

107
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FALLA DE ORIGEN

**AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE UN
FACTOR DE ADHERENCIA (K88) DE
Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA Y SU
POSIBLE NEUTRALIZACION**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MA. DEL REFUGIO PEDROZA VARGAS



MEXICO, D. F.

1990



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

PAGINA

INTRODUCCION.

OBJETIVOS.

HIPOTESIS.

CAPITULO	I.	<u>Escherichia coli</u>	1
		A. <u>E. coli</u> enterotoxigénica (ETEC).....	4
		B. Adhesinas fimbriales.....	6
		C. Hemaglutinación.....	8
		D. Caracterización de la adhesina K88.....	12
CAPITULO	II.	ADHERENCIA.....	18
		A. Mecanismos de adherencia.....	18
		B. Adhesión a la célula epitelial intestinal.	21
		C. Factor de adherencia K88.....	22
		1. Naturaleza de los sitios receptores para K88.....	25
		D. Organización genética del determinante K88.	28
		1. Organización de genes involucrados en la producción de K88ab.....	29
		2. Biosíntesis de la fimbria.....	32
		3. Modelo de exportación de subunidades K88ab.....	33
		E. Importancia del antígeno K88 en cuadros diarreicos.....	36
		1. Variantes K88 negativas.....	39

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	42
A. Material.....	42
1. Material biológico.....	42
2. Material de uso común.....	42
3. Equipo.....	43
4. Reactivos.....	44
5. Medios de cultivo.....	45
B. Métodos.....	47
1. Pruebas para confirmar la presencia de fimbria.....	47
1.1. Hemaglutinación.....	47
1.2. Hidrofobicidad.....	47
1.3. Microscopía electrónica.....	47
2. Producción de la fimbria K88.....	50
2.1. Extracción.....	50
2.2. Purificación.....	52
2.3. Prueba de actividad.....	52
3. Obtención de variantes K88 negativas... 55	
3.1. Producción del suero anti-K88.....	55
3.2. Obtención de IgG.....	55
3.2.1. Fracción γ -G.....	55
3.2.2. Purificación de IgG.....	59
3.2.3. IgG anti-K88ab.....	61
3.3. Neutralización.....	61
3.3.1. Ensayo en placa.....	61

3.4. Obtención de plásmidos.....	61
3.4.1. Extracción.....	61
3.4.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	64
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	67
CAPITULO V. ANALISIS DE RESULTADOS.....	80
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	83
ANEXO.....	84
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFIA.....	85

INTRODUCCION

La capacidad de muchas bacterias patógenas para adherirse a células epiteliales es una importante característica de virulencia, ya que es a menudo, el primer paso en el establecimiento de la infección. Así, las cepas de *E. coli* enterotoxigénica se adhieren específicamente a las células epiteliales del intestino delgado del huésped, donde secretan enterotoxinas, las cuales son una causa de diarrea en lactantes tanto humanos como de ganado porcino y vacuno.

Las adhesinas o fimbrias de la bacteria se originan en la membrana citoplasmática y están compuestas por monómeros autopoliimerizables de una proteína denominada pilina. Las fimbrias se distribuyen alrededor de toda la superficie celular, y poseen la capacidad de unirse a determinados residuos de azúcares presentes en las glucoproteínas y otros componentes superficiales de las células. Estas funciones pueden detectarse midiendo la adherencia de la bacteria a células epiteliales, o bien, a través de su capacidad de producir hemaglutinación en presencia de D-manosa. La D-manosa es uno de los ligandos más comunes de las fimbrias y es posible impedir la adhesión de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) a la superficie celular mediante un bloqueo competitivo con D-manosa o algún manósido.

Las cepas de E. coli que producen diarrea requieren la presencia de dos factores: una enterotoxina y un factor de adherencia; éste último es un tipo de fimbria cuya adhesión no es inhibida por D-manosa, como en el caso particular de K88, en el cual se basa este trabajo.

Las adhesinas manosa resistentes presentes en las cepas de ETEC que son especie-específicas, son las siguientes: K88 y 987P para el ganado porcino, K99 para bovinos y CFA I y CFA II para los humanos.

Cada uno de estos antígenos es codificado por plásmidos y se ha encontrado que a través de pases de la cepa de ETEC K88 positiva en medio sintético que contiene calostro inmune, estas cepas pierden rápidamente la capacidad de expresar la fimbria en la superficie, obteniéndose variantes K88 negativas.

Resumiendo lo anterior, se llevó a cabo el aislamiento, purificación y empleo del antígeno de superficie K88 para después inducir la pérdida del mismo, por la importancia que tienen las cepas de ETEC de producir cuadros diarreicos en lactantes.

OBJETIVOS:

1. Determinar la capacidad de adherencia de la cepa de E. coli K88ab.
2. Visualizar por microscopía electrónica la presencia de fimbrias.
3. Purificar las fimbrias por centrifugación, diálisis y cromatografía por Filtración en Gel.
4. Inocular a animales de experimentación con la bacteria total muerta, para la obtención de inmunoglobulinas específicas para K88ab.
5. Determinar los plásmidos que codifican para el K88ab, en geles de agarosa por electroforesis.
6. Realizar la curación de la cepa K88ab positiva con las inmunoglobulinas obtenidas.

HIPOTESIS:

Es posible que las inmunoglobulinas anti-k88ab, realicen la curación del plásmido que codifica para la fimbria K88ab.

CAPITULO I

Escherichia coli.

Bacilo recto Gram negativo, que mide de 1.1 a 1.5 micro-m x 2.0 a 6.0 micro-m, que puede encontrarse solo o en pares. Es facultativo, tiene ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo.

En agar nutritivo su morfología colonial puede ser de tipo lisa (S), poco convexa, húmeda, gris, con borde entero y la superficie brillante y fácilmente dispersable en solución salina; o puede ser rugosa (R), seca y difícilmente dispersable en solución salina. Aunque también pueden ocurrir formas intermedias, como mucoides y viscosas.

Es quimioorganótrofo, oxidasa negativo, pudiendo utilizar el acetato como una única fuente de carbono. La glucosa y otros carbohidratos son fermentados con la producción de piruvato, el cual se convierte en ácido fórmico, acético y láctico. La lactosa la fermentan la mayoría de las cepas (72).

Características	Bioquímicas (72)	Producción de ácido a partir de:	
Catalasa	+	Lactosa	+
Oxidasa	-	Maltosa	+
Gas de glucosa	+	Manitol	+
Acido sulfhídrico	-		
Reducción de nitratos	+	Reacción con proteínas:	
M.R.	+		
V.P.	-		
Citrato	-	Hidrólisis de gelatina	-
G+C, %	48-52	Indol	+
		Ureasa	-

La composición antigénica de *E. coli*, está dada por los antígenos somático O, de envoltura K y flagelar H, que se usan comunmente para la clasificación serológica de las cepas patógenas y no patógenas.

El antígeno somático O es un polisacárido que constituye parte de la membrana externa, es termoestable a temperaturas de 100°C a 121°C. El lipopolisacárido está compuesto por tres partes: la parte proximal ó región hidrofóbica del lípido A; la distal ó región hidrofílica del polisacárido del antígeno O; y la región central que conecta a las dos anteriores. De acuerdo al estado del lipopolisacárido, las cepas se describen como lisas (S) o rugosas (R). Las formas S desarrollan las cadenas de polisacáridos, mientras que las formas R pierden esas cadenas por mutación (72). Las propiedades de las mutantes que producen moléculas de LPS incompletas, sugieren un cambio en la naturaleza de las funciones biológicas. La pérdida del antígeno O promueve la pérdida de la virulencia (19,53).

El antígeno K es un polisacárido de naturaleza ácida, el cual forma una envoltura o cápsula alrededor de la pared celular; algunas de sus características se alteran por calentamiento a varias temperaturas.

El antígeno H está constituido por una proteína soluble llamada flagelina; y en la cual el orden de los aminoácidos representa la especificidad de los distintos antígenos flagelares. Son termolábiles y se inactivan a 100°C por 1h (19).

Además de la proteína flagelar, la mayoría de las cepas tienen una fimbria o proteína fibrilar que se extiende en gran número en la superficie bacteriana y tiene funciones específicas, como la adhesión a diversos órganos.

Se describen dos variedades de fimbrias (pilis) por su capacidad de aglutinar eritrocitos: el pili tipo I (61), que se caracteriza por producir hemaglutinación (HA) la que es inhibida por manósidos, y que se denomina HA manosa-sensible (MS); y la otra variedad que no es inhibida por manosa, produciendo una hemaglutinación manosa-resistente (MR) (30,70).

La fimbria tipo I (F1), se adhiere a la superficie de la mucosa de vías urinarias, mientras que las diversas fimbrias MR, son un factor de virulencia especie-específicas y órgano-específicas (72).

Algunas de las fimbrias MR se han aislado de cepas enterotoxigénicas en porcinos, que generalmente poseen el antígeno K88, 987 P, y ocasionalmente K99; encontrándose este último con más frecuencia en cepas de bovinos (25).

Desde que se reconoció la naturaleza protéica de estos antígenos fimbriales MR y se encontraron más antígenos similares no sólo en casos de diarrea sino en enfermedad extraintestinal, se propuso una nueva designación para tales fimbrias: los antígenos " F ". Así, para el antígeno K88 es F4, para K99 es F5 y para 987 P es F6. Las denominaciones F2 y F3 se describen para el Factor de colonización CFA I y CFA II de cepas enterotoxigénicas

en humanos (72).

A. E. coli Enterotoxigénica (ETEC).

Ciertas cepas de la bacteria intestinal común E. coli se han identificado como los agentes causales de una variedad de enfermedades diarreicas, incluyendo la diarrea infantil, la diarrea parecida al cólera en adultos, la diarrea del viajero y la colibacilosis en animales domésticos neonatos (12).

Myron M. (48), clasifica a las cepas de E. coli productoras de diarrea en cuatro categorías: Enterotoxigénica (causa mayor de la diarrea del viajero y diarrea en niños), Enteroinvasiva (una causa de disentería), Enteropatógena (una importante causa de diarrea en niños) y Enterohemorrágica (productora de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico).

Estas categorías difieren en su epidemiología, patogénesis y en sus serotipos O:H. Las características comunes aunque distintas para cada categoría, incluyen propiedades de virulencia codificadas por plásmido, las interacciones características con la mucosa intestinal y la elaboración de varios tipos de enterotoxinas.

Una quinta categoría no muy bien definida de E. coli, es la Enteroadherente, que se identifica por su patrón de adherencia a células Hep-2.

Las cepas enterotoxigénicas se caracterizan por su capacidad de proliferar en el intestino delgado y por la producción de la enterotoxina termolábil LT y/o la termoestable ST, que es controlada por plásmidos.

La toxina LT es una proteína con un peso molecular aproximado de 91 000 daltones, que se destruye por calentamiento a 65°C durante 30 minutos. Es semejante a la toxina del cólera y está constituida por una subunidad A y una subunidad B. La cadena polipeptídica A, consiste en una molécula A1 y otra A2 unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad A está ligada en forma no covalente a cinco cadenas polipeptídicas de B.

El mecanismo por el cual la toxina LT estimula la actividad de la adenilato ciclasa en la célula es el siguiente: la subunidad B de la toxina se liga a el gangliósido GM1, un receptor específico de la célula, y la subunidad A1 (parte activa), se libera de la toxina y penetra en la célula estimulando la actividad de la adenilato ciclasa ligada a la membrana. Esto da como resultado, la conversión de ATP en AMP cíclico (AMPC), el cual induce la excreción activa de cloruros (Cl⁻) e inhibe la absorción de sodio (Na⁺), creando así un desequilibrio hidroelectrolítico en la mucosa intestinal, eliminándose a la vez grandes cantidades de bicarbonato y potasio (11,12).

La toxina ST son polipéptidos de bajo peso molecular, es débilmente antigénica y no se destruye por calentamiento a 100°C durante 30 minutos. No tiene reacción cruzada con la toxina LT de *E. coli* ni con la toxina del cólera. Las cepas de *E. coli* productoras de la toxina ST que se han aislado de una variedad de huéspedes, principalmente el humano y los porcinos, que pueden producir varios tipos de la toxina ST que

difieren en su solubilidad en metanol y son especie-específicas. La toxina STa (soluble en metanol) es activa en cerdo y ratón recién nacido, mientras la toxina STb (insoluble en metanol) es activa en cerdos adultos (11).

La toxina ST no afecta la concentración de AMP, pero estimula la guanilato ciclasa causando un incremento de GMP cíclico (GMPc), inhibiendo el cotransporte de NaCl por la pared intestinal (11).

Las cepas de ETEC originalmente se encuentran dentro de dos categorías: cepas productoras solamente de ST y cepas productoras de ambas ST y LT. El antígeno K88 se encontró asociado con cepas productoras de ambas enterotoxinas (22,23). Sin embargo, Guineé y Jansen en 1979 (21), reportan que de 52 cepas K88+, 37 producen solamente LT mientras las otras 15 producen ST + LT. En el mismo año, Söderlind y Möllby (68), analizan la correlación en la producción de K88 en cepas con serogrupo O 149 y la producción de ambas, ST y LT, pero el serogrupo O 8 solo produce ST. Obviamente la presencia de K88 puede asociarse con ST, LT, o ambas (21,68).

B. Adhesinas Fimbriales.

En 1961 se describe un nuevo tipo de antígeno K, nombrado K88, en un estudio serológico realizado a un número de cepas de *E. coli* frecuentemente aisladas de enteritis en

cerdos. Más recientemente, Nagy y col en 1977 (49), reportan la colonización del intestino delgado de porcinos por una cepa de *E. coli* enterotoxigénica que carece del antígeno K88, pero que posee otra adhesina designada 987 P.

En 1972, Smith y Linggood(67), reportan un descubrimiento hecho anteriormente por Sojka, acerca de que cepas enteropatógenas para vacas y terneros poseen un antígeno común, K99 que facilita la adhesión al epitelio intestinal, mientras que las cepas K99 negativas no proliferan en el intestino delgado.

Evans y col, describieron un antígeno de superficie con características similares al antígeno K88 en *E. coli* enterotoxigénica de origen humano y que fue encontrado en la cepa H- 10407 aislada de un paciente con diarrea severa parecida a la del cólera en Daca, Bangladesh, al cual se le denominó Factor de Colonización CFA I y a otro inmunológicamente distinto, CFA II (13,14,15).

