

82-
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ANTIGENO K99 ADHESINA DE E. COLI

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

LAURA MARTINEZ ORTIGOZA



1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

<u>RESUMEN.</u>	
<u>OBJETIVOS.</u>	
<u>JUSTIFICACION.</u>	
<u>INTRODUCCION.</u>	
I. <u>ESCHERICHIA COLI.</u>	pág.
a. Características morfológicas y coloniales.	1
b. Clasificación de <u>E.coli</u> por su efecto clínico.	3
II. <u>MECANISMOS DE ADHESION.</u>	7
III. <u>ADHESINAS FIMBRIALES HUESPED ESPECIFICAS.</u>	9
a. Ocurrencia	9
b. Composición Química y Estructura.	9
c. Algunas propiedades biológicas.	11
IV. <u>PAPEL DE LAS ADHESINAS EN LA COLONIZACION DEL EPITELIO INTESTINAL.</u>	12
V. <u>EL ANTIGENO K99.</u>	14
a. Estructura y Composición Química.	14
b. Ocurrencia.	16
c. Hemaglutinación.	16
d. Producción.	17
e. Papel de la membrana membrana celular en la expresión de K99.	19
f. Inmunidad.	20
<u>ESQUEMA DE TRABAJO.</u>	21
<u>METODOLOGIA.</u>	22
I. Producción y Aislamiento del Antígeno K99.	22
II. Purificación del Antígeno K99.	23
III. Determinación de proteínas.	23

IV. Hemaglutinación	23
V. Producción de anticuerpos anti-K99.	24
VI. Titulación del suero anti-K99.	25
VII. Extracción de plásmidos.	26
VIII. Electroforesis en geles de agarosa.	27
IX. Efecto de los anticuerpos específicos en - la expresión del plásmido K99.	27
<u>RESULTADOS.</u>	29
<u>DISCUSION.</u>	35
<u>CONCLUSIONES.</u>	37
<u>APENDICE DE REACTIVOS.</u>	38
<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	42

RESUMEN

Las interacciones específicas entre las bacterias y las células eucariotas dependen de la habilidad de los procariotes para producir sustancias que permitan su adhesión a la célula huésped.

En 1977 Jones (41), describe una terminología que define cada una de estas sustancias u organelos de adhesión:

- Fimbrias: son filamentos no flagelares que se encuentran en la superficie bacteriana y que se conocen como organelos de adhesión bacteriana.
- Pilis: son estructuras que transmiten información genética.
- Fibras: son estructuras o filamentos de forma y estructura química irregular con puntos indiscretos de origen en la superficie bacteriana.
- Adhesinas; se refiere a cualquier sustancia que facilite el ataque bacteriano a una superficie.
- Hemaglutinina: es una adhesina especial que causa aglutinación de eritrocitos.

La importancia de la adhesión a diferentes superficies y en especial a superficies celulares por las bacterias, radica en que los organismos patógenos tienen que competir con los organismos de la flora habitual para colonizar el órgano huésped y una manera efectiva de hacerlo es mediante los organelos de adhesión; de aquí también la importancia que ha tenido desde la década pasada el estudio de los mecanismos de adhesión bacteriana y su papel en la patogénesis de las enfermedades.

Se han identificado organelos de adhesión en varios microorganismos, como son la mayoría de la familia Enterobacteriaceae, también en los géneros Vibrio, Neisseria, Bordetella, Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Corynebacterium, y Mycoplasma, entre otros.

Las ventajas que provee la asociación bacteria-célula huésped, a la célula bacteriana, son: nutrirse de los fluidos que secreta la célula huésped (Zo -

Bell, 1972), utilización de productos extracelulares, de enzimas celulares y de los componentes de la superficie celular, fuentes de sustrato adicional. Además en el caso de bacterias que colonizan la mucosa intestinal, una bacteria que posee adhesinas es capaz de resistir los mecanismos de arrastre de la peristalsis (30).

Los mecanismos de adhesión bacteriana a células animales más estudiados, son los de las enfermedades diarreicas, producidas por cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli y las de infecciones urinarias provocadas por la misma bacteria. En estos casos la colonización está facilitada por la adhesión a la mucosa mediante fimbrias huésped específicas, cuya composición química es en su mayoría proteínica (100 ó más subunidades idénticas de pilina); son estructuras filamentosas o peludas, no flagelares que pueden apreciarse por microscopía electrónica y que tienen su origen en la membrana citoplasmática de la bacteria.

La producción de estas fimbrias, depende de factores como, las condiciones de cultivo de la bacteria, la composición química del medio de cultivo, el grado de aereación, la temperatura y el tiempo de incubación.

Por su naturaleza proteínica las adhesinas fimbriales son antigénicas, lo cual permite su identificación mediante ensayos serológicos.

Además tienen la peculiaridad de causar aglutinación de eritrocitos de diferentes especies en presencia de D-manosa, uniéndose a residuos de azúcares de las glucoproteínas de la superficie de las células eucarióticas (29).

Se ha reportado que existen diferentes fimbrias, dependiendo de la especie que alberga a la cepa de Escherichia coli enterotoxigénica, por ejemplo; en 1961, se describió el antígeno K88 aislado del intestino de porcinos y posteriormente se reportó que cepas que tienen el antígeno K88 tienen también otra fimbria designada como 987P (1).

Evans (1978) describió una fimbria de origen humano y la llamó CFA/I, posteriormente por métodos inmunoquímicos describió otra a la que llamó CFA/II. En 1972 se reportó un antígeno común de cepas enterotoxigénicas de cabras y corderos, al cual se designó como K99 (Smith y Linggood).

La producción de fimbrias, así como de enterotoxinas (termolábil y termolábil y termolábil) en las cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli asociadas con diarrea animal o humana está controlada por plásmidos transmisibles. En la mayoría de las cepas porcinas, bovinas y humanas la producción de fimbrias y enterotoxinas parece estar codificada por un plásmido sencillo (1).

Hasta ahora los estudios respectivos a las fimbrias huésped específicas se han enfocado a la producción de las mismas y la inducción de posible inmunidad para la prevención de cuadros diarréicos. Sin embargo, se ignora la posible participación de esta respuesta inmune sobre la expresión de la fimbria K99, a nivel genético.

OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo fue establecer si los anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno fimbrial K99 afectan de alguna manera la expresión de dicho antígeno.

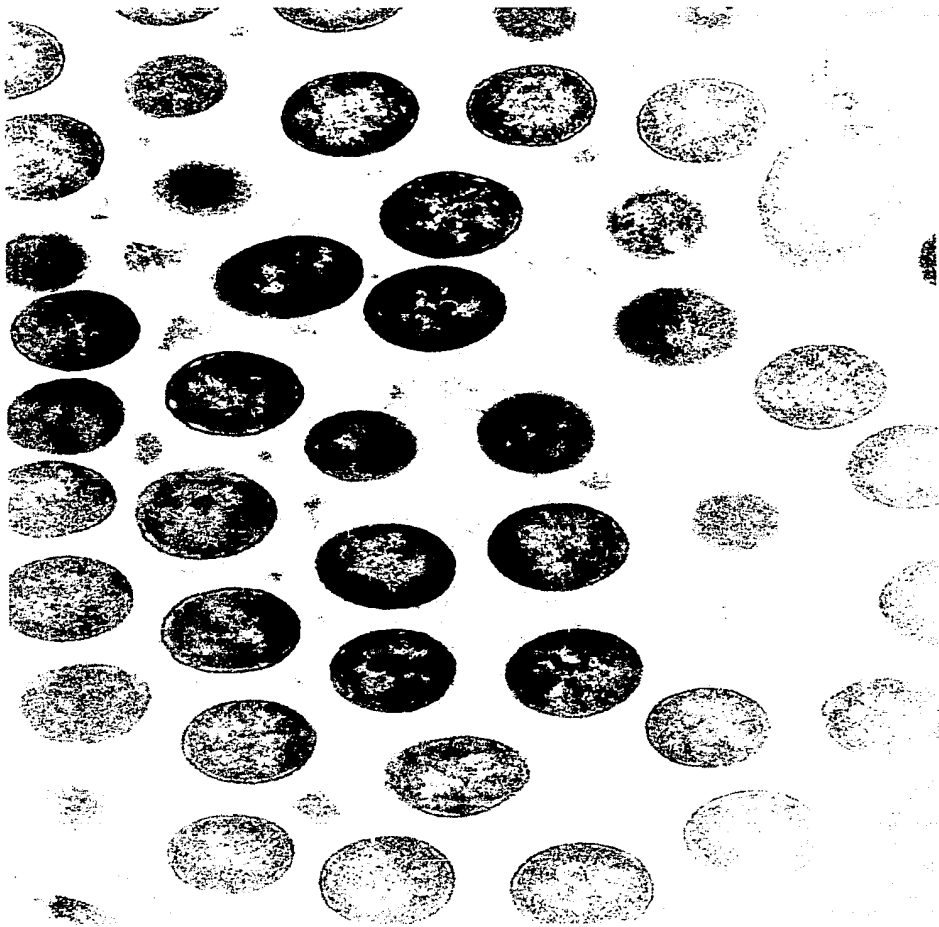
Para ello hubo que alcanzar primero los siguientes objetivos particulares:

1. Producir, aislar y purificar el antígeno K99 de Escherichia coli.
2. Obtener anticuerpos anti-K99, mediante la inoculación de cobayos con el antígeno purificado.
3. Comprobar la identidad del antígeno K99, mediante una reacción antígeno-anticuerpo.
4. Realizar electroforesis en geles de agarosa, para comprobar la presencia del plásmido de la bacteria K99.
5. Realizar electroforesis en geles de agarosa, para observar el efecto de los anticuerpos anti-K99 sobre la expresión del plásmido de la cepa K99.

JUSTIFICACION

El presente trabajo pretende dar evidencia de la presencia de fimbrias denominadas K99 en Escherichia coli, y con ello hacer un breve bosquejo de la funcionalidad que dichos organelos tienen en la patogénesis de cuadros diarréicos principalmente.

