrollados y como agente causal de la llamada diarrea de los viajeros en el Norte de África y México y Santiago de Chile (LEVINE *et al.*, 1993).

El interés de la detección de *E. coli* patógenas no se ha limitado a muestras clínicas, la detección directa en muestras de alimentos cárnicos contaminados y poco cocidos, leche cruda, frutas, ensalada de vegetales, mayonesa, agua etc. (OLSVIK *et al.*, 1991; SIMANGO, 1995; NORAZAH *et al.*, 1998), han estimulado las investigaciones conducentes a establecer los posibles alimentos que pueden servir como vehículos de cepas patógenas de *E. coli* (BENNETT *et al.*, 1995; FENG, 1995; HATHCOX *et al.* 1995, ZHAO *et al.*, 1995).

La determinación de coliformes y de *E. coli* sigue siendo el indicador más utilizado para establecer las condiciones sanitarias, y su relación con la necesidad de detectar la presencia de cepas de *E. coli* patógenas se hace cada vez más importante.

El consumo de la ostra madre perla (*Pinctada imbricata*) en la ciudad de Cumaná se realiza en condiciones sanitarias potencialmente deficientes, se

consumen crudos y no son previamente depurados, por tanto se creyó de interés realizar un estudio para determinar la calidad sanitaria del producto e investigar la presencia de posibles *E. coli* enteropatógenas (ECEP) en este tipo de alimento.

MATERIALES Y METODOS

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

En el lapso comprendido entre junio de 1994 y junio de 1995, se recolectaron 72 muestras de ejemplares no manipulados del bivalvo directamente de los botes de pesca que procedían de la zona de pesca (muestras no manipuladas) de manera simultánea, igual número de muestras del bivalvo una vez que habían sido desbulladas por los expendedores tal como se venden al público, pero previendo la no adición de sal, limón o vinagre o picante (muestras manipuladas). Ambos tipos de muestras fueron transportadas asépticamente al laboratorio en bolsas con cierre hermético en contenedores con hielo para su estudio inmediato.

Las muestras en su concha fueron abiertas en condiciones de asepsia según las recomendaciones de la AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) (1992). La homogeneización de los bivalvos se realizó de acuerdo a las recomendaciones de ABEYTA *et al.* (1991).

COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli*.

La enumeración de coliformes, fecales y *E. coli* se llevo a cabo por la técnica del Número Más Probable, según las recomendaciones de la APHA (1992).

E. coli ENTEROPATÓGENA.

Enriquecimiento. Se tomaron 25 g de cada muestra y se colocaron en 222 ml de infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid), a 35°C por 2 horas. Se agitó y del sobrenadante se tomaron 5 ml y se vaciaron en 250 ml de caldo triptona fosfato doble concentración. De ambos caldos se realizaron siembras por estría en placas de agar Mac Conkey y agar Endo según LEVINE (Merck).

Se seleccionaron por lo menos 10 colonias

sospechosas de *E. coli* de las placas sembradas, por cada muestra. Se le realizaron pruebas IMViC y su identificación definitiva se realizó por el empleo de las galerías de Identificación ID 32E del sistema ATB Expression (BioMérieux, Zuos-Pharma, Caracas Venezuela).

Las colonias de *Escherichia coli* previamente aisladas e identificadas se sembraron en agar tripticasa de soya (TSA)(BBL). Se incubaron por 24 horas a 37°C y a cada una de ellas se les practicaron las pruebas de aglutinación en lámina con cada uno de los antisueros polivalentes.

El diagnóstico de *E. coli* enteropatógena se realizó utilizando antisueros polivalentes. Estos antisueros para *E. coli* son antisueros OK de *E. coli* (Denka -Seiken. Co. Ltd. Japón) por lo tanto pueden utilizarse para la aglutinación de cepas vivas o muertas por el calor. Los antisueros aglutinan los siguientes serogrupos: Polivalente 1: Incluye los serogrupos 026, 0086a, O111, O119, O127a y O128; Polivalente 2: Incluye los serogrupos O44, O55, O125, O126, O146; Polivalente 3: Incluye los serogrupos O18, O114, O142, O151, O157 y O158.

