

03072  
7  
28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

FACULTAD DE QUÍMICA

EPÍTOPOS CONTINUOS EN ADHESINAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROTOXIGÉNICA

FALLA DE ORIGEN

Tesis que presenta Héctor Enrique Espinosa Arciniega para optar por el grado de  
Maestro en Biotecnología

Mayo de 1995



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la asesoría de la Doctora Yolanda López Vidal, de noviembre de 1991 a mayo de 1994.

A mis padres, Evangelina Arciniega de Espinosa y Germán Espinosa Chavarría, con profunda gratitud y a mis hermanos.

Amis amigos,  
Ana, Alberto, Juan Pablo, Nora, Curt, Martín, Mariana, Bertrand, Daniel, Cecilia, Gustavo, Luis, Pablo, Marina, Ernesto..., con todo el cariño.

"... de cuanto trabajo me tomé, cuánta dificultad tuve que sufrir, cuántas veces desesperé y cuántas otras desistí y empecé de nuevo, por el empeño de aprender. Testigo es mi conciencia que lo he padecido, y la de los que conmigo han vivido".

San Jerónimo

## CONTENIDO

Contenido .....	5
Lista de Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Objetivos y Justificación .....	15
Hipótesis .....	16
Estrategia Experimental .....	17
Material y Métodos .....	20
Resultados y Discusión .....	25
1 Posible Motivo KNITVTAS .....	25
2 Control de la síntesis de péptidos unidos covalentemente a "pins" de polietileno .....	28
3 Búsqueda del epítipo de CFA/I reconocido por el monoclonal 1:6 .....	28
4 Epítipos lineales en la respuesta humana .....	37
5 Epítipos lineales comunes .....	58
Conclusiones y perspectivas.....	67
Bibliografía .....	69
Anexos .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
CFA	Factor antigénico de colonización (de <i>E. coli</i> enterotoxigénica).
CS	Antígeno de superficie de <i>E. coli</i> . Los CS son subcomponentes de los factores antigénicos de colonización.
PEPSCAN	Escrutinio por pruebas inmunoquímicas en fase sólida (ELISA) de numerosos péptidos unidos covalentemente a una fase sólida, la cual consiste en palillos de polietileno ("pins") cubiertos con un polímero de ácido acrílico.

## RESUMEN

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es una causa importante de diarrea en países en desarrollo y entre viajeros de países industrializados a estos países. Este patógeno causa una diarrea parecida al cólera. El primer evento en la patogénesis de la diarrea por ETEC es la adhesión de la bacteria a la pared intestinal, la cual es mediada por adhesinas. Estas adhesinas tienen normalmente una estructura fimbriada y son de naturaleza proteica. Estas estructuras son reconocidas por la respuesta de anticuerpos protectora contra ETEC. Además, hay una homología antigénica comprobada entre las diferentes fimbrias que se han caracterizado, en la cual podrían estar involucrados epitopos lineales comunes. En este trabajo se buscaron epitopos lineales en el factor antigénico de colonización, involucrados en tres fenómenos: epitopo reconocido por el anticuerpo monoclonal 1:6 (anti CFA/I), epitopos reconocidos por la respuesta humoral humana a la infección por ETEC portadora de CFA/I y epitopos lineales involucrados en la reactividad cruzada.

Se sintetizaron octapéptidos que comprendían a toda la secuencia de aminoácidos de la subunidad de CFA/I, siguiendo el método de Geysen. Estos péptidos (unidos covalentemente a palillos de polietileno, lo que los hace reutilizables) se usaron en el escrutinio por ELISA (Pepscan) de un anticuerpo monoclonal (Mab 1:6) anti CFA/I, desueros de niños que habían estado infectados por ETEC portadoras de CFA/I y de sueros hiperinmunes contra otros factores de colonización. Se hicieron además ELISAs indirectos para buscar anticuerpos anti CFA/I en sueros humanos y los resultados fueron comparados con los obtenidos con Pepscan.

Se encontraron regiones de la secuencia de CFA/I consistentemente reconocidas por sueros inmunes de humanos. El aumento en los valores de absorbencia para los péptidos de estas regiones después de infecciones por ETEC CFA/I+ y la correlación de los títulos de anticuerpos anti CFA/I con los resultados de los Pepscan son evidencias de que las regiones seleccionadas de la secuencia de la subunidad de CFA/I son determinantes antigénicos de esta proteína reconocidos por la respuesta de anticuerpos humana a la infección natural por ETEC CFA/I+.

Al estudiar las secuencias de aminoácidos de las subunidades de distintas adhesinas se encontró un posible motivo en el extremo amino de varias de ellas. Por otra parte, los experimentos realizados con el anticuerpo monoclonal 1:6 (anti CFA/I) y los péptidos hacen pensar que el epitopo reconocido por este anticuerpo es conformacional.

Se encontraron péptidos (subsecuencias de CFA/I) reconocidos por sueros hiperinmunes heterólogos. Estos podrían ser epitopos comunes a distintas adhesinas de ETEC. Estos posibles epitopos comunes explicarían al menos parcialmente la homología antigénica entre los distintas fimbrias de ETEC. De estos, los reconocidos por la respuesta humana a la infección se podrían usar en una vacuna contra ETEC.



# INTRODUCCIÓN

## ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÉNICA

*Escherichia coli* es una bacteria que forma parte de la población microbiana normal del intestino humano. Sin embargo, se conocen cepas capaces de ocasionar diferentes tipos de enfermedad diarreica. La clasificación actual de las cepas de *E. coli* que ocasionan enfermedad a nivel intestinal la siguiente:

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC),

*Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC),

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC),

*Escherichia coli* enteroadherente (EAEC)

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC de "Enterotoxigenic *Escherichia coli*") (1).

Recientemente se ha descrito también la *E. coli* enteroagregativa (EAagg). ETEC es un agente patógeno importante que constituye una de las principales causas de diarrea en niños menores de cinco años en países subdesarrollados y en viajeros a estos países. De un 16 a un 83 por ciento de los casos de enfermedad diarreica en niños en México han sido asociados a ETEC, según muestran estudios llevados a cabo durante el pico de incidencia de verano en áreas con condiciones sanitarias precarias (2). *Escherichia coli* enterotoxigénica ocasiona una diarrea acuosa parecida al cólera, cuya severidad es variable, pudiendo ocasionar la muerte por deshidratación.

## LAS ADHESINAS FIMBRIADAS: DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD Y ANTÍGENOS IMPORTANTES

Las fimbrias o pili son apéndices filamentosos no flagelares y diferentes del pili F (involucrado en la conjugación), presentes en un gran número de especies bacterianas (3, 4). Aparte de la fimbria Tipo 1, que se encuentra en muchos tipos distintos de *Escherichia coli* patógenas y no patógenas, los pili de ETEC tienen un papel extensamente comprobado experimentalmente como factores de patogenicidad. Se

sabe, por ejemplo, que mutantes no pilladas de cepas enterotoxigénicas son incapaces de colonizar la pared intestinal y causar la enfermedad diarreica típica y, en la mayoría de los casos, recuperan esta capacidad al recibir un plásmido que codifica para la fimbria (5). Es importante mencionar que se conocen adhesinas con estructura no filamentosas y que se ha reportado, para cepas de *E. coli* uropatógenas, que la capacidad adherente de las fimbrias se debe a una proteína asociada a la estructura fimbrial, pero diferente a ésta (14). Por esta razón se utilizará el término más general de "factores de colonización", con el que se designa generalmente a las fimbrias o pili y que incluye otro tipo de estructura.