Debido a la incidencia en el aislamiento de cepas de Escherichia coli K99 como agentes patógenos relacionados con diarrea en bovinos neonatos, la importancia del estudio de los factores que intervienen en la producción de la enfermedad, de los factores que influyen en la producción de la fimbria K99 y sobre todo el estudio de los mecanismos que afectan la expresión de la fimbria, radica en abrir nuevas rutas de investigación que comprendan el uso de los antígenos bacterianos adecuados, para lograr la estimulación de una respuesta inmune específica y en realidad protectora que facilite la prevención de cuadros diarréicos.



Escherichia coli K99.

(Cortesía de la sección de Microscopía Electrónica del Departamento de -
Ecología Humana de la Facultad de Medicina UNAM).

INTRODUCCION

I. ESCHERICHIA COLI.

a. Características morfológicas y coloniales.

Son bacilos rectos gramnegativos, que miden 1.1-1.5 μ m x 2.0-6.0 μ m, se presentan solos o en pares. Algunas cepas tienen cápsulas o microcápsulas, especialmente aquellas aisladas de sitios extraintestinales. Son móviles mediante flagelos peritricos.

No son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales, cualquier medio de agar sirve para su aislamiento; y para su aislamiento diferencial los medios contienen generalmente inhibidores parciales o totales de otras bacterias que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (inhibidores como: tetracionato, deoxicolato, sales biliares, etc.).

La temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C.

Las colonias en agar nutritivo pueden ser lisas (S) o rugosas (R), dependiendo del tipo de lipopolisacárido (LPS) o de la membrana externa. Las formas S, que crecen usualmente como colonias planas, convexas, grises húmedas de superficie brillante y bordes enteros, fácilmente dispersables en solución salina y muestran turbidez en medio líquido, han desarrollado cadenas laterales de polisacárido; mientras que las formas R, que mostrarán colonias secas rugosas, difíciles de dispersar en solución salina y que aglutinan espontáneamente en medio líquido, tienen pérdida de sus cadenas polisacáridas laterales por mutación.

Son microorganismos facultativos, con ambos tipos de metabolismo: respiratorio y fermentativo.

Fermentan glucosa y otros carbohidratos con producción de gas y piruvato que después es convertido en ácidos láctico, acético, y fórmico; parte de

éste último es degradado por un complejo enzimático hidrogenilasa en cantidades iguales de CO_2 y H_2 . Algunas cepas son anaerogénicas. La mayoría de las cepas fermentan lactosa, pero en algunas la fermentación puede ser tardía.

Son quimiorganótrofos, oxidasa negativos, pueden utilizar acetato como única fuente de carbono, pero no el citrato ni la urea, producen indol.

Además de los flagelos proteináceos que les dan movilidad, la mayoría de las cepas poseen fimbrias (pilis, adhesinas, proteínas fibrilares), que se extienden en gran número sobre la superficie bacteriana. Tienen un diámetro de 5-9nm. Algunas fimbrias tienen funciones específicas como órganos adhesivos. Se han descrito dos variedades principales, basadas en su actividad hemaglutinante:

- Fimbrias tipo I; caracterizadas porque su actividad hemaglutinante, se inhibe por manósidos (manosa sensible).
- Fimbrias de otra variedad; cuya actividad hemaglutinante no se inhibe por manosa (manosa resistente).

Algunas cepas de Escherichia coli producen enterotoxinas y se han estudiado bien dos de éstas: la toxina termolábil (LT), que es muy semejante a la cóleratoxina, y la toxina termoestable (ST). Ambas se encuentran solas o juntas en las cepas de Escherichia coli enterotoxigénicas (ECET) y a menudo se asocian con un número limitado de serovariedades O:K:H y grupos O. Las cepas ECET tienen frecuentemente fimbria manosa resistente.

La subdivisión de especies de Escherichia coli puede realizarse por varios métodos, pero la serología es uno de los más útiles. Este método se basa en las muchas diferencias antigénicas encontradas en las estructuras de la superficie bacteriana. Los antígenos más comunes de Escherichia coli son los O, K Y H.

La terminología "O", se usa para los antígenos somáticos, que son polisacáridos complejos y constituyen parte de la membrana externa. Son ter-

moestables, no se inactivan a temperaturas de 100 a 121°C.

Los antígenos "H" o flagelares, son proteínas y se inactivan a 100°C.

Los antígenos "K", son polisacáridos acídicos que forman una envoltura o cápsula alrededor de la pared celular.

Otro métodos para la subdivisión de especies son: la tipificación por fagos y colicinas, por patrón de proteínas de membrana externa, por patrones de resistencia a antibióticos, hemaglutinación directa, etc.

Los microorganismos colonizan la parte baja del intestino de animales de sangre caliente e inicialmente se designaban como patógenos oportunistas, pero otras investigaciones mostraron que un número bastante limitado de sero variedades también juegan un papel muy importante y específico en enfermedades intestinales y extraintestinales (25).

b. Clasificación de Escherichia coli por su efecto clínico.

Las cepas de Escherichia coli que causan enfermedades entéricas pueden clasificarse en base a sus diferentes propiedades de virulencia, interacciones con la mucosa intestinal, síndromes clínicos y serotipos O:H, de la siguiente manera:

ECEI (Enteroinvasivas).

Son cepas que causan un síndrome parecido a la disentería causada por Shigella dysenteriae, ya que la capacidad invasiva de ambas depende de la presencia de un plásmido que codifica para la producción de varias proteínas de membrana externa involucradas en la invasividad. ECEI al igual que Shigella no es móvil y no fermenta la lactosa. Además sus antígenos "O" muestran varias reacciones cruzadas.

ECEI invade preferentemente la mucosa del colon.

La enfermedad clínica se caracteriza por fiebre, contracciones abdominales

les severas, toxemia y diarrea acuosa seguida por disentería gruesa consistente de heces escasas de sangre y moco.

ECEP (Enteropatógenas).

Las clásicas cepas ECEP son lógicamente patógenas, pero el mecanismo por el cual causan diarrea todavía se desconoce.

Se ha observado por microscopía electrónica (Polotsky y cols. 1977) que las cepas ECEP causan una lesión histopatológica ultraestructural en el intestino humano. Esta lesión distintiva involucra la destrucción del microvello - por la bacteria sin evidencia de invasión.

La bacteria se une firmemente a la membrana del enterocito, cubriéndose o envolviéndose parcialmente en ésta.

Esta misma lesión ultraestructural también se ha estudiado en cerdos (Monon y cols. 1983).

Otros estudios (Cravioto y cols. 1973) han demostrado que aproximadamente el 80% de las cepas ECEP se adhieren a células Hep-2 en cultivo de tejidos. Esta propiedad es rara en cepas ECET y ECEI o en cepas de flora normal y está dada en cepas ECEP por un factor de adherencia enteropatógena (EAF) que es un plásmido de 60MDa.

Los serotipos ECEP que no poseen el factor EAF no dan adherencia localizada o dan adherencia difusa a células Hep-2, y su patogénesis a nivel molecular todavía no se conoce. Sin embargo, estas cepas EAF-negativas se consideran como una segunda clase de la categoría ECEP.

Algunos autores han reportado que las cepas ECEP elaboran cantidades moderadas de una citotoxina idéntica a la citotoxina de S. dysenteriae tipo 1 y que ésta puede participar en el desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad clínica se caracteriza por fiebre, vómitos y diarrea con gran cantidad de moco, pero sin sangre. La enfermedad por ECEP tiende a ser -

clínicamente más severa que muchas otras enfermedades diarréicas.

ECEH (Enterohemorrágicas).

El término ECEH se refiere a cepas como la O157:H7, que causan un síndrome clásico, notable por la diarrea acuosa y sanguinolenta no acompañada por leucocitosis fecal en pacientes afebriles a diferencia de la disentería clásica por Shigella o ECEI.

Las cepas ECEH elaboran potentes citotoxinas que son activas en células He-La y células Vero. Una de estas toxinas (toxina Shiga-1 o Verotoxina-1) es aparentemente idéntica a la potente citotoxina neuro-enterotóxica producida por Shigella dysenteriae tipo 1; reacciona y es neutralizada por anticuerpos contra la toxina Shiga.

Muchas cepas también elaboran una segunda citotoxina (toxina Shiga-2 o Verotoxina-2), la cual no es neutralizada por anticuerpos contra la toxina Shiga.

Las características patológicas de la infección observadas por microscopía electrónica, muestran el ataque y destrucción de los enterocitos así como el del microvello, como a una lesión semejante a la causada por cepas ECEP. Sin embargo en cerdos la infección por ECEH y ECEP puede diferenciarse claramente por el sitio anatómico involucrado, la severidad de las lesiones y el grado de infiltración de polimorfonucleares. ECEP infecta la entrada del intestino en cerdos, ECEH sólo el colon, las lesiones por ECEP son generalmente menos severas y se ha observado infiltración de leucocitos con ECEP, pero no con ECEH.

ECET (Enterotoxigénicas).

Estas cepas son la segunda clase más importante asociada con diarrea en animales neonatos y en el hombre. Se caracterizan por su habilidad para proli

ferar en el intestino delgado y por la producción de enterotoxinas.

La infección por ECET se adquiere por ingestión de agua o comida contaminada.

La colonización del intestino delgado se dá por adherencia directa a las superficies mucosas, mediante organelos específicos llamados fimbrias (codificadas por plásmidos) con las cuales las células bacterianas se unen a los bordes ciliados de la célula intestinal permitiéndoles superar el mecanismo peristáltico de defensa del intestino delgado. La consecuente producción de enterotoxinas (LT y/o ST) estimula a las células del epitelio intestinal para secretar fluidos en el lumen, lo cual implica un cuadro diarréico con deshidratación.