RESULTADOS

NMP COLIFORMES FIECALES Y *Escherichia coli*

Los valores promedios de la enumeración de los coliformes fecales y *E. coli* tanto para el bivalvo no manipulado como para el desbullado se muestran la Figura 1.

La variación del NMP/g de estos grupos, indica que los valores máximos para los indicadores de contaminación coliformes fecales y *E. coli* ($4,6 \times 10^2$ y $2,1 \times 10^2$ respectivamente) correspondieron a la condición de manipulado. Los valores más bajos se observaron en el bivalvo no manipulado (<3 , NMP/g respectivamente). Los muestreos realizados en los meses de febrero y marzo registraron los valores más bajos para ambos tipos de muestra. El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) para las posibles fuentes de variación (condición del desbullado y meses de la toma de las muestras)

DIAGNOSTICO DE *E. coli* ENTEROPATÓGENA

Se aislaron un total de 230 cepas identificadas como *E. coli*; de éstas, 145 aisladas de las muestras manipuladas por los expendedores, aglutinaron los antisueros 114 cepas (78,62%) con predominio del polivalente 1 (42,8%); polivalente 2 (28,6%) y 3 (7,1%).

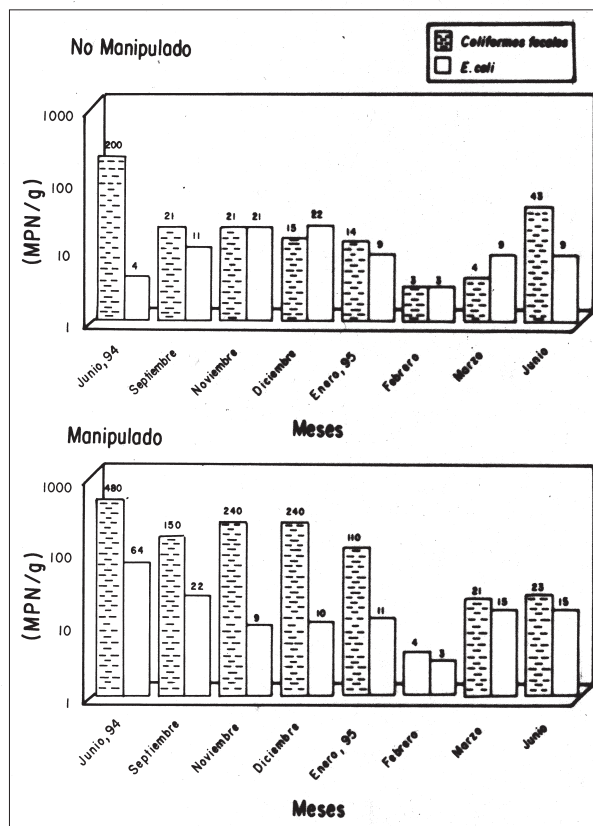


Figura 1. Número Más Probable de coliformes fecales y *E. coli* (NMP/g), en el bivalvo *Pinclada imbricata* no manipulado y manipulado. Junio 1994 junio 1995.

De las muestras no manipuladas se aislaron un total de 85 cepas de las cuales aglutinaron los antisueros 16 cepas (18,2%); equitativamente para los polivalentes 1 y 2 (Fig. 2).

DISCUSIÓN

En el proceso de alimentación normal, los moluscos bombean y filtran grandes cantidades de agua a través del cuerpo. Durante este acto concentran microorganismos, tanto inocuos como patógenos, así como otras sustancias dañinas como metales pesados o biotoxinas. El grado de concentración de las mismas

depende de las especies de moluscos, salinidad, temperatura del agua, concentración de los contaminantes en el agua y de la condición fisiológica. (FDA, 1990a).

