TRABAJOS ORIGINALES

Rev. Chil. Pediatr. 58 (4); 285-290, 1987

Prevalencia de agentes enteropatógenos en síndrome diarreico agudo en niños hospitalizados y ambulatorios

Dra. Valeria Prado J.¹; Dra. M. Teresa Siri A.¹; Dr. Luis Fidel Avendaño C.²;
Dra. Stephanie Braun J.³; Dra. Eliana Marambio L.⁴; Dr. Iván Jorquera B.³;
T.M. Lucía Reyes M.¹; T.M. Juan Martínez D.¹; T.M. Nora Mamani M.¹

Prevalence of bacterial and viral pathogens among children with acute diarrhea at hospital and out patient clinics

In order to evaluate the relative importance of bacterial and viral enteropathogens associated with acute diarrhea in children (at hospital and in out patients visits) we developed an etiologic study along two summer periods. The first summer period (1983) included 102 patients with diarrhea (58 children taken from hospital wards and 44 from out patient clinics) and 66 controls. In the second summer period (1986), 161 children with diarrhea were studied (80 came from hospital and 81 from out patient clinics) together with 71 controls matched by age. In patients with diarrhea, the most prevalent agents were enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (37%), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) (21%), rotavirus (16%) and shigella (12%). In the control group EPEC, ETEC, campylobacter and rotavirus were found at significantly lower frequencies (15%, 19%, 1.5%, 0% respectively). Among patients requiring admission for their diarrheal disease, the frequency of EPEC and rotavirus was significantly higher in comparison with ambulatory patients (45 vs 26% and 24 vs 9% correspondingly).

(Key words: acute diarrhea, diarrheal disease, etiology).

La diarrea aguda es un padecimiento frecuente en lactantes y pre-escolares en áreas en desarrollo y nuestro país no escapa a esta realidad. Diferentes estudios prospectivos han determinado, que en los primeros 5 años de vida los niños que habitan en países latinoamericanos, asiáticos o africanos sufren como promedio 2 a 4 episodios de diarrea por año, observándose la mayor incidencia en los niños menores de 12 meses¹⁻⁵. En los últimos años con el respaldo de instituciones como la Organización Mundial de la Salud y UNICEF, se han desplegado muchos esfuerzos a nivel mundial para tratar de disminuir la mortalidad y morbilidad por diarrea y como resultado se han logrado avances sustanciales en determinar los agentes causales, sus mecanismos de patogenicidad y los trastornos fisiopatológicos que caracterizan al síndrome diarreico agudo. Este nuevo conocimiento ha permitido el desarrollo de vacunas contra algunos agentes enteropatóge-

nos como *E. coli* enterotoxigénicos, shigella, rotavirus⁶⁻⁸, cuya utilidad está en estudio.

Para definir las estrategias preventivas más útiles en cada comunidad es indispensable identificar la importancia relativa que tienen los diferentes agentes enteropatógenos descritos.

Nuestro interés estuvo dirigido a determinar comparativamente la prevalencia de enteropatógenos bacterianos y virales en un grupo de lactantes hospitalizados por diarrea aguda con deshidratación moderada a severa, en relación a un grupo de lactantes que acuden por diarrea aguda al consultorio y se tratan en forma ambulatoria, en un estudio prospectivo durante 2 períodos estivales, para definir cuáles agentes son responsables de los casos más severos. La presente comunicación corresponde a los resultados obtenidos durante los períodos: noviembre 1982 a marzo 1983 y noviembre 1985 a marzo 1986.

MATERIAL Y METODOS

Para los propósitos de este estudio se trabajó con la siguiente definición de diarrea: cuadro de comienzo brusco, con evacuación de 3 o más deposiciones diarias, de mayor contenido acuoso de lo normal, con o sin elementos patológicos como mucus, pus y, o, sangre; con una duración mayor de un día y menor de 7.