Es de primordial importancia la presencia de estos factores fimbriales de colonización para el desarrollo de la enfermedad, ya que la capacidad adhesiva de la bacteria está relacionada con el número de fimbrias presentes en la superficie bacteriana de cada cepa, es decir, que la asociación de varios factores fimbriales en una misma cepa, hace más efectiva la colonización del intestino.

II. MECANISMOS DE ADHESION.

El mayor problema que debe superar las células bacterianas para adherirse a las células animales, es la repulsión de cargas que existe entre ambas. Las membranas biológicas, incluyendo las bacterias, tienen generalmente una carga neta negativa y pH ácido, con punto isoeléctrico en la región de pH 3. Esto es el resultado de la ionización de varios grupos químicos de la superficie; en gramnegativos por ejemplo, la fuente de cargas negativas son lipopolisacáridos-ácidos y proteínas de la membrana externa, además de polímeros extracelulares del glicocálix (23,30).

De las muchas descripciones acerca de las interacciones físicoquímicas entre partículas de carga parecida, la teoría DVLO y sus derivaciones han dado las descripciones más convenientes. Esta teoría afirma que, los cuerpos rígidos con cargas parecidas, están sujetos a fuerzas atractivas y repulsivas que son aditivas, pero que varían con la distancia de separación entre los cuerpos. La carga y la forma de los cuerpos son importantes y contribuyen significativamente a las fuerzas de atracción y repulsión.

Hablando de cuerpos planos; a distancias relativamente grandes (10nm), las fuerzas entre estos cuerpos son más de atracción que de repulsión, es decir, están en el mínimo secundario de energía potencial. Sin embargo las fuerzas de atracción a esta distancia son débiles y fácilmente reversibles por el fluido de arrastre, lo cual resulta en una adhesión reversible.

A distancias cortas, aumentan relativamente las fuerzas repulsivas, con respecto a las atractivas. Si las fuerzas de repulsión pueden superarse a distancias muy cortas (1nm), entonces hay una atracción mutua y se habla de un mínimo primario de energía potencial. A esta distancia, la atracción entre los dos cuerpos es fuerte y no fácilmente reversible, de lo cual resulta una adhesión irreversible. Desafortunadamente la bacteria no posee suficiente energía cinética para superar las fuerzas del máximo de energía potencial y por lo tan-

to nunca alcanzará el mínimo primario.

Las fuerzas de atracción y repulsión pueden disminuirse cambiando la forma de los cuerpos. Aumentando la curvatura (disminuyendo el radio) hay una disminución en las fuerzas de atracción y repulsión. De esta manera, los cuerpos curvos están más cercanos al mínimo secundario y requieren menos energía cinética para llegar al mínimo primario, la adhesión de la bacteria de estructura elipsoidal a células con microvellosidades, es energéticamente más favorable comparada con un tejido de configuración plana, ya que el microvello también es curvo. Sin embargo, el efecto de la curvatura, no disminuye las fuerzas repulsivas lo suficiente para permitir que la bacteria alcance el mínimo primario. En un órgano como el intestino delgado, el efecto del fluido de arrastre debido a la peristálsis deberá desalojar a la bacteria resultando en su remoción de la superficie del tejido.

Las estructuras en las células bacterianas pueden acortar la distancia entre éstas y el tejido, manteniendo el mínimo secundario, pues son, generalmente estructuras largas que mantienen a la bacteria a la distancia requerida para que disminuyan las fuerzas repulsivas, y de esto resultará una adhesión irreversible. Tales estructuras deben por necesidad, tener radio relativo muy pequeño con respecto a la célula bacteriana y deberán entrar en contacto con el tejido. Las adhesinas bacterianas, con radios de 1 a 5 nm cumplen este requerimiento y deben ser adhesinas ideales. Debido al pequeño radio de la adhesina, la interacción molecular entre ésta y el tejido, no necesita depender del efecto de carga; aunque tales fuerzas son importantes. A nivel molecular, la distribución de carga es menos importante que la carga total de las estructuras (23).

III. ADHESINAS FIMBRIALES HUESPED ESPECIFICAS.

Se sabe que en la patogénesis de las enfermedades diarreicas producidas -- por bacterias, como en el caso de Escherichia coli, el proceso de adhesión tiene gran importancia, ya que de ello depende la colonización del intestino delgado y la producción de cuadros diarreicos.

a. Ocurrencia.

La adhesión de estas bacterias a la célula huésped se ve facilitada por organelos de superficie llamados adhesinas fimbriales y la presencia de estos huéspedes específicos está relacionada con un número relativamente pequeño de serogrupos "O" (21), como se enlista a continuación:

<u>Adhesina</u>	<u>Origen</u>	<u>Serogrupo O</u>
K88	Cerdo	08,045,0138,0141 0147,0149,0157.
987P	Cerdo	09,020,0141.
K99	Cerdo,Cabra	08,09,020,0101.
K99	Cerdo	064,0101.
F41	Cabra	09,0101.
CFA/I	Humano	015,025,063,078.
CFA/II	Humano	06,08.

b. Composición Química y Estructura.

Las adhesinas fimbriales son polímeros de subunidades idénticas de proteína, llamadas pilina (aunque en algunas fimbrias se han encontrado sustituyentes no aminoácidos)(23).

El número de subunidades define el peso molecular y la longitud de la fimbria. Los datos obtenidos del análisis de aminoácidos y de la determinación de

la secuencia amino terminal, muestran que una molécula de estas contiene aproximadamente 160 residuos de aminoácidos entre los cuales hay una gran proporción de cadenas no polares (50%) y pocos grupos básicos, lo cual, da a la fimbria ca características acídicas y extremadamente hidrofóbicas.

Una subunidad sencilla también contiene dos residuos de cisteína los cuales parecen formar una unión por puentes disulfuro (24).

No se conocen todavía las fuerzas que mantienen unidas a estas subunidades, pero no incluyen uniones covalentes intrapilina. Sin embargo parece ser que en algunas fimbrias son esenciales las uniones disulfuro intrapilina, pues estas fimbrias adquieren tres diferentes conformaciones estructurales que dependen de la integridad de la unión S-S y que pueden por lo tanto afectar la funcionalidad adhesiva, de ensamblaje o antigénica (23).

La morfología de estas estructuras filamentosas se aprecia solo por microcopia electrónica, y en la mayoría de las bacterias gramnegativas se encuentran distribuidas en forma peritrica y el número de fimbrias por célula depende del microorganismo y las condiciones de crecimiento (temperatura y composición del medio de cultivo); no se producen a 18°C y los medios nutritivos comerciales no son eficaces para la producción.

Solo se han reportado estudios amplios sobre los factores que afectan la producción, del antígeno K99 y 987P. De otras adhesinas se sabe muy poco acerca de esto, por ejemplo; para el antígeno K88 solo se ha descrito la influencia de la temperatura y para el CFA/I se han descrito algunos medios de cultivo óptimos.

Todo esto es consecuencia de un mecanismo de regulación que determina el número y/o la longitud de fimbrias por célula y que es independiente de la variación de fase a la que están sujetas las fimbrias tipo I (1); este mecanismo se llama variación cuantitativa y el ejemplo más ampliamente estudiado sobre esta corresponde al antígeno K99, al cual se hará referencia más adelante.

c. Algunas Propiedades Biológicas.

Su naturaleza protéica confiere a las adhesinas fimbriales huésped específicas, propiedades antigénicas que han sido de gran ayuda en la detección de estos organelos por pruebas inmunológicas como son la aglutinación, precipitación, ELISA, etc.

Debido también a dicha antigenicidad, es posible que el huésped que alberga a microorganismos fimbriados, active sus mecanismos de defensa contra ellos inhibiendo la adhesión bacteriana mediante anticuerpos específicos, ya sea por síntesis local vía sistema inmune secretorio intestinal o por vía materna a través del calostro y la leche (21).

Las adhesinas fimbriales tienen además propiedades hemaglutinantes que despertaron el interés de los investigadores, precisamente por su asociación con la presencia de antígenos particulares "k", adhesivos para el epitelio intestinal de humanos, cerdos y vacas.

En 1955 Duguid probó actividad hemaglutinante de varias cepas de Escherichia coli y encontró tres grupos (I,II,III) de cepas con diferentes patrones de actividad hemaglutinante contra eritrocitos de diferentes especies animales y cuatro grupos de cepas no aglutinantes y las clasificó de la siguiente manera:

Todas las cepas del grupo I que aglutinan la mayoría de especies de eritrocitos probados a temperaturas entre 0-5°C, que desarrollan mejor en la fase estacionaria del crecimiento y en medio líquido y cuya actividad hemaglutinante se inhibe totalmente por la presencia de 0.5% de D-manosa o metilmanósidos, son designadas como manosa sensibles (MS), y a éstas pertenecen las fimbrias tipo I.

Las cepas de los grupos que muestran diferentes patrones de hemaglutinación a temperaturas de 3-5°C preferentemente, que desarrollan mejor en cultivos de agar a 37°C y cuya actividad hemaglutinante no se afecta por la presencia de D-manosa, pero sí por temperaturas elevadas, son designadas como manosa resistentes eluyentes (MRE) y son las fimbrias huésped específicas.

IV. PAPEL DE LAS ADHESINAS EN LA COLONIZACION DEL EPITELIO INTESTINAL.

Se ha propuesto que las adhesinas bacterianas interactúan específicamente con sustancias receptoras localizadas en el hábitat de la bacteria. De este modo la adhesión de bacterias a receptores específicos, en la mucosa del intestino delgado no solamente las habilita para resistir la peristalsis, sino que, también asegura que se localicen en un ambiente favorable; lo cual, facilita la so brevencia y la subsecuente colonización del tejido huésped.

Es aparente, sin embargo, que los sitios más probables de adhesión bacteriana y proliferación, son los bordes pilosos de las células epiteliales y la sobrecapa de gel mucoso. Se supone, por lo tanto, que componentes específicos de estos sitios, actúen como receptores para las adhesinas bacterianas.