Todos estos antígenos de superficie, que confieren propiedades adhesivas a las cepas enterotoxigénicas, se identifican como apéndices proteináceos, no flagelares filamentosos, que se encuentran en la superficie celular bacteriana.

La terminología más común para estas estructuras es fimbria, y pili (7). Pili, es una palabra derivada del latín que significa pelo o estructura parecida a un pelo.

Una típica bacteria fimbriada, *E. coli* K-12, contiene

aproximadamente de 100 a 300 de estas estructuras alrededor de toda la célula bacteriana. cada estructura mide aproximadamente 7 nm de ancho por 0.2 a 2 μ m de largo.

Una simple fimbria consiste de ~ 1 000 subunidades repetidas de un polipéptido de ~ 17 kda. La estructura primaria de una subunidad se determina por el análisis de sus aminoácidos, la secuencia amino-terminal y la secuencia de genes del ADN que codifican para la subunidad. En base a esto, la molécula contiene ~ 160 residuos de aminoácidos, con una alta proporción de aminoácidos con cadenas hidrocarbonadas y una proporción baja de aminoácidos básicos. Así, la molécula es extremadamente hidrofóbica. Además, contiene dos residuos de cisteína, los cuales forman una unión disulfuro intracadena (7,53).

Los pilis se han dividido en dos grupos generales: el sexual y el somático. El primero tiene una función específica que se requiere para el intercambio de información genética entre las bacterias. Aunque se conocen las funciones precisas de algunos pilis somáticos en muchos de los casos se reconocen como estructuras morfológica y serológicamente distintas. El término de fimbria se usa como sinónimo de pili somático (19).

C. Hemaglutinación.

Hemaglutinina es un término que se usa para algunos componentes de la superficie bacteriana que causan la

aglutinación de eritrocitos. La palabra adhesina se usa para describir algunas estructuras de la superficie bacteriana que median el ataque de la bacteria a la célula epitelial. Hemaglutinina y adhesina son a menudo sinónimos.

Se emplean dos técnicas básicas para detectar propiedades adhesivas de la bacteria: primero, la prueba de hemaglutinación semi-cuantitativa, la cual muestra la capacidad de adhesividad de la bacteria o de las adhesinas libres de células para unirse a eritrocitos; la segunda es la prueba de adhesión, en la cual se aíslan células epiteliales, células en cultivo de tejido, eritrocitos, cortes de tejido epitelial o en cultivos de órganos que se incuban con cantidades viables de bacterias y miden cuantitativamente la adhesión obtenida por conteo de bacterias viables o de la bacteria marcada con radioisótopos (57,62).

La mayoría de las cepas de *E. coli* exhiben un patrón similar de hemaglutinación con eritrocitos de varias especies animales.

Evans y col (16), distinguen tres grupos de cepas con diferente patrón de hemaglutinación y un cuarto grupo que no produjo hemaglutinación. La actividad hemaglutinante se asoció con las fimbrias, las cuales se desarrollaron en cultivos sólidos y medio líquido estático. El grupo I exhibe una hemaglutinación inhibida totalmente en presencia de 0.5 % de D-manosa o metil β -D-manósido por lo cual se clasifica como fimbria tipo 1. Los grupos II y III muestran una gran diversidad de patrones de reacciones con

diferentes eritrocitos. Las reacciones no se afectan por la presencia de D-manosa, y cuando las mezclas aglutinadas se calientan a 10°, 20°, 30°, 40° y 50°C, la bacteria se eluye de los eritrocitos. Por lo tanto se le denomina manosa-resistente y eluyente (MRE). Los grupos II y III difieren, en que el grupo II posee la forma de fimbria y el grupo III no.

La producción de la adhesina se inhibe a 18°C y la actividad hemaglutinante se destruye por calentamiento de las células a 65°C por 30 minutos. Algunas otras propiedades se muestran en la Tabla 1.

Jones y Rutter (29), prueban 108 cepas *E. coli* K88 positiva que muestran una hemaglutinación manosa resistente con eritrocitos de cobayo a una temperatura de 0° a 3°C. La hemaglutinación no se presenta con las cepas K88 positivas crecidas a 18°C o las mutantes K88 negativas de una cepa K88 positiva.

Parry y Porter (55), prueban diferentes tipos de eritrocitos contra un gran número de preparaciones libres de células de dos variantes serológicas del K88 (K88ab y K88ac), así como también de células que portan estos antígenos. Observaron una poderosa afinidad de K88ab por eritrocitos de pollo. La adhesión es estable a temperatura ambiente y es manosa resistente. Las células y preparaciones libres de células de K88ac no se adhieren a la membrana de eritrocitos de pollo. Con respecto a eritrocitos

TABLA 1

Fimbria. Propiedades Generales.

Propiedad	MS	MRE
Actividad con D-manosa al 0.5 %	Ausente	Presente
Actividad a más de 50°C	Presente	Ausente
Actividad después de calentamiento a 65°C durante 30 min.	Presente	Ausente
Actividad después de tratamiento con formaldehído 0.5% a 37°C por 4 h.	Presente	Ausente
Patrón de actividad con eritrocitos de diferentes especies.	Patrón similar	Patrón diferente
Condiciones óptimas de desarrollo para la adhesina.	Cultivo prolongado (48 h) en medio de caldo en aerobiosis o estático.	Cultivo en Agar-amortiguador a 37°C / 24h No desarrolla de 15° a 20°C.

de cobayo, aglutinan con ambas bacterias K88ab y K88ac, pero la reacción es inestable a temperatura ambiente. La selectividad del K88ab para los eritrocitos de pollo puede involucrar la adhesión vía el determinante K88b.

D. Caracterización de la adhesina K88.

El primer reporte acerca del descubrimiento del antígeno K88, hecho en 1961, describe a la adhesina como una sustancia termolábil, denominada K88. El proceso de aislamiento para el antígeno, descrito en 1966, consiste en liberar el antígeno de las células, por calentamiento a 60°C durante 20 min, o por tratamiento de la suspensión celular con agitación. La purificación se hace bajo precipitaciones isoeléctricas repetidas y ultracentrifugación. El análisis químico revela que el antígeno purificado es una proteína, en contraste con el polisacárido natural de todos los otros antígenos K (17,69).

El estudio por microscopía electrónica (7,56) muestra la morfología del antígeno, encontrándose que la bacteria estaba cubierta por un material filamentososo. El antígeno purificado tiene una estructura parecida a la fimbria y se visualiza como un hilo flexible.

Una fimbria K88 tiene de 0.1 a 1 μ m de largo y 7nm de diámetro. El antígeno K88 presenta cuatro variantes: K88ab, K88ac, K88ad, K88ad(e), mostrando diferencias

inmunológicas y relativa diferencia en la estructura primaria (21).

La variante K88ab, originalmente se obtuvo en cepas de *E. coli* aisladas en porcinos con enteritis, en Inglaterra. La variante K88ac, se aisló primero en Irlanda y en la República Democrática Alemana. Posteriormente, la variante K88ad se aisló en Holanda, en cepas de *E. coli* enteropatógenas.

La variación serológica del antígeno K88 podría representar un esfuerzo de la bacteria para escapar de la presión inmunológica impuesta sobre la población bacteriana K88 positiva por la vacunación a grande escala con vacunas que contienen K88. Otra explicación, para las variantes K88 observadas, puede ser la "resistencia" de porcinos a un tipo particular de adhesina K88, debido a la presencia de "sitios receptores" alterados, en las células del epitelio intestinal, que está dirigida a la selección de otras variantes K88 naturales que también se adaptan a estos receptores alterados.

La idea de que las variantes serológicas del antígeno K88, son adaptaciones a circunstancias alteradas, se apoya en el hecho de que la adhesividad se encontró asociada a los antígenos K88b y K88c y que esta capacidad se neutraliza con antisueros homólogos.

El peso molecular de la subunidad K88ab es de 25,000 - 26,000 daltones empleando la electroforesis en gel SDS/poliacrilamida; sin embargo, el peso molecular calculado en base a su secuencia

completa de aminoácidos es de 27,540 daltones. El punto isoeléctrico determinado por Klemm en 1981(35), es de 4.4, este valor difiere del valor de 4.2 encontrado por Mooi & Graaf en 1979 (41), pero la pequeña diferencia reside en el empleo de distintos métodos.

La subunidad K88ab comprende cerca de 264 residuos de aminoácidos, 43 tienen carga, de los cuales 24 son residuos de ácido glutámico y ácido aspártico y 19 son residuos de arginina y de lisina. Además, el 33 % de los residuos son hidrofóbicos (35).

Mooi y De Graaf (41), purificaron variantes de K88 por filtración en columna de gel Sepharose CL - 4B, después del tratamiento de una suspensión celular del extracto crudo de K88 por agitación y precipitación con sulfato de amonio. El peso molecular varía dependiendo de la variante aislada. El 98 % del peso seco fue proteína. El análisis de azúcares indica la presencia de cantidades traza, variando entre 0.06 y 0.28 % del peso seco del antígeno.

Aparentemente el antígeno K88 no es una glicoproteína; sin embargo, existen tres regiones en la secuencia de aminoácidos de la subunidad proteica del K88ab, donde puede ocurrir una N-glicosidación.

Las preparaciones de K88 contienen todos los aminoácidos comunes, con excepción de cisteína. Esto implica que las subunidades de la fimbria, no están unidas por puentes disulfuro, pero sí por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

La estructura primaria del KBBab la determinaron dos grupos por diferentes caminos: Klemm (35), que determina la secuencia de aminoácidos de la subunidad KBBab; y Gaastra y col (18), que determinan la secuencia de bases del ADN del gen que codifica la proteína KBBab. La composición de aminoácidos se encuentra en la Tabla No. 2 (41).

TABLA 2

Variantes KBB. Composición de aminoácidos^a (41).

AMINOACIDO	KBBab	KBBac	KBBad	KBBad(e)
Asp	28	28	29	30
Thr	27	23	24	23
Ser	16	19	16	17
Glu	16	15	18	20
Pro	6	7	7	7
Gly	35	34	34	35
Ala	27	28	26	25
Cys	0	0	0	1
Val	18	17	19	19
Met	2	2	2	1
Ile	10	10	11	13
Leu	18	20	18	18
Tyr	8	9	7	7
Phe	10	9	10	10
His	0	1	2	2
Lys	12	13	10	9
Arg	7	7	6	5

^a Expresados como subunidad pili/residuos, con un peso molecular de aproximadamente 25,000 daltones.

Con respecto a otras adhesinas, no se observa ninguna homología entre la estructura primaria del K88 con el F2, ni con las secuencias de aminoácidos de otros antígenos de adhesión (30).

Tabla No. 3 (19).

TABLA 3

Composición de aminoácidos de subunidades
de varias adhesinas (19).

AMINOÁCIDOS	K88ab	987 P	K99	CFA I	CFA II
Asp	30	34	23	12	14
Thr	29	28	19	15	9
Ser	18	23	15	17	6
Glu	17	16	10	11	20
Pro	5	8	5	7	3
Gly	36	26	19	10	11
Ala	28	26	18	19	8
Cys	0	2	4	0	0
Val	21	15	8	19	7
Met	3	1	3	3	2
Ile	13	12	9	5	4
Leu	20	17	9	12	7
Tyr	10	5	7	4	5
Phe	11	3	9	2	4
His	0	0	3	1	1
Lys	11	10	9	8	5
Arg	8	2	6	1	3
Trp	4	1	ND	1	ND

ND, no determinado.

La relación función-estructura en la secuencia del K88 está dirigida hacia el hecho de que todas las variantes antigénicas de K88 poseen la parte C-terminal idéntica. La preservación de esta estructura altamente hidrofóbica, puede servir como un ancla molecular que fije la fimbria a la membrana bacteriana. Al contrario, la parte central de la molécula es bastante hidrofílica y es también en esta parte donde se encuentran la mayoría de los residuos de aminoácidos básicos. Además, las cuatro variantes antigénicas contienen el determinante antigénico "a", el cual probablemente es esencial para la función de la fimbria K88 y puede estar involucrado en la interacción con el receptor en el intestino delgado de porcinos (41).

CAPITULO II

ADHERENCIA

A. Mecanismos de adherencia.

Desde 1950, se conoce que la adherencia bacteriana de muchas bacterias Gram negativas a células eucarióticas es específicamente inhibida por manosa y metil α -manósidos. En 1977 se sugirió que la bacteria posee lectinas en su superficie, que sirven como adhesinas, las cuales enlazan o se unen a residuos de manosa en células humanas. Desde entonces, se han identificado varias adhesinas bacterianas como lectinas, con diferentes azúcares específicos.

La adherencia mediada por adhesinas bacterianas con enlace a carbohidratos (CBAs) en bacterias Gram negativas, se expresa en la superficie en forma de fimbria.

Más tarde, se describen unas CBAs manosa-específica (47), que posee la bacteria en la forma de fimbria tipo I y encuentran que el trisacárido α -D-Man (1-3)- α -D-Man (1-4)-D-GlcNAC y el glicósido p-nitrofenil- α -D-mano-piranosido son potentes inhibidores para CBAs manosa-específico en E. coli.

En contraste con otras enterobacterias, estos compuestos inhiben pobremente el CBAs de Salmonella sp., y solamente el trisacárido resulta un potente inhibidor para el CBAs de Enterobacter cloacae. Los estudios sugieren que el carbohidrato

más simple reconocido por la fimbria F1 de enterobacterias es D-manosa; las CBAs de distintos géneros exhiben diferencias en el tipo de oligomanósido.

El nexo de unión también puede establecerse mediante lectinas extracelulares que forman enlaces entre las células del huésped y células bacterianas. La procedencia de la lectina puede ser endógena (producida por el huésped) ó exógena (adquirida principalmente de alimentos), fig.1.

Un tercer mecanismo, propone a las lectinas como componentes integrales de la membrana celular del huésped que se unen a residuos de azúcares en la superficie de la bacteria.

Costerton y col (8), sugieren que esta adherencia se consigue mediante una masa de fibras de polisacáridos ramificados que se extienden desde la superficie bacteriana formando un compacto glicocálix que rodea a las células individualmente. El glicocálix de la bacteria y el de la célula huésped interactúan entre sí. Los monosacáridos terminales de las fibras interactúan directamente por medio de enlaces polares reaccionando los azúcares cargados negativamente con cationes divalentes como el magnesio, fig. 2.

