

Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)

Angela Lluque¹, Eric Mercado¹, Maribel Riveros¹, Luis Alvarado², Eduardo Carlos³, Alejandro Colichón³, Eduardo Salazar⁴, Theresa Ochoa^{1,5}

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. En los laboratorios clínicos la identificación de EPEC se basa en la determinación de serotipos específicos por técnicas de aglutinación utilizando antisueros O y H. Actualmente la identificación del gen de intimina (*eaeA*) por PCR es el método diagnóstico de elección para EPEC.

OBJETIVOS. Comparar el diagnóstico por serología con el diagnóstico por PCR de cepas de EPEC.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se recolectaron cepas identificadas como EPEC en base al antígeno O, de 4 laboratorios clínicos de Lima, procedentes de muestras de diarrea de niños menores de 5 años. En estas cepas se buscaron genes relacionados a virulencia mediante un PCR múltiple a tiempo real para las *E. coli* diarreogénicas.

RESULTADOS. Se recolectaron 113 cepas; 82% de niños menores de 2 años. Únicamente 15 cepas (13.3%) presentaron el gen de intimina con un diagnóstico confirmatorio de EPEC. Adicionalmente se encontraron 3 cepas enterotoxigénicas (ETEC), 3 productoras de shiga-toxina (STEC), 1 enteroagregativa (EAEC) y 1 enteroinvasiva (EIEC).

CONCLUSIONES. Para la identificación correcta de EPEC se debe usar el PCR. Sin embargo, los métodos moleculares aún no están fácilmente disponibles en los laboratorios clínicos a nivel mundial.

PALABRAS CLAVES: *E. coli* enteropatógena, EPEC, *E. coli* diarreogénicas, diarrea, serología, PCR.

Rev. Gastroenterol. Perú; 2010; 30-2: 121-125

ABSTRACT

INTRODUCTION. The identification of EPEC in clinical laboratories is based on the determination of the serotypes by agglutination with O and H antiserum. Currently the proper diagnosis of EPEC should be done by the identification of the intimin gene (*eaeA*) by PCR.

OBJECTIVES. To compare the diagnosis of EPEC by serotyping and by PCR.

MATERIALS AND METHODS. We collected EPEC strains, identify by their O antigen, from 4 clinical laboratories in Lima from diarrheal samples in children less than 5 years of age. In those strains we have searched for virulence genes by a real time multiplex PCR for the diarrheagenic *E. coli*.

RESULTS: We collected 113 strains; 82% from children less than 2 years of age. Only 15 strains (13.3%) had the intimin gene and therefore a confirmatory diagnosis of EPEC. In addition we found 3 enterotoxigenic (ETEC), 3 shiga toxin-producing (STEC), 1 enteroaggregative (EAEC) and 1 enteroinvasive (EIEC) strains.

CONCLUSIONS. PCR should be use for the proper identification of EPEC. However, molecular methods are still not easily available in clinical laboratories worldwide.

KEYWORDS: enteropathogenic *E. coli*, EPEC, diarrheagenic *E. coli*, diarrhea, serology, PCR.

1 Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición (LEEN), Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

2 Laboratorio Clínico ROE, Lima, Perú.

3 Laboratorio Clínico Medlab, Lima, Perú.

4 Gastrolab, Lima, Perú.

5 University of Texas School of Public Health, Houston, USA.

INTRODUCCIÓN

Las *E. coli* diarrogénicas en conjunto, son la principal causa de gastroenteritis en niños en países en vías de desarrollo, siendo responsable del 30 al 40% de todos los casos de diarrea en niños (1). Estos patógenos son también prevalentes en nuestro medio, siendo responsables del 30% de casos de diarrea en niños menores de 1 año en zonas peri-urbanas de Lima (2); y están asociadas con altos niveles de resistencia a antibióticos (2). En la actualidad existen 6 categorías de *E. coli* asociadas a diarreas, las cuales han sido clasificadas en base a sus características clínicas, epidemiológicas y por la presencia de proteínas y genes específicos de virulencia. Los patotipos son: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), productora de Shiga toxina (STEC), enteroagregativa (EAEC), enteropatógena (EPEC) y de adherencia difusa (DAEC).