El mecanismo de patogénesis de la diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica se halla bien elucidado. La adhesión de estas bacterias al intestino delgado mediada por adhesinas (las cuales generalmente tiene una estructura de pili o fimbrias) es seguida de su reproducción y la colonización del intestino, después de la cual la producción de las toxinas termolábil y termoestable da lugar a la aparición de un cuadro de diarrea acuosa. La adhesión de estas estructuras a la pared intestinal es altamente específica. Las distintas cepas de ETEC son exclusivas de especie (hay por ejemplo, cepas porcinas y cepas humanas), lo cual ilustra esta especificidad. En vista de esto, se han buscado receptores a las adhesinas. Actualmente se conocen los receptores para varias de ellas, los cuales en general involucran sialil glicoproteínas.

Las fimbrias de ETEC son además inmunógenos importante. Una parte de la respuesta a la infección por ETEC está dirigida a dichas estructuras. Además, está plenamente comprobado que la inmunidad contra ETEC se debe en buena medida a la respuesta inmune contra los diferentes factores antigénicos de colonización (67). Se sabe, por ejemplo, que la administración oral de CFAs purificados es capaz de inducir la producción de IgA anti CFA y confiere protección contra la infección con ETEC portadoras de CFAs (65) y que una infección por ETEC asociada a la presencia de diarrea, induce protección contra la infección por bacterias productoras del mismo tipo de adhesina (CFA) o enterotoxina (66). De esta manera, la respuesta de anticuerpos contra las fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica protege contra la diarrea ocasionada por este patógeno inhibiendo su adherencia al epitelio intestinal.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS FACTORES DE COLONIZACIÓN DE E. COLI ENTEROTOXIGÉNICA

Existen distintos factores de colonización (tabla 1). Los que se conocen mejor y cuyo papel está mejor establecido son los factores antigénicos de colonización I, II, III y IV (CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV). Se han aislado y caracterizado también los factores putativos de colonización PCF0166, PCF0159:H4, el antígeno 2230, el antígeno de superficie 17 (CS17), el PCF09 y el 8786. CFA/I es un antígeno único, fimbriado y homogéneo, mientras que CFA/II y CFA/IV están compuestos cada uno por tres componentes antigénicos diferentes (codificados por genes distintos). Estos componentes son los antígenos asociados a la superficie o CS (de *Coli Surface-Associated Antigen*). Así, las cepas CFA/II+ expresan a menudo CS3 solo o combinado con CS1 y/o CS2. Las cepas con CFA/IV expresan ya sea el antígeno CS4 o CS5, junto con el antígeno no fimbriado CS6 y han sido identificadas algunas ETEC que portan únicamente CS2, CS5 o CS6 (2). Los antígenos 2230 y 8786 fueron detectados en la superficie celular bacteriana y parecían ser no fimbriados. PCF09 está constituido por estructuras fibrilares muy delgadas que tienden a verse agregadas en grandes masas al microscopio electrónico. (14-24)

Los distintos tipos de fimbrias de ETEC han sido identificados y distinguidos por sus diferentes patrones de hemaglutinación y por serología. Los factores de colonización tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes orígenes en forma no inhibible por la D-manosa (hemaglutinación resistente a la manosa o MRHM) (27, 29). Por ejemplo, se sabe que CFA/I, CFA/IV y el antígeno 8786 causan MRHM de eritrocitos del grupo A y bovinos, mientras que CFA/II causa MRHM de eritrocitos bovinos y de pollo. A su vez, el antígeno 2230 no posee ninguna actividad hemaglutinante. En los últimos años se ha generalizado la identificación mediante antiseros específicos.

TABLA 1

CFA	TOXINAS ASOCIADAS	MORFOLOGIA, diámetro(nm)	TAMAÑO (kD)	GEN REGULADOR	HARM
CFA/I	LT/ST, ST	F (6-7)	15	CfaD	H,B,P
CFA/II					
CS1	LT/ST	F (6-7)	16.8	rns	Hf,B,P
CS2	LT/ST	F (6-7)	15.3	rns	B,P
CS3	LT/ST	f (2-3)	14.5		no HA
CFA/III	LT	F(7-8)	18		no HA
CFA/IV					
CS4	LT/ST	F (6-7)	17	CfaD	H,B
CS5	ST	h (5-6)	18.6/21	CfaD?	H,B,C
CS6	LT/ST,LT	no F	14.5/16		no HA
CS7	LT/ST,LT	h (3-6)	21	CfaD?	H, B, C
CS17	LT	F(6-7)	15.5/17	CfaD?	H, B
PCF O9	LT	f(2-3)	27		H,P
PCF O148	LT/ST	f(3)			no HA
PCF O159	LT/ST	F (6-8)	19		no HA
PCFO166	ST	F (6-7)	15.5/17	CfaD?	H, A
2230	ST	no fimbriado	16		no HA
8786	ST	no fimbriado	16.3		H, B
CS18	LT/ST	F (6-7)	25		no HA

Factores antigénicos de colonización de ETEC que han sido identificados.

HARM: Hemaglutinación resistente a la monosa, F: fimbria rígida, f:fibrilar

Patrones de hemaglutinación resistente a la manosa: H: eritrocitos humanos, B:bovinos, P: pollo, C: cobayo, f. humanos, preferentemente de raza negra.

## BIOGÉNESIS Y GENÉTICA DE LAS FIMBRIAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÉNICA

Cada fimbria está formada por la agrupación de aproximadamente mil subunidades proteicas idénticas, unidas por enlaces no covalentes. Los genes estructurales de estas subunidades se han encontrado casi siempre en plásmidos. Una excepción la constituye una cepa en la que se observó que los genes estructurales de los antígenos de superficie CS1 y CS2 (subcomponentes del factor antigénico de colonización CFAll) aparentemente estaban ubicados en el cromosoma bacteriano (24).

Las fimbrias mejor conocidas en su estructura y en su mecanismo de exportación y ensamblaje son la fimbria P, presente en cepas uropatogénicas de *E. coli* y la fimbria tipo 1, presente en aislamientos de *E. coli* patógenas y no patógenas de diversas cepas. Estas fimbrias son morfológicamente muy diferentes a los CFAs y PCFs encontrados en las cepas humanas de ETEC; sin embargo, comparten ciertas características con éstos, lo que hace útil describirlas como una aproximación a la manera en que los factores de colonización se forman.

La fimbria P y la tipo 1 están formadas por subunidades acomodadas en una hélice de 7 nm de diámetro con un agujero axial. Tienen además una punta formada por otro tipo de subunidad, cuyo diámetro sugiere un arreglo polimérico lineal en sus subunidades. Al final de esta punta se encuentra la subunidad proteica que funciona como adhesina. La biosíntesis y expresión de la fimbria P involucra once genes ubicados en un "cluster" en el cromosoma bacteriano, cuyas respectivas funciones se conocen gracias a estudios de inactivación de cada gen. Existen dos genes reguladores (Pap I, Pap B), un gen estructural (Pap A) que codifica para la subunidad proteica principal (la que forma la estructura helicoidal) y otros cuatro genes estructurales (Pap K, E, F, G) que codifican para proteínas que conforman la punta de la fimbria, incluyendo la adhesina misma. Además de estos genes, el operón Pap contiene un gen (Pap D) que codifica para una chaperonina que se localiza en el espacio periplásmico y que evita la agregación de las subunidades fimbriales en formas improductivas antes del ensamblaje que es realizado en la membrana externa con la participación de la proteína codificada por el gen Pap C. Los genes involucrados en la síntesis y expresión de la fimbria tipo 1 (denominados *fim*) son similares a los de Pap. (28).