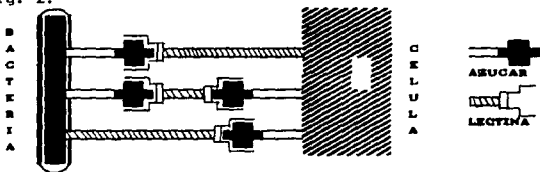


Figura 1.

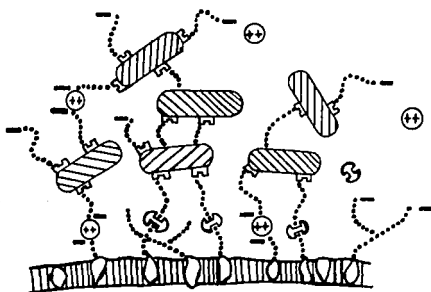
La adherencia de la bacteria a una célula del huésped por medio de enlaces covalentes o de lectinas puede inhibirse de varias formas (B) :

i) suministrando un análogo de los monómeros que constituyen las fibras de polisacáridos, que ocuparía los sitios activos de las enzimas de polimerización, evitándose así las síntesis de las fibras de polisacáridos;

ii) bloqueando los sitios activos de una lectina por un análogo;

iii) bloqueando los receptores de las glicoproteínas de la célula huésped por un agente que mimetice el glicocálix bacteriano .

LECTINA
IONES Mg^{2+}



CELULA HUESPED

Figura 2.

B. Adhesión a la célula epitelial intestinal.

Existen ciertos factores que pueden influenciar la adherencia bacteriana (4), los cuales se dan a continuación.

1. El potencial de la superficie celular.

La superficie de ambas células, eucariótica y procariótica, tiene un potencial negativo que resulta de la ionización de varios grupos químicos en la superficie. El potencial de la superficie de los eritrocitos de origen humano, resulta principalmente de la ionización del grupo carboxilo del ácido siálico. Las entidades químicas responsables del potencial de superficie de la célula bacteriana varían con la cepa, especie y condiciones de crecimiento, así como con la presencia de la fimbria en E. coli. La pérdida o modificación de estos componentes puede cambiar el potencial de superficie. La carga negativa de los grupos fijados en la superficie atrae iones cargados positivamente del medio en que se encuentra, lo que forma una doble capa eléctrica difusa. Cuando una célula es forzada a moverse dentro de un campo eléctrico, los iones de la doble capa se mueven junto con la célula.

2. Teoría DLVO.

La aparente paradoja de dos cuerpos, en los que ambos tienen un potencial de superficie negativo y pueden atraerse y adherirse uno con otro, puede explicarse en parte con la teoría de Derjaguin-Landau y de Verwey-Overbeek (DLVO) (57), la cual

considera que la energía de interacción de dos partículas cargadas, de igual magnitud y signo, es la suma de la energía electrostática de repulsión VR y la energía de atracción VA propuesta por fuerzas de Vander Waals.

Las fuerzas de repulsión VR y de atracción VA, entre superficies próximas con una distancia de separación "d", hace que las superficies a ciertos valores de "d", se atraigan una a otra, mientras que a otros valores de "d" se repelan. Un primer nivel de energía que favorece las interacciones superficie-superficie ocurre a una aproximación muy cerrada de las partículas (mínima primaria) y otras que ocurren a grandes distancias de separación aproximadamente de 10 a más de 100 Å (mínima secundaria).

En un ambiente de alta fuerza iónica, la doble capa se contrae efectivamente y la repulsión entre ambas superficies se reduce. Al contrario, una baja fuerza iónica del extendido de la doble capa puede ser tal, que la mínima secundaria se reduzca como una efectiva fuerza de atracción (57).

C. Factor de Adherencia K88.

La unión específica de la fimbria K88 a receptores en la superficie de las células epiteliales debe vencer las fuerzas repulsivas entre las células epiteliales y la bacteria.

El papel de las interacciones hidrofóbicas en las propiedades adhesivas de la cepa enterotoxigénica fimbriada, se ha demostrado

por cromatografía de interacción hidrofóbica (15). Smyth y col (66) sugieren que la reducción en el potencial de la superficie celular por enmascaramiento de la carga por los antígenos polisacáridos K, lipopolisacáridos y adhesinas con características hidrofóbicas, probablemente promueven la adhesión; también sugieren que la unión hidrofóbica está involucrada en la interacción de estas adhesinas con la mucosa intestinal. El antígeno K88 capacita a los microorganismos para proliferar en la porción anterior del intestino delgado, área más sensible a la actividad enterotóxica.

Bertschinger y col (5), comparan dos cepas, una enterotoxigénica y otra no enterotoxigénica de *E. coli* y su asociación con el epitelio del intestino delgado en porcinos. La primera se encontró cerca de la punta de la base de las vellosidades y se continuó en el borde vellosa, pero no se encontró en las criptas (2); mientras que la otra cepa permanece en el lumen del intestino cerca de las puntas del vello.

La importancia del antígeno K88 y el papel de adherencia que desempeña en la diarrea causada por *E. coli* enteropatógena en porcinos, se muestra claramente cuando se compara el número de microorganismos presentes en los tejidos del intestino delgado de neonatos de hembras vacunadas con K88 positiva o con K88 negativa; una vacuna contiene solamente antígenos "O" y estimula la producción de anticuerpos anti -O, mientras que la vacuna con K88 positivo estimula la producción de ambos anticuerpos para "O" y K88.

Comparando a cerdos no vacunados con 10^{10} K88 positiva, la vacuna K88 negativa produce un establecimiento de cinco veces la cantidad de microorganismos presentes en el lumen del intestino delgado y un establecimiento de tres veces el número de microorganismos presentes en la pared del intestino delgado. Con la vacuna K88 positiva, el establecimiento del número de microorganismos fué de 10 y 100 veces respectivamente (19).

Moon y Whipp (46), reportan que la resistencia en el intestino delgado de porcinos hacia cepas enteropatógenas de E. coli la adquieren especies adultas, mientras la respuesta a otras cepas enterotoxigénicas fue positiva para todas las edades. El ratón recién nacido, es susceptible a cepas de E. coli K88 positivas, pero no así el ratón adulto, porque este ya produce anticuerpos contra la bacteria, la cual pierde el plásmido que codifica para K88; por lo tanto, el ratón viejo es resistente a estas cepas.

En contraste a ETEC K88-positivo en porcinos, las cepas ETEC K88-negativo no se adhieren a la célula epitelial intestinal *in vitro*; sin embargo, se adhieren al epitelio intestinal *in vivo*. La diferencia entre la adhesión *in vivo* e *in vitro* puede explicarse por las condiciones que se generan en el crecimiento dentro del intestino, lo cual parece seleccionar o promover el desarrollo de células fimbriadas. Las colonias fimbriadas aisladas del intestino pueden distinguirse de las no fimbriadas por su morfología colonial en placas de Agar Sangre, son pequeñas y translúcidas las fimbriadas y grandes y opacas las no fimbriadas (49).

Bajo cierto control en las condiciones de crecimiento, se promueve la producción de la adhesina, seleccionándose clonas fimbriadas. Issacson y col (26), fueron capaces de demostrar que células 987 P-positivo se adhieren a células del epitelio intestinal *in vitro*. Nagy y col (49), al establecer la adhesina 987 P como un factor de colonización en porcinos, y comparándola con la bacteria K88 positiva, la cual prolifera en mayor grado en la parte anterior del intestino delgado, observan que las cepas 987 P positivas se encuentran en mayor proporción en la parte posterior del mismo.

1. Naturaleza de los sitios receptores para K88.

Kearns y Gibbons (32), reportan que las membranas plasmáticas preparadas del borde vellosos de epitelios susceptibles a la adhesión por la bacteria K88 positiva, pierden el 78% de su actividad de receptor. La capacidad de enlace de las membranas de borde vellosos, fue mejor cuando las membranas se incubaron con las fracciones del sobrenadante obtenidas durante su preparación. El análisis de estas fracciones del borde vellosos adhesivo y no adhesivo, revela una diferencia consistente en los perfiles de glicolípidos de estas fracciones, lo que indica la posible naturaleza del receptor para el antígeno K88. Intentos para inhibir el enlace del antígeno K88 marcado radioactivamente al borde vellosos con varios mono-, di-, y oligosacáridos, sugiere

que en estas interacciones complejas puedan estar involucrados residuos de galactosa. La inhibición por parte de algunas glicoproteínas de la mucosa sobre la capacidad del antígeno K88 de aglutinar eritrocitos de cobayo, sugiere que está presente un residuo terminal β -D-galactosil en el receptor para el K88 (20). Una especificidad diferente fue reportada por Anderson y col (1), quienes emplearon el antígeno K88 marcado con I^{125} formando complejos con membranas de bordes vellosos aisladas de porcinos. La formación de estos complejos se vió inhibida por glicoproteínas con residuos terminales de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y poco menos para N-acetilhexosaminas libres. Se desarrolló un método directo y cuantitativo, para investigar el efecto de azúcares y glicoproteínas en esta interacción (1). Los resultados muestran que la glucosa, manosa, galactosa, fucosa, lactosa, α -metil-D-galactósido, β -metil-d-galactósido, α -metil-D-manósido, o β -metil-D-glucósido no producen una inhibición significativa a una concentración de 100 mM. Mientras que la N-acetil-galactosamina, N-acetil-manosamina y N-acetil-glucosamina a 100 mM inhiben la unión del K88 en un 40, 29 y 14 %, respectivamente. Con respecto a las glicoproteínas, el efecto mostrado es mayor para la asialo OSM (Mucina Submaxilar de Ovino) con un 45% de inhibición, para la asialoagalactosil α -ácido-glicoproteína un 38% de inhibición y para la asialo PSM (Mucina Submaxilar de Porcino) un 28% de inhibición. La OSM, que tiene como residuo terminal el ácido

siálico no muestra un efecto inhibitorio. Sin embargo, después de quitar el ácido siálico de la DSM queda un residuo terminal de N-acetil-galactosamina, que inhibe el enlace. Lo mismo sucede con la PSM, que contiene un residuo terminal de N-acetil-galactosamina, interactuando con el antígeno K88 (1).

En conclusión, la diferencia puede ser el resultado de haber empleado distintos sistemas. Gibbons (20), estudió la adhesión de K88 con eritrocitos de cobayo, mientras Anderson (1), usó un enlace directo con membranas de borde vellosos.

La bacteria K88 positiva no se adhiere al borde de las microvellosidades de todos los porcinos. Se encontraron dos fenotipos en porcinos, el designado como "adhesiva" (para la bacteria K88 positiva que se une a su borde vellosos) y "no adhesiva" (para la que no se une al borde vellosos), (58, 63). En estudios recientes se clasificaron cinco diferentes fenotipos por su capacidad adhesiva, que involucran tres de las variantes K88 (Tabla 4). Un fenotipo es susceptible a todas las tres variantes, tres fenotipos son susceptibles solamente a una o dos variantes y un fenotipo es resistente a la adhesión mediada por K88. La susceptibilidad se debe a la presencia de un receptor intestinal y se caracteriza por una herencia simple Mendeliana. El producto del gen adhesivo (S) es dominante sobre el gen no adhesivo (s). Así, existen dos fenotipos que son la expresión de tres genotipos (SS, Ss, ss), (6, 32).

Kearns y Gibbons (32) estudiaron la posible naturaleza del

receptor. Este, que tiene especificidad para K88, muestra similitud con el receptor para la toxina del cólera (Gangliósido GM1).

Tabla 4.

Adherencia de cepas de *E. coli* K88ab, K88ac, K88ad-positivas aisladas del borde de las microvellosidades del intestino delgado de porcinos (19).

Fenotipo	Adhesión por células K88+		
	K88ab	K88ac	K88ad
A	(+)	(+)	(+)
B	(+)	(+)	(-)
C	(+)	(-)	(+)
D	(-)	(-)	(+)
E	(-)	(-)	(-)

D. Organización genética del determinante K88.

El determinante genético de la adhesina K88 se encontró localizado en un plásmido que puede transferirse a otra bacteria por conjugación. Se encuentran involucrados dos plásmidos en la transferencia del determinante K88 : (i) un factor responsable de la transferencia de los genes de K88 y/o marcas cromosómicas a células receptoras, y (ii) otro segmento de DNA en el cual se localiza el determinante K88.

Bak y col, (3) realizaron estudios con microscopía electrónica en ADN de plásmidos aislados de cuatro cepas de *E. coli* que portan diferentes variantes del determinante K88, sus resultados sugieren que un plásmido que porta la adhesina y otro que porta los genes de transferencia, pueden asociarse en uno compuesto.

La capacidad para utilizar rafinosa (Raf) como una única fuente de carbono es cotransferida frecuentemente con el determinante K88. Shipley y col (64), determinan que los genes Raf y K88 se localizan en un simple plásmido no conjugativo de un peso molecular de 50 Md. Sin embargo, en algunas cepas con plásmido conjugativo grande se observó que existió recombinación aparente entre el factor que lo transfiere y el plásmido Raf-K88. Mooi y col (42), localizan los determinantes genéticos K88ab y Raf en un plásmido K88, los cuales no están estrechamente unidos, sino separados por un pequeño segmento de ADN de 20 Md. El determinante Raf, dota a las cepas enteropatógenas de una ventaja, ya que les permite establecer resistencia contra la fagocitosis por la producción de una pared celular de rafinosa (19).

Los genes para K88ab (45), K88ac (33,34) y K88ad (19) se han aislado por clonación molecular. En los tres casos, el determinante genético K88 se localiza en un fragmento Hind III de un tamaño de aproximadamente de 7 a 8 Md.

1. Organización de genes involucrados en la producción de K88ab.

Los genes que codifican para la producción del K88ab se han aislado por clonación molecular, construyéndose un plásmido recombinante designado pFM205. El mapa genético de los fragmentos de ADN clonado de K88ab (43,44) se describe en la figura 3.