Se consideraron niños menores de 2 años de estrato socio-económico bajo con diarrea aguda y controles que

1. Unidad microbiología, Depto. Salud Pública, División Ciencias Médicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
2. Unidad virología, Depto. Microbiología y Parasitología, División Ciencias Médicas Norte, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
3. Becado programa especialista microbiología.
4. Instituto de Salud Pública de Chile.

no habían recibido antimicrobianos durante los 7 días previos de ingreso al estudio, en los siguientes periodos:

Verano 83: Se incluyeron 168 pacientes: 58 hospitalizados por diarrea aguda en el Hospital Luis Calvo Mackenna, 44 que consultaron por diarrea en Consultorio La Faena (Área Metropolitana Oriente) y 66 niños controles, de consulta ambulatoria.

Verano 86: Se estudiaron 232 lactantes: 80 pacientes con diarrea hospitalizados en el mismo centro asistencial, 81 que consultaron ambulatoriamente y 71 niños controles. Los controles fueron pareados por edad y estrato socio-económico y fueron seleccionados entre los niños que acudían a control de niño sano al centro de salud de La Faena y algunos²² eran niños hospitalizados por patología diferente a diarrea aguda.

Las muestras de deposiciones (1 por cada niño) fueron recolectadas del pañal de heces recién emitidas o mediante hisopado rectal, se transportaron en medio Cary Blair y se sembraron dentro de 4 a 6 horas. Según el grupo de estudio, las muestras se recolectaron el primer día de hospitalización o en el momento de consulta.

Procesamiento e identificación de enteropatógenos.

Cada muestra de deposición se sembró en agar SS, agar MacConkey, agar CampyBAP y tampón fosfato salino pH 7,2; se agregó agar sangre con ampicilina en el segundo período de estudio.

La identificación de salmonella y shigella, se efectuó de acuerdo a los criterios establecidos por Edwards y Ewing¹⁴.

La pesquisa de Yersinia enterocolitica se hizo de acuerdo a pautas establecidas por OMS¹⁵.

Para el estudio de campylobacter se utilizó agar Campy-BAP: agar Brucella base adicionado de 5% de sangre de cordero y de antibióticos como inhibidores de la flora agregada (vancomicina - trimetoprim - polimixina B - anfotericina y cefalotina). Se incubó en jarra Gas Pak sin catalizador por 48 horas a 42°C. A las colonias características, grises, brillantes, se les estudió la morfología por Gram, producción de oxidasa y catalasa. Posteriormente se observó crecimiento a temperaturas de 42°C, 37°C y 25°C, para diferenciar Campylobacter jejuni y Campylobacter coli y prueba de TTC, siguiendo recomendaciones de OMS¹⁵. La producción de betalactamasa en las cepas de campylobacter se determinó por la técnica de la cefalosporina cromógena; nitrocefina¹⁶.

Para el aislamiento de Aeromonas hydrophila se utilizó una placa de agar sangre adicionado de 5% de sangre de cordero y 15 µg/ml de ampicilina¹⁷.

La tipificación de E. coli enteropatógeno siguió la siguiente secuencia: Los serogrupos clásicos fueron identificados serológicamente con antisueros OK (Difco) 018 - 020 - 025 - 026 - 055 - 0111 - 0119 - 0125 - 0127 - 0128 - 0142, mediante reacción de aglutinación en lámina y posteriormente el serogrupo fue confirmado por el Instituto de Salud Pública (SP) de Chile, mediante titulación del antígeno somático O. Los E. coli invasores fueron identificados a partir de cepas con biotipos compatibles incapaces de decarboxilar la lisina e inmóviles en las cuales se efectuó prueba de Serény¹⁸ y, posteriormente, serotipificación con antisueros correspondientes a serogrupos invasores: 028 - 029 - 032 - 042 - 044 - 0112 - 0124 - 0136 - 0143 - 0152 - 0156 (suministrados por Dr. Luiz Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo, Brasil). En todas aquellas cepas de E. coli no pertenecientes a las 2 categorías anteriores se determinó la capacidad de producir enterotoxinas (E. coli toxigénicos) por los siguientes métodos: La detección de toxina LT se efectuó