Un aspecto muy interesante con respecto a las adhesinas fimbriadas de las cepas humanas de ETEC (CFA/I, II, III, IV, PCF 0166, etc.) es que su estructura es similar a la de la punta de las fimbrias P y tipo 1. Se puede incluso especular que posiblemente estas fimbrias hayan evolucionado de genes que forman parte del "cluster" de Pap o tipo 1. La fimbria K88 ha sido aislada de cepas porcinas y tiene una estructura parecida a la de las fimbrias de ETEC humanas mencionadas. Esta fimbria difiere de P y tipo 1 en estar formada por subunidades idénticas constituidas por la adhesina misma. Al igual que los CFAs de cepas humanas, K88 tiene un diámetro menor y parece ser el producto de una polimerización con arreglo lineal. Los genes involucrados en su expresión han sido estudiados y se sabe que son en cierta medida equivalentes a los operones Pap y fim, con genes reguladores, genes que codifican para una chaperonina periplásmica, una proteína de membrana externa involucrada en el ensamblaje final y un gen estructural (27). De esta manera, existen razones para pensar que la biosíntesis y el ensamblaje de los CFAs y PCFs siga los mismos principios que las fimbrias mencionadas.

Las fimbrias encontradas en cepas de ETEC humanas son menos conocidas en sus aspectos genéticos, de biosíntesis y de ensamblaje. Además de sus genes estructurales, se conocen solamente genes reguladores (no se conocen genes de ensamblaje), los cuales tienen características interesantes. El primero en ser descubierto fue *rns*, que regula la expresión de CS1 y CS2 (subcomponentes de CFA/II) (24). Después se describieron genes reguladores de la expresión de CFA/I y CFA/IV, homólogos a *rns*. El gen regulador para CFA/I, reportado como *cfaD* y como *cfaR*, puede sustituir a *rns* además de hibridar con él. Lo mismo se ha observado en el gen regulador de la expresión de CS4 y CS6 (componentes de CFA/IV) (8,9, 25). Un aspecto interesante de este grupo de genes reguladores homólogos es tener un contenido de G+C poco usual en *Escherichia coli* y poseer codones raros (AUA para isoleucina, GGA o GGG para glicina), además de ser homólogos a genes de proteínas reguladoras conocidas de otras especies bacterianas, como Ara C de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, Er C de *Erwinia carotovora* y VirF de *Yersinia enterocolitica*. Se piensa que se trata de un gen de adquisición reciente. Además, se ha reportado un gen silencioso homólogo a *cfaD* separado de éste y cercano al gene estructural. Lo

mismo se ha encontrado para CS1 y CS2 de CFA/II y para CS4 y CS6 de CFA/IV, en donde los genes estructurales y el regulador se encuentran en plásmidos separados (10).

Existe un grupo amplio de factores de colonización de ETEC regulados por el mismo tipo de genes. Se ha encontrado que numerosas cepas de ETEC que expresan otros factores de colonización (el factor putativo de colonización 0166, PCF 0159, PCF 0169, CFA/III y CS7) hibridan fuerte o débilmente con una sonda de *cfbD*. Casi todas estas cepas eran capaces de regular positivamente la expresión de CFA/II (11). Además, se ha visto que hibridan con una sonda de *rns* no sólo cepas que presentan los antígenos CS1 y CS2 (a quienes regula), sino todas las cepas probadas que expresaban CS3 (antígeno componente de CFA/II, cuyo gen se encuentra en el mismo plásmido que *rns*) y cepas de *E. coli* patógenas diferentes de ETEC (*E. coli* enterohemorrágica, enteropatógena y enteroinvasiva) (26).

#### HOMOLOGÍA ANTIGÉNICA Y HOMOLOGÍA SECUENCIAL

A pesar de que son antigénicamente distintos (se distinguen por serología), los factores de colonización presentan cierto grado de reactividad cruzada en pruebas inmunoquímicas. Se ha observado en pruebas de Western blot que los anticuerpos producidos contra bacterias que expresan el componente CS4 de CFA/IV reaccionan con CFA/II y CS1 y en menor grado con CS2 (42). En otra serie de estudios orientados hacia una caracterización más completa de esta reactividad cruzada, se encontró que sueros inmunes y anticuerpos monoclonales obtenidos contra fimbrias intactas eran capaces de reaccionar con fimbrias desnaturalizadas de un tipo diferente de aquel que había sido utilizado como inmunógeno. Esto fue demostrado con pruebas de ELISA-inhibición de la unión de anticuerpos anti CFAs o anti CS a CFs unidos a fase sólida (inhibición mediada por los antígenos desnaturalizados) (López Vidal et al., resultados sin publicar). Las fimbrias utilizadas en este último estudio fueron CFA/II, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CFA/III, 2230, 0166 y 0159.

Existen distintos grados de similitud en las secuencias de aminoácidos de los diferentes factores de colonización. La reactividad cruzada entre varias fimbrias diferentes se puede deber a que algunas regiones conservadas estén actuando como

determinantes antigénicos comunes. Esta similitud secuencial puede ser muy notable en algunos casos, como el de las subunidades de los antígenos CFA/I y CS1, (figura 1). Es bien conocido que las subunidades de CFA/I, CS1, CS2 y CS4 tienen extremos amino terminales muy parecidos. Recientemente se ha encontrado que a este grupo se le puede añadir el factor putativo de colonización 0166 (figura 2). Desgraciadamente, solo se conoce la secuencia completa de algunas subunidades de adhesinas, por lo que todavía no es posible saber bien cuál es la extensión y el porcentaje de identidades entre estas proteínas. En el caso de fimbrias de cepas porcinas, se ha visto que la región de mayor similitud corresponde al extremo carboxilo terminal (9 a 27). Se muestran a continuación los resultados de alineamientos y comparaciones hechos con el paquete PC GENE, que muestran otras regiones similares (figura 3). Uno de los objetivos de este trabajo es determinar si alguna de estas regiones está involucrada (como epítipo común) en el fenómeno de reactividad cruzada.