Este fragmento expresa, por lo menos, seis polipéptidos en minicélulas, con pesos moleculares de 17,000 , 26,000 , 27,000 , 27,500 , 30,000 y 81,000 daltones. El polipéptido de 26 000 daltones se identificó como la subunidad fimbrial. El polipéptido de 30,000 daltones parece ser el precursor del polipéptido de 27 000 daltones (44). El promotor natural para K88ab no está presente en pFM205 y los genes K88ab son transcritos esencialmente por un fuerte promotor P1 pBR322 (54). Cuando este promotor está ausente se observa un decremento de 10 a 20 veces en la producción de la fimbria K88ab. Un promotor débil, próximo al gen que codifica para el polipéptido de 17,600 daltones (p.17.6 Kd), puede ser responsable del bajo nivel de producción de la fimbria K88ab en ausencia de P1. El gen para la subunidad fimbrial K88ab (p.26 Kd) se localiza hacia el extremo 3' del operón K88ab, a la derecha del gen para (p81 Kd), fig. 3. El K88ab puede codificar para un mínimo de dos diferentes proteínas de superficie. Los cinco polipéptidos (81, 27.5, 27, 26 y 17 Kd) se sintetizan como precursores, por lo tanto es de esperarse que se localicen fuera del citoplasma. Tres polipéptidos se localizan en el espacio periplásmico (p 17, p27 y p27.5 Kd) y dos en la membrana externa (p26 y p81 Kd), ver tabla 5 (54, 71).

Tabla 5.

Localización celular y posible función de los polipéptidos codificados por el determinante K88ab (19).

Polipéptido P.M. (d)	Localización celular	Posible función
81,000	Membrana externa	Ensamblaje y/o anclaje de la subunidad fimbrial.
27,500	Periplasma	Necesaria para la integración de la subunidad fimbrial dentro de la membrana externa.
27,000	Periplasma	
26,000	Membrana externa	La subunidad fimbrial
17,000	Periplasma	Involucrado en la modificación post-translacional de las subunidades de la fimbria.

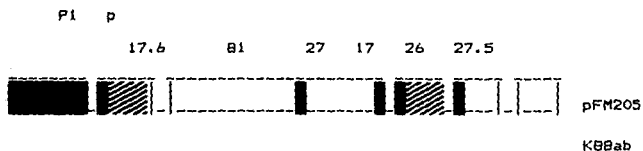


Figura 3.

Mapa genético de DNA K88ab clonado (54).

- pBR322.
 P1, promotor principal pBR322
- DNA clonado.
 p, promotor débil.
- genes estructurales.
 Los números, se refieren al peso molecular (x 1,000 daltones).

2. Biosíntesis del K88ab.

Para el estudio de este proceso y obtener la información sobre la función de los productos de los genes, se obtienen una serie de mutantes por delección para cada gen del plásmido pFM205, siendo cada mutante analizada en minicélulas.

A las cepas que contienen la delección derivada de pFM205, se les probó la capacidad para adherirse a las células del epitelio intestinal de porcinos y para aglutinar eritrocitos de cobayo (55,56). Una delección en el gen para p81 Kd, no tiene influencia en la expresión de la subunidad de la fimbria ni en el transporte de ésta hacia la superficie de la célula. Sin embargo, no se adhiere al borde de las vellosidades del epitelio intestinal y no aglutinan eritrocitos de cobayo. Las mutantes con delección para p27 Kd también expresan la subunidad pero se degradan muy rápido porque aparentemente en ausencia de p27 Kd la subunidad es susceptible a proteólisis. Las cepas con delección para p27 Kd, expresan la subunidad y la exportan hacia la superficie celular, pero el ensamblaje de la fimbria no es normal, por lo tanto no se adhieren al epitelio intestinal ni aglutinan eritrocitos de cobayo. La delección en el gen de p27.5 Kd produce poca cantidad de la adhesina K88ab, pero todavía se adhiere y aglutina a los eritrocitos (54).

Mool y col., (44), localizan al polipéptido de 17,000 daltones fuera del citoplasma (tabla 5) y excluyen un papel de regulación positiva, por lo menos a nivel de transcripción. Además, p27 Kd puede forzar la cadena polipeptídica de las subunidades, a una

conformación requerida para el transporte a través de la membrana externa y polimerizarla en fimbria.

Las mutantes defectivas en la síntesis de p17.6 Kd, acumulan subunidades fimbriales en el interior de la célula, sugiriendo que p 17.6 Kd está involucrado en el transporte o ensamblaje de las subunidades (54).

3. Modelo de exportación de subunidades K88ab.

Se ha propuesto un modelo basado en los datos presentados anteriormente acerca del modelo a seguir para la exportación y la unión de subunidades de K88ab. Este modelo se describe en la figura 4. Los precursores de la subunidad fimbrial se translocan co-transduccionalmente a través de la membrana citoplásmica con la ayuda de su péptido señal en el extremo amino terminal. En el espacio periplásmico los polipéptidos p27 Kd se asocian con las subunidades y estabilizan la conformación que se requiere para la exportación a través de la membrana externa y previenen la degradación proteolítica y la polimerización prematura de las subunidades. Los complejos p27 Kd y la subunidad fimbrial se asocian para formar agregados de diferentes tamaños. Los p17 Kd se unen a estos complejos y aumentan su afinidad por los p81 Kd en la membrana externa. Una vez que los polipéptidos p17, p26 y p27 Kd se han unido al p81 Kd, la subunidades son modificadas por los p17 Kd y translocadas al otro lado de la membrana externa a través de canales formados por uno o más p81 Kd. Los p17 y p27 Kd se disocian del complejo y se vuelven a utilizar para ciclos

adicionales de unión. Los pB1 Kd catalizan el pliegue de las subunidades a una conformación que polimeriza espontáneamente con otras subunidades y que también sirve como ancla para las fimbrias. En este modelo no se incluye una función para p17.6 Kd; sin embargo, puesto que éste parece afectar el transporte y/o la unión de las subunidades, podría interactuar con las subunidades en el curso del proceso de unión o podría ser siempre una parte de la estructura de la fimbria, o bien, formar un enlace entre la proteína anclada y las subunidades de la fimbria (54).

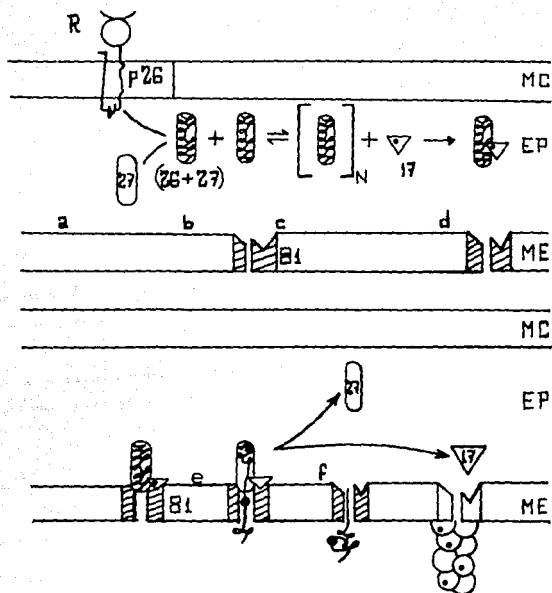


Figura 4.

Modelo de exportación de la subunidad KBBab.

a, b, c, d, e, f, indican la secuencia del proceso.

Los números, se refieren al peso molecular ($\times 1,000$ daltones) de cada polipéptido. La R, indica el ribosoma; MC, membrana citoplásmica; EP, espacio periplásmico; ME, membrana externa.

E. Importancia del antígeno K88 en cuadros diarreicos.

El reconocimiento de determinantes microbianos de virulencia y su papel en la patogénesis de la enfermedad entérica, proveen una base más para el estudio de la respuesta del huésped. Entre tales determinantes de virulencia, el antígeno K88 y la enterotoxina, se han identificado en cepas de E. coli K88 enteropatógena para porcinos. Estudios *in vivo* e *in vitro*, sugieren que la propiedad adhesiva de K88, capacita a la bacteria para colonizar el intestino delgado de porcinos e indican que el porcino es protegido contra la diarrea neonatal por la neutralización de esta propiedad adhesiva (27,28). Sin embargo, a pesar de que las fimbrias son específicas de especie, estudios hechos por Deneke y col en 1984 (9), reportan que el patógeno portador de K88 de porcinos, puede colonizar células del intestino delgado del hombre. Para esto se aislaron células del epitelio intestinal (ileon) de humano y porcino, ambas células se pusieron en contacto con cepas de E. coli enterotoxigénica patógenas para el hombre (B2C, 334 y H10407) y para porcinos (G205, P155, V17, G491, P307 y G1108-E). Las tres cepas patógenas para el hombre, se adhirieron a ambos tipos de células, tanto de porcinos como de humanos. Un hecho similar ocurrió con las cepas productoras de los antígenos K88ab y K88ac, que también se adhirieron a los dos tipos de células. Este experimento confirma el estudio hecho en 1971, alimentando a cuatro voluntarios con una dosis de bacteria K88 viable (10^{10} células/ml) en la leche. Los resultados sobre la recuperación de la bacteria de las heces por períodos de tres meses

sugieren que ocurre alguna colonización en el intestino delgado por el patógeno K88. Sin embargo, solamente uno de los voluntarios, desarrolló una diarrea mínima comparado con siete de diez voluntarios alimentados con una dosis bacteriana de las cepas B2C y B7A patógenas para humanos. La cepa K88 se recuperó de muestras de aspirados de fleón en cantidad de 10^6 bacterias, comparado con 10^7 bacterias patógenas para el humano, sólo que estas últimas se recuperaron tanto de yeyuno como de fleón.

El enlace de E. coli enterotoxigénica patógena para el hombre, a células del epitelio intestinal de porcinos, puede proveer un modelo útil para la fase de ataque de la colonización en el humano. El conocimiento de los mecanismos precisos del poder de ataque de ETEC K88, tiene gran relevancia en la diarrea del humano (9).

Como la adhesión de E. coli al epitelio intestinal es un prerrequisito esencial para el desarrollo de la enteritis, la inhibición de la adherencia mediada por anticuerpos, es uno de los mecanismos de defensa del huésped contra el patógeno. En un porcino neonato, el valor protector del calostro contra la enteritis es bien conocido. No existe transferencia transplacentaria de inmunoglobulina materna *in utero* y la cría depende de la absorción intestinal de niveles altos de inmunoglobulina del calostro durante los primeros días de su vida para sobrevivir (36,39,40). La vacunación de hembras con una preparación de K88 purificado, confiere inmunidad pasiva a su cría. Rutter y col (59), probaron *in vitro*, secreciones mamarias y

suelo de hembras vacunadas para investigar la naturaleza del factor protector concluyendo que la neutralización de la propiedad adhesiva por anticuerpos K88 de calostro y de leche, contribuye significativamente a la protección de los críos. Además, el calostro de hembras susceptibles efectúa más eficientemente la fagocitosis opsonizante y muerte de E. coli K88 *in vitro*, que el calostro de hembras resistentes. En E. coli el efecto del pili en la susceptibilidad a la fagocitosis se reduce después de que la fimbria se elimina por irradiación ultravioleta. La fagocitosis disminuye en un 75% en presencia de D-manosa 0.1 M, un agente que inhibe competitivamente el enlace del pili a la superficie celular (65).

En colibacilosis neonatal, el K88 exhibe características específicas de ataque al epitelio intestinal de porcinos, y la eliminación de elementos genéticos responsables de su síntesis, promueven la pérdida de su virulencia (10). La pérdida de la capacidad de sintetizar la fimbria, se debe a la pérdida permanente del gen que la controla y no de la supresión temporal de este efecto. Tal pérdida del plásmido se acepta normalmente como una evidencia de curación de plásmido (40). En este proceso se usan también otros agentes, como el colorante de acridina y el dodecil sulfato de sodio (SDS), pero no se utilizan *in vivo* por su inherente toxicidad (60). Esta curación del plásmido K88 positiva produce variantes K88 negativas .

1. Variantes K88-negativas.

Una inmunización oral con vacuna de E. coli inactivada con calor, muestra una capacidad peculiar para inducir la pérdida de la adhesina K88 del patógeno bajo esta infección, mientras una camada control no inmunizada, no la muestra. La infección se controla en el grupo vacunado y después de un período corto se excreta el patógeno administrado, como una forma K88 negativa avirulenta. Sin embargo, en el grupo control usado, se excretó la bacteria K88 positiva después de dos semanas aproximadamente, asociada con diarrea. Estudios posteriores *in vitro*, confirman que los anticuerpos producidos por inmunización oral inducen la pérdida de los antígenos K88ab y K88ac en un cultivo (39, 40 y 56). El efecto que tienen los pases de la cepa 08:K87(B)K88ab en presencia de anticuerpos de origen porcino que se obtuvieron por inmunización con antígenos inactivados con calor, se hace realizando cinco pases cada doce horas en presencia del 25% de la fracción en caldo nutritivo. Bajo condiciones de control no pierde la capacidad de sintetizar el antígeno, pero con anticuerpos presentes en el cultivo, la cepa 08 se convierte en K88 negativa después de cuatro a cinco pases. Esta pérdida no se restablece cuando la cepa se hace crecer en un medio apropiado. Cuando se realizó la investigación de las fracciones del suero relacionadas con la actividad curante del plásmido, en gel de filtración Sephadex G-200 se localizó en las fracciones IgG; mientras que las fracciones IgG e IgM/IgA de la leche, también inducen la pérdida, pero las más activas resultaron ser las fracciones IgM/IgA (56).

Por otro lado, se han utilizado preparaciones de la fimbria para proteger pasivamente a porcinos recién nacidos contra la diarrea causada por ETEC, amamantándolos con calostro o leche de cerdas inmunizadas con tales preparaciones de fimbria (39,40, 50,51). Estos datos muestran que la cepa bacteriana que alberga el plásmido natural K88 que se pasó a través de un medio que contiene calostro inmune, pierde rápidamente la capacidad de expresar la fimbria K88 en su superficie. Se propuso que el calostro inmune contiene un factor que cura activamente el plásmido de la bacteria y un componente termoestable distinto a los anticuerpos K88, que es el responsable de tal curación. Otra posible explicación para la pérdida de células que expresan el K88 de la población, es que el calostro inmune selecciona a las células que pierden espontáneamente el plásmido. Tales células aparecen a una baja frecuencia en cultivos normales. Este otro mecanismo se ve favorecido por varias observaciones reportadas por Nagy y col (52), en las cuales se hicieron pases de la cepa CN6913 de E. coli K88 positiva, a través de un medio sintético con calostro inmune, produciéndose en gran cantidad variantes CN6913 K88 negativas. Estas variantes pierden un plásmido grande que codifica para K88. Otros cuatro plásmidos de resistencia a antibioticos que porta la misma cepa, no se afectan. Sin embargo, cuando se incubaron a 18°C cultivos similares, condición en la cual se suprime la expresión fenotípica de la fimbria, las células viables acumuladas no mostraron pérdida del plásmido. Esto parece indicar que se requiere la expresión

fenotípica del determinante para su eliminación.