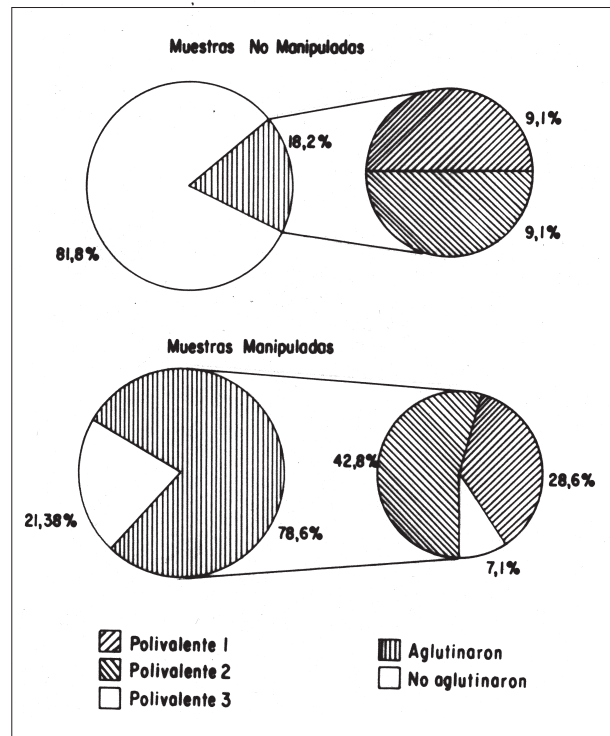


Figura 2. Resultados de la prueba de aglutinación en lámina para el diagnóstico de *Escherichia coli* Enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* no manipulado y manipulado. Junio 1994 - Junio 1995

Se ha establecido, que la decisión final si un molusco debe ser consumido o no, es, la presencia o no de organismos coliformes fecales o *E. coli* y en qué número están presentes, no sólo en las áreas de cultivo, sino en el momento de la comercialización. (FDA, 1990b).

Otros grupos bacterianos han sido propuestos como indicadores de contaminación fecal; estreptococos fecales, *Clostridium perfringens* y otros clostridios. Sin embargo, aun cuando ningún grupo indicador satisface todas las características deseadas, es recomendable emplear los análisis de coliformes fecales y *E. coli* para determinar la contaminación fecal en aguas de cultivo de moluscos y evaluar el riesgo potencial a la salud pública de los consumidores de estos productos (MARTÍNEZ-MANZANARES *et al.*, 1992; AYULO *et al.*, 1994).

Según la FDA (1990b), los moluscos no deben sobrepasar un NMP de 230/100 g para los coliformes fecales. En el presente estudio, el NMP/g de los coliformes fecales en los moluscos no manipulados presentaron en su mayoría valores por debajo del límite establecido, lo que permite inferir que el molusco está siendo cosechado en aguas con cierta contaminación fecal directa (HUNT *et al.*, 1984; KUEH & CAHN, 1985; MIESCIER *et al.*, 1992).

No necesariamente un elevado NMP de coliformes fecales y *E. coli*, es indicativo de una contaminación fecal reciente o tardía del producto, explicable en primer lugar, por la sobrevivencia de los coliformes en aguas marinas que puede sobrepasar los cinco días después de una descarga, y en segundo lugar, al hecho que entre los géneros de enterobacterias que se logra detectar con la metodología empleada, alguno de ellos son propios del medio ambiente marino (CHAI, 1983; FDA, 1991).

La variabilidad de los NMP citados en los lapsos de muestreo, se explica, pues si bien las condiciones de nutrientes, y climáticas estacionales se deben tomar en cuenta al evaluar la calidad bacteriológica de los moluscos (CHAI, 1983; KOUASSI *et al.*, 1990), es cierto también que la manipulación inadecuada del producto aumenta la peligrosidad de su consumo, por lo que es necesario determinar como rutina la presencia de patógenos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) han sido reconocidas como un muy extendido problema para la salud pública, y una causa importante de baja productividad para los países, empresas o individuos. Su ocurrencia o el temor a ellas, fundamentado o no, pueden producir daño económico enorme a la industria turística de un país o de una región. En las últimas décadas se ha observado un incremento del número y frecuencia de brotes de ETA, tanto en países industrializados como en vía de desarrollo (QUEVEDO & GONZÁLEZ, 1994).