Los bordes pilosos y la sobrecapa de gel mucoso, constituyen pues, dos ambientes de la superficie del intestino delgado. De éstos, los bordes pilosos son física y químicamente más estables, además de que son los últimos en ser influenciados por cambios en la composición del contenido luminal.

La superficie de los bordes pilosos está cubierta por una capa rica en carbohidratos (glicocálix) similar a la de otras células eucariotes. El glicocálix es sintetizado por la célula, y se compone principalmente de una población heterogénea de glicoproteínas formando una parte integral de la superficie celular.

La bacteria se une probablemente a residuos de azúcar del glicocálix.

La fase inicial de colonización de los bordes pilosos, ocasiona la unión de la adhesina posiblemente por la interacción de receptores con una o más de las subunidades del filamento bacteriano. Consecuentemente la bacteria se une a la superficie y posteriormente prolifera.

El ambiente del moco epitelial, es probablemente desfavorable porque remueve partículas inertes de la superficie epitelial y remueve también bacterias de la mucosa; el moco intestinal contiene además receptores para adhesinas y por lo tanto, bacterias pegadas.

Para colonizar la superficie mucosa, parece ser que, el patógeno requiere más que la habilidad potencial para adherirse y para utilizar nutrientes. Sin embargo, la ausencia de otras actividades microbianas como son, la habilidad para superar la remoción por secreción de moco y la distribución de receptores — restringen la colonización (30).

V. EL ANTIGENO K99.

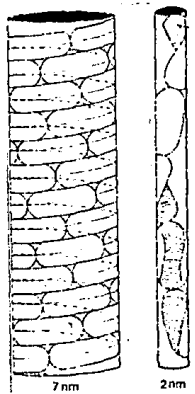
El antígeno K99 es una adhesina encontrada en la mayoría, sino es que en todas las cepas de Escherichia coli enterotoxigénicas que causan diarrea en cabras y en una tercera parte de todas las ETEC que causan diarrea en cerdos. In vivo, K99, promueve la colonización del intestino delgado facilitando la adhesión, por el acercamiento entre la bacteria y el supuesto receptor (9).

a. Estructura y Composición Química.

El antígeno K99 puro, parece estar compuesto principalmente de proteínas; menos del 0.6% de carbohidratos y 6.6% de lípidos. Parece ser que está formado por agregados de pequeñas subunidades de pilina (5).

Morfológicamente parece ser flexible, y, debido a esta morfología es muy difícil de visualizar en las células bacterianas. A menudo, las bacterias K99 parecen tener una superficie peluda (23). La estructura flexible está dada por el número de subunidades que forman la estructura helicoidal (por, ejemplo, en K99 son más numerosas que en el tipo I).

Representación esquemática de la fimbria tipo I (izquierda) y del antígeno K99 (derecha).



El peso molecular de una subunidad es de 19 500 D. Aunque en 1977 Isaacson reportó inicialmente que el antígeno K99 era un polímero proteínico compuesto - de subunidades de dos diferentes pesos moleculares (22 500 y 29 500 D respectivamente) ; posteriormente en 1981, el mismo Isaacson explica esta diferencia de pesos moleculares, de la siguiente manera:

Las subunidades de K99 contienen una intercadena sencilla de puentes disulfuro, dos residuos de cisteína, que se rompe por un tratamiento con 2-mercaptoetanol y que se regenera si éste se elimina. Entonces las subunidades pueden adquirir una o dos conformaciones que parecen tener diferentes pesos moleculares, dependiendo de la conformación que adquiera la unión disulfuro.

Una tercera conformación ocurre cuando la unión disulfuro no se rompe con 2-mercaptoetanol (9,5).

Su punto isoeléctrico es de 10.1 (5); esto es una excepción pues la mayoría de las adhesinas tienen puntos isoeléctricos en el rango de pH 3.7 a 5.6 y por lo tanto, carga negativa (tabla No.1); esta propiedad hace al antígeno K99 una adhesina particularmente útil, pues las Escherichia coli K99 se adhieren totalmente a las células del epitelio intestinal, en base, a la interacción de cargas. Aunque se presume que existen receptores específicos para K99 en la superficie intestinal; la interacción de carga entre K99 y la célula blanco incrementará la estabilidad de la capa bacteriana y con esto la probabilidad del ataque irreversible permanente.

TABLA No.1

Algunas características de adhesinas de cepas ECET.

<u>ADHESINA</u>	<u>DIAMETRO</u>	<u>P.M. DE LA UNIDAD</u>	<u>pI</u>
K88	2.1	27 540	4.2
987P	7	20 000	3.7
K99	4.8	19 500	10.1
F41	3.2	29 500	4.6
CFA/I	3.2	15 058	4.8
CFA/II	3.2	13 000	-

b. Ocurrencia.

La producción del antígeno K99 parece estar relacionada con el antígeno O, portado por la cepa.

Cepas de Escherichia coli aisladas de cabras o corderos con diarrea portaron los serogrupos O8, O9, O101 y O20 (17). Myers y Guineé (22) reportaron la serotipificación de 35 cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli aisladas de cabras en los Estados Unidos; los serotipos detectados fueron: O8:K25, O8:K85, -- O20:K7, O101:K30. Posteriormente Guineé y Jansen (1979) describieron los siguientes serogrupos de 74 cepas aisladas de bovinos; O8(16%), O9(27%), O20(3%) y - O101(54%), (23).

Otros reportes confirman la frecuente asociación de la producción de K99 - con grupos O8, O9, O20 y O101.

El antígeno K99 parece ocurrir también entre cepas porcinas de los serogrupos O64 y O101 y ocasionalmente en el O9. Estos datos indican que aunque K99 - también facilita la adhesión y colonización del intestino en cerdos, no todas - las cepas enterotoxigénicas K99 son hábiles para hacerlo.

Por lo tanto, la ocurrencia del antígeno K99 parece estar restringida a cepas bovinas, porcinas y ovinas.

c. Hemaglutinación.

Los reportes relacionados con la actividad hemaglutinante del antígeno K99, indican que se trata de una adhesina manosa resistente, pues dicha actividad se manifiesta cuando la bacteria crece a 35°C y el ensayo de hemaglutinación se realiza a 4°C, en presencia de 0.5% de D-manosa. Esta actividad se inhibe si el antígeno se calienta a 100°C, durante 15 minutos (29).

La naturaleza hemaglutinante, así como, adhesiva del antígeno K99, se ha demostrado por transferencia de este plásmido K99 a una cepa recipiente K99 negativa; la transferencia de este plásmido confiere ambas propiedades a la cepa-receptora (37).

Existen diferencias de actividad hemaglutinante cuando el antígeno está todavía unido a la bacteria y cuando está puro o libre de células; las diferencias son las siguientes:

<u>Bacteria K99</u>	<u>K99 puro</u>
- Aglutina eritrocitos de cobayo, oveja y humano tipo O (Orsov y cols., Tixier y Govet (1975), Burrows y cols.(1976), Morris y cols.(1978)).	- Aglutina eritrocitos de caballo y oveja pero no de cobayo (Isaacson, De Graaf(1981)).
	- Aglutina eritrocitos de cobayo y oveja (Morris y cols.(1978)).

Los reportes de Isaacson y De Graaf sugieren que las preparaciones utilizadas por Morris y cols., contenían una adhesina adicional no idéntica al antígeno K99; y que es designada como F41, la cual está presente en cepas que tienen serogrupos O9 y O101 (1).

d. Producción.

Los estudios que conciernen a la producción de K99 se han intensificado -- debido a la dificultad que presenta la detección del mismo (principalmente por aglutinación en placa) en cepas crecidas en un medio de cultivo comercial común donde la producción de antígenos capsulares K enmascara al antígeno K99 (1).

Hasta ahora se sabe que los factores que influyen en la producción del antígeno K99 son: aereación, presencia de glucosa, L-alanina, AMPc y temperatura de incubación (3,27,28).

Estudios realizados por Guineé y cols.(15), determinaron que la producción de K99 se ve favorecida en un medio semisintético (medio Minca) que contiene mg nos aminoácidos y carbohidratos que un medio nutritivo comercial común (pues su prime la producción de antígenos capsulares K) y con una temperatura de incubación de 37°C.

En 1980 Isaacson demostró que la producción neta de K99 ocurre exclusivamente durante la fase logarítmica de crecimiento y declina en la fase estacionaria. La expresión de la fimbria parece estar también relacionada con el grado de aereación y la concentración de oxígeno, pues células crecidas en aereación produjeron seis veces más K99 por célula que las células no aereadas. Esta se relaciona con el modelo de colonización intestinal por cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli K99; en el cual se propone que de las células K99 ingeridas por el huésped, una parte de ellas estará en la fase estacionaria del crecimiento y tendrá por lo tanto poco K99, la otra parte de las células estará en la fase logarítmica y tendrá entonces más K99. Estas bacterias ingeridas descienden en el intestino delgado y solo se adherirán al epitelio mucoso aquellas que posean K99; dicha adhesión se verá favorecida por la concentración de oxígeno en esta área, pues se presume que hay mayor concentración de oxígeno en el epitelio que en el lumen. Entonces la colonización del intestino delgado será más intensiva y extensiva por la existencia de células fimbriadas y de futuras células hijas (3).

La glucosa adicionada al medio de crecimiento suprime la producción de la fimbria K99; el grado de supresión se relaciona con el medio basal, es decir, la glucosa en un medio rico como el caldo de soya y tripticaseína suprime altamente la producción; el AMPc disminuye la represión por la glucosa, mientras que en un medio mínimo la glucosa no afecta significativamente la producción.

Otro factor que afecta la biosíntesis de K99, es la L-alanina; células crecidas en un medio que contenga glucosa y L-alanina a una concentración 1mM, se ven afectadas en la síntesis de subunidades. Este efecto puede modularse incluyendo en el medio de cultivo otros aminoácidos como la L-treonina o L-isoleucina (27,28).