La estabilidad de los otros cuatro plásmidos que porta la cepa CN6913, que no se afectaron por el calostro inmune, sugiere que el efecto de curación específica del plásmido, es responsable de la pérdida del plásmido K88. Así, es inverosímil que la interferencia directa con la replicación del plásmido, sea responsable de la eliminación del mismo (52).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

A. Material.

1. Material biológico.

Eritrocitos de cobayo, de pollo y tipo A humano.

Conejos Nueva Zelanda (2 - 3 kilos).

Cepa de E. coli SC 644 K88ab.

Cepa de E. coli K99.

Cepa de E. coli J54.

Cepas de E. coli con plásmidos de referencia:

GM 30/PBR 322	Tc ^r Amp ^r	2.6 x 10 ⁶ daltones.
P 654/PRS D1	Tc ^r	35 x 10 ⁶ daltones.
J 53/RP 4	Tc ^r Amp ^r Km ^r Nm ^r	40 x 10 ⁶ daltones.
K 37/RI-19	Amp ^r Km ^r Sm ^r Sp ^r Su ^r Cf ^r	63 x 10 ⁶ daltones.

2. Material de uso común.

Asa bacteriológica.

Baño de hielo.

Baño de hielo seco-etanol (-70°C).

Cajas de Petri.

Espátula.

Filtros de plástico millipore.

Frascos viales de vidrio de 10 ml.

Gradilla.

Jeringa de insulina.

Matraz Erlenmeyer de 50 ml.
Matraz Erlenmeyer de 4 litros.
Mechero.
Membrana para diálisis.
Microplacas de plástico.
Micropipeta de 1-20 μ l.
Micropipeta de 25 μ l.
Micropipeta de 50-200 μ l.
Pipeta Pasteur.
Pipeta de 1 ml dividida en 1/10.
Pipeta de 10 ml dividida en 1/10.
Portaobjetos.
Probeta graduada de 100 ml.
Probeta graduada de 500 ml.
Tela de alambre con asbesto.
Tripié.
Tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
Tubo de ensayo de 13 x 100 mm.
Tubo de ensayo de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
Tubo Eppendorf de 1.5 ml.
Vaso de precipitado.

3. Equipo.

Agitador magnético Corning.
Balanza analítica digital CFI DGN.
Balanza granataria OHAUS.
Colorímetro Klett-Summerson.

Espectrofotómetro Beckman DU-6.
Fotómetro de sistema PMQ3 Zeiss.
Fuente de poder Buchler Instruments.
Microfraccionador Gilson.
Ultracentrífuga Beckmann.
Ultracentrífuga Eppendorf Brinkmann.
Potenciómetro Corning.

4. Reactivos.

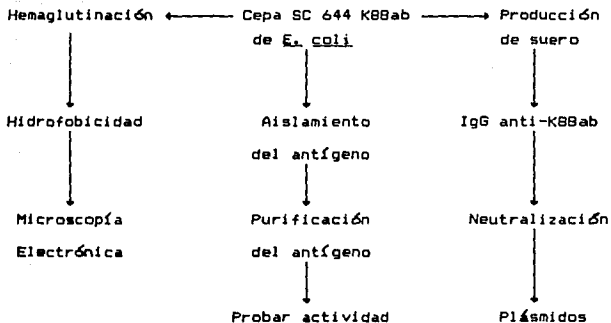
Acetato de sodio - Baker Analyzed.
Acido acético glacial - Baker Analyzed.
Acido clorhídrico - Merck.
Acido bórico - P. Q. Monterrey.
Acido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) - Baker Analyzed.
Agarosa - Sigma.
Albúmina sérica bovina - Sigma.
Azida de sodio - Merck.
Azul de bromofenol - Sigma.
Bromuro de etidio -Sigma.
Carbonato de sodio - Baker Analyzed.
Cloruro de manganeso - Baker Analyzed.
Cloruro de sodio - Merck.
DEAE-Sephacel - Pharm. Chem.
D-manosa - Merck.
Dodecil sulfato de sodio (SDS) - Sigma.
Etanol absoluto - Merck.
Fosfato de sodio dibásico - Merck.

Fosfato de sodio monobásico - Merck.
Glucosa - Merck.
Hidróxido de sodio - Baker Analyzed.
Lisozima - Sigma.
Reactivo de fenol Folin-Ciocalteu - Merck.
Sepharosa CL 4B - Pharm. Chem.
Sulfato de amonio - Merck.
Sulfato de cobre - Merck.
Sulfato de magnesio - P. Q. Monterrey.
Tartrato doble de sodio y potasio - Baker Analyzed.
Trizma-base - Sigma.
Urea - Merck.

5. Medios de cultivo.

Agar Sangre (Base) - Merck.
Agar Soya Trypticase - Bioxon.
Caldo BHI - Merck.
Caldo Nutritivo - Bioxon.

ESQUEMA DE TRABAJO



B. Método.

I. Pruebas para confirmar la presencia de la fimbria.

1. Hemaglutinación.

De los medios de conservación se tomó una asada de cada cepa (K88, K99, J54) y se sembró en Agar Soya Tripticasa (TSA); el desarrollo se resuspendió en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.15 M pH 7.4 ajustándose la concentración a 1.5×10^8 células/ml (ver esquema 1). La suspensión bacteriana y la suspensión de eritrocitos se agregaron en cantidades iguales. Por otra parte, bajo las mismas condiciones se agregó D-manosa al 1%, efectuándose la lectura a los 15 min, observando como reacción de Hemaglutinación Manosa Resistente (HMR) la hemaglutinación en presencia de manosa.

2. Hidrofobicidad.

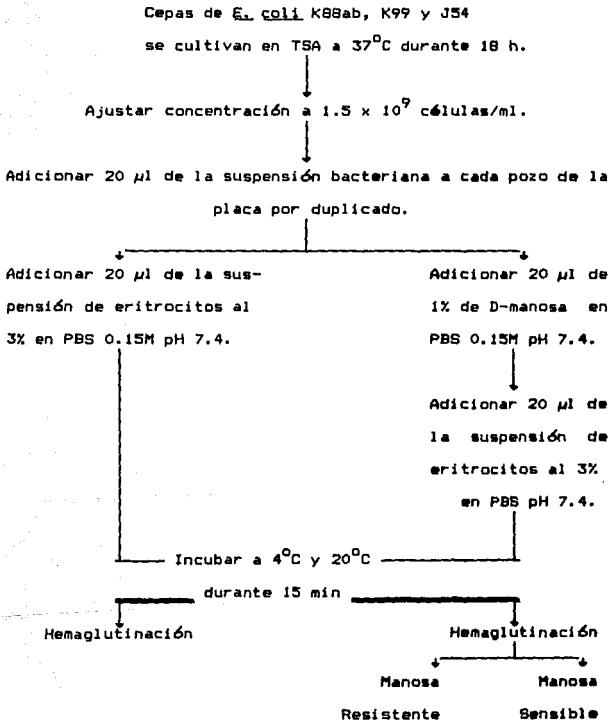
La cepa SC 644 se sembró en TSA (ver esq. 2), se incubó y se ajustó a la concentración de 5×10^8 células/ml. Se colocó la suspensión bacteriana con diferentes concentraciones de sulfato de amonio (0.1, 1, 2, 3 y 4 M) (38). Posteriormente la aparición de un precipitado blanco, correspondió a una reacción de hidrofobicidad positiva.

3. Microscopía Electrónica.

Esta parte se realizó con el apoyo del personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina UNAM.

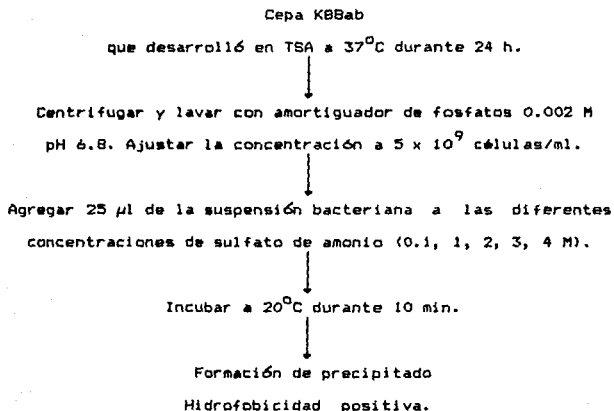
ESQUEMA 1

HEMAGLUTINACION



ESQUEMA 2

HIDROFOBICIDAD



II. Producción de la fimbria K8B.

1. Extracción.

Se agregó en partes iguales un inóculo de 6 ml de un cultivo de 24 horas a 4 matraces con 100 ml de medio para su desarrollo. Después de 5 horas de incubación, se depositó el inóculo en 4 matraces con 2 litros de medio cada uno, incubándose por otras 5 horas.

Al terminar el período de incubación, el paquete celular se recuperó y se lavó con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con NaCl 1 M (Esq. 3).

La extracción parcial se efectuó con la suspensión bacteriana en agitación vigorosa durante 30 min a 4°C. El homogenizado se centrifugó a baja velocidad durante 20 min; se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 50,000 x g durante 60 min. Todo esto, se hizo con el propósito de ir eliminando restos celulares que no interesan. Posteriormente, al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio al 60% durante 16 horas a 4°C, para que precipitara la fimbria; se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 20 ml de amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7.4 con urea 2 M. Después de dializar contra el mismo amortiguador se le agregó azida de sodio al 0.02% como conservador.

Al extracto crudo se le determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry (31), para calcular la cantidad de gel en la columna para su purificación.

ESQUEMA 3

EXTRACCION

La cepa K88ab se cultiva aeróbicamente en 8 litros de medio caldo soya tripticasa. Se incuba a 37°C durante 5 h.

↓

Durante la fase exponencial, se centrifuga a 7,000 rpm durante 20 min.

↓

Lavar el paquete celular con Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y resuspender a una concentración de 10^{11} células/ml con el mismo amortiguador con NaCl 1 M.

↓

La suspensión bacteriana se agita vigorosamente por 30 min a 4°C. Centrifugar a 7,000 rpm durante 20 min.

↓

El sobrenadante se centrifuga a 50,000 x g/60 min y se recupera el sobrenadante. Precipitar con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% durante 16 h a 4°C.

↓

Centrifugar y resuspender el precipitado en 20 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7.4 con urea 2 M. Dializar contra el mismo amortiguador.

↓

Extracto crudo

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

2. Purificación.

La purificación se llevó a cabo por filtración en gel Sepharosa CL-4B (Esq. 4). El extracto crudo se hizo pasar por la columna y después se eluyó con amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7.4 con urea 2 M. A las fracciones colectadas se les determinó la Densidad Óptica (D.O.) a 280 nm, gráfica 1.

3. Prueba de Actividad.

La presencia del Factor de Adhesión K88ab se confirmó tomando ventaja de su actividad de hemaglutinación específica con eritrocitos de pollo, lo cual ocurre a temperatura ambiente en presencia de D-manosa al 0.5% (esq. 5). Las muestras de los tres picos (gráfica 1) encontrados durante la purificación se diluyeron con 25 μ l de D-manosa al 0.5% en PBS pH 7.1. A cada dilución se le agregó 25 μ l de la suspensión de eritrocitos de pollo al 1%. El sistema se agitó cada 5 min y se tomó la lectura al término de los 20 min. El título indicado es la última dilución en la cual se observó hemaglutinación.

ESQUEMA 4

PURIFICACION

Extracto crudo dializado.



Se hace pasar por cromatografía en columna de Sepharosa Cl-4B
previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 100 mM pH
7.4 con urea 2 M.



Se eluye con 45 ml del mismo amortiguador utilizado para
equilibrar la columna.



Las fracciones eluidas se colectan en un volumen de 2.5 ml
determinando la D.O. a 280 nm de cada fracción.

ESQUEMA 5

PRUEBA DE ACTIVIDAD

Fraciones de los picos encontrados en el perfil de purificación de la fimbria. Adicionar 25 μ l de cada fracción.

Hacer diluciones, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, ... 1:512 con D-manosa al 0.5 % en PBS 0.15M pH 7.1.

Agregar 25 μ l de la suspensión de eritrocitos de pollo al 3%.

Agitar cada 5 min durante un período de 20 min.

Lectura: una reacción positiva de aglutinación indica la presencia de la fimbria.

III. Obtención de variantes K88-negativas.

1. Producción del suero anti-K88.

La cepa K88 positiva se cultivó en medio de TSA, se resuspendió en solución salina isotónica (SSI) agregándose otra cantidad igual de SSI formalinizada (0.6%) para inactivarla de 24-48 h. El paquete celular obtenido se ajustó al tubo No.3 del Estándar de Mac Farland (37) con SSI formalinizada (0.3%). Después de realizadas las pruebas de inactivación y esterilidad se procedió a la inmunización de tres conejos Nueva Zelanda de 2-3 kilos de peso (Esquema 6).

Se aplicaron 5 dosis por vía intravenosa, 2 dosis de 0.5ml y 3 dosis de 1 ml, con intervalos de 4 días entre cada inoculación. A los 8 días se efectuó la sangría de prueba y fue adecuado un título mayor a 1:1280 (Esq. 7).

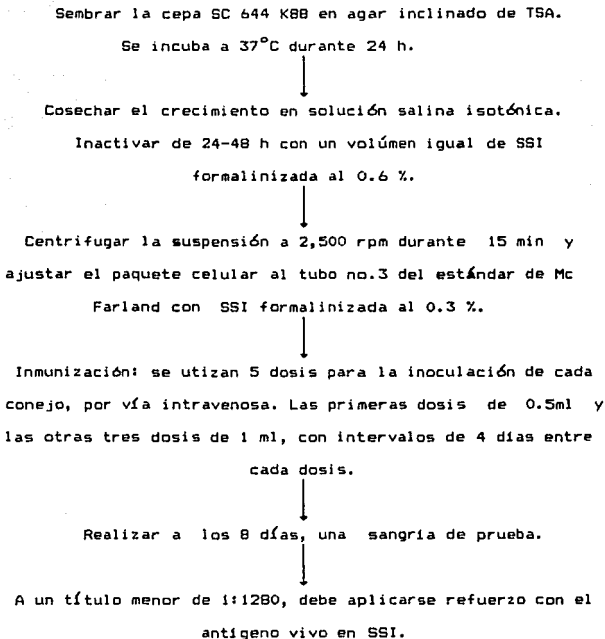
2. Obtención de IgG anti-K88ab.