DIAGNÓSTICO DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

Escherichia coli forma parte de la microbiota intestinal normal de los humanos y de los homeotermos. Su recuperación a partir de alimentos implica que otros organismos de origen fecal, incluyendo patógenos, pueden estar presentes. Aunque

no es el indicador perfecto, es el más utilizado hasta el presente. Hasta finales de la década del 50 fue considerada como una especie no patógena (OLSVICK *et al.*, 1991), pero actualmente se reconoce la existencia de especies patógenas que causan diferentes síntomas diarreicos (SUSSMAN, 1985; LEVINE, 1987; DOYLE & PADHYE, 1989; BAUDRY *et al.*, 1990; LEVINE *et al.*, 1993). El grupo de la *Escherichia coli* enteropatógena, induce una diarrea acuosa similar a la *Escherichia coli* enterotóxigena, pero sin la producción de enterotoxina termolábiles o termoestables, teniendo como mecanismo de patogenicidad su capacidad de adherirse a las células epiteliales de la mucosa intestinal, destruyendo el borde en cepillo de la misma y produciendo una lesión característica conocida como "attaching-effacing".

La detección tradicional de *E. coli* EPEC es realizada utilizando antisueros preparados con cepas de serogrupos patógenos además de mostrar patrones de adherencia en cultivos de células tales como Hep-2. Métodos alternativos como por pruebas de tinción de actina fluorescentes, ELISA, hibridización de ADN y PCR han sido utilizados (FRAMPTON & RESTAINO, 1993). Sin embargo, estos otros métodos no son de fácil ejecución por laboratorios de rutina, por sus costos en cuanto a material, equipos y personal entrenado. La eficacia de la serología como herramienta en el diagnóstico de *E. coli* EPEC ha sido discutida por varios autores, quienes enfatizan que este método es un excelente marcador epidemiológico, una herramienta sensible para ser usada en el diagnóstico bacteriológico, y de gran facilidad, lo cual permite la reproducibilidad de los resultados (SCALETSKY *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 1989; DÍAZ *et al.*, 1994, NORAZAH *et al.*, 1998) sobre todo en aquellos laboratorios donde no se pueden realizar las pruebas de adherencia en líneas celulares estables.

En general, se destaca el hecho que en el bivalvo desbullado el porcentaje de cepas positivas para la prueba de aglutinación en lámina fue superior y de mayor heterogeneidad (1, 2, 3) a éstas de los moluscos no manipulados (1 y 2), indicando como probable fuente de contaminación adicional para estos tipos de alimentos, las condiciones higiénicas en el manejo del producto, los utensilios, higiene personal, agua de la cocción, cadena frío, tal como lo señaló BRUNI (1997). Es decir que la manipulación tal como se realiza en las condiciones actuales sin agua potable, sistemas de refrigeración, higiene del local y del vendedor, sin

control de las zonas de pesca, incide negativamente en la calidad sanitaria del producto al aumentar la carga microbiana y por ende la presencia probable de patógenos causantes de ETA y otras enfermedades, tal como se deduce de la aglutinación del polivante 3 que ocurrió sólo en los moluscos desbullados, este polivalente contiene al grupo O157, el cual está siendo estudiado por los brotes y la gravedad de las enfermedades que produce.

La presencia de EPEC en alimentos puede ser una fuente potencial de brotes alimenticios. El entrenamiento en higiene y manipulación de alimentos para los expendedores de alimentos es necesario si se desea evitar posibles epidemias de enfermedades diarreicas producidas por patógenos de origen entérico. Sugerimos que el aislamiento y la identificación de cepas patógenas de *E. coli* en alimentos se realice rutinariamente como medida preventiva sobre todo en aquellos alimentos que se consumen crudos o con poco cocimiento.