mediante la técnica de inmunoprecipitación de Biken, descrita por Honda^{19,20}, que consiste básicamente en hacer crecer las colonias de E. coli en un medio sólido (agar Biken) adicionado de lincomicina en concentración de 90 mcg/ml y enfrentarla a un suero anti LT; empleamos un suero anti-cólera fabricado por nosotros inoculando conejos albinos con toxoide de cólera. En cada placa siempre se incluyeron como cepas controles E. coli 40T productora de toxina LT y E. coli K12 toxina LT negativa (suministradas por Dr. L. Trabulsi). Mediante este método se estudiaron 709 cepas de E. coli. Como técnica de referencia se utilizaron líneas celulares VERO y CHO en las cuales la toxina LT produce alteraciones morfológicas características^{21,22,23}. Para inocular las diferentes líneas celulares, se cultivó una colección de cepas de cada niño en medio de Evans²⁴ (1 a 7 cepas por paciente) en agitación continua durante 18 horas a 37°C y posteriormente se procedió a centrifugar a 3.500 rpm durante 30 minutos. Se obtuvieron de este modo 172 sobrenadantes de colecciones de E. coli correspondientes a igual número de pacientes que fueron mantenidos a -30°C hasta su uso; en los restantes pacientes no se aislaron cepas de E. coli diferentes a ECEP clásicos o invasores. Con estos sobrenadantes se inocularon microplacas plásticas (LIMBRO) en las cuales previamente se logró obtener monocapas de células VERO y CHO (se sembraron aproximadamente 2 x 10⁴ células por cada pocillo) inoculando 25 µl de sobrenadante de cultivo de E. coli. Los efectos sobre las células fueron observados con lecturas a las 6 y 18 h utilizando un microscopio invertido; se consideró como positivo la presencia de alteraciones morfológicas en una proporción igual o superior a 75 % de las células.

Cuando la lectura no fue concluyente se prepararon sobrenadantes por separado con cada una de las cepas incluidas en la colección; esto ocurrió con 58 colecciones, procediéndose a preparar 297 nuevos sobrenadantes con las cepas correspondientes.

En el segundo período de estudio, se investigó producción de toxina LT mediante ELISA²⁵ y paralelamente se utilizaron técnicas de ingeniería genética para identificar los genes que codifican toxina LT mediante hibridación de DNA con sondas marcadas radioactivamente, preparadas en el Centro de Desarrollo de Vacunas de la Universidad de Maryland.

La toxina ST fue detectada mediante inoculación intragástrica en ratones lactantes, según la técnica descrita originalmente por Dean²⁵, pero en este estudio se inoculó igualmente sobrenadante de una colección de cepas de cada paciente (1 a 7 cepas)²⁶. Además se utilizaron sondas genéticas con plásmidos de STh y STp.

La investigación de rotavirus se efectuó mediante la técnica de electroforesis del RNA viral en geles de poliacrilamida²⁷, en las muestras obtenidas en el verano 85-86.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la proporción comparativa con que se encontraron asociados los diferentes enteropatógenos estudiados, en casos de diarrea aguda o infecciones asintomáticas, en ambos períodos de verano.