2.1. Preparación de la fracción γ -Globulina

La técnica de preparación de la fracción γ -Globulina se efectuó por precipitación con sulfato de amonio (Esq. 8). Esta precipitación se realiza dos veces con una solución saturada de sulfato de amonio para tener una concentración final del 45 y 40 % en la primera y segunda precipitación respectivamente. El sulfato de amonio se eliminó mediante diálisis contra una solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.8. La fracción obtenida debe quedar libre de las demás proteínas contenidas en el suero.

ESQUEMA 6

PRODUCCION DEL SUERO ANTI-K88



ESQUEMA 7

TITULACION DEL SUERO HIPERINMUNE

Hacer una dilución del suero 1:10.



Colocar 0.5 ml de SSI en cada tubo, pasar 0.5 ml del suero diluido al primer tubo, mezclar y pasar 0.5 ml de éste al segundo tubo y así sucesivamente.



Del paso anterior se obtienen diluciones 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:40, 1:1280, 1:2560.



De cada dilución se toman 20 μ l y del mismo antígeno utilizado para la inmunización se agregan 20 μ l.



La aglutinación en placa a la más alta dilución indica el título.

ESQUEMA 8

PREPARACION DE LA FRACCION γ -GLOBULINA

Diluir el suero 1:2 con SSI, adicionar una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada hasta obtener una concentración final de 45 % (V/V). Agregando gota a gota con agitación suave

durante 30 min.

↓
Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C y efectuar un lavado con la solución de sulfato de amonio al 45 %, se centrifuga.

↓
Redisolver el precipitado en PBS, en el mismo volumen originalmente usado.

↓
Agregar la solución saturada de sulfato de amonio hasta obtener una concentración final del 40 %, centrifugar a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C, efectuar un lavado con la suspensión de sulfato de amonio al 40 %.

↓
Centrifugar, redisolver el precipitado en un volumen mínimo de PBS 0.01M pH 7.8.

↓
Dializar contra PBS a 4°C y cambiar esta solución hasta que se de una reacción negativa de sulfatos. La aparición de un precipitado blanco al agregar a la muestra cloruro de bario al 10 %, indica presencia de sulfatos.

A la fracción γ -G obtenida, se le determinó proteínas totales por el método de Lowry (31), para proceder a la purificación.

2.2. Purificación de IgG.

En este método se empleó la resina dietilaminoetil Sephacel (DEAE), que es un intercambiador iónico que tiene la propiedad de adsorber a todas las inmunoglobulinas a excepción de la IgG, la cual se eluyó con el mismo amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 8 utilizado para equilibrar la columna (Esq. 9). Las fracciones de IgG colectadas aparecen indicadas como picos que se muestran en la gráfica 2.

La pureza de la fracción IgG se llevó a cabo por inmunolectroforesis (24).

En la inmunolectroforesis se utilizó gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-barbital. En la placa de agarosa se hicieron dos pozos laterales y el centro de la placa se dividió por un canal. Se colocó la placa del gel de agar sobre la plantilla de la cámara y se puso la muestra en el pozo, así como el colorante azul de bromofenol. El corrimiento se lleva a cabo a 120 V durante 1 hora; se sacó la placa de la cámara y se retiró el gel del canal, llenándose con anti-IgG de conejo. La inmunoprecipitación se llevó a cabo en ambiente húmedo durante 24 horas.

ESQUEMA 9

PURIFICACION DE IgG

La fracción γ -G obtenida, se aplica a una columna de 9.5 x 2.2 cm con DEAE-Sephacel previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 8.0.



Se eluye con el mismo amortiguador de fosfatos.



Las fracciones eluidas se colectan en volúmenes de 2.5 ml.



Cada fracción se lee a 280 nm en el espectrofotómetro.

2.3. Obtención de IgG anti-K88ab.

La absorción de anticuerpos inespecíficos se realizó con la cepa de E. coli J 54 que no codifica para ningún factor de adherencia.

La cepa J54 se inactivó igual a como se preparó la cepa K88ab para la inmunización (Esq. 6). El paquete celular de J54 se pone a incubar con la fracción IgG a 37°C durante 30 min. El sobrenadante obtenido representa la fracción de IgG anti-K88ab (Esq. 10).

3. Neutralización (ver esquema 11).

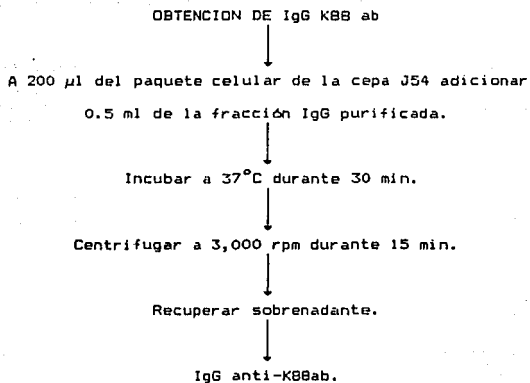
La neutralización se llevó a cabo con una suspensión bacteriana de 10^8 bacterias en 200 μ l de medio de caldo nutritivo en presencia de anticuerpos, y un control en ausencia de anticuerpos. Después de una incubación de 24 horas, se hicieron diluciones con amortiguador PBS 0.15M pH 7.2 tomando la dilución 10^{-6} , de la cual se obtuvo un inóculo para colocar en placas con Agar Sangre. Después de 24 horas de incubación, a las colonias seleccionadas se les probó aglutinación con eritrocitos de cobayo en presencia de D-manosa al 1% y se determinó la presencia de plásmido.

4. Obtención de plásmido (ver esquema 12).

4.1. Extracción. Método de lisis alcalina.

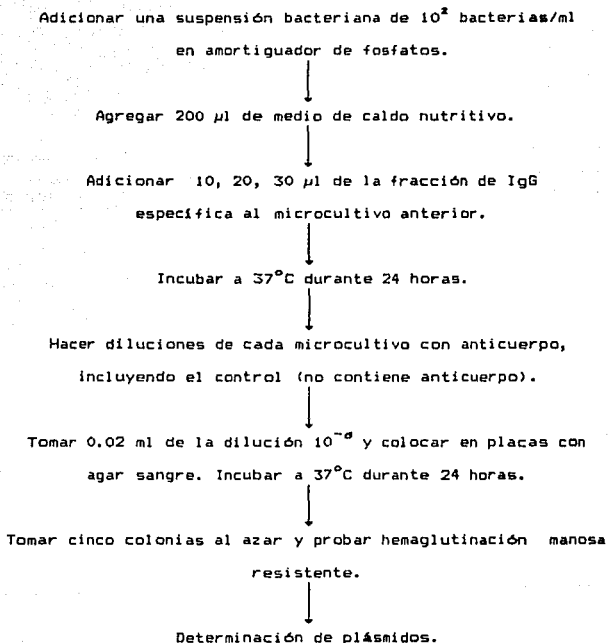
El método emplea un cultivo de 18 horas en BHI con ampicilina. La lisis se llevó a cabo a pH 8.0 en presencia de lisozima, la cual rompió la pared celular y junto con la

ESQUEMA 10



ESQUEMA 11

NEUTRALIZACION



glucosa provocó el estallamiento suave de la célula sin desnaturalización del DNA. La adición posterior de SDS y NaOH (ver anexo) hizo que precipitaran los lípidos de la membrana y las proteínas; mientras que el ácido acético de la solución III (ver anexo), bajó el pH aproximadamente a 7 por lo tanto, el DNA cromosómico se desnaturalizó, pero permitió la renaturalización del plásmido. La muestra obtenida después del último lavado con etanol absoluto frío se dejó que precipitara, para luego proceder a la electroforesis.

El precipitado se resuspendió en 50 μ l de TE a pH 8.0 más 10 μ l de púrpura de bromocresol al 0.1 %.

4.2. Electroforesis en gel de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa al 0.75 % en amortiguador Tris-boratos pH 8.0. Se colocaron 10 μ l de la muestra obtenida en el paso 4.1, previamente centrifugada durante 5 min, efectuándose el corrimiento electroforético a 10 V/cm durante 2 $\frac{1}{2}$ horas. El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio. Después de 1 hora, se pudieron observar las bandas de ADN del plásmido al exponer el gel a un transiluminador de luz UV.

Los plásmidos de referencia utilizados tienen un peso molecular de 2.6, 35, 40, y 63 Md (ver la sección de material biológico).

ESQUEMA 12

EXTRACCIÓN DE PLASMIDO (Método de lisis alcalina)

Inocular en 3 ml de BHI con ampicilina. Incubar a 37°C durante 18 h en agitación vigorosa. Agregar 1 ml del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar durante 5 min.

↓

Remover el sobrenadante y resuspender el paquete en 100 µl de la solución I (fría) agitando en vortex. Colocar durante 30 min en un baño de hielo.

↓

Agregar 200 µl de solución II y mezclar el contenido por inversión del tubo dos o tres veces. Poner el tubo sobre hielo durante 5 min.

↓

Adicionar 150 µl de la solución III. Cerrar el tubo y agitar suavemente en Vortex. Poner sobre hielo durante 40 min.

↓

Centrifugar durante 20 min, pasar 400 µl del sobrenadante inmediatamente a otro tubo Eppendorf limpio.

↓

Adicionar 1 ml de etanol absoluto frío (enfriarlo 10 min en baño de hielo seco-etanol antes de agregarlo). Mezclar y poner en baño de hielo seco-etanol (-70°C) durante 5 min o hasta que esté viscoso.

CONTINUACION...



Centrifugar 5 min y desechar el sobrenadante. Adicionar 100 μ l de acetato de sodio más 200 μ l de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión. Poner en baño a -70°C hasta que se ponga viscoso (5 min).



Centrifugar 5 min, desechar el sobrenadante, lavar con 1 ml de etanol absoluto frío. Agitar en vortex.



Centrifugar 5 min, desechar el etanol. Secar con bomba de vacío hasta que precipite la muestra.



El precipitado se resuspende en 50 μ l de TE pH 8.0 más 10 μ l de púrpura de bromocresol al 0.1 %.

RESULTADOS

TABLA 6

HEMAGLUTINACION

CEPA DE ETEC	ERITROCITOS DE COBAYO TIPO A		HEMAGLUTINACION	
			NMR	NMS
K88ab	(+)	(+)	(+)	(-)
K99	(+)	(+)	(+)	(-)
J54	(-)	(-)	(-)	(+)

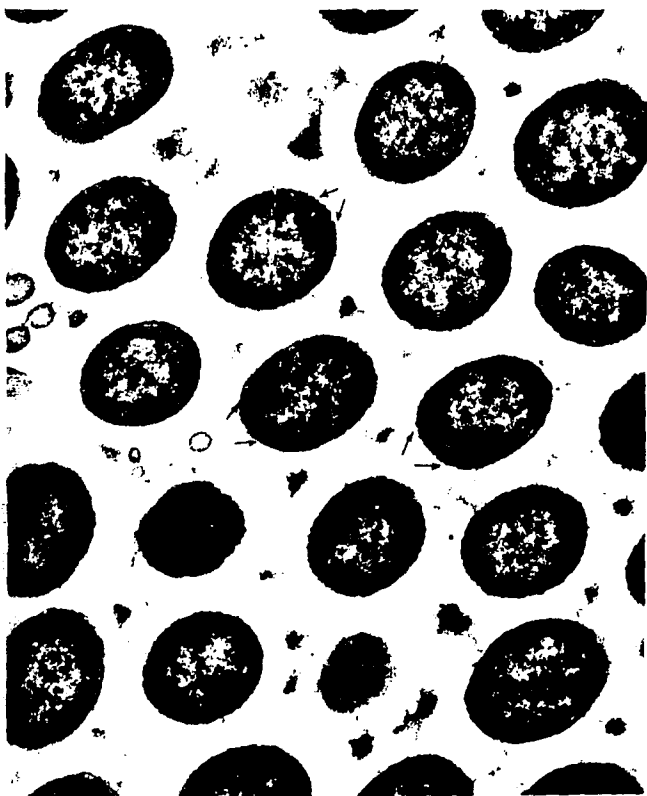
NMR, HEMAGLUTINACION MANEJO RESISTENTE.

NMS, HEMAGLUTINACION MANEJO SENSIBLE.

TABLA 7.

HIDROFOBICIDAD

No. DE FASE	AGREGACION (10 MIN)	(NH ₂) ₂ SO ₄ 4M
I	(+)	(+)
II	(+)	(+)
III	(+)	(+)
IV	(-)	(-)



CORTE DE LA BACTERIA FIMBRIADA VISTA AL MICROSCOFIO ELECTRONICO

← , señala las partes fimbriadas de la bacteria.

PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA FIMBRIA

La concentración de proteínas del extracto crudo fué de 126.3 mg. Para la purificación del antígeno se utilizó la técnica de filtración en gel, la elución de las moléculas de mayor peso molecular se obtienen dentro de los dos primeros picos que aparecen en la gráfica No. 1, que corresponden al K88. El tercer pico muestra restos de fragmentos celulares. La tabla 8 muestra la absorbancia a 280 nm que mide la cantidad relativa de proteínas de las diversas fracciones eluidas.

A las fracciones de los tres picos se les determinó actividad para K88, con eritrocitos de pollo en presencia de manosa (Tabla 9). Los picos 1 y 2 mostraron actividad y el 3 no.

GRAFICA 1.

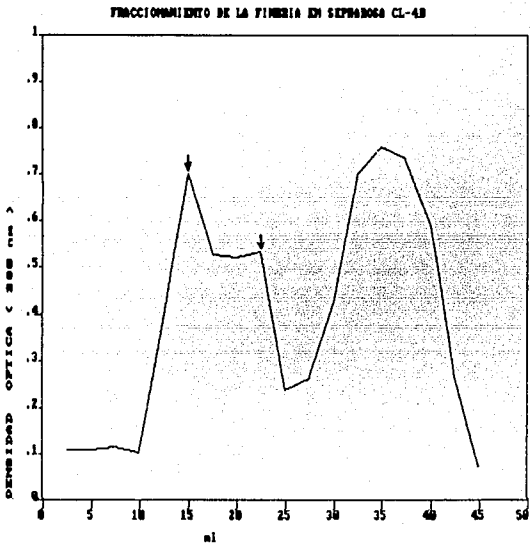


TABLA 8.