**FIGURA 1**  
**ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES DE CS1\* Y CFA/I**

```

CS1 - VEKTSIVTASVDPTVDLLQSDGSALPNSVALTYSPAVNNFEAHTINTVVHTNDS - 55
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CFA/I - VEKNITVTASVDPVIDLLQADGNALPSADKLAYS PASKTFESYRVMTQVHTNDAT - 55

CS1 - KGVVVKLSADPVLSNVLNPTLQIPVSVNFAGKPLSTTGTITDSNDLNFASSGVNK - 110
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CFAI - KKVIVKLDATPQLTDVLNSTVQMPISVSWGQVLS TTAKEFEAAALGYSASGVNG - 110

CS1 - VSSTQKLSIHADATRVTTGGALTAGQYQGLVSIILT KST - 148
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CFAI - VSSSQELVI - SAAPKTAGTAPTAGNYSGVVSLVMTLGS - 147
  
```

Identidad: 75 ( 51%), Similitud: 30 (20.4%)  
 Número de huecos insertados en CS1: 0, Número de hueco insertados en CFAI: 1  
 Matriz de comparación: Estructural-genética.  
 El caracter para indicar que dos residuos son idénticos es '\*'  
 El caracter para indicar que dos residuos son similares es ':'  
 Los aminoácidos que se consideran similares son: A,S,T,D,E;N,Q;R,K;I,L,M,V;F,Y,W  
 \* CS1: antígeno de superficie de E.coli 1, es un subcomponente de CFAVII.



**FIGURA 2**  
**ALINEAMIENTO DE LOS EXTREMOS AMINO DE CFAI Y OTRAS ADHESINAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÉNICA**

Adhesina	Secuencia de aminoácidos	Posición
CFA/I	VEKNITVTASVDFVIDLLQADGNALPSADKLAISPASKTFESYRVMTQVHTND	- 53
CS1	...T:S:::TV:::S::S::NSVA:T:::VNN:AHTIN:V:::..	- 53
CS2	A:::.....	- 20
CS4	.....C:::.....I:::	- 20
O166	.....T::I:::N:S::	- 25

El carácter para indicar que dos residuos son idénticos es "

Los caracteres en cursivas indican aminoácidos similares (Los aminoácidos que se consideran similares son: A;S;T; D;E; N;Q; R;K; I;L;M;V; F;Y;W)El alineamiento se hizo según el método de Needleman y Wunsch.

**FIGURA 3**  
**ALINEAMIENTO DE OTRAS SUBSECUENCIAS SIMILARES MAS CORTAS**

Adhesina-Pos.-Subsecuencia	Adhesina-Posición-Subsecuencia
CS3      94- NITLDKN ::: : : : :	CS5      108- TLSTAVEAA : : : : :
CS5      43- NITLDSN	TIPO1    39- TASLAQEGA
CS3      119- PLKF : : :	CS5      107- LTLSTAV : : : : :
8786     13- PLVF	CS1      31- LTYSPAV
CS3      48- LSNTSI : : : :	CS5      116- AKGEVA : : : :
CS1      89- LSTTGI	8786     3- AVGDVA
CS3      39- SNTLVGV : : : :	CS5      11- WQGVVPS : : : :
TIPO 1   95- SATNVGV	CFAI     84- WGGQVLS
CS3      14- NVLS : : :	CS5      42- LNIT : : :
2230     2- NVLS	CS4      3- LNIT
O166     21- NGSAL : : :	
CS5      125- NGQAL	

Los alineamientos se realizaron con el programa FASTPSCAN de PCGENE, que sigue el algoritmo de Needleman y Wunsch (44).

## OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Aspectos de la inmunogenicidad de las fimbrias de ETEC que se busca aclarar:

- 1.- Los epítomos continuos (epítomos constituidos por posiciones adyacentes en la estructura primaria) en CFA/I de ETEC reconocidos por la respuesta de anticuerpos humana.
- 2.- Los epítomos involucrados en la homología antigénica o reactividad cruzada.

### Razones para utilizar CFA/I como modelo:

- CFA/I es una fimbria frecuentemente presente en los aislamientos de ETEC, por lo que la información obtenida de esta proteína sería de más utilidad en la búsqueda de vacunas contra la diarrea por ETEC que la información obtenida de una proteína de menor importancia.
- La secuencia de aminoácidos de su subunidad proteica presenta similitud con otras adhesinas de ETEC (CS1 y CS2 de CFA/II, CS4, de CFA/IV y O166), lo que hace más probable encontrar epítomos continuos comunes.
- Se cuenta ya con antecedentes en la búsqueda de determinantes antigénicos en esta proteína(56), esta información puede ahorrar esfuerzos, pues se sabe la región donde debe encontrarse el epítomo reconocido por uno de los anticuerpos estudiados en este trabajo.

### UTILIDAD DEL PROYECTO

- Un anticuerpo monoclonal dirigido contra algún epítomo común facilitaría la identificación de cepas fimbriadas de ETEC en un método de escrutinio. Este método de escrutinio podría consistir en el uso de un anticuerpo que reconozca a todo un grupo de adhesinas. Un método así sería mucho más sencillo que el método actual, el cual requiere del aislamiento, la purificación y la identificación de factores de colonización individuales.
- Las regiones idénticas de los genes de las fimbrias homólogas podrían además ser utilizada en una sonda para la identificación de cepas enterotoxigénicas de E. coli en aislamientos clínicos.

- Las subsecuencias reconocidas por la respuesta humana podrían ser utilizadas como parte de una vacuna contra este patógeno, especialmente las secuencias que además estuvieran involucradas reactividad cruzada (homología antigénica), ya que podrían inducir una protección cruzada frente a cepas diferentes de ETEC.

La estrategia experimental que se propone para lograr estos objetivos se basa en las siguientes hipótesis, que parten de la información existente sobre la inmunogenicidad y la estructura de las fimbrias de ETEC:

## HIPÓTESIS

- 1.- Una parte de la respuesta inmune humana al factor antigénico de colonización 1 (CFA/I) de *Escherichia coli* enterotoxigénica, inducida por la infección de bacterias portadoras de esta fimbria, está dirigida a epítomos lineales; es decir, a epítomos constituidos por series de posiciones adyacentes en la secuencia de aminoácidos de esta proteína.
- 2.- La reactividad cruzada que presentan distintas fimbrias se debe, al menos en parte, a la existencia de regiones homólogas en las secuencias de aminoácidos de sus subunidades proteicas, las cuales están actuando como epítomos lineales comunes.
- 3.- El anticuerpo monoclonal 1:6, que se une a un fragmento de 50 aminoácidos correspondiente al extremo N terminal de la subunidad de CFA/I, puede estar reconociendo un epítomo lineal.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### ESTRATEGIA PARA LA BUSQUEDA Y CONFIRMACION DE EPITOPOS RECONOCIDOS POR LA RESPUESTA HUMANA

1.- Realización de pruebas de ELISA utilizando todos los posibles octapéptidos subsecuencia de CFA/I (PEPSCAN CFA/I) con sueros de tres niños, obtenidos antes y después de una infección por ETEC CFA/I+

2.- Selección de las regiones de la proteína que pueden ser consideradas importantes como determinantes antigénicos lineales, utilizando los siguientes criterios:

a) Se seleccionaron los péptidos que consistentemente tienen una absorbancia alta con sueros post infección (aquellos que se encontraban entre los diez de mayor absorbancia en cada prueba).

b) De los anteriores, se escogieron los péptidos que además presentaban una razón valor/fondo alta (como fondo se consideró el promedio de todos los valores de absorbancia en un pepscan, razón valor fondo alta se consideró como aquella correspondiente a los valores de absorbancia de más del doble del fondo).

c) De los péptidos que pasaban la segunda selección, se consideraron sólo aquellos para los que se cumpla el criterio de seroconversión (cambio en la absorbancia asociado a la infección mayor al 150%).