Isaacson (1983) concluye que la L-alanina no afecta la regulación genética de síntesis de K99, pero afecta indirectamente a la membrana celular, la cual,

tiene un papel activo en la biosíntesis de K99.

e. Papel de la membrana celular en la expresión de K99.

Estudios realizados por Isaacson (1983), revelan el mecanismo de regulación para la expresión de K99:

La expresión de K99, dice, es un proceso regulado que puede dividirse en dos pasos; síntesis de subunidades y ensamblaje de la fimbria. Aunque ambos procesos pueden acoplarse, no necesariamente son simultáneos.

La fimbria K99 ensamblada aparece en la superficie de Escherichia coli durante la fase logarítmica de crecimiento, pero la síntesis de subunidades K99 ocurre durante el ciclo de vida de la célula. El ensamblaje de subunidades en polímeros de fimbria no requiere síntesis activa de subunidades. Por lo tanto, se concluye que la concentración de subunidades de fimbria en la membrana externa debe ser adecuada para permitir el ensamblaje sin la síntesis simultánea de subunidades.

No se han encontrado subunidades de fimbria en el citoplasma y sí se ha observado que la síntesis de subunidades se inhibe a 18°C, por lo cual se presume que la síntesis ocurre en la membrana interna, y que K99 como proteína de membrana requiere ser transportada de la membrana interna hacia la membrana externa.

A 18°C, la membrana de Escherichia coli está más bien en un estado sólido que líquido y la secuencia de iniciación necesaria para la síntesis de subunidades no puede insertarse en ella o transportarse de membrana interna a espacio periplásmico o membrana externa. puesto que no hay síntesis de subunidades a 18°C y como no se encuentran en el citoplasma a 37°C, se deduce que cualquier iniciación de cadena de síntesis de subunidades de K99, requiere un sitio en la membrana (27).

f. Inmunidad.

Se han publicado varios reportes sobre la inmunización pasiva de becerros recién nacidos contra la colibacilosis producida experimentalmente, aplicando - vacuna a sus madres. Estas vacunas consisten generalmente de: células bacterianas K99 inactivadas con formalina o de fimbria purificada (11,14).

El primer reporte indica la presencia de inmunidad en neonatos hacia cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli vía calostro materno y corresponde a Morgan y cols. (1978).

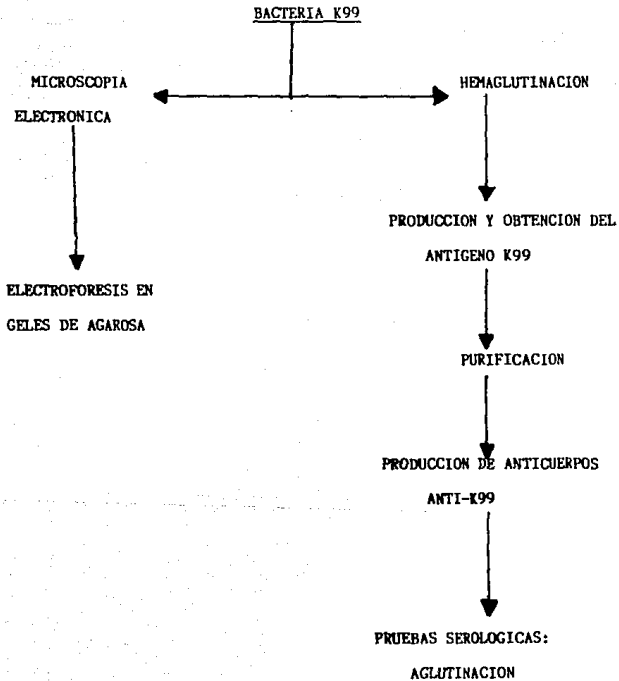
Morgan indujo la formación de anticuerpos, mediante la inoculación parenteral de antígeno K99 purificado y observó que la incidencia, duración y grado de colonización intestinal disminuyeron después de administrar una cepa viable de Escherichia coli K99.

Posteriormente, Isaacson (1979), mostró un incremento en los anticuerpos - anti-K99, tanto en suero, como en calostro de hembras preñadas, después de vacunarlas vía parenteral con antígeno K99 purificado. Un estudio similar, realizado por Morris y cols. (1980) reveló que la vacunación produce altos niveles de anticuerpos K99 en suero y calostro , que estos anticuerpos son predominantemente inmunoglobulina G y que mostraron estar asociados con propiedades antiadhesivas (1).

Todos los datos anteriores apoyan la hipótesis de que el antígeno K99, es un factor de virulencia, y que la inmunidad contra éste previene cuadros diarréicos. Un mecanismo propuesto para esta hipótesis es que los anticuerpos pueden - bloquear la adhesión ya sea inhibiéndola, haciéndola reversible o ambas cosas. Estos anticuerpos pueden también actuar aglutinando u oponizando a la bacteria o inhibiendo otras funciones de la fimbria como son la movilidad y la utilización de oxígeno (14).

Es aparente, por lo tanto, que el uso de vacunas fimbriales puede ser de gran ayuda en la prevención de muchas enfermedades.

ESQUEMA DE TRABAJO



METODOLOGIA

I. Producción y Aislamiento del Antígeno K99.

Fundamento:

Las bacterias están constituidas por un gran número de fracciones antigénicas diferentes; de aquí que puedan utilizarse como antígenos tanto las células-integras o bien sus fracciones aisladas; ya sea antígenos somáticos, flagelares o capsulares, dependiendo del tipo de bacterias. En el presente trabajo se obtuvieron antígenos fimbriales de Escherichia coli, mediante desprendimiento de la célula bacteriana y su posterior recuperación en precipitaciones sucesivas.

Técnica:

Se utilizó una cepa bacteriana de Escherichia coli 8944K99.

Después de tres pases sucesivos en medio Minca (caldo), las células bacterianas crecidas en cuatro litros de medio, a 37°C, durante 18-24 horas con agitación vigorosa, se recolectaron por centrifugación a 17 000xg durante 30 minutos y se resuspendieron en 100ml de PB con NaCl 1.0M.

La extracción del antígeno K99, se llevó a cabo mediante el rompimiento de las células bacterianas con perlas de vidrio y agitación vigorosa durante 30 minutos; se recuperó el sobrenadante después de centrifugar a 17 000xg durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante obtenido se precipitó con sulfato de amonio (10.6g/100ml)- y agitación constante a 4°C. Después de 30 minutos, el material insoluble se separó por centrifugación a 20 000xg durante 10 minutos y el sobrenadante se precipitó con 11.3g/100ml de sulfato de amonio en las mismas condiciones, el material insoluble se recuperó por centrifugación a 20 000xg durante 10 minutos, se resuspendió en PB y se dializó una noche contra PB.

II. Purificación del Antígeno K99.

Fundamento:

La separación de sustancias por resinas de intercambio iónico, se consigue por un mecanismo de adsorción reversible que consiste en la fijación inicial a una resina estabilizada de las sustancias a fijar, seguida de su remoción. Si las sustancias fijadas tienen diferentes propiedades eléctricas, mediante la variación de pH o de la fuerza iónica del eluyente se conseguirá que cada una de ellas eluya por separado. En el presente trabajo la elución se hizo por variación de fuerza iónica.

Técnica:

La muestra dializada se aplicó a una columna con DEAE-Sephadex A-50 (0.5 x 8.0 cm) equilibrada con PB. Se aplicó un gradiente de NaCl (0 a 1.0 M) en PB y la absorbancia de las fracciones eluidas se determinó a 280nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ 3.

III. Cuantificación de Proteínas.

Fundamento:

En el Método de Lowry las proteínas reaccionan inicialmente con los iones-Cu en solución alcalina y posteriormente el complejo Cu-proteína reducirá a los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a un producto colorido con absorbancia máxima a 750nm.

Técnica:

La cuantificación de proteínas en éste trabajo se hizo por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como patrón.

IV. Hemaglutinación.

Fundamento:

Los eritrocitos normales tienen la capacidad de absorber polisacáridos y -

se usan con diversos extractos microbianos crudos o purificados. También pueden adsorber varios antígenos en forma simultánea y pueden tener receptores específicos para diferentes antígenos. En este trabajo se probará la capacidad adhesiva del antígeno K99, ya que los eritrocitos de caballo poseen receptores específicos para éste, y en presencia de D-manosa, se bloquea la posible interferencia por fimbrias tipo I.

Técnica:

Para probar actividad hemaglutinante del antígeno K99 purificado, se utilizaron placas de microdilución en las cuales se trabajaron diluciones dobles consecutivas del antígeno (25 μ l) y se hicieron reaccionar con eritrocitos de caballo al 3% (25 μ l) en presencia de D-manosa al 0.5% (25 μ l); las placas se mantuvieron a 4°C y después de una hora se observó la hemaglutinación.

El ensayo para hemaglutinación de la bacteria completa se realizó en las mismas condiciones pero además con eritrocitos de cobayo.

V. Producción de anticuerpos anti-K99.

Fundamento:

La célula bacteriana comprende un conjunto de materiales antigénicos, cada componente antigénico provoca la formación de un anticuerpo homólogo. En este trabajo se utilizó el antígeno fimbrial K99 purificado para estimular la producción de anticuerpos anti-K99, en cobayos.

Técnica:

Se utilizaron dos cobayos hembra adultos y se inocularon según el siguiente esquema (40):

Día 0.

Inyección subcutánea de 10-100 μ g de K99 con adyuvante completo de Freund - en 4-5 sitios del lomo del animal (0,1ml por sitio).

Día 8.

Inyección subcutánea de 10-50 μ g de K99 con adyuvante incompleto de Freund-

en 4-5 sitios del lomo del animal (0.1ml por sitio).

Día 16.

Inyección intramuscular de 10-50µg de K99 con SSI en las patas traseras - del animal (0.2ml por pata).

Día 24.

Sangría de cosecha.

Se purificó la fracción γ del suero por precipitación con sulfato de amonio y a ésta se le llamó suero anti-K99.