FRACCIONAMIENTO POR FILTRACION EN GEL EN SEPHAROSA CL-4B.

FRACCION COLECTADA (ml)	DENSIDAD OPTICA (280 nm)
2.5	0.109
5.0	0.108
7.5	0.114
10.0	0.102
12.5	0.401
15.0	0.700 : : :
17.5	0.527
20.0	0.520
22.5	0.533 : :
25.0	0.238
27.5	0.263
30.0	0.427
32.5	0.699
35.0	0.760 :
37.5	0.734
40.0	0.590
42.5	0.269
45.0	0.079

: : : , : : , PICO NO. 1 Y 2.
: , PICO NO. 3.

TABLA 9

ACTIVIDAD PARA K88ab.

PICO NO.	HEMAGLUTINACION	ACTIVIDAD
1	HMR	(+)
2	HMR	(+)
3	HMS	(-)

PRODUCCION Y PURIFICACION DE IgG ANTI-K88ab.

La producción del suero anti-K88ab se realizó en tres conejos Nueva Zelanda (2 a 3 kilos) de los cuales se obtuvieron los siguientes títulos :

conejo no.:	título:
1	1 : 1280
2	1 : 2560
3	1 : 2560

La fracción de inmunoglobulinas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio, se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en un gel de DEAE-Sephacel. Tomando ventaja de las diferencias en su carga eléctrica, el corrimiento cromatográfico muestra las fracciones (tabla II) que comprenden al pico obtenido que se observa en la gráfica no. 2, con una concentración de proteínas de 2.5 mg/ml.

Para comprobar la pureza de las IgG, se realizó una inmunoelectroforesis colocando la IgG en los pozos y la anti-IgG en el canal, observándose la banda de precipitación que muestra la figura no. 5.

TABLA 11.

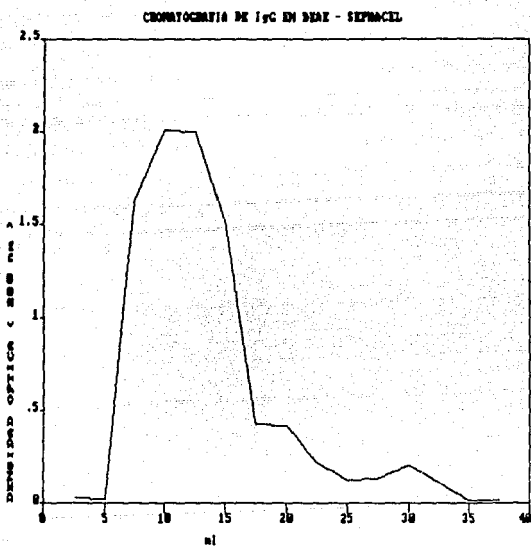
PURIFICACION DE IgG POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

FRACCION COLECTADA (ml)	DENSIDAD OPTICA (280 nm)
2.5	0.122
5.0	0.026
7.5	0.021
10.0	1.623
12.5	2.006
15.0	2.000
17.5	1.510
20.0	0.428
22.5	0.418
25.0	0.224
27.5	0.123
30.0	0.129
32.5	0.209
35.0	0.110
37.5	0.017



Figura 5
Inmunolectroforesis de IgG.

GRAFICA 2.



Determinación del Peso Molecular de Plásmidos.

Para la correlación de pesos moleculares con la movilidad relativa obtenida de ADN de plásmidos por electroforesis en geles de agarosa, se utilizaron plásmidos de peso molecular conocido que portan las cepas de E. coli GM 30/PBR322, PG 54/PRSD1, J53/RP4 y K37/R1-19 referidos en la tabla 12, como R₁, R₂, R₃ y R₄ respectivamente construyendo una gráfica (graf. 3) en la cual se interpoló el logaritmo de la movilidad relativa de las muestras problemas.

En la tabla 13 se muestra el peso molecular de los plásmidos encontrados en las cepas de E. coli K88ab y K88 ac.

Obtención de variantes K88 negativas.

El efecto que tuvo en la cepa K88ab la presencia de IgG anti-K88 en un medio de cultivo de 24 horas se observa en la tabla 14, donde hay eliminación del plásmido de bajo peso molecular (fig. 7) que presentó la cepa original (fig.6). Utilizando como grupo control la cepa K88ab crecida en un cultivo de 24 horas sin anticuerpo, y el grupo problema se desarrolló con la cepa en presencia de dichos anticuerpos.

A las cepas de los grupos problema y control se les determinó hemaglutinación con eritrocitos de cobayo en presencia de manosa; observando una hemaglutinación manosa resistente en el grupo control, mientras que en las variantes K88 obtenidas no.

TABLA 12.

PLASMIDOS DE REFERENCIA	MOVILIDAD RELATIVA (mm)	Log DE LA MOVILIDAD RELATIVA	PESO MOLECULAR (Md)
R 1	45	1.65	2.6
R 2	16	1.20	35.0
R 3	9	0.95	40.0
R 4	7	0.84	63.0

TABLA 13.

PLASMIDOS	MOVILIDAD RELATIVA (mm)	Log DE LA MOVILIDAD RELATIVA	PESO MOLECULAR (Md)
K8Bab	10	1.00	46.0
	11	1.04	43.0
	13	1.11	38.4
	15	1.17	34.5 §
	26	1.41	18.0 §
K8Bac	11	1.04	43.0
	48	1.68	0.5

§ PLASMIDO K8B COMPUESTO, 24.5 + 18.0 = 42.5 Md.
Md, 10⁶ daltones.

GRAFICA 3.

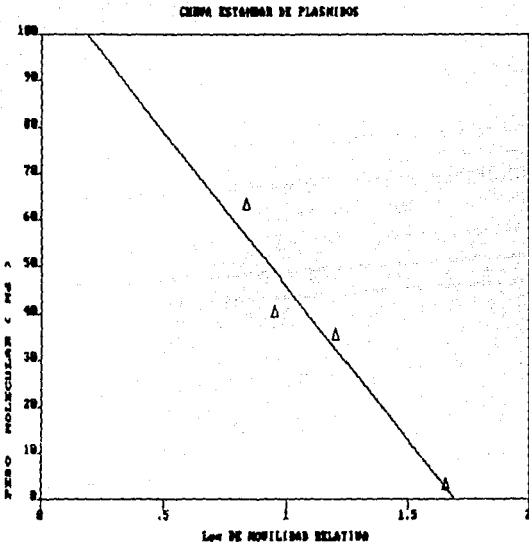


TABLA 14.

CEPA	PLANES (P. M. EN Md)	
	PRESENTE	AUSENTE
K880b		
GRUPO CONTROL	46.0	NINGUNO
	43.0	
	38.4	
	34.5	
	18.0	
GRUPO PROBLEMA	45.8	18.0
	43.0	
	38.4	
	34.5	

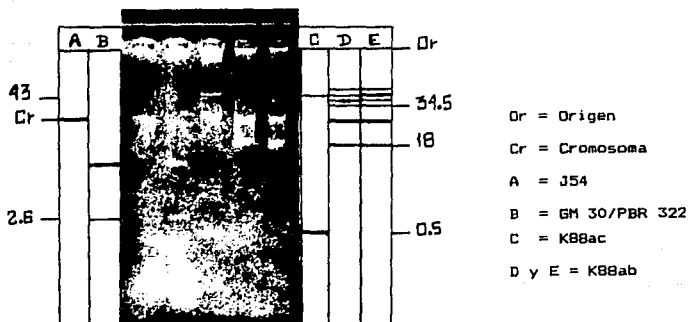


Fig. 6.

Cepa SC 644 de *E. coli* K88ab
(antes de la curación)

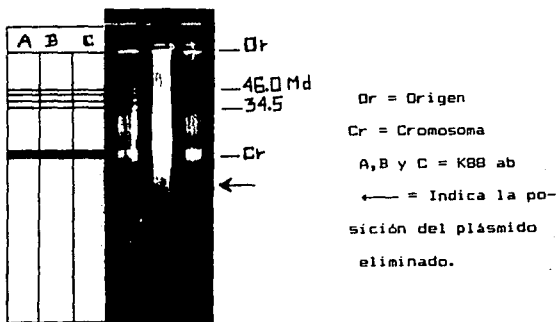


Fig. 7.

Cepa SC 644 de *E. coli* K88ab
(después de la curación)

ANALISIS DE RESULTADOS:

La presencia de la fimbria se detectó por hemaglutinación manosa resistente. La hidrofobicidad entre dos o más bacterias, se debe a la gran cantidad de fimbrias que contienen a su alrededor, de 100 a 300 de estas adhesinas, que contienen una alta proporción de aminoácidos con cadenas hidrocarbonadas. La hidrofobicidad disminuye debido a que la bacteria pierde el plásmido que codifica para el determinante K88.

La visualización de la fimbria por microscopía electrónica solamente nos indica una bacteria originalmente fimbriada.

Durante el proceso de obtención de la fimbria sin el empleo de un fermentador como lo realizaron algunos investigadores Mooi y De Graff (41) se logró tener 126 mg de proteína, cifra que se considera no muy distante de la ya reportada, que es de 150 mg, a partir de un mismo volumen que es de 8 litros.

En la purificación con la técnica de Filtración en gel se logró la elución de moléculas de alto peso que corresponden a K88. A diferencia de otros autores (41) se obtuvo un tercer tipo que correspondió a moléculas de menor peso molecular cuya actividad ante eritrocitos de pollo fué negativa (Tabla 9) .

Se puede afirmar que la purificación de K88 utilizando Sepharosa CL-4B, se manifestó en los dos picos iniciales (gráfica 1).

Shibley y col (64), identifican un plásmido no conjugativo de aproximadamente 50×10^6 daltones, el cual puede disociarse en dos: uno de 10 Md que porta los genes estructurales para K88 y otro de 40 Md que porta el factor que porta el factor que lo transfiere. Esto se compara con los resultados obtenidos en el corrimiento electroforético de ADN en geles de agarosa, los cuales muestran que la cepa de E. coli K88ab porta cinco plásmidos, de los cuales, los de peso molecular de 18 y 34.5 Md corresponden a un plásmido compuesto K88, dando un peso molecular total de 52.5 Md.

Con respecto a la capacidad de adherencia mediada por estructuras fimbriales como K88 que pueden inducir la respuesta inmune, comprobada a través de la presencia de anticuerpos en calostro y suero, éstos se han usado como protectores contra bacterias portadoras de dicho antígeno, disminuyendo su efecto patógeno.

Ahora bien, la actividad curante de las fracciones de IgB en suero y de las fracciones de IgM/IgA en leche, reportada por Porter y Linggood (56), da como resultado más activa a la primera fracción.

Linggood y col (39) proponen que el calostro inane contiene un factor que cura activamente al plásmido que codifica al determinante K88 de la bacteria y que un componente termoestable, distinto a los anticuerpos K88, fue responsable de la curación.

Otra posible explicación de la pérdida de las células que expresan el antígeno K88 de la población es que el calostro inmune hace una selección activa de las células que pierden espontáneamente el plásmido K88 (52).

En base a lo hecho por Nagy y col en 1986 (52), se elimina un plásmido grande que codifica para K88, a través de pases en presencia de calostro inmune, sin verse afectados otros cuatro plásmidos de resistencia a antibióticos contenidos en la misma cepa.

Partiendo de esta premisa, el presente trabajo estuvo dirigido a determinar el efecto de IgG sérica anti K88ab.

Posteriormente, cuando se llevó a cabo el proceso de curación en presencia de IgG anti K88ab, los plásmidos que permanecen son los de alto peso molecular y el que se pierde es el de 18 Md (fig.6), esto se presenta independientemente de la concentración de IgG aplicada al medio de cultivo.

CONCLUSIONES

1. El rendimiento de la fimbria K88ab obtenida en este experimento fue de 126 mg.
2. La purificación de K88 utilizando Sepharosa CL-4B se presentó en los dos primeros picos.
3. Independientemente de la concentración de IgG aplicada al medio de cultivo con la bacteria, los resultados obtenidos permitieron visualizar la pérdida de un plásmido de bajo peso molecular.
4. La permanencia de los plásmidos de peso molecular 46.0, 43.0, 38.4 y 34.5 Md, indica que una curación específica promueve la pérdida del plásmido de 18 Md.
5. Durante el proceso de curación, no se deben realizar pases de la cepa SC 644 K88ab en presencia de anticuerpo, para no promover la pérdida espontánea del plásmido K88 y obtener falsos positivos.
6. La pérdida de un plásmido de bajo peso molecular visualizado a nivel de electroforesis en geles de agarosa, no es determinante, si no va respaldado de pruebas que indiquen la pérdida de la adhesina codificada por el plásmido K88ab.
7. En este caso lo anterior se logró a través de hemaglutinación en presencia de D-manosa mediada por K88ab, ya que en la literatura se ha descrito la presencia de más de un tipo de fimbria que pudiera confundirse por microscopía electrónica.

ANEXO

Soluciones.

Para la extracción de plásmido:

Solución I. Lisozima 2 mg/ml de conc. final	10 mg
EDTA 0.5 M	0.1 ml
Tris 1 M pH 8.0	0.125 ml
Glucosa al 20 %	0.222 ml
H ₂ O desionizada estéril	4.55 ml

Solución II. NaOH 10 N (0.2 N de conc. final)	0.2 ml
SDS al 20 % (1 % de conc. final)	0.5 ml
H ₂ O desionizada estéril	9.3 ml

Solución III. Acetato de sodio 3 M pH 4.8.

Disolver el acetato de sodio en un volumen mínimo de agua. Medir pH y ajustarlo con ácido acético glacial, aforar y almacenar a temperatura ambiente.

TE a pH de 8.0:

Tris-HCl	10 mM pH 8.0.
EDTA	1 mM pH 8.0.

Tris-Boratos:

Tris-Base	54 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA 0.05 M pH 8.0	20 ml

Aforar a un litro. Solución patrón 5x

SDS 20 %.

Pesar 200 g de SDS y disolverlos en 90 ml de agua desionizada, calentar a 68°C para disolver. Ajustar a pH 7.2 con gotas de HCl. Aforar a un volumen de 1 litro.

EDTA 0.5 M pH 8.0.

Adicionar 186.1 g de EDTA a 800 ml de agua desionizada, disolver y ajustar pH con NaOH.