En el grupo de niños con diarrea, los principales agentes detectados fueron E. coli enteropatógeno (ECEP) como primera frecuencia (37,3% y

Tabla 1.
Frecuencia de bacterias enteropatógenas y rotavirus aislados en lactantes
con diarrea y controles en 2 periodos de verano

Enteropatógeno	VERANO 1983					VERANO 1986				
	Grupo Diarrea		Grupo Control		P*	Grupo Diarrea		Grupo Control		P*
	n = 102		n = 66			n = 161		n = 71		
	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	
<i>E. coli</i> enteropatógeno	38	37,3	10	15,2	0,001	57	34,4	11	15,5	0,002
<i>E. coli</i> enterotoxigénico	22	21,6	13	19,7	NS	28	17,4	6	8,5	0,07
<i>E. coli</i> enteroinvasor	2	2,0	1	1,5	NS	3	1,9	1	1,4	NS
<i>Shigella</i>	13	12,7	0	—	0,002	14	8,7	0	—	0,01
<i>Campylobacter</i>	8	7,8	1	1,5	0,07	9	5,6	0	—	0,04
<i>Salmonella</i>	4	3,9	0	—	NS	1	0,6	0	—	NS
<i>Yersinia</i>	0	—	0	—		0	—	0	—	
<i>Aeromonas</i>	ni	—	ni	—		0	—	0	—	
Rotavirus ¹	ni	—	ni	—		26	16,1	2	2,8	0,004
Asociaciones	24	23,5	3	4,5	0,001	18	11,2	1	1,4	0,01
Negativo	36	35,3	44	66,7	0,00006	59	36,6	54	76,0	0,00000003

¹ Rotavirus se estudió en 144 pacientes y 71 controles en período 86.

ni = no investigado.

* χ^2

Tabla 2.
Importancia relativa de agentes enteropatógenos bacterianos y virales
en lactantes con diarrea aguda, a nivel hospitalario y ambulatorio

Enteropatógeno	VERANO 83					VERANO 86				
	Hospital		Consultorio		P	Hospital		Consultorio		P
	n = 58		n = 44			n = 80		n = 81		
	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	
<i>E. coli</i> enteropatógeno	28	48,3	10	22,7	0,008	36	45,0	21	25,9	0,01
<i>E. coli</i> enterotoxigénico	12	20,7	10	22,7	NS	19	23,8	9	11,1	0,01
<i>E. coli</i> enteroinvasor	1	1,7	1	2,3	NS	2	2,5	1	1,2	NS
<i>Shigella</i>	11	19,0	2	4,5	0,03	6	7,5	8	9,9	NS
<i>Campylobacter</i>	3	5,2	5	11,4	NS	3	3,7	6	7,4	NS
<i>Salmonella</i>	3	5,2	1	2,3	NS	1	1,2	0	0	
<i>Yersinia</i>	0	0	0	0		0	0	0	0	
<i>Aeromonas</i>	ni	—	ni	—		0	0	0	0	
Rotavirus ¹	ni	—	ni	—		19	23,7	7	8,6	0,009
Negativo	14	24,1	22	50	0,006	17	21,3	42	51,8	0,00006

ni = no investigado.

¹ = Rotavirus se investigó en 79 pacientes hospitalizados y 65 que consultaron en forma ambulatoria.

35,4%), luego *E. coli* enterotoxigénico (ECET), 21,6% y 17,4%, enseguida rotavirus (16,1%) y shigella (12,7 y 8,7%).

En el grupo control se aislaron ECEP, ECET, ECEI, campylobacter y rotavirus, resultando significativamente inferior la frecuencia de ECEP, shigella y rotavirus; respecto a ECET y campylobacter se observó diferencia sólo en el período de verano 86 en el cual el número de pacientes estudiados fue superior. No se observaron diferencias en la frecuencia de aislamiento de ECEI y salmonella en ambos períodos (mediante prueba

de χ^2). No se aisló ninguna cepa de yersinia ni aeromonas.

La diferencia en la frecuencia de recuperación de varios enteropatógenos investigados entre niños con diarrea y asintomáticos fue altamente significativa.

En la tabla 2 se analiza la importancia relativa de los agentes enteropatógenos estudiados en los pacientes con diarrea de diferente grado de severidad. En el grupo de niños que necesitaron hospitalización los principales agentes identificados en los 2 períodos de estudio fueron *E. coli*

enteropatógeno, *E. coli enterotoxigénico*, *Shigella* y *Rotavirus*: en este grupo de pacientes fue posible identificar uno o más de los agentes investigados en el 76% o 79% de los casos, lo cual resultó significativamente superior a lo observado en el grupo que se atendió en Consultorio.