3.- Pepscan de las regiones seleccionadas con sueros de cuatro niños más pre y post infección (sueros del estudio de ETEC de abril a julio de 1987 realizado en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"):

TABLA 2  
PARES DE SUEROS DE NIÑOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

CLAVE DEL NIÑO	FECHA DE NACIMIENTO	FECHA DE OBTENCIÓN DE LOS SUEROS		FECHA DE AISLAMIENTO DE ETEC CFA/I+	SINTOMÁTICO (DIARREA)
		PRE	POST		
D573	27/3/91	4/6/91	26/8/91	12/8/91	sí
R220*	30/12/88	15/2/90	29/6/90	11/6/90	no
S318**	4/4/90	29/1/91	29/5/91	16/4/91	sí
C16***	10/8/84	9/4/87	15/6/87	27/5/87	no
G24	20/1/86	9/4/87	17/6/87	1/6/87	no
G34	10/1/87	6/4/87	9/6/87	27/5/87	no
G44	12/7/85	14/4/87	22/6/87	8/5/87	no

\* Dos aislamientos previos (27/sep/89 y 15/mayo/90), nos se sabe el CFA. \*\* Un aislamiento previo de ETEC (no se sabe el CFA) 77 días antes. \*\*\* Un aislamiento previo (7/4/87) CFA sin identificar. D573, R220 y S318 (primer grupo de sueros) se ensayaron con los péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals. Los demás (segundo grupo) se ensayaron con los péptidos sintetizados en el laboratorio como parte de este trabajo.

### ESTRATEGIA PARA LA BUSQUEDA DE EPIPOPOS COMUNES ENTRE CFA/I Y OTROS FACTORES DE COLONIZACIÓN

1.- Obtención de sueros policlonales hiperinmunes de conejo anti CFAs:

TABLA 3  
CONEJOS Y CEPAS UTILIZADAS EN LOS ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN

CONEJO	CEPA CON LA QUE SE INMUNIZÓ	ANTIGENO EXPRESADO
52 y 53	39275	CFA/II: CS1, CS3
54 y 55	E8775	CFA/IV: CS4, 6CS6
56 y 57	H10407	CFA/I

2.- Absorción de los sueros hiperinmunes obtenidos con bacterias de diversas cepas de ETEC para eliminar anticuerpos contra otras estructuras y obtener sueros de mayor especificidad (para un solo CFA).

TABLA 4

CEPAS DE ETEC UTILIZADAS EN LA ABSORCIÓN DE LOS SUEROS POLICLONALES

CEPA	CFA QUE EXPRESA
60R75	únicamente CS1
C36/092 (tipo clínico del INNSZ)	únicamente CS3 de CFA/II
C01/350 (Cepa tipo clínico, INNSZ)	únicamente CS6
H10407	mutante deficiente de CFA/I

TABLA 5

POLICLONALES OBTENIDOS

SUERO	TITULO DE ANTICUERPOS (1/log)	CONEJO DEL QUE PROCEDE	ESPECIFICIDAD ORIGINAL	CEPA CON LA QUE SE ABSORBIO	ESPECIFICIDAD FINAL
15	3.16	52	anti CFA/II	C36/092(CS3+)	anti CS1
16	3.16	53	anti CFA/II	C36/092(CS3+)	anti CS1
3	1.72	52	anti CFA/II	60R75(CS1+)	anti CS3
4	1.72	53	anti CFA/II	60R75 (CS1)	anti CS3
9	3.12	54	anti CFA/IV	C01/350(CS6+)	anti CS4
10	3.12	55	anti CFA/IV	C01/350	anti CS4

3.- Realización de Pepscan CFA/I con los sueros contra otros factores de colonización (sueros heterólogos, obtenidos absorbiendo los sueros hiperinmunes de conejos) y sus sueros preinmunes correspondientes, para buscar epítomos comunes.

Se realizaron ELISAs indirectos anti factores de colonización con los sueros de los conejos durante el esquema de inmunización hiperinmunes antes y después de absorberlos con algún CFA determinado. Se realizaron además inmunodifusiones en gel de agarosa de los sueros hiperinmunes antes y después de absorberlos.

## BUSQUEDA DEL EPITOPO EN CFA/I RECONOCIDO POR EL MONOCLONAL 1:6

- 1.- Pepscan de CFA/I (péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals) con el anticuerpo monoclonal 1:6 como fluido de ascitis y como sobrenadante de cultivo de hibridomas, en distintas diluciones y bajo distintas condiciones de bloqueo de la fase sólida, así como con IgG purificadas a partir de fluido de ascitis.
- 2.- ELISA indirecto y ELISA inhibición con el péptido VEKNITVTAS y con el péptido NITVTASV acoplado a albúmina sérica bovina.
- 3.- Pepscan CFA/I (péptidos sintetizados por duplicado en el Departamento de Infectología del INNSZ como parte de este trabajo) con sobrenadante de cultivo de hibridomas 1:6.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### MÉTODO DE GEYSEN DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS PARA PRUEBAS INMUNOQUÍMICAS

El método de Geysen es una variante del método tradicional de síntesis de péptidos en fase sólida(43). En este método se sintetizan los péptidos sobre paillos o "pins" de polietileno a los que se ha adicionado polímero de ácido acrílico y que tienen grupos amino disponibles. Los péptidos sintetizados (síntesis FMOC) quedan unidos covalentemente a esta fase sólida. Los "pins" quedan ordenados en una matriz para que puedan entrar en los pozos de una placa de ELISA. Esto hace posible obtener un gran número de péptidos diferentes en forma simultánea, los cuales se hacen reaccionar con el mismo suero en una prueba inmunoquímica en fase sólida (ELISA). Como los péptidos están unidos a la fase sólida covalentemente, se pueden remover los anticuerpos que se hayan unido durante la prueba sin que se desprendan los péptidos, lo que hace posible reutilizar los péptidos hasta sesenta veces, en pruebas diferentes (48-54).

### PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Octapéptidos traslapados que comprendían toda la secuencia de CFA/I, unidos covalentemente a "pins" de polietileno fueron inicialmente sintetizados por Cambridge Research Biochemicals, según la secuencia reportada por Klemm (11) y posteriormente sintetizados en el laboratorio (Departamento de Infectología, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán") por duplicado, según la secuencia reportada por Karjalainen et al. y confirmada por Cassels et al. (12, 38).

### CONTROL DE LA SÍNTESIS

El control de la síntesis se realizó sintetizando simultáneamente a los péptidos de CFA/I los péptidos control positivo PLAQ y GLAQ, los cuales se sintetizan como extremos amino de octapéptidos que terminan con glicinas en el extremo carboxilo, que es el extremo unido a la fase sólida; es decir, los péptidos control fueron realmente PLAQGGGG y GLAQGGGG. Existe un anticuerpo monoclonal que reacciona con el

primero y no con el segundo. Este anticuerpo fue comprado a Cambridge Research Biochemicals Inc. (ahora Zeneca Inc.) Ver adelante en "RESULTADOS".