REFERENCIAS

- ABEYTA, C., M. AROCHA, & CH. KAYSNER. 1991. Procedimiento esquemático para la identificación de *Vibrio* especies (*V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*). Modificación a la metodología descrita en B.A.M. 7th edition. *Curso interfacultades Microbiología de alimentos marinos y Análisis de Riesgo. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Central de Venezuela.*
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (APHA) 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. C. Vanderzant and D.F. Splittatoesser (ed.). Washington, D.C., U.S.A.
- AYULO, A. M. R., R. A. MACERADO, & V. M. SEUSSEL, 1994. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Innt.J.. Food Microbiol.* 24:171-178.
- BAUDRY, B., S. J. SAVARINO, P. VIAL, J. B. KAPER & M. M. LEVINE. 1990. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroagregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J.*

- Inf. Dis.* 161:1249-1251.
- BENNETT, A. R. S. MACPHEE, & R. B. BETTS. 1995. Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef. *J. Appl. Bacteriol.* 78:375-379.
- BHAN, M. K., P. RAJ, M. M. LEVINE, J. B. KAPER, N. BHANDARI, R. SRIVASTAVA, R.R. KUMAR, & S.SAZAWAL. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* 159:1061-1064
- BRUNI, O. 1997. Un estudio de la Dirección de la Higiene del Gobierno de la ciudad. Departamento de Salud y Servicios Sociales. DHHS. Publicación N° (FDA) 903-4235 s. Buenos Aires, Argentina
- CHAI, T. 1983. Characteristics of *E. coli* grown in Bay water as compared to the rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1316-1323.
- DÍAZ, C. S., R. GONZALEZ, R. CLORALT, D. PEQUENEZE, & I. PÉREZ-SCHAEL. 1994. *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) serología vs. adherencia localizada. Valor diagnóstico. Seminario Internacional sobre Enfermedades Diarreicas. Proyecto para el control de Enfermedades diarreicas. PROCED Quito- Ecuador
- DOYLE, M. & V. PADHYE. 1989. *Escherichia coli* En: *Foodborne bacterial pathogens*. M. Doyle (ed.). Marcel Dekker. New York pp:235-281.
- DOYLE, M. P., T. ZHAO, J. MENG & S. ZHAO 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Ed. M.P. DOYLE, L.R. BEUCHAT y T. J. MONTVILLE. A.S. M. Washington D.C. pp 171-191.
- EDELMAN, R. & M. M. LEVINE. 1983. Summary of a workshop on enteropathogenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 147:1108-118
- FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA) 1990a. Sanitation of Shellfish areas. National Shellfish Sanitation Program. Manual of Operations. Part 1. U.S. Dept. of Health and Human Services. Public Health Service, Food and Drug Administration. Washington D.C.
- 1990b. Sanitation in Harvesting processing and distribution of shellfish. National Sanitation Program. Manual of Operations. Part II. U.S. Dept. of Health and human services Public Health Service. Food and Drug Administration. Washington D.C.
- 1991 Microbiological and parasitic exposure and health effects. *National Academy of Sciences report on seafood safety*. Department of Health and Human Services .Washington D.C.
- FENG, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157:H7, novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg. Infect. Disea.* 1(2):47-52
- FRAMPTON, E. W. & L. RESTAINO. 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in foods. Water and clinical samples based on Beta-glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.* 74:223-233
- GÓMEZ, T. A., A. M. VIEIRA, I.K. WASCHUMUTH, P.A. BLAKE & L. TRABULSI. 1985. Correlation between adherence to HeLa cells and Serogroups, serotypes and bioserotypes of *E. coli*. *Infec. Immun.* 49: 528-553
- HATHCOX, A. K., L. R. BEUCHAT & M. P. DOYLE. 1995. Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in real mayonnaise and reduced calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(12):4172-4177.
- HITCHINS, A. D., P. A. HARTMAN, & E. C. D. TODD. 1992. Coliforms *Escherichia coli* and its toxins. En: *Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods*. Marvin L. Speck (ed.) American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A.
- HUNT, D. A., D. A. MIESCIER, J. REDMAN, A. SALINGER & J. P. LUCAS. 1984. Molluscan shellfish fresh or frozen oyster, mussels or clams. En: *Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods*. Marvin L. Speck (ed.) American Public Health Association. Washington, D.C. U.S.A.