En los pacientes ambulatorios se logró identificar algún agente enteropatógeno en el 50% de los casos, siendo los principales agentes detectados *E. coli enteropatógeno*, *E. coli enterotoxigénico*, *shigella* y *campylobacter*. Este último ocupó el segundo lugar en el período de verano 83 y fue desplazado por *shigella* al tercer lugar en el verano 86. En ambos periodos *campylobacter* mantuvo una frecuencia relativa de aislamiento superior en el grupo de niños ambulatorios sin alcanzar sin embargo significación estadística. En este grupo de niños la frecuencia de ECEP, rotavirus, *shigella* (año 83) y ECET (año 86) fueron estadísticamente inferiores.

Al analizar la incidencia de los principales agentes asociados a diarrea por grupos de edad, (tabla 3) se observó que las infecciones por *E. coli enteropatógeno* tienen un impacto mayor en lactantes menores de 6 meses ($p < 0.0001$). *E. coli enterotoxigénico* y rotavirus afectan en mayor proporción a niños mayores de 6 meses, no alcanzando valores significativos. Las infecciones por *shigella* y *campylobacter* en cambio, aumentan su frecuencia en lactantes mayores de 6 meses en forma significativa ($p = 0.03$ y 0.059 respectivamente) según prueba de análisis de diferencia entre proporciones (Z).

COMENTARIOS

Si bien nuestro estudio no refleja la participación relativa de agentes enteropatógenos bacterianos y de rotavirus en todos los casos de diarrea que se producen en lactantes de los estratos más pobres en nuestro medio, ya que muchos cuadros diarreicos son tratados por la madre en la casa sin

llegar a consultar, la información obtenida nos muestra cuáles son los principales agentes que se asocian a los cuadros de diarrea que motivan a la madre a solicitar ayuda médica. En este grupo seleccionado de pacientes, 4 son los agentes de mayor importancia epidemiológica: *E. coli enteropatógeno*, *E. coli toxigénico*, rotavirus y *shigella* (tabla 1).

Estos resultados difieren sustancialmente de lo observado en países industrializados, en los cuales rotavirus tiene una incidencia mucho más elevada, con porcentajes de 35% en consultas privadas y 47% en lactantes hospitalizados y las bacterias enteropatógenas se aíslan sólo en un 2% en ambos grupos de pacientes²⁷. Esto indicaría que la frecuencia de infecciones entéricas bacterianas se correlaciona en forma inversa con el nivel de vida y las condiciones de saneamiento básico.

La significativa recuperación de uno o más de los agentes investigados en los pacientes con diarrea en forma categórica que en nuestro medio la diarrea aguda infantil es de origen infeccioso.

En estudios efectuados en otros países del tercer mundo como Bangladesh, con condiciones ambientales quizás peores que las nuestras, *E. coli enterotoxigénico*, *shigella* y rotavirus fueron los agentes que se asociaron al 70% de los episodios de diarrea con deshidratación²⁸; lamentablemente en ese estudio no se incluyó la identificación de *E. coli enteropatógeno*.

En los niños asintomáticos se aislaron predominantemente *E. coli enteropatógeno*, pero como lo hemos analizado en publicaciones anteriores, los serogrupos son diferentes y la frecuencia es significativamente inferior.²⁹ Llama la atención que la frecuencia de *E. coli enterotoxigénico* fue igual en niños con diarrea y en controles en el verano 83 y diferente en el período 86. En un estudio en que se caracterizaron las cepas toxigénicas, observamos que existe un amplio predominio de cepas que pro-

Tabla 3.
Incidencia por grupo etario de los principales enteropatógenos
asociados a diarrea aguda