#### PEPCAN

Las pruebas de ELISA simultáneas con los 140 octapéptidos de CFA/I se realizaron según el método originalmente propuesto por Geysen et al. (24), con algunas modificaciones:

Se bloqueaban los "pins" con albúmina sérica bovina grado IV (Sigma Chemical Co.) al 1% y ovalbúmina grado II (Sigma) al 1% en solución salina amortiguada con fosfatos 0.1M (pH=7.2) con Tween 20 al 0.1% y azida de sodio al 0.1 % (PBSN-Tween) durante una hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo en algunos casos contenía además suero bovino diluido 1/625 o solamente ASB en PBS-Tween, según se indique en los resultados. Después de un lavado en PBS-Tween durante diez minutos con agitación a 100 rpm, los pins reaccionaban con el suero de prueba diluido 1/1000 (a menos que se indique otra dilución en los resultados) en la solución de bloqueo 18 horas a 4 grados. Después de cuatro lavados de diez minutos cada uno en PBS-Tween, reaccionaban con anticuerpos anti inmunoglobulinas humanas, de conejo o de ratón, según fuera el anticuerpo analizado, conjugados con peroxidasa (HRP) (Dakko) diluidas 1/100 (1/2500 en el caso del anticuerpo anti inmunoglobulinas de ratón) en PBS-Tween que contenía caseína 0.1% w/v) y suero bovino (1% v/v), sin azida de sodio (la azida de sodio inhibe la peroxidasa) a temperatura ambiente y con agitación durante una hora. Después, se sometían a otros cuatro lavados y se revelaba sumergiendo los pins en pozos de una placa de ELISA en una solución de ABTS (2-2'-azino-bis[3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonato) 50mg/100ml en una solución de fosfato disódico 1.0 M y ácido cítrico 1.0 M pH=4 con peróxido de hidrógeno (se agregan 0.3 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 45 minutos (a menos que se indique otro tiempo de reacción), interrumpiendo para leer la absorbancia a los 10 minutos. La reacción se detenía retirando los pins del medio de reacción y se leía la absorbancia del medio de reacción a 405 nm. Después de cada prueba se separaban los anticuerpos unidos a la fase sólida sonicando durante treinta minutos los pins en una solución de 2-mercaptoetanol (1ml/1000ml) y SDS (10g/1000ml) en solución salina amortiguada con

fosfatos a una temperatura inicial de 65 grados, lavando 30 minutos en agua desionizada a 65 grados y secando por inmersión en metanol hirviendo.

#### CEPAS BACTERIANAS

La cepa de ETEC 60R75, que expresa únicamente CS1 (subcomponente de CFA/II) fue provista por el Dr. James Nataro, del Centro para el Desarrollo de Vacunas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Maryland. Las cepas C36/092 y C01/350, que expresaban solamente los antígenos CS3 (componente de CFA/II) y CS6 (componente de CFA/IV) respectivamente, son aislamientos realizados en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. La cepa E8775, que expresa CFA/IV compuesto por CS4 y CS6, fue originalmente provista por el Dr. Bernard Rowe, del "Public Health Laboratory Service", Londres, Inglaterra. La cepa 139275, que expresa CFA/II compuesto de CS1 y CS2, fue originalmente provista al Departamento de Infectología del INNSZ por la Dra. Ann Mari Svennerholm, de la Universidad de Gotemburgo, Suecia.

#### SUEROS HUMANOS

Los sueros de niños menores de dos años provenían de estudios epidemiológicos realizados en el Departamento de Infectología INNSZ. Se utilizaron también sueros de adultos provenientes de una zona endémica (México) y una no endémica para ETEC (Suecia), estos últimos, provistos por la Dra. Ann Mari Svennerholm. (Ver adelante la estrategia para la determinación de epítomos de respuesta humana).

#### ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES

Los anticuerpos policlonaes contra factores de colonización se obtuvieron inmunizando con bacterias formalinizadas, comenzando con un inóculo subcutáneo que contenía un 50% en volumen de adyuvante completo de Freund y prosiguiendo con cuatro inoculaciones semanales intravenosas de bacterias formalinizadas suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos estéril. (Ver esquema de la estrategia para la búsqueda de epítomos comunes para detalles sobre la obtención de cada suero policlonaes.) El anticuerpo monoclonal 1:6 (37) y el policlonaes

R1593%Rowe 16 fueron provistos por la Dra. Ann Mari Svennerholm, de la Universidad de Gotemburgo, Suecia.

#### ELISA INDIRECTO CON ADHESINAS DE ETEC O CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Se sensibilizaban los pozos de una microplaca de ELISA con 100  $\mu$ l de antígeno crudo o purificado 5  $\mu$ g/ml en amortiguador de bicarbonato/carbonato 0.005M pH9 durante 24 horas a temperatura ambiente o 72 a 4 C. Después de tres lavados con PBS se bloqueaba con albúmina sérica bovina al 1% en PBS treinta minutos a 37 C, después de lo cual se realizaba un lavado y se agregaban 100  $\mu$ l de la dilución correspondiente del suero y se incubaba una hora a 37 C. Después de esta incubación se hacían tres lavados con PBS y se agregaba a cada pozo 100 $\mu$ l del anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti inmunoglobulinas totales humanas Dakko-P1212 o anti inmunoglobulinas de conejo o anti inmunoglobulinas de ratón, según el caso) diluido 1/100 en PBS-Tween (el conjugado anti ratón se diluía 1/2500) y se incubaba una hora a 37 C. Se hacían cuatro lavados con PBS-Tween y se revelaba adicionando como sustrato de la enzima O-fenilendiamina (4mg/7.5ml) en amortiguador de citratos a pH4.5 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 $\mu$ l/7.5ml), deteniendo la reacción después de 5 a 20 minutos adicionando 100 $\mu$ l/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Se leía la absorbancia a 492nm.

#### ELISA INHIBICIÓN CON CFA/I CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Se realizaba de la misma manera que el ELISA indirecto, adicionando al medio diferentes diluciones (de 1/25 a 1/15625, por diluciones sucesivas 1/5) del inhibidor, que podía ser CFA/I o algún péptido, conservando el volumen final de 100 $\mu$ l/pozo.

#### PURIFICACIÓN DE IGG A PARTIR DE SUERO HUMANO O FLUIDO DE ASCITIS

Se realizaba primero un "salting out", para lo que se agregaba sulfato de amonio sólido en cantidad necesaria para dar un 40% de saturación, se agitaba de dos a cuatro horas en frío y se separaba el precipitado por centrifugación. Se dialisaba el precipitado en PBS a pH8 contra veinte veces el volumen de agua desionizada. El dialisado se utilizaba para la purificación de IgG por cromatografía de afinidad con proteína A de *Staphylococcus aureus*. Se estabilizaba primero la columna de proteína

A unida covalentemente a esferas de agarosa con 10 volúmenes de amortiguador de fosfato de sodio 10mM+cloruro de sodio 0.15M pH=8. Se aplicaba la muestra y se lavaba la columna con 10 volúmenes del amortiguador midiendo la absorbancia a 280 nm hasta que el producto de la elución diera cero. La fracción de IgG se eluía con citrato de sodio 0.1M a pH 3.0

#### PURIFICACIÓN DE CFA/I PARA SER UTILIZADO EN ELISA

El antígeno purificado se obtuvo como se ha reportado (5A). Brevemente, el producto del crecimiento masivo en agar CFA se suspendió en PBSN, se homogenizó en licuadora y el sobrenadante después de centrifugación (antígeno crudo) se sometía a una precipitación diferencial con sulfato de amonio, eliminando el precipitado a 20% de saturación y recuperando el precipitado a 40% de saturación, el cual se dialisaba contra 1000 volúmenes del mismo amortiguador en el que se resuspendió (fosfato de sodio 0.05M pH=7.2). El dialisado se purificó por cromatografía en una columna de DEAE-Sephadex A-50 en el mismo amortiguador. En esta columna quedan retenidas las proteínas diferentes a CFA/I, las cuales son eluidas después aumentando la concentración de NaCl en el amortiguador de elución.