- KOUASSI, A. M., D. GURAL & M. DOSSO. 1990 Seasonal variations of microbial contamination of an estuarine tropical lagoon urban area. The case of the city of Abidjan (Ivory Coast). *Rev. Hydrobiol. Trop.* 23:181-194.
- KUEH, C. S. & K. Y. CHAN. 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J. Appl. Bacteriol.* 59:41-47.
- LEVINE, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea. Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389.
- _____. C. FERRECCIO, V. PARDO, M. CAYAZZO, P. ABREGO, J. MARTINEZ, L. MAGGI, M. M. BALDINI, W. MARTIN, D. MANEWAL, B. KAY, L. GUERS, H. LIOR, S. S. WASSWMAN & J. P. NATARO. 1993. Epidemiologic studies of *Escherichia coli*, diarrheal infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago de Chile. *Am. J. Epidemiol.* 138 (10):849-69.
- MARTINEZ-MANZANARES, E., M. A. MORINIGO, D. CASTRO, M. C. BABELONA, M. A. MUÑOZ & J. J. BORREGO, 1992. Relationship between indicators of faecal pollution in shellfish-growing water and occurrence of human pathogenic microorganism in shellfish. *Food prot.* 55(8):609-614.
- MATHEWSON, J. J., P. C. JOHNSON, H. L. DUPONT, D. R. MORGAN, S. A. THORNTON & L. V. WOOD. 1985. A newly recognized cause of travelers diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Inf. Dis.* 151: 471-475.
- _____. P. C. JOHNSON & H. L. DUPOT. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J. Inf. Dis.* 154:524-527.
- MIESCIEP, J. J., D. A. HUNT, J. REDMAN, A. SALINGER & J. P. LUCAS. 1992. Molluscan Oysters, Mussels and Clams. En: *Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods*. C. Vanderzant and D.F. Splitsoesser (ed.) American Public Health Association. Washington, D.C. U.S.A. pp 897-918.
- MOSSEL, D. A. A. & G. MORENO 1985. *Microbiología de Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. P 135.
- NORAZAH, A., I. RAHIZAN, T. ZAINULDIN, M.Y. ROHANI, A. G. KAMEL. 1998. Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked food. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health* 29(1):91-93.
- OLSVICK, O., Y. WASTESON, A. LUND & E. HARNES. 1991. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *J. Food Microbiol* 12: 103-114
- PRATTS, G. & T. LLOVET. 1995. *Escherichia coli* enteroinvasiva. Patogenia y epidemiología. *Microbiología Sem.* 11:91-96
- QUEVEDO, F. & S. GONZALEZ AYALA. 1994. Enfermedades transmitidas por alimentos. Impacto socioeconómico. La alimentación Latinoamericana. 203:52-60
- REYES, H. & P. NAVARRO. 1993. *Diarreas Infecciosas*. Caracas. Disinlimed, C.A. Hospital Universitario. P. 318.
- SCALETSKY, I. C. A., M. L. M. SILVA, M. R. F. TOLEDO, B. R. DAVIS, P.A. BLAKE & L. R. TRABULSI. 1985. Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.* 160: 131-135.
- SIMANGO, C. 1995. Isolation of *Escherichia coli* in foods. *Centr. Afr. J. Med* 41 (6): 181-185
- SUSSMAN, M. 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease. En: *The virulence of Escherichia coli* (ED. M. Susman). Academic Press. London pp. 7-45
- ZHAO, T., M. P. DOYLE, J. SHERE & I. GARBER. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herd. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4):1290-1312.