Edad meses	Nº1	EPEC		ETEC		SHIGELLA		Campylobacter		ROTAVIRUS		
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº1	Nº	%
<6	91	52	57,1	15	16,5	5	5,5	3	3,3	43	5	11,6
6 - 12	94	32	34	22	23,4	11	11,7	6	6,4	60	18	30
12 - 24	72	11	15,3	11	15,3	10	13,8	8	11,1	38	3	7,9
>24	6	0	-	2	-	1	-	0	-	3	0	-
Total	263	95	-	50	-	27	-	17	-	144	26	-

Nº 1 = Nº de pacientes estudiados en cada grupo etario.

ducen enterotoxina termoestable (ST) exclusivamente, expresan Factor de Colonización I (CFAI) y pertenecen al serotipo 0153: H6³⁰; esto estaría indicando que habría una cepa endémica predominante en nuestro ambiente, la cual a través de infecciones repetidas podría inducir una inmunidad parcial. Se requieren otras investigaciones para poder entender mejor la epidemiología de las infecciones por *E. coli* enterotoxigénico en nuestros lactantes. Respecto a los *E. coli* enteroinvasores tienen baja incidencia en la diarrea aguda y también se asociaron a infecciones asintomáticas. La frecuencia de shigella, campylobacter y rotavirus en lactantes asintomáticos fue significativamente inferior a los niños con diarrea.

Al analizar separadamente los agentes identificados en niños hospitalizados, respecto de aquellos atendidos ambulatoriamente (tabla 2) vemos que en el último grupo se aislaron enteropatógenos en menor proporción y que los agentes más importantes en los 2 niveles son *E. coli* enteropatógeno y *E. coli* enterotoxigénico.

En los dos períodos de estudio, campylobacter se asoció con relativa mayor frecuencia a casos ambulatorios que a casos severos. Con shigella se observó una situación inversa en el primer período de verano, pero en el segundo período la frecuencia fue similar en ambos grupos, reflejando creemos, fluctuaciones en la epidemiología de la shigellosis, ya que desde el punto de vista metodológico en ambos períodos participó el mismo equipo de investigadores y se utilizaron las mismas técnicas de laboratorio. En relación a rotavirus su importancia resultó mayor en los casos severos que en cuadros leves que no requieren hospitalización, coincidiendo con observaciones de otros investigadores.³² Llama la atención el relativo alto porcentaje de aislamiento en niños hospitalizados en verano, en circunstancias que la diarrea por rotavirus es típicamente de invierno. Este hecho se ha encontrado en otros estudios en Chile²⁷

No se aisló en ningún paciente cepas de *Yersinia enterocolitica* ni *Aeromonas hydrophila*.

Una información de interés que aporta el análisis de estos resultados es la incidencia relativa de los agentes enteropatógenos estudiados por distintos grupos de edad, se observó un cierto patrón en el sentido que las infecciones más precoces serían por *E. coli* enteropatógeno, después de los 6 meses cobran mayor importancia rotavirus, shigella y campylobacter. Sin embargo este patrón observado necesitará ser confirmado, mediante estudios prospectivos de cohortes, ya que este aspecto es primordial que sea claramente establecido para planificar medidas de control específicas como vacunas.

En conclusión, nuestras observaciones han mostrado que en nuestro medio 5 serían los agentes que tienen participación más importante en los casos de diarrea aguda que requieren atención médica y ellos son: *E. coli* enteropatógeno, *E. coli* enterotoxigénico, shigella, campylobacter y rotavirus. Será necesario definir mejor, en futuros estudios, la importancia de *E. coli* enterotoxigénico. En base a estos antecedentes para disminuir la incidencia de diarrea aguda en lactantes, dentro del conjunto de otras estrategias debería darse prioridad cuando estén disponibles, a vacunas que otorguen protección frente a estos agentes.