#### SINTESIS DE SUBSECUENCIAS DE CFA/I

Se utilizó también la síntesis tradicional de péptidos para obtener dos péptidos de CFA/I (POSICIONES 1-9 Y 4-10 la subunidad) con el fin de corroborar resultados obtenidos con el método de Geysen. La síntesis de estos péptidos se realizó automáticamente, seguida por una separación por cromatografía en columna, en el laboratorio del Dr. Lourival Possani, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biotecnología, UNAM.

#### ACOPLAMIENTO DE PÉPTIDOS A ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

El péptido NITVTASC (posiciones 4-10 de CFA/I más una cisteína como aminoácido c-terminal para orientar el acoplamiento) se acopló a albúmina sérica bovina utilizando el éster N-maleimidobenzoilhidroxisuccinimídico (MBS), que en una parte de su molécula reacciona con grupos amino y en el otro a grupos mercapto, lo que permite orientar el

acoplamiento. Se acopló primero el MBS a la ASB adicionando 70µl de una solución de MBS en dimetil formamida a una solución de ASB en PBS, dejando reaccionar media hora, el conjugado se separaba de los reactivos libres por cromatografía en Sephadex G-25. A la fracción correspondiente a ASB se le adicionaron cinco miligramos del péptido disuelto en 1.5 ml de clorhidrato de guanidinio 6M en amortiguador de fosfatos, después de ajustar el pH a 7.3 se dejó reaccionar en agitación por tres horas y se dializó contra cuatro litros de agua desionizada. El producto se almacenó liofilizado. PEPTIDOS VEKNITVTASC Y NITVTASVC, SUBSECUENCIAS DE CFA/I

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1 POSIBLE MOTIVO KNITVTASV

Durante el trabajo inicial de comparación de las secuencias de aminoácidos de las subunidades proteicas de las distintas fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica se encontraron varias características interesantes de la subsecuencia KNITVTASV, correspondiente a las posiciones 3-11 del factor antigénico de colonización I (CFAI):

1.- Está situado en la región N terminal conservada de las secuencias de las subunidades de CFAI, CS1, CS2 (subcomponentes de CFA II), CS4 (subcomponente de CFA IV) y el factor putativo de colonización O166, con algunas sustituciones:

Fimbria	Secuencia de Aminoácidos (Extremo N-Terminal)	Posición
CFA/I	VEKNITVTASVDPVIDLLQADGNALPSADKLAYSPASKTFESYRVMTQVHTND	- 53
CS1	:::T:S:::::TV::::S::S:::NSVA:T::::VNN::AHTIN:V:::::	- 53
CS2	A:::::::::::	- 20
CS4	::::::C:::::I:::::	- 20
O166	::::::::::::T::I::::N:S:::	- 25

(El caracter " : " indica que los aminoácidos son idénticos en la posición correspondiente. Donde no lo son se indica la sustitución)

2.- Realizando comparaciones de secuencia de aminoácidos de los distintos factores de colonización reportados hasta ahora utilizando los programas PALIGN y FSTPSCAN del paquete PCGENE, que se basan en los métodos de Lipman y Pearson (68) y de Needleman y Wunsch (44) se encontró que esta secuencia estaba también presente, con sustituciones entre aminoácidos similares, en tres posiciones de CS3 (secuencia reportada en 15):

Subsecuencias de CS3:	68- KNITVT	139- NITITS
	:: : ::	:: : ::
Posible motivo:	KNITVT	KNITVTA

(El número indica la posición de las subsecuencias de CS3)

Además, es similar a una región de homología entre CS3 y CS5 (40):

```

Subsecuencia de CS3      94- NITLDKN
      : : : : :
Subsecuencia de CS5      43- NITLDSN
      : : :
Posible motivo:          NITVTAS
  
```

4.- Se encontró en una búsqueda en el banco de secuencias GENBANK, versión 72.0, junio 1992 (número de acceso L01263) utilizando el programa FASTA, (este programa sigue el método de Devreux-Haebler-Smithies-ref. 69-, que utiliza el algoritmo desarrollado por Lipman y Pearson -ref. 70) que la subsecuencia en cuestión está presente en una región conservada en las hernaglutininas de cuarenta aislamientos o cepas de virus Influenza. También se encontró esta secuencia en una sección de la traducción de una secuencia de DNA genómico de *Mycobacterium leprae* ("MSGB577COS *Mycobacterium leprae* genomic DNA sequence, cosmid b577", Smith, D.R. por publicarse).

Lo anterior se ilustra con el siguiente ejemplo:

Identidad del 85.7% con una subsecuencia de siete aminoácidos (y un 80% de identidad en una subsecuencia de 10 aminoácidos). Nótese que dos sustituciones son entre aminoácidos similares.

```

CFA/I          1- VEKNITVTASVDP
      : : : : :
FLATHA1       -DTVLEKNVTVTHSVNLE-
      50          60
  
```

Pensando que se podría tratar de un motivo con alguna función en las proteínas en las que se ha encontrado, se buscó en banco de motivos PROSITE. El programa Prosite del paquete PCgene no reconoce esta subsecuencia en CFA/I como un motivo (sin embargo, la asparagina contenida en esta sección de la proteína es identificada como un posible sitio de glicosilación). Al comparar esta subsecuencia con toda la base de datos de Prosite no se encuentra identidad con ninguna secuencia. No es un motivo ya reportado. Tampoco se encontró nada al usar el programa motifs del paquete Wisconsin.



En las hemaglutininas mencionadas, la subsecuencia se encuentra en posiciones que van del aminoácido 35 al 55 de la fracción HA1. Estas posiciones están dentro de una región con forma de tallo en la estructura tridimensional de la proteína, que se agrupa en trímeros. Las regiones de reconocimiento de las células blanco se encuentran en una región globular diferente de este tallo. El "tallo", región larga fibrosa, contiene los primeros 63 aminoácidos de la secuencia, los cuales llegan desde el extremo amino (en lado membranar) en una conformación casi extendida a lo largo de 96 Å antes de que haya el primer doblez compacto en la secuencia (71, 72).

Es difícil asignar una función posible a la subsecuencia en cuestión: Las regiones de reconocimiento de las células blanco se encuentran en una región globular diferente del tallo (73) y ninguna de las mutaciones que ocasionan cambios en la fusión de membrana de este virus se sitúan cerca de donde está la subsecuencia (74), por lo que no se puede pensar que la subsecuencia pueda estar involucrada en el reconocimiento de receptores de membrana o fusión. Por otra parte, se han encontrado determinantes antigénicos en la región en la que está la subsecuencia; además, en esta región puede haber glicosilaciones (72).