VI. Titulación del suero inmune por aglutinación en placa.

Fundamento:

Al poner en contacto anticuerpos con su antígeno correspondiente, reaccionan con éste formando acúmulos apreciables a simple vista. En este trabajo se utilizaron los anticuerpos anti-K99 y su antígeno correspondiente, bacterias - K99 para cuantificar dichos anticuerpos.

Técnica:

Un cultivo bacteriano de 18 horas se resuspendió en 10ml de SSI y, 50µl - de éste se hicieron reaccionar con suero inmune de cobayo a diferentes diluciones, en una placa de vidrio para observar aglutinación.

Posteriormente se hicieron reaccionar 25µl de fimbria purificada con 25µl de suero inmune y 50µl de bacterias resuspendidas en SSI, en una placa de vidrio para observar inhibición de la aglutinación.

VII. Extracción de plásmidos por lisis alcalina.

Fundamento:

En este método la lisis celular se realiza en dos pasos; la formación del esferoplasto se consigue por digestión con la enzima lisozima en presencia de sacarosa, la cual provee una alta presión osmótica externa, protegiendo al esferoplasto del estallamiento. Para completar la lisis celular se agrega una solu

ción de SDS/NaOH, la cual además de precipitar lípidos y proteínas de membrana proporciona un medio alcalino que provoca la desnaturalización del ADN; el retorno a la neutralidad por la adición de acetato de sodio renaturaliza el ADN del plásmido. La subsecuente centrifugación sirve para remover el ADN cromosomal y los desechos celulares. El ADN del plásmido se precipita con etanol.

Técnica:

Una colonia bacteriana se inoculó en 2ml de caldo Muller-Hinton y se hizo crecer durante 12-16 horas a 37°C con agitación vigorosa; 1ml de este cultivo se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf durante 3 minutos, el paquete celular se resuspendió en 100µl de solución I fresca y fría y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se agregaron 200µl de solución II; el contenido se mezcló por inversión y se colocó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 150µl de solución III, se agitó el tubo en un vortex y se dejó reposar en hielo durante 40 minutos. La muestra se centrifugó durante 20 minutos y 400µl del sobrenadante se separaron en otro tubo para posteriormente agregar 1ml de etanol absoluto frío; las dos soluciones se mezclaron y el tubo se colocó en un baño de hielo seco-etanol hasta lograr una consistencia viscosa. Después de 5 minutos de centrifugación, el botón se homogenizó con 100µl de solución III y 200µl de etanol absoluto frío, el tubo se colocó nuevamente en el baño de hielo seco-etanol hasta lograr viscosidad y enseguida se centrifugó; el botón se lavó con 1ml de etanol absoluto y se dejó secar a cristalización. Finalmente los cristales formados se resuspendieron en 50µl de TE pH 8 + 12µl de verde de bromocresol.

Esta última solución se centrifugó durante 5 minutos antes de realizar la electroforesis en geles de agarosa, utilizando para este fin el líquido sobrenadante.

VIII. Electroforesis en geles de agarosa.

Fundamento:

El método de electroforesis en geles de agarosa, permite separar los componentes de la extracción por lisis alcalina en base a sus pesos moleculares, y - como en la agarosa no se produce el efecto de electroendósmosis, todos los componentes migran hacia el ánodo a pH 8.

Técnica:

Se preparó agarosa a una concentración del 0.7% en amortiguador Tris-Boratos y se disolvió en autoclave a 10lbs de presión durante 5 minutos. Se vació a una placa de acrílico de 12.5 x 8.0cm y se dejó solidificar.

El gel sólido se colocó en la cámara para electroforesis con 200ml de amortiguador Tris-Boratos y en cada pozo del gel se colocaron 25 μ l de muestra tratada por lisis alcalina. Se hizo pasar una corriente de 80volts durante 2 horas, - haciendo dos cambios de amortiguador a los 30 y 60 minutos y al cabo de este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografió utilizando un filtro rojo y película fotográfica Kodak blanco y negro Tri-X-Pan (asa 400), durante 30-40 segundos de exposición. Los geles teñidos se almacenaron a 4°C.

IX. Efecto de los anticuerpos específicos en la expresión del plásmido K99.

Fundamento:

Al hacer crecer suspensiones bacterianas K99, en presencia de anticuerpos anti-K99, se trata de determinar si estos anticuerpos, al reaccionar antigénicamente con las fimbrias bacterianas, afectan la expresión del plásmido que codifica para estas fimbrias.

Técnica:

Un cultivo bacteriano K99 se ajustó a las siguientes concentraciones:

- 300×10^6 bacterias/ml.

- 300 bacterias/ml

Las cuales se hicieron crecer en presencia de suero inmune de cobayo (sue-
ros A y B), usando como control la misma cepa crecida en suero normal de cobayo
(fracción Y) como se indica a continuación:

TABLA No. 1.

POZO No.	SUERO COBAYO	SUSPENSIÓN BACTERIANA	#BACT/ml	SUERO
	(μ l)	(μ l)		
1	150	150	300×10^6	"A"
6	50	150	300	"A"
2	150	150	300×10^6	"B"
5	150	150	300	"B"
3	200	150	300×10^6	NORMAL
4	200	150	300×10^6	NORMAL

Se utilizó la dilución del suero, siguiente a la última dilución que dió -
aglutinación franca.

Después de 24 horas de incubación a 37°C , se realizó un plaqueo en agar -
sangre y después de incubar estas placas a 37°C durante 24 horas, se tomó una -
colonia bacteriana y se procedió a la extracción de plásmidos descrita anterior-
mente.

Estos experimentos se corrieron cada uno por quintuplicado.

RESULTADOS

Para lograr una mayor producción del antígeno K99, se empleó un medio de cultivo que facilitara la expresión de la fimbria y disminuyera la interferencia de los antígenos capsulares bacterianos; este medio de cultivo es el medio Minca y es un medio mínimo que da las condiciones óptimas para este fin.

Durante los ensayos anteriores al empleo de este medio, se utilizó el medio comercial de soya y tripticaseína, efectuando el desarrollo bacteriano a partir de un inóculo base de una asada de bacterias en 2ml de medio de cultivo y aumentando este inóculo cada 18-24 horas a inóculos de 20ml, 200ml, y 200 ml, de modo de obtener un desarrollo abundante. Sin embargo, aunque el desarrollo fue el esperado, no fue posible aislar la fimbria, probablemente por las interferencias antes mencionadas; con el empleo del medio Minca el desarrollo en los inóculos fue el mismo, pero la recuperación del material precipitado con sulfato de amonio aumentó considerablemente y por lo tanto aumentó también la producción de la fimbria.

El antígeno obtenido se hizo pasar através de una columna cromatográfica de intercambio iónico, y de las seis fracciones eluidas con un gradiente de cloruro de sodio de 0M a 1.0M, sólo se encontró actividad hemaglutinante manosa resistente en la fracción I (figura No. 1), las fracciones II a IV aunque muestran en la gráfica picos de alta absorbancia, no presentaron actividad hemaglutinante (tabla No. 2), y probablemente esta alta absorbancia se deba a restos de proteínas celulares no fimbriales que no lograron eliminarse durante la precipitación con sulfato de amonio, por lo tanto el antígeno K99 se concentró sólo en la fracción I y la cuantificación de proteínas de esta fracción resultó en 420 µg/ml de extracto purificado, lo cual tomando en cuenta el desarrollo bacteriano de cuatro litros de medio de cultivo, es aceptable. La presencia del antígeno K99 en la fracción I se confirmó por aglutinación -

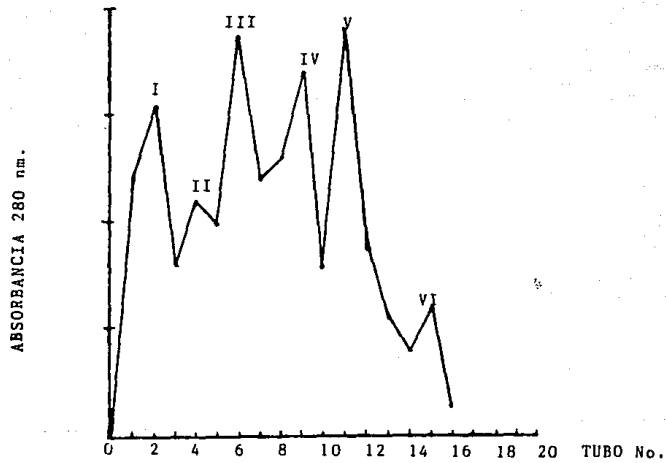


Figura No.1 Purificación del antígeno K99 por cromatografía en columna DEAE-Sephadex.

específica de eritrocitos de caballo, como lo reporta la literatura (1).

El título de anticuerpos producido por el antígeno K99 puro inoculado a cobayos, fue de 1:65 536 y 1:4096 para los sueros A y B respectivamente, esto demuestra la inmunogenicidad del antígeno, pues el título fue satisfactorio y se detectó por una aglutinación bacteriana franca; la especificidad de estos anticuerpos se determinó al inhibir esta aglutinación con el antígeno purificado, observándose inhibición de la aglutinación en las diluciones 1:1024 y 1:128 para los sueros A y B respectivamente.

TABLA No. 2

GRADIENTE DE NaCl APLICADO	FRACCION	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE
0M	I	++++
0.2M	II	_____
0.4M	III	_____
0.6M	IV	_____
0.8M	V	_____
1.0M	VI	_____

Hemaglutinación de eritrocitos de caballo al 3% por la fimbria K99 en presencia de D-manosa al 0.05% a 4°C.

Según la literatura (32,34,38), la expresión del antígeno K99 está regulada por un plásmido de aproximadamente 50MDa, y para demostrar su presencia se realizó electroforesis en geles de agarosa, del material extraído a las bacterias K99 por lisis alcalina, los geles revelaron la presencia de bandas de material genético, presumiblemente plásmidos de diferentes tamaños o diferente corrimiento electroforético, y casi siempre una banda superior con el -

mismo corrimiento, el cual suponemos es el plásmido de $\approx 50\text{MDa}$, reportado en la literatura, pues aunque se reporta siempre el peso molecular del plásmido, no tenemos evidencia de éste en un gel de electroforesis; las bandas inferiores corresponden presumiblemente a otros plásmidos o bien a fragmentos del mismo plásmido (figura No.3).