RESUMEN

Para conocer importancia relativa de agentes enteropatógenos bacterianos y virales en niños con diarrea aguda que necesitan atención médica de nivel primario o secundario, se efectuó un estudio etiológico durante 2 períodos de verano. Primer período, verano 1983, 102 pacientes que cumplían con definición pre establecida de diarrea aguda (58 de hospital, 44 de consultorio) y 66 controles; segundo período, verano 86 se estudiaron 161 pacientes con diarrea (80 hospitalizados, 81 ambulatorios) y 71 controles pareados por edad. En el grupo con diarrea los principales agentes detectados fueron *E. coli* enteropatógeno (ECEP) (37%), *E. coli* enterotoxigénico (ECET) (21%), rotavirus (16%) shigella (12%). En el grupo control se aislaron ECEP, ECET, campylobacter y rotavirus; la frecuencia de ECEP, shigella y rotavirus fue significativamente inferior. En los pacientes hospitalizados por diarrea, con respecto a los ambulatorios la prevalencia de ECEP y rotavirus en hospitalizados fue significativamente superior. Hubo mayor tendencia al aislamiento más frecuente de campylobacter en los pacientes ambulatorios.

AGRADECIMIENTOS

Estos estudios han sido financiados con fondos de OMS/OPS Grant CDD Programme 107 CHI2 y del Departamento de Investigación y Biblioteca de la Universidad de Chile (DIB) Proyecto N° M2104-8623.

Agradecemos la asesoría técnica de la Dra. Karen D'Ottone y T.M. Sra. Nancy Rivera F., del Instituto de Salud Pública, por la confirmación de la serotipificación de *E. coli* y al Dr. Myron Levine, Director del Centro de Desarrollo de Vacunas de la Universidad de Maryland U.S.A., la confirmación de *E. coli* enteropatógenos y *E. coli* enterotoxigénicos. A la Dra. Catherine Ferreccio, académico de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, debemos agradecer el análisis estadístico de los resultados.