Las EPEC fueron los primeros patotipos de *E. coli* en ser descritos y fueron definidas como *E. coli* asociados a diarrea en niños pequeños que produce una histopatología característica conocido como "adherencia y efacemento" (A/E). Todos los elementos genéticos requeridos para la producción de la lesión A/E están codificados en una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Uno de los genes (*eaeA*) ubicada en LEE, codifica una adhesina de membrana externa denominada "intimina", la cual permite la unión íntima entre la bacteria y el enterocito, luego de translocar su propio receptor (tir, translocated intimin receptor). Las EPEC son a su vez clasificadas por la presencia o no de un pili denominado bfp (bundle-forming pilus). Las EPEC típicas son *eae+*/*bfp+* y las EPEC atípicas son *eae+*/*bfp-* (3).

Para el diagnóstico de EPEC se utilizan diversas metodologías, incluyendo: serotipificación, ensayo de adherencia con células HEP-2, prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y técnicas de biología molecular para amplificar el gen de intimina (*eaeA*), el cual está presente en todas la EPEC. En 1987 la Organización Mundial de la Salud (OMS) acordó que los siguientes serogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O128, O142, y O158, serían considerados "serogrupos EPEC". Desde entonces, en la mayoría de los laboratorios clínicos se diagnostica rutinariamente EPEC por medio de serología para antígeno O haciendo uso de antisueros polivalentes para los serogrupos antes mencionados. La serología se realiza en aquellas muestras procedentes de pacientes pediátricos negativas a los patógenos entéricos comunes, y en las que se tiene un cultivo puro de *E. coli*. Sin embargo, el diagnóstico actual de EPEC debe ser por la identificación del gen de intimina (*eaeA*) por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el cual se realiza únicamente en laboratorios de investigación. El presente trabajo tiene por objetivo comparar el diagnóstico de EPEC por serología (mediante el uso de antisueros polivalentes que contienen anticuerpos contra el antígeno O de *E. coli*), con el diagnóstico por PCR en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de diarrea de niños menores de 5 años procedentes de laboratorios clínicos de Lima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas. Para el presente estudio se recolectaron de manera prospectiva 101 cepas de EPEC durante el 2009 y 12 cepas de manera retrospectiva del 2006 al 2008 de 4 laboratorios clínicos de Lima. Estas cepas fueron aisladas de niños menores de 5 años con diarrea e identificadas como "EPEC" por métodos bioquímicos y serológicos en base a antisueros somáticos O polivalentes que contienen anticuerpos contra los siguiente serogrupos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158. El aislamiento y caracterización fenotípica de las *E. coli* se realizó en cada laboratorio clínico, de acuerdo a sus respectivos protocolos de trabajo.

Caracterización genotípica. Para la detección de las *E. coli* diarrogénicas, se utilizó un PCR múltiple a tiempo real, previamente estandarizado y validado. Se utilizaron cebadores diseñados específicamente para amplificar ocho genes de virulencia diferentes en la misma reacción (4) (Tabla 1). El PCR a tiempo real permite la identificación de los amplicones haciendo uso de un fluoróforo SYBER green, el cual al unirse a las cadenas de ADN de doble hebra emite fluorescencia, el cual se incrementa a medida que el producto se acumula con cada ciclo de la amplificación. El PCR a tiempo real tiene la ventaja de ser más rápido y más robusto, al no requerir procedimientos posteriores al PCR para detectar los productos de la amplificación (4). Se realizó el PCR en un pool de 5 colonias lactosa positiva a partir de la placa de Mac Conkey, según metodología estandarizada en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición (LEEN), del Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt" de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (5) (Figura 1).