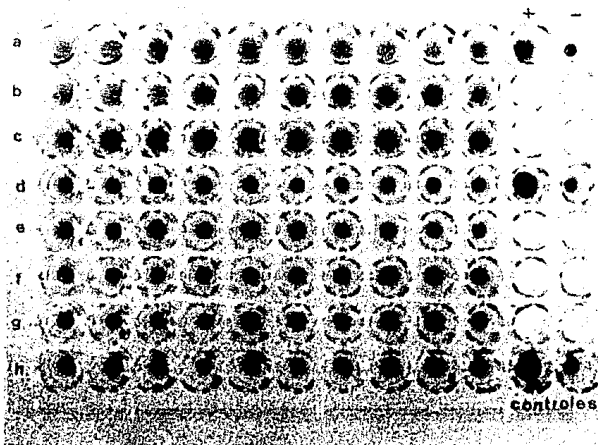


Figura No.2 (a) y (b); aglutinación de eritrocitos de caballo por el - antígeno K99 purificado (fracción I), (c); aglutinación de eritrocitos de cobayo por la cepa de Escherichia coli K99, (d); fracción II, (e);- fracción III, (f); fracción IV, (g); fracción V, (h); fracción VI. En - (d), (e), (f), (g), y (h), no se observa actividad hemaglutinante.

Para evaluar el efecto de los anticuerpos específicos contra K99, se realizó el corrimiento electroforético de la bacteria K99 en presencia de suero inmune de cobayo y también en presencia de suero normal de cobayo como control, de esta manera observamos que la presencia del plásmido de 50MDa, no se ve afectada por los anticuerpos específicos del suero "A", pero sí por los del suero "B", es decir, que el suero "A" es capaz de aglutinar a la bacteria K99 específicamente, pero no es capaz de regular la expresión del plásmido (figura No.3),



Figura No. 3 Los pozos marcados con los números 3 y 4, corresponden a los controles; en el control c_1 , aparecen las bandas de plásmidos originales de una cepa K99 crecida en medio Muller-Hinton, el control c_2 , contiene la misma cepa K99, pero crecida en presencia de fracción γ de suero normal de cobayo no inmunizado y se observan las mismas bandas. Los pozos 1 y 6 corresponden a la cepa K99 crecida en presencia de suero inmune "A" a las concentraciones indicadas en la tabla No.1, observándose que este antisuero no tiene efecto en el patrón de bandeos. Los pozos 2 y 5 que muestran un patrón incompleto y ausencia de éste respectivamente, indican un efecto del antisuero "B" sobre la cepa K99.

DISCUSION

Los resultados presentados aquí, muestran que los anticuerpos dirigidos - contra diferentes epítopes de la fimbria K99 afectan la expresión del plásmido - que codifica para la expresión de ésta, pues al observar el corrimiento de los plásmidos en las muestras tratadas con suero inmune y compararlos con el con-- trol, es evidente que el plásmido de ≈ 50 MDa, desaparece cuando 150 μ l del anti suero "B" son incubados con 300 bacterias/ml. El mismo suero "B" (150 μ l) cuan-- do se incuba con 300×10^6 bacterias/ml induce la desaparición de las bandas de - menor peso molecular, sugiriendo un efecto de dilución (figura No.3).

Nuestros datos sugieren diferentes comportamiento de anticuerpos de la mis ma especie (suero de cobayo), inducidos en iguales condiciones; pero esto no im plica sólo una disparidad de datos pues existen reportes que apoyan lo expuesto, como por ejemplo, el de Dougan y cols. (1986), quienes al analizar el comporta miento de cepas de Escherichia coli K88 y K99 frente a calostro inmune, observa ron esta doble respuesta en la expresión del material que codifica para dichos- antígenos fimbriales y hacen notar que aún cuando las cepas K99 pierden la viru lencia, no pierden la capacidad de expresar el plásmido, al contrario de las ce pas K88 (38). Del mismo modo, Moon y cols (1987), al intentar determinar como - una cepa K99 pierde los genes que codifican para la expresión de la adhesina - K99, durante la infección en cerdos lactantes inoculados con una cepa K99, encuen tran que esta doble respuesta se dá también, tanto en animales no inmunizados, - como en los inmunizados específica e inespecíficamente contra K99. Reportan tam bién que la pérdida de la característica K99, siempre es secundaria a la pérdida de la capacidad para producir enterotoxina, pero que el plásmido puede o no es tar presente, independientemente de la presencia de anticuerpos específicos (32)

Otros estudios (Williams, 1986), demuestran que es posible desarrollar una- respuesta inmune protectora en cuanto a disminuir el grado de colonización in--

testinal y por lo tanto evitar el cuadro diarreico al inocular sueros homólogos por vía oral en cerdos (34).

Recientemente se ha reportado que la respuesta inmune intestinal contra el antígeno K99, se debe a una respuesta local, de la cual son responsables anticuerpos de las clases IgM, IgA e IgG, pero que éstos últimos son absorbidos de la circulación sanguínea(42).

Se ha sugerido que los anticuerpos dirigidos contra los antígenos fimbriales, favorecen la pérdida de la virulencia en cepas ETEC, y que son un importante componente de protección en poblaciones animales vacunadas. Teóricamente, es los anticuerpos, contribuyen a la pérdida de virulencia suprimiendo el crecimiento bacteriano o removiendo a las bacterias del sistema (32). Sin embargo, los reportes descritos previamente indican que la pérdida de virulencia no es completa, y que si esta pérdida de virulencia estaba asociada con la pérdida del plásmido asociado a las adhesinas, aún hay que especular a esta respecto, debido a que la expresión del plásmido K99, puede o no afectarse por la presencia de anticuerpos específicos. Aunque no se descarta el hecho de que la expresión del plásmido juegue algún papel en esta pérdida de virulencia; pero entonces hay que tomar en cuenta que es posible que intervengan otros factores diferentes a los anticuerpos para inhibir la expresión. También es posible que los anticuerpos tengan que estar dirigidos contra uno o más de estos epítopes de la adhesina, o bien que el anticuerpo unido a la fimbria bloquee la adhesión bacteriana, pero que no necesariamente genere algún evento que intervenga en la síntesis o regulación del plásmido; pero tal vez sí actúe en los procesos de polimerización y ensamblaje de la fimbria.

Es importante señalar que no se conoce el nivel de anticuerpos requerido para un efecto protector en una población animal, ni tampoco se conoce el nivel de pérdida de virulencia en animales no protegidos; por lo tanto es relativa la importancia de la pérdida del plásmido K99, para el desarrollo de una vacuna.

CONCLUSIONES

1. Las adhesinas bacterianas responsables de cuadros diarréicos, son capaces de despertar una respuesta inmune tanto a nivel local como a nivel sistémico, pero esta respuesta no es del todo preventiva de la enfermedad.
2. Los anticuerpos obtenidos inducen diferente regulación de la síntesis del plásmido, sugiriendo que diferentes epítopes de la fimbria son capaces de regular la expresión del plásmido.
3. Es necesario investigar la relación que existe entre la pérdida del plásmido y la expresión de la adhesina correspondiente.
4. Localizando los diferentes epítopes que componen a la fimbria, tal vez se logre el desarrollo de una vacuna.

Con todo lo anterior concluimos que el trabajo desarrollado es solo el inicio de una línea de investigación con enfoque veterinario para la prevención de cuadros diarréicos que obstaculicen el buen desarrollo del ganado disminuyendo con ello su aprovechamiento.

APENDICE DE REACTIVOS.

Medio de cultivo (Minca) para la producción de K99.

KH_2PO_4 1.36g.
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.1g.
Glucosa 1g.
Sol. trza de sales ... 1ml.
Casaminoácidos 1g.
Agua destilada 1000ml.

pH 7.5

Esterilizar en autoclave a 121°C , 15lbs., durante 15 minutos.

Solución traza de sales.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g.
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1g.
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.135g.
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g.
Agua destilada 1000ml.

Adicionar al medio de cultivo antes de esterilizar.

PB (Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, pH 7.2- con 1.0M de NaCl.).

Na_2HPO_4 4.97g.
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.96g.
NaCl 58.5g
 NaH_3 0.02g
Agua destilada 1000ml.

PBS (Solución amortiguadora de fosfatos 0.15M, pH 7.2)

NaCl8g.
KCl0.20g.
Na₂HPO₄1.15g.
KH₂PO₄0.20g.
Agua destilada1000ml.

Preparación de eritrocitos de caballo y cobayo para hemaglutinación

.Colectar 5-10 ml de eritrocitos en anticoagulante (EDTA 0.1%).
.Lavarlos por lo menos tres veces con PBS 0.15M, pH 7.2; centrifugando a 2000rpm durante 20 minutos en cada lavado.
.Resuspender 0.3 ml del paquete de eritrocitos en 10 ml de PBS para obtener una solución al 3% v/v.

D-manosa al 0.5%.

D-manosa 0.05g.
PBS 10 ml.
Disolver la D-manosa en PBS y utilizar esta solución como diluyente en la hemaglutinación.

Reactivos para la determinación de proteínas.

SOLUCION "A".

Na₂CO₃ 2g.
NaOH 0.4g
Agua destilada 100 ml.

SOLUCION "B".

CuSO₄.5H₂O 0.5g/100ml de agua destilada.
Tartrato de Na y K..1.0g/100ml de agua destilada.
Mezclar volúmenes iguales antes de usar.

REACTIVO "C".

Solución "A" 50ml.

Solución "B" 1ml.

Preparar en el momento de usar.

Solución patrón de Albúmina.

Albúmina sérica bovina 10mg.