REFERENCIAS

1. Snyder, J.D., Merson, M.H.: The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull WHO* 40: 65, 1982.
2. Mata, L.J.: The children of Santa María Cauqué: a prospective field study of health and growth. Cambridge, Man MIT Press 1978.
3. Newell, K.W.: Diarrheal disease of infancy in Cali Colombia: study design and summary report on isolated disease agents. *Bull of PAHO* 10: 143, 1976.
4. Lie, K.J.: Diarrhoea among infants in a crowded area of Djakarta, Indonesia: a longitudinal study from birth to two-years. *Bull WHO* 34: 197, 1966.
5. Black, R.E., Brown, K.H., Becker, S. et al: Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh II. Incidence and etiology of diarrhea. *Am J Epidemiol* 115: 315, 1982.
6. Levine, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E. et al: New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* 47: 510, 1983.
7. Klipstein, R.A., Engert, R.F., Clements, J.D. et al: Vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* based on synthetic heat-stable toxin cross-linked to the B sub unit of heat labile toxin. *J Infect Dis* 147: 318, 1983.
8. Evans, D.G., Graham, D.Y., Evans, D.G., Jr.: Administration of purified colonization factor antigens (CFAI, CFAll) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. *Gastroenterology* 87: 934, 1984.
9. Schmidt, M., Kelly, E.P., Tseng, L.Y. et al: Towards an oral *E. coli* piles vaccine for travelers' diarrhea: susceptibility of purified colonization factor antigen II to proteolytic digestion. *Gastroenterology* 88: 1575, 1985.
10. Vesikari, T., Isolauri, E., D'Hondt, E. et al: Protection of infants against Rotavirus diarrhea by RIT 4237 attenuated bovine Rotavirus strain vaccine. *Lancet* i: 977, 1984.
11. Losonsky, G., Rennels, M.B., Kapikian, A.Z. et al: Safety, infectivity, transmissibility and immunogenicity of Rhesus Rotavirus vaccine (MMU 18006) in infants. *Pediatr Infect Dis* 5: 25, 1986.
12. Mel, D.M., Arsic, B.L., Radovanovic, M.L. et al: Live oral Shigella vaccine: vaccination schedule and the effect of booster dose. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 21: 109, 1974.
13. Levine, M.M., Gangarosa, E.J., Barrow, W.B. et al: Shigellosis in custodial institutions. V effect of intervention with streptomycin-dependent shigella sonnei vaccine in an institution with endemic disease. *Am J Epidemiol* 104: 88, 1976.
14. Edwards, P.R., Ewing, W.H.: Identification of Enterobacteriaceae. Shigella, Capítulo 7. *Salmonella*, Capítulo 9. 6ª Ed. Minneapolis, Minn. Burgess Publishing Co., 137 and 181, 1976.
15. OMS/OPS Documento oficial 80.2 83º Comité Ejecutivo. Programa de Control de Enfermedades Diarreas.
16. Lennette, E.H., Bolows, A., Hausler, W.J., Truant, P.J.: Manual of Clinical Microbiology. Third Ed., Washington D.C. American Society for Microbiology, 483, 1980.
17. Von Graevenitz, A., Bucher, C.: Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* sp from human feces. *J Clin Microbiol* 17: 16, 1983.
18. Sereny, B.: Experimental Shigella Keratoconjunctivitis: a preliminary report. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 2: 293, 1955.
19. Honda, T., Iaga, S., Takeda, Y., Miwatani, T.: Modified Elek Test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 13: 1, 1981.
20. Honda, T., Glass, R., Akhtar, Q., Kibria, A.: A simple assay to detect *E. coli* producing LT enterotoxin: results of a field study of the Biken test in Bangladesh. *Lancet* i: 609, 1981.
21. Konowalchuck, J., Speirs, J.L.: Response of various cell lines to *Escherichia coli* toxic products. *Can J Microb* 25: 335, 1979.
22. Speirs, Starrick, S., Konowalchuck: Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infect Immun* 16: 617, 1977.
23. Guerrant, R.L., Brunton, L.L., Schaitman, T.C., Rebhun, L.I., Gibman, A.G.: Cyclic Adenosine Monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of vibrio cholerae and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 10: 320, 1974.
24. Evans, D.G., Evans, D.J., Pierce, N.: Differences in the response of rabbit small intestine to LT and ST enterotoxins of *E. coli*. *Infect Immun* 7: 873, 1973.
25. Dean, A.G., Ching, Y., Ch., Williams, R.G. et al: Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in study of diarrhea in children on Honolulu. *J Infect Dis* 125: 407, 1972.
26. Merson, M.H., Sack, R.G., Kibria, A.K.M.G. et al: The use of colony pools for diagnosis of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *J Clin Microbiol* 9: 493, 1979.
27. Avendaño, L.F., Spencer, E., Calderón, A., Martínez, A.: Infección por rotavirus en lactantes con diarrea aguda. *Rev Med Chile* 111: 240, 1983.
28. Koopman, J.S., Turkish, V.J., Monto, A.S. et al: Patterns and etiology of diarrhea in three clinical settings. *Am J Epidemiol* 119: 114, 1984.
29. Black, R.E., Merson, M.H., Huq, I. et al: Incidence and severity of Rotavirus and *Escherichia coli* diarrhea in rural Bangladesh. *Lancet* i: 141, 1981.
30. Prado, V., Braun, S., Bosh, P. et al: Análisis de *E. coli* enteropatógenos clásicos como causa endémica de diarrea aguda en niños chilenos. *Rev Chil Pediatr* 55: 171, 1984.
31. Aguero, M.E., Reyes, L., Prado, V. et al: Enterotoxigenic *Escherichia coli* in a population of infants with diarrhea in Chile. *J Clin Microbiol* 22: 576, 1985.
32. Black, R.E., Merson, M.H., Rahman, S.M.M., Yunus M. et al: A two year study of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis* 142: 660, 1980.