Tabla 1. Categorías de *E. coli* diarrogénicas (DEC)

Abreviatura	Descripción	Genes de virulencia y diagnóstico
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	st, lt
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena	<i>eaeA</i>
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva	<i>ipaH</i>
STEC / EHEC	<i>E. coli</i> productora de shiga toxina o enterohemorrágica	<i>eaeA</i> , <i>stx1</i> , <i>sxt2</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa	<i>aggR</i>
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa.	<i>daaD</i>

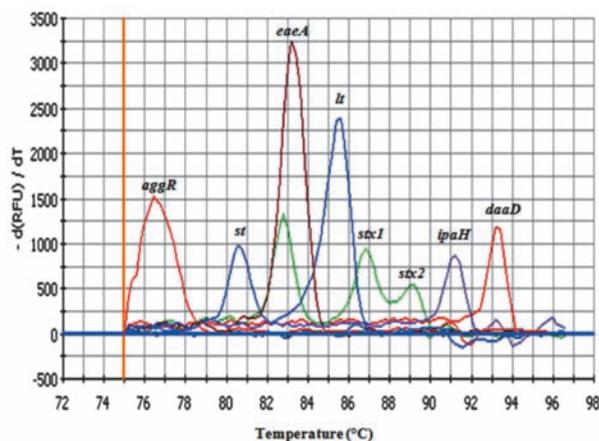


Figura 1. PCR múltiple a tiempo real para el diagnóstico las *E. coli* diarrogénicas. Este método permite la determinación simultánea de 8 genes, basados en la temperatura de denaturación (TM) de cada amplicón. El eje vertical representa el nivel de fluorescencia.

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 113 cepas identificadas por métodos bioquímicos y serológicos como EPEC. Cada laboratorio clínico aportó entre 22 y 33 cepas, con un promedio de 28 cepas por laboratorio. Solamente 15 cepas (13.3%) presentaron el gen de intimina con un diagnóstico confirmatorio de EPEC. Adicionalmente se encontraron 3 cepas enterotoxigénicas (ETEC), 3 productoras de shiga-toxina (STEC), 1 enteroagregativa (EAEC) y 1 enteroinvasiva (EIEC). Noventa cepas (80%) no presentaron ningún gen de virulencia asociado a las *E. coli* diarrogénicas. La confirmación de EPEC por PCR según el laboratorio participante fue bastante heterogénea, variando de un 3% a un 33%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) (Tabla 2)

Tabla 2. Categorías de *E. coli* diarrogénicas en los serogrupos de *E. coli* Enteropatógeno (EPEC), según laboratorio participante

DEC	Frecuencia n (%)	Laboratorio participante, n (%)*			
		Lab1 (n=30)	Lab 2 (n=22)	Lab 3 (n=33)	Lab 4 (n=28)
Negativo	90 (80)	18 (60)	19 (86)	32 (97)	21 (75)
EPEC	15 (13)	10 (33)	2 (9)	1 (3)	2 (7)
ETEC	3 (3)	1 (3)	0	0	2 (7)
STEC**	3 (3)	1 (3)	1 (5)	0	1 (4)
EAEC	1 (1)	0	0	0	1 (4)
EIEC	1 (1)	0	0	0	1 (4)

* $p < 0.01$ para la comparación de resultados entre los laboratorios participantes

Tabla 3. Frecuencia de *E. coli* diarrogénicas (DEC) según grupo etáreo, recuento de leucocitos fecales y características macroscópicas de la muestra

DEC*	Grupo etáreo**		Leucocitos fecales†		Tipo de muestra		Moco		Sangre	
	< 2a (n=79)	2a – 5a (n=17)	< 20xc (n=60)	≥ 20xc (n=36)	Líquida (n=52)	Pastosa (n=30)	Presente (n=47)	Ausente (n=34)	Presente (n=8)	Ausente (n=73)
Negativo	60 (76)	15 (88)	41 (68)	34 (94)	43 (83)	23 (77)	40 (85)	25 (74)	8 (100)	57 (78)
EPEC	11 (14)	2 (12)	12 (20)	1 (3)	8 (15)	3 (10)	5 (11)	6 (18)	0	11 (15)
ETEC	3 (4)	0	3 (5)	0	0	2 (7)	0	2 (6)	0	2 (3)
STEC	3 (4)	0	2 (3)	1 (3)	1 (1)	2 (7)	2 (4)	1 (3)	0	3 (4)
EAEC	1 (1)	0	1 (2)	0	0	0	0	0	0	0
EIEC	1 (1)	1 (1)	0	1 (2)	0	0	0	0	0	0

* Frecuencia: n (%); ** Edad en años;

† Número de leucocitos fecales x campo de alto poder.