Agua destilada 10ml.

Diluir 1:10 antes de usar.

Reactivos para la extracción de plásmidos.

SOLUCION I.

Lisozima (2mg/ml) 10mg.

EDTA 0.5M pH 8 0.1ml.

TRIS BASE pH 8,1M 0.125ml.

Sacarosa 20% 0.222ml.

Agua desionizada estéril .. 4.55ml.

Preparar en baño de hielo, al momento de usar.

SOLUCION II.

NaOH 10N 0.2ml.

SDS al 20% 0.5ml.

Agua desionizada 9.3ml.

SOLUCION III.

Disolver acetato de sodio 3M en un volúmen mínimo de agua.

Medir pH y ajustarlo a 4.8 con ácido acético glacial.

Aforar a 1litro.

Esterilizar en autoclave a 10lbs., durante 10 minutos.

Almacenar a temperatura ambiente.

TE pH 8.0

TRIS BASE pH 8 10mM

EDTA pH 8.0 1mM

TRIS BORATOS (5X)

Tris Base 54g.

Acido bórico 27.5g.

EDTA 0.05M pH 8 20ml.

Agua desionizada ... 1000ml.

Esterilizar a 10lbs., 115°C, durante 10 minutos.

Almacenar a temperatura ambiente.

Disuolir a 1X antes de usar, con agua desionizada estéril.

BIBLIOGRAFIA.

1. Gaastra W., De Graaf F.K. 1982. Host Specific Adhesins of Noninvasive Enterotoxigenic Escherichia coli Strains. Microbiol Rev. Vol. 46. No. 2 p. 129-161.
2. Runnels R.L. 1980. Development of Resistance with Host Age to Adhesion of K99⁺ Escherichia coli to Isolated Intestinal Epithelial Cells. Infect Immun. Vol. 28. No. 1 p. 298-300.
3. Isaacson R.E. 1980. Factors Affecting Expression of the Escherichia coli Pilus K99. p. 190-194.
4. De Graaf F.K. 1980. Purification, Characterization and Partial Covalent Structure of Escherichia coli Adhesive Antigen K99. Infect. Immun. Vol. 33. No. 3 p. 877-883.
5. Isaacson R.E. 1977. K99 Surface Antigen of Escherichia coli Purification and Partial Characterization. Infect. Immun. - Vol. 15. No. 1 p. 272-279.
6. Oudega B., Moon F.R., De Graaf F.K. 1984. Excretion of proteins by gramnegative bacteria: export of bacteriocins and fimbrial proteins by Escherichia coli. Antonie Van Leeuwenhoek. Vol. 50 p. 569-584.
7. Mouricot M.A. 1987. Pilus-Mediated Binding of Bovine Enterotoxigenic Escherichia coli to Calf Small Intestinal Mucins. Infect. Immun. Vol. 55. No. 5 p. 1216-1223.
8. Brinton Ch.C. 1959. Non flagellar Appendages of Bacteria. Nature. Vol. 183. No. 4664 p. 782-786.
9. Isaacson R.E., Colmenero J., Ritcher p., 1981. Escherichia coli K99 pili are composed of one subunit Species. Fems Microbiol. Lett. Vol. 12 p. 229-232.
10. Guineé P.A.M. 1976. Detection of K99 Antigens by Means of Agglutination and Immunoelectrophoresis in Escherichia coli Isolated from Calves and Its Correlation with Enterotoxigenicity. Infect. Immun. Vol. 13. No. 5 p. 1369-1377.
11. Acres S.D. 1979. Immunization of Calves Against Enterotoxigenic Colibacillosis by Vaccinating Dams with purified K99 Antigen and Whole Cell Bacterins. Infect. Immun. Vol. 25. No. 1 p. 121-126.

12. De Graaf F.K.1984.Organization and Expression of Genes Involved in the Biosynthesis of K99 Fimbriae.Infect.Immun. Vol.43.No.1 p.508-514.
13. Contreprois M.G.1985.Additive Protective Effects of Colostrum Antipili Antibodies In Calves Experimentally Infected with Enterotoxigenic Escherichia coli.Infect.Immun. Vol.50.No.3 p.947-949.
14. Moon H.W.1978.Immunization Of Sucking Pigs Against Enterotoxigenic Escherichia coli-Induced Diarrheal Disease by Vaccinating Dams with purified 987P or K99 pili:Protection Correlates with Pilus Homology of Vaccine and Challenge.Infect.Immun.Vol.22.No.3 p.771-777.
15. Guineé P.A.M.1977.Improved Minca Medium for the Detection of K99 Antigen in Calf Enterotoxigenic Strains of Escherichia coli.Infect.Immun.Vol.15.No.2 p.676-678.
16. Isaacson R.E.1978.K99 Surface Antigen of Escherichia coli Antigenic Characterization.Infect.Immun.Vol.22.No.2 p.555-559.
17. De Graaf F.K.1980.Production of K99 Antigen by Enterotoxigenic Escherichia coli Strains of Antigen Groups 08,09, -020,0101,Grown at Different Conditions.Infect.Immun.Vol.27.No.1 p.216-221.
- 18.Morris J.A.,Stevens A.E.,Sojka W.J.1977.Preliminary Characterization of Cell free K99 Antigen Isolated from Escherichia coli B41.J.Gen.Microbiol.Vol.99.p.353-357.
19. Ofek I.,Perry A.Molecular Basis of Bacterial Adherence to Tissues.Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion.Stephens E.,Mergen Hagen,Benton Rosan.American Society for Microbiology.1985.p. 7-13.
20. Silverblatt F.J.1979.Effect of Pili on Susceptibility of Escherichia coli to Phagocytosis.Infect.Immun.Vol.24.No.1 p. 218-223.
21. Nagy L.K.,Mackenzie T.,Painter K.R.1985.Protection of nursing pig Against experimentally induced enteric colibacillosis by Vaccination of dam with fimbrial Antigens of Escherichia coli (K88,K99,987P).Vet.Rec.No.117 p.408-413.
22. Myers L.L.1976.Occurrence and Characteristics of Enterotoxigenic Escherichia coli Isolated from Calves with Diarrhea.

- Infect.Immun.Vol.13.No.4 p.117-119.
23. Isaacson R.E.Pilus Adhesins,Bacterial Adhesion,Mecanisms and Physiological Significance,Dwayne C.Savage,Madilyn - Fletcher.Plenum Press.New York and London.1985 p.307-336.
 24. Eisenstein B.I.Fimbriae,E.coli and S.typhimurium.Cellular and Molecular Biology,Neidhart F.C.American Society for Microbiology.1987 p.84-90.
 25. Orsov F.Escherichia.Bergeys Manual of Systematic Bacteriology,William & Wilkis.8th Edition.1984 p.420-423.
 - 26 Levine M.M.1987.Escherichia coli that Cause Diarrhea:Enterotoxigenic,Enteropathogenic,Enteroinvasive,Enterohemorrhagic and Enteroadherent.J.Infect.Dis.Vol.55.No.3 p.377-389
 27. Isaacson R.E.1983.Regulation of Expression of Escherichia coli Pilus K99.Infect.Immun.Vol.40.No.2 p.633-639.
 28. De Graaf F,K.1980.Biosynthesis of K99 Surface Antigen Is Repressed by Alanine.Infect.Immun.Vol.30.No.1 p.125-128.
 29. Bacterial Adherence (Receptors and Recognition, Series B, Vol.6).E.H.Beachey.1980.Chapman and Hall.London.p.187-215
 30. Microbial Interactions (Receptors and Recognition.Series-B,Vol.3).J.L.Reissig.1977.Chapman and Hall.London p.141-163.
 31. Myers L.L.1975.Characterization of Escherichia coli Obtained from Newborn Calves with Diarrhea.Infect.Immun.Vol.11 No.3 p.493-496.
 32. Noon W.H.1987.In Vivo Emergence of Enterotoxigenic Escherichia coli Variants Lacking Genes for K99 Fimbriae and Heat-Stable Enterotoxin.Infect.Immun.Vol.55.No.12 p.3111-3116.
 33. Jones G.W.Adhesive Properties of Enteropathogenic Bacteria.Microbiology.Scheleensinger.1975.American Society for Microbiology p.137-142.
 34. Smith W.H.1972.The Nature of the protective effect of Antisera Against Escherichia coli Diarrhea in Piglets.J.Med Microbiol.Vol.5 p.345-353.
 35. Isaacson R.E.1978.In Vitro Adhesion of Escherichia coli to Porcine Small Intestinal Epithelial Cells:Pili as Adhesive Factors.Infect.Immun.Vol.21.No.2 p.392-397.

36. Smith H.W.1978.The influence of Plasmid-Determined and other Characteristics of Enteropathogenic Escherichia coli on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets,calves and lambs.J.Med.Microbiol.Vol.11 p.471-492.
37. Burrows M.R.1976.Hemagglutination and Adhesive Properties Associated with the K99 Antigen of Bovine Strains of Escherichia coli.J.Gen.Microbiolo.Vol.96 p.269-275.
38. Dougan G.1986.Effects of immune Colostrum on the Expression of a K88 Plasmid Stability and Influence of Phenotypic Expression of K88 fimbriae.J.Gen.Microbiol.Vol.132 p.2497-2503.
39. Duguid J.P.S.1978.The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of Escherichia coli.J.Med.Microbiol.Vol.12
40. Alan Johnstone,Robin Thorpe.Immunochemistry in Practice. 2nd Editio,Blackwell Scientific Publications,1988.
41. Mortimer p. Starr.The Prokaryotes.A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria.Berlin Springer. 1981.Vol.2.
42. Zigterman G.J.W.J.,Loeffen A.H.C.,Rijke E.O..Induction of Mucosal immune response Against Bacterial Pilus Antigen in Chickens.International Congress of Mucosal Immunology. London,1989.
43. Maniatis T.,Fritsh E.F., Sambrook J.Molecular Cloning:a Laboratory manual.New York:Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.