Tris 1 M pH 8.0.

Disolver 121.1 g de Tris-base en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH por adición de HCl.

Amortiguador de fosfatos (PBS) 0.15M pH 7.2:

Na_2HPO_4	1.15 g
KH_2PO_4	0.20 g
NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
H_2O Destilada	1000 ml

Tris-HCl 50mM pH7.4 con NaCl 1M.

Disolver 6.05 g de trizma-base en 800 ml de agua destilada, ajustar pH con HCl. Agregar 58.4 g de NaCl, disolver y aforar a un litro.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, M. J., J. S. Whitehead and Y. S. Kim. "Interaction of E. coli K88 antigen with porcine intestinal brush border membranes". *Infec Immun* 29(3): 897-901 (1980).
2. Arbuckle, J. B. R. "The location of E. coli in the pig intestine". *J Med Microbiol* 3:333-340 (1970).
3. Bak, A. L., Gunna Christiansen, C. Christiansen, a. Stenderup, Ida Orskov and F. Orskov. "Circular DNA molecules controlling synthesis and transfer of the surface antigen(K88) in E. coli". *J Gen Microbiol* 73:373-385 (1972).
4. Beachey, E. H.
RECEPTOR AND RECOGNITION.
Chapman and Hall.
Serie B, vol. 6, pag.187-215 London (1980).
5. Bertschinger, H.U., H.W. Moon and S.C. Whipp. "Association of E. coli with the small intestinal epithelium". *Infec Immun* 5(4):595-605 (1972).
6. Bijlsma, I.G.W., A. de Nijs and J.F. Frik. "The prevalence of different porcine phenotypes in the Netherlands concerning adherence of K88-positive E. coli to intestinal epithelium". *Vet Quart* 7(3):246-248 (1985).
7. Briton, Ch.C.Jr. "The structure function synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in Gram negative bacteria". *Trans N Y Academy Sci* 27:1003-1054 (1965).
8. Costerton, J.W., G.G. Geesey y K.J. Cheng. "El mecanisao de adherencia de las bacterias". *Investigación y Ciencia*. 18:66-77 (1978).
9. Denek, C.F., K. McGowan, A.D. Larson and S.L. Gorbach. "Attachment of human and pig (K88) enterotoxigenic E. coli strains to either human or porcine small intestinal cells". *Infec Immun* 45:522-524 (1984).
10. Dougal G., R. Sellwood, D. Maskell, K. Sweeney, Foo Y. Liew, J. Beesley and C. Hormaeche. "*In vivo* properties of a cloned K88 adherence antigen determinant". *Infec Immun* 52(1):344-347 (1986).
11. Eidels, L., R.L. Proia and D.A. Hart. "Membrane receptors for bacterial toxins". *Microbiol Rev* 47(4):596-620 (1983).

12. Elwell, L.P. and P.L. Shipley. "Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals". *Ann. Rev Microbiol* 34:465-496 (1980).
13. Evans, D.G., R.P. Silver, D.J. Evans Jr., D.G. Chase and S.L. Gorbach. "Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *E. coli* enterotoxigenic for humans". *Infec Immun* 12:656-667 (1975).
14. Evans, D.G. and D.J. Evans Jr. "New surface-associated heat-labile colonization factor antigen CFA/II produced by enterotoxigenic *E. coli* of serogroups O6 and O8". *Infec Immun* 21:638-647 (1978).
15. Evans, D.G., Evans D.J. Jr., S. Clegg and J.A. Pauley. "Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *E. coli*". *Infec Immun* 25:738-748 (1979).
16. Evans, D.J. Jr., D.G. Evans and H.L. DuPont. "Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *E. coli* determined with human, bovine chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose". *Infec Immun* 23(2):336-346 (1979).
17. Ferrier, G.R. "The use of the fluorescent antibody test to detect *E. coli* with K88 and 987P pilus antigens". *Vet Microbiol* 11:197-201 (1986).
18. Gaastra, W., P. Kleem, J.M. Walker and F.K. De graaf. "K88 fimbrial protein: amino and carboxyl terminal sequence of intact proteins and cyanogen bromide fragments". *FEMS Microbiol Lett* 12:41-46 (1981).
19. Gaastra, W. and Frits K. De graaf. "Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *E. coli* strains". *Microbiol Rev* 46(2):129-161 (1982).
20. Gibbons, R.A., G.W. Jones and R. Sellwood. "An attempt to identify the intestinal receptor for the K88 adhesin by means of haemagglutination inhibition test using glycoproteins and fractions from sow colostrum". *J Gen Microbiol* 86:228-240.
21. Guinée, P.A.M. and W.H. Jansen. "Behavior of *E. coli* k antigens K88ab, K88ac and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and hemagglutination". *Infec Immun* 23:700-705 (1979).

22. Gyles, C.L. "Discussion: heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from E. coli strains enteropathogenic for pigs". Ann NY Acad Sci 176:314-322 (1971).
23. Gyles, C.L., M. So and S. Falkow. "The enterotoxin plasmids of E. coli". J Infec Dis 130:40-49 (1974).
24. Hudson, L. and F.C. Hay. PRACTICAL IMMUNOLOGY. Second Edition Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, pag.2, 10 (1980).
25. Issacson, R.E. "K99 surface antigen of E. coli: purification and partial characterization". Infec Immun 15(1):272-279 (1977).
26. Issacson, R.E., B. Nagy and J.H.W. Moon. "Colonization of porcine small intestine by E. coli: colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88". J Infec Dis 135:531-539 (1977).
27. Jones, G.W. and J.M. Rutter. "Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by E. coli in piglets". Infec Immun 6(6):918-927 (1972).
28. Jones, G.W., Ph.D. and J.M. Rutter, B.V.M.S., Ph. D. "Contribution of the K88 antigen of E. coli to enteropathogenicity: protection against disease by neutralizing the adhesive properties of K88 antigen". Am J Clin Nutr 27:1441-1449 (1974).
29. Jones, G.W. and J.M. Rutter. "The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of E. coli". J Gen Microbiol 84:135-144 (1974).
30. Jungh, A.L., A. Paris and T. Wadstrom. "Hemagglutination by E. coli in septicemia and urinary tract infections". J Clin Microbiol 10(4):447-481 (1979).
31. Kabat, E. IMMUNOQUIMICA EXPERIMENTAL. Prensa Médica Mexicana. México (1986).
32. Kearns, M.J. and R.A. Gibbons. "The possible nature of the pig intestinal receptor for the K88 antigen of E. coli". FEMS Microbiol Lett 6:165-168 (1979).

33. Kehoe, M., R. Sellwood, P. Shipley and D. Gordon. "Genetic analysis of K88 mediated adhesion of enterotoxigenic E. coli". *Nature* 291:122-126 (1981).
34. Kehoe, M., M. Winther and G. Dougan. "Expresion of a cloned K88adhesion antigen determinant: identification of a new adhesion cistron and role of a vector-encoded promotor". *J Bacteriol* 155(3):1071-1077 (1983).
35. Klemm, P. "The complete aminoacid sequence of the K88 antigen a fimbrial protein from E. coli". *Eur J Biochem* 117:617-627 (1981).
36. Klobasa, F., Butler, J.E., E. Werhahn and F. Habe. "Maternal-neonatal immunoregulation in swine". *Vet Immun Immunopathol* 11:149-159 (1986).
37. Lennette, E.H.
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
Third Edition.
American Society for Microbiology.
Washintong, D.C. (1980).
38. Lindahl, M., A. Paris, T. Wadstrom and S. Hjerten. "A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells". *Biochim Biophys Acta* 667:471-476 (1981).
39. Linggood, M.A., M.L. Ellis and P. Porter. "An examination of the D and K specificity involved in the antibody induced loss of the K88 plasmid from porcine enteropathogenic strains of E. coli". *Immunol* 38:123-127 (1979).
40. Linggood, M.A. and P. Porter. "Antibody induced elimination of the plasmid controlled K88 adhesion factor from a porcine enteropathogen". *Immunol* 35:125-127 (1978).
41. Mooi, F.R. and F.K. De Graaf. "Isolation and characterization of K88 antigens". *FEMS Microbiol Lett* 5:17-20 (1979).
42. Mooi, F.R., F.K. De Graaf and J.D. A. Van Endent. "Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen". *Nucleic Acid Res* 6:849-865 (1979).
43. Mooi, F.R., N. Harms, D. Bakker and Frits K. De Graaf. "Organization and exprsion of genes involved in the production of the K88ab antigen". *Infec Immun* 32(3): 1155-1163 (1981).

44. Mooi, F.R., C. Wouters, A. Wijfjes and Frits K. De Graaf. "Construction and characterization of mutants impaired in the biosynthesis of the K88ab antigen". *J Bacteriol* 150(2):512-521 (1982).
45. Mooi, F.R., M. Van Buuren, G. Koopman, B. Roosendaal and Frits K. De Graaf. "K88ab gene of *E. coli* encodes a fimbrial-like protein distinct from the K88ab fimbrial adhesin". *J Bacteriol* 159(2):482-487 (1984).
46. Moon, H.W. and F.P. Whipp. "Development of persistence with age by swine intestine to effect of enteropathogenic *E. coli*". *J Infec Dis* 122:215-223 (1970).
47. Morgenhagen, S.E.
MOLECULAR BASIS OF ORAL MICROBIAL ADHESION.
Third Edition.
American Society for Microbiology.
Pag. 7-13 U.S.A. (1985).
48. Myron, M.L. "*E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent". *J Inf Dis* 155(3):377-389 (1987).
49. Nagy, B., H.W. Moon and R.E. Issacson. "Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *E. coli*: selection of piliated forms *in vivo*, adhesion of piliated forms to epithelial cells *in vitro* and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*". *Infec Immun* 16(1):334-352 (1977).
50. Nagy, B., H.W. Moon, R.E. Isaacson, C.C. to and C.C. Briton. "Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *E. coli* infection by vaccinating dams with purified pili". *Infec Immun* 21(1):269-274 (1978)
51. Nagy, L.K., T. Mackenzie and K.R. Painter. "Protection of the nursing pig against experimentally induced enteric colibacillosis by vaccination of dam with fimbrial antigens of *E. coli* K88, K99 and 987P". *Vet Rec* 117:408-413 (1985).
52. Nagy, L.K., T. Mackenzie, D.J. Pickard and G. Dougan. "Effects of immune colostrum on the expression of a K88 plasmid encoded determinant: role of plasmid stability and influence of phenotypic expression of K88 fimbriae". *J Gen Microbiol* 132:2497-2503 (1986).

53. Neidhardt, F.C.
E. coli and S. typhimurium. CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY.
 American Society for Microbiology.
 Vol 1, pag. B4-90 U.S.A. (1987).
54. Dudega, B., Frits R. Mooi and Frits K. De Graaf. "Excretion of proteins by Gram-negative bacteria: export of bacteriocins and fimbrial proteins by E. coli". *Antonie Van Leeuwenhoek* 50:569-584 (1984).
55. Parry, S.H. and P. Porter. "Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic E. coli". *Immunology* 34:41-49 (1978).
56. Porter, P. and M.A. Linggood. "Novel mucosal anti-microbial functions interfering with the plasmid mediated virulence determinants of adherence and drug resistance". *Ann N Y Academy Sci* 409:564-579 (1983).
57. Reissig, J.L.
 RECEPTORS AND RECOGNITION.
 Chapman and Hall.
 Serie B vol. 3, pag.141-167 London (1977).
58. Rutter, J.M., M.R. Burrows, R. Bellwood and R.A. Gibbons. "A genetic basis for resistance to enteric disease caused by E. coli". *Nature* 257:135-136 (1975).
59. Rutter, J.M., G.M. Jones, G.T.H. Brown, M.R. Burrows and P.D. Lutter. "Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K88-positive E. coli". *Infec Immun* 13:667-676 (1976).
60. Salisbury, V., R.W. Hedges and Naomi Datta. "Two modes of curing transmissible bacterial plasmids". *J Gen Microbiol* 70:443-452 (1972).
61. Salit, I.E. and E.C. Gotschlich. "Hemagglutination by purified type I E. coli pili". *J Exp Med* 146:1169-1181 (1977).
62. Sedlock, D.M., H.F. Bartus, I. Zajac and Paul Actor. "Use of a hemadsorption technique to evaluate the stability of the hemagglutination reaction of E. coli cultures possessing human colonization factor antigens". *J Clin Microbiol* 15(4):554-557 (1982).

63. Sellwood, R., R.A. Gibbons, G.W. Jones and J.M. Rutter. "Adhesion of enteropathogenic E. coli to pig intestinal brush borders: The existence of two pig phenotypes". J Med Microbiol 8:405-411 (1975).
64. Shipley, P.L., C.L. Gyles and Stanley Falkow. "Characterization of plasmid that encode for the K88 colonization antigen". Infect Immun 20(2):559-566 (1978)
65. Silverblatt, F.J., J.S. Dreyer and Susan Schaver. "Effect of pili on susceptibility of E. coli to phagocytosis". Infect Immun 24(1):218-223 (1979).
66. Smyth, C.J. Per Jonsson, Eva Olsson, Olof Soderlind, Jan Rosengren, Stellan Hjerten and Torstedt Modstrom. "Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic E. coli with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography". Infect Immun 22(2):462-472 (1978).
67. Smith, H.M. and M.A. Linggood. "Further observations on E. coli enterotoxins with particular regard to those produce by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains". J Med Microbiol 5:243-250 (1972).
68. Soderlind, O. and R. Mollby. "Enterotoxins, O groups and K88 antigen in E. coli from neonatal piglets with and without diarrhea". Infect Immun 24(3):611-616 (1979).
69. Stirm, S., I. Orskov and F. Orskow. "K88, an episome determined protein antigen of E. coli". Nature 209:507-508 (1966).
70. To S.C.M., H.W. Moon and P.L. Runnels. "Type I pili (F1) of porcine enterotoxigenic E. coli: vaccine trial test for production in the small intestine during disease". Infect Immun 43(1):1-5 (1984).
71. Van Doorn Joop, Bauke Oudega, Frits R. Mooi and Frits K. De Graaf. "Subcellular localization of polypeptides involved in the biosynthesis of K88ab fimbriae". FEMS Microbiol Lett 13:99-104 (1982).
72. Williams & Wilkies.
 BERGEYS MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.
 8th Edition.
 Sans Tache.
 Pag. 420-423 Baltimore/London (1984).