** las tres cepas STEC presentaron stx1

Con el objeto de determinar si alguna característica de la muestra tenía una mejor correlación con la confirmación de EPEC por PCR, se analizó la frecuencia de las *E. coli* diarrogénicas según las características de la muestra (Tabla 3). El 82% de las muestras (79/96) correspondió a pacientes menores de 2 años. En este grupo de edad la frecuencia de EPEC fue de 14% comparado con un 12% en el grupo de edad de 2 a 5 años. El recuento de leucocitos así como la descripción de las características macroscópicas de las muestras fue realizado en cada laboratorio participante. Cabe aclarar que no todas las muestras contaron con la descripción de sus características, motivo por el cual los denominadores varían en cada caso. El 63% de las muestras presentaron <20 leucocitos x campo (60/96); de los cuales un 20% (12/60) tuvo

un PCR confirmativo de EPEC comparado con 3% en las muestras con mayor recuento de leucocitos fecales. El 63% de las muestras presentaron consistencia líquida (52/82), de las cuales el 15% tuvo un PCR confirmativo para EPEC comparado con 10% de las muestras de consistencia pastosa. El 58% (47/81) y el 10% (8/81) de las muestras presentaron moco y sangre respectivamente, en éstas se confirmó EPEC en el 11% de las muestras con moco y en ninguna de las que presentó sangre.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron 113 cepas de *E. coli* identificadas como EPEC por serología, utilizando antiseros comerciales polivalentes. De las 113 cepas analizadas por PCR para las *E. coli* diarrogénicas, sólo 23 (20%) presentaron alguno de los 8 genes de virulencia examinados. Este resultado es comparable con estudios previos. Tamaki y colaboradores evaluaron 1,130 cepas de *E. coli* procedentes de varios países del mundo caracterizadas como enterovirulentas en base al antígeno O con el uso de antiseros comerciales. En este grupo de cepas sólo 263 (23.3%) presentaron alguno de los 6 genes patogénicos examinados (*eae*, *stx*, *aggR*, *st*, *lt*, *ipaH*) (6). En otro estudio similar realizado en Japón, de un total de 229 cepas identificadas como enterovirulentas en base a sus antígenos O, sólo 40 (17.5%) fueron reconocidas como diarrogénicas (7). Sin embargo, estudios menos recientes reportan prevalencias más altas. Así por ejemplo, Giammanco y colaboradores reportaron que el 75% de 55 cepas aisladas en Italia entre 1987 y 1992 e identificadas como EPEC por

antiseros comerciales presentaron propiedades de virulencia asociadas a EPEC (8). Campos y colaboradores analizaron 805 cepas pertenecientes a los serogrupos clásicos de EPEC procedentes de pacientes pediátricos con diarrea en São Paulo, colectadas entre 1970 y 1990, encontrando que el 84% presentaron algún gen de virulencia de las *E. coli* diarrogénicas (9). En este estudio los autores encontraron que los serogrupos O126, O127 y O128 correspondían en un alto porcentaje a cepas avirulentas; por otro lado el serotipo O128 estaba asociado hasta con 3 patotipos diferentes: EPEC, EAEC y ETEC. De manera similar, en otros estudios se ha reportado que cepas identificadas como otras *E. coli* diarrogénicas (no-EPEC) pueden tener serotipos considerados como clásicos para EPEC, tal es el caso de estudios realizados con cepas de ETEC (10), STEC (11) y con cepas EAEC y DAEC (12,13). Por lo tanto, dado que algunos se-

rogrupos incluyen más de uno de los patotipos de las *E. coli* diarreogénicas, la mayoría de publicaciones recientes sugieren que la serotipificación como único método diagnóstico debería abandonarse. Sin embargo, la serotipificación es un método confiable para aquellos serotipos que corresponden a clonas (9).

Recientemente se publicó un estudio sobre la variabilidad alélica de genes de virulencia en 120 cepas de EPEC aisladas de niños peruanos de un estudio de cohorte en el cono sur de Lima (14). En este grupo de cepas confirmadas como EPEC por PCR, solo el 52% fueron tipificables por el serotipo O. Se encontraron 36 diferentes serogrupos, siendo el más frecuente el serotipo O55, presente en 8 cepas (6.7%). Solo se encontraron 4 serotipos considerados como "clásicos" para EPEC: O128:H2, O55:H7, O26:H1 y O142:H34. De manera similar, en un estudio realizado por Afset y colaboradores en 43 aislamientos reportados como EPEC atípica en niños de Noruega, solo 8 pertenecían a los serogrupos clásicos de EPEC y 35 no aglutinaron con los antisueros para EPEC (15). Ambos estudios señalan la poca sensibilidad de esta técnica como método diagnóstico.

En el presente estudio la identificación de EPEC por PCR fue de 13%. El análisis de frecuencia de detección de EPEC por PCR según las características de la muestra (edad, leucocitos fecales, consistencia, presencia de moco o sangre), no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la detección de EPEC según el laboratorio participante, lo cual podría explicarse por las diferencias en los protocolos de cada laboratorio, el uso de antisueros polivalentes diferentes, así como diferentes criterios para decidir en qué tipo de muestra se debería buscar EPEC. Por otro lado, encontramos 80% de las cepas sin ningún gen de virulencia de las *E. coli* diarreogénicas. Esto puede deberse a la reacción cruzada de los antisueros polivalentes de *E. coli* con cualquier miembro de la familia enterobacteriaceae (16); pero también podría deberse a su vez a las condiciones de almacenamiento de las cepas. Campos reportó que la mayoría de sus cepas avirulentas fueron virulentas durante el aislamiento y que llegaron a ser avirulentas durante el almacenamiento; así mismo, describe que mientras más viejas sean las cepas más alto el número de cepas avirulentas, probablemente por la pérdida de plásmidos de virulencia (9). Por lo tanto, una

de las limitaciones de este estudio fue que se trabajaron con cepas guardadas, siendo posible que las condiciones de almacenamiento no hayan sido óptimas. Sin embargo, cabe señalar que solo el 11% de total de las cepas fueron cepas conservadas de años anteriores. Otra limitación del estudio es que no se determinó el serotipo específico de cada cepa con antisueros monovalentes. Sin embargo, en la práctica clínica de rutina no se determina los serotipos específicos, dado que es muy costoso y solo se realiza en laboratorios de referencia y para estudios muy específicos de investigación.

La confirmación diagnóstica de los agentes etiológicos de diarrea en pediatría se realiza con fines epidemiológicos y clínicos. Para los estudios epidemiológicos en los que se quiere conocer la prevalencia, incidencia y carga de enfermedad de cada agente etiológico es recomendable incidir en el uso del PCR para un diagnóstico preciso. En el caso de los estudios clínicos, para el diagnóstico etiológico del paciente individual, tiene poca utilidad la determinación del patotipo individual de *E. coli* diarreogénica dado que no está establecido en el paciente pediátrico el beneficio del manejo antibiótico. Para el caso de diarrea persistente, existe muy poca literatura sobre ensayos clínicos que prueben el beneficio del uso de antibióticos (17,19). En el caso de adultos, específicamente de diarrea del viajero, en la cual los principales agentes son ETEC y EAEC, múltiples estudios han determinado la utilidad de los antibióticos (ciprofloxacina, azitromicina, rifaximina entre otros) para reducir el tiempo de enfermedad (19). En conclusión, la mayoría de las cepas clasificadas como EPEC por serología no presentan el gen *eaeA* característico de las EPEC por PCR, es decir hay falsos positivos. Por otro lado, los serotipos clásicos de EPEC pueden también corresponder a otros patotipos de las *E. coli* diarreogénicas, es decir la serología de EPEC no es específica. Por lo tanto, el método de elección debe ser el uso del PCR. Sin embargo, este no es un método fácilmente disponible en los laboratorios clínicos. Hasta que no se disponga de pruebas rápidas, específicas y de fácil acceso, no se tendrá información de ensayos clínicos randomizados que demuestren el beneficio del tratamiento antibiótico en pacientes pediátricos con gastroenteritis por las *E. coli* diarreogénicas.

Dirección de los autores: Angela Lluque Aquino, Theresa Ochoa Woodell
ANGELA.LLUQUE.A@UPCH.PE, Theresa.J.Ochoa@uth.tmc.edu

REFERENCIAS

- O'RYAN M, PRADO V, PICKERING LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing World. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005;16(2):125-36
- OCHOA TJ, RUIZ J, MOLINA M, et. al. High frequency of antimicrobial Drug Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81(2): 296-301.
- OCHOA TJ, BARLETTA F, CONTRERAS C, MERCADO E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102(9): 852-856.
- GUION CE, OCHOA TJ, WALKER CM, et. al. Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1752-1757.
- BARLETTA F, OCHOA TJ, ECKER L, et. al. Validation of Five-Colony Pool Analysis Using Multiplex Real-Time PCR for Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1915-1917.
- TAMAKI Y, NARIMATSU H, MIYAZATO T, et. al. The Relation ship between O- Antigens and Pathogenic

- Genes of Diarrhea – Associated Escherichia coli. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(2), 65-69
7. NISHIKAWA Y, ZHOU Z, HASE A, et.al. Diarreagenic Escherichia coli isolated from stools of Sporadic Cases of Diarrheal Illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: Prevalence of Enteroaggregative E. Coli Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene-Possesing E. coli 2002;55:183-190
 8. GIAMMANCO A, MAGGIO M, GIAMMANCO G, et. al. Characteristics of Escherichia coli strains belonging to enteropathogenic E. Coli serogroups isolated in Italy from child with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3):689-94.
 9. CAMPOS L, FRANZOLIN M, TRABULSIL. Diarrheagenic Escherichia coli Categories among the Traditional Enteropathogenic E. coli O Serogroups - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2004; 99: 545-552.
 10. ARIAS I, HUGUET JC. Detección molecular de toxinas termoestable y termolabil de escherichia coli mediante hibridación. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2002;19:193 -196.
 11. JASINSKI C, GADEA P, TANZI MN, et. al. Escherichia coli enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Urug* 2007; 23: 153-163.
 12. KNUTTON S, PHILLIPS AD, SMITH HR, et. al. Screening for Enteropathogenic Escherichia coli in Infants with Diarrhea by the Fluorescent-Actin Staining Test. *Infect Immun* 1991; 59(1):365-371.
 13. KNUTTON S, SHAW RK, BHAN MK, et. al. Ability of enteroaggregative Escherichia coli strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infect Immun* 1992; 60(5):2083-2091.
 14. CONTRERAS CA, OCHOA TJ., LACHER DW, et. al. Allelic variability of critical virulence genes (eae, bfpA and perA) in typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli in peruvian children. *J Med Microbiol* 2010;59: 25-31.
 15. AFSET JE, BERGH K, BEVANGER L. High prevalence of atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2003; 52:1015-1019.
 16. STENUTZ R, WEINTRAUB A, WIDMALM G. The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(3):382-403
 17. BARTLETT AV, TORUN B, MORALES C, et. al. Oral gentamicin is not effective treatment for persistent diarrhea. *Acta Paediatrica* 1992; 81:149-154
 18. PHAVICHITRN, CATTO-SMITHAG. Acute Gastroenteritis in Children. What Role for Antibacterials?. *Pediatric Drugs* 2003;5(5):279-290.
 19. DUPONT HL. Traveling Internationally: Avoiding and Treating Travelers' Diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010 (en revision).