## 2 CONTROL DE LA SÍNTESIS DE PEPTIDOS UNIDOS COVALENTEMENTE A "PINS" DE POLIETILENO

Los péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc. (hoy Zeneca Inc.) fueron revisados después de realizar las pruebas de ELISA en las que se usaron. Esta revisión consistió en poner a reaccionar el anticuerpo monoclonal control (anti péptido PLAQ, que no reacciona con GLAQ) con los péptidos control sintetizados en forma simultánea a los péptidos de CFA/I (ver "Material y Métodos"). Los resultados (figura 37, en "ANEXOS") muestran que en el momento de hacer la última prueba reportada en este trabajo, los péptidos estaban todavía en buen estado, y que la síntesis fue hecha correctamente.

Los péptidos sintetizados en el laboratorio como parte de este trabajo fueron revisados inmediatamente después de su síntesis. Los resultados obtenidos con el monoclonal control muestran la validez de la síntesis (figura 37, "ANEXOS").

### 3 EPITOPO DE CFA/I RECONOCIDO POR EL MONOCLONAL 1:6

#### PEPSCAN CON PÉPTIDOS SINTETIZADOS POR CRB

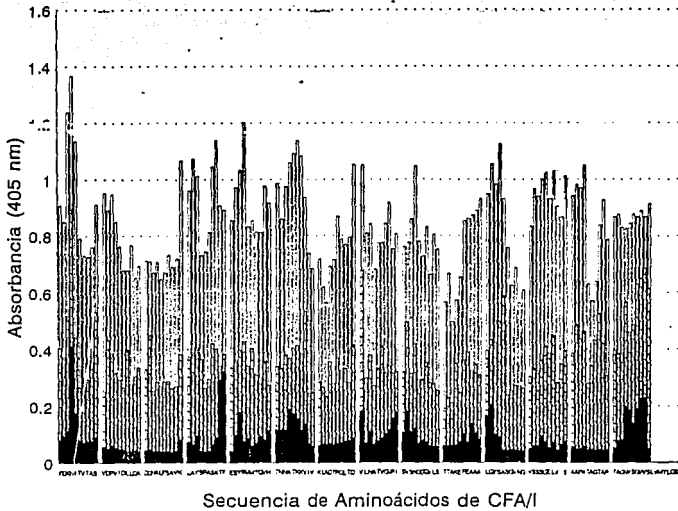
La búsqueda de determinantes antigénicos o epítopos se ha abordado hasta ahora con varias estrategias. Una consiste en la digestión parcial de la proteína en estudio y la evaluación subsecuente de la unión de los fragmentos obtenidos a anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la proteína. Otra consiste en la síntesis de subsecuencias de distintos tamaños de la proteína para evaluar también su capacidad de ser reconocidas por el o los anticuerpos. En el caso de CFA/I, se ha hecho la búsqueda del determinante antigénico reconocido por un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir la unión de las bacterias a cultivos celulares utilizando fragmentos de la proteína obtenidos por digestiones con enzimas (37). El método de Geysen permite hacer un escrutinio de todas las subsecuencias de CFA/I de cierto tamaño (en el caso de este estudio se utilizaron todos los octapéptidos de CFA/I), con lo que se evalúan todas las posibilidades, sin necesidad de aproximarse gradualmente a la región importante.

En las pruebas realizadas con el anticuerpo monoclonal 1:6, que es un monoclonal anti CFA/I (56) obtenido como líquido de ascitis se obtuvieron valores altos de absorbancia (unión de inmunoglobulinas de ratón) para todos los péptidos de CFA/I (fig. 4). Para un pepscan con un anticuerpo monoclonal se esperaría que el anticuerpo reconociera a un solo péptido o a varios traslapados, pues este anticuerpo reconoce un solo determinante antigénico. Existen varias razones para pensar que los resultados corresponden a una unión inespecífica:

- 1.- Al purificar IgG a partir de este fluido de ascitis, hay una reducción en todos los valores de absorbancia, quedando varios valores de absorbancia elevados, los cuales corresponden a péptidos alejados en la secuencia de CFA/I (fig 4).
- 2.- Los pepsca realizados con sobrenadante de cultivo de híbridomas, que es una forma mucho más pura del anticuerpo monoclonal daban valores menores al fondo observado al utilizar únicamente el conjugado (fig. 4). Hay que recordar que el fluido

de ascitis contiene distintas proteínas, algunas de las cuales pueden ser inmunoglobulinas diferentes del anticuerpo monoclonal.

FIGURA 4



Resultados del pepscan de CFA/I con el anticuerpo monoclonal 1:6 obtenido de distintas maneras: ■ sobrenadante de cultivo de hibridomas diluido 1/25, ▨ fluido de ascitis diluido 1/400, □ IgGs purificadas a partir de fluido de ascitis (dilución final= 1/400). Cada posición en la secuencia de aminoácidos de CFA/I corresponde a un octapéptido cuyo aminoácido N terminal es el aminoácido en dicha posición. Octapéptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc. (ver métodos). Se graficó, para cada anticuerpo, el promedio de dos determinaciones.

#### ELISAS CON EL PÉPTIDO 1 10 (EXTREMO N-TERMINAL DE CFA/I)

Al realizar el pepscan con IgGs purificadas a partir del fluido de ascitis (ver arriba) se observó que para el péptido que comprendía las posiciones 4 a 11, los valores de absorbancia se reducían mucho menos, en comparación con los valores obtenidos utilizando líquido de ascitis sin purificar, que para los demás péptidos. Por esta razón, se pensó inicialmente que este péptido correspondía al epitopo reconocido por el monoclonal 1:6. Las pruebas posteriores, realizadas con péptidos sintéticos, demostraron lo contrario.

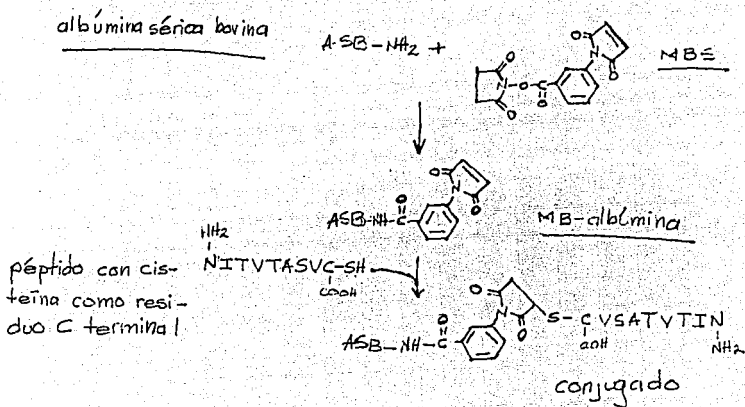
El anticuerpo monoclonal no se unió a la fase sólida (ELISA indirecto) sensibilizada con soluciones del péptido 1 10 en concentraciones que iban de 2.5 a 250  $\mu\text{M}$  en amortiguador de bicarbonatos (ver métodos). En cambio, el mismo monoclonal (en la misma concentración) se une normalmente a la fase sólida cuando se ha sensibilizado con subunidades nativas de CFA/I en una concentración de 0.3  $\mu\text{M}$ . por otra parte, este péptido, en concentraciones tan altas como  $2.1 \times 10^{-4} \text{M}$ , fue incapaz de inhibir la unión del monoclonal (1/400) con su antígeno en ELISA indirecto, mientras que normalmente una concentración de aproximadamente  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  (dos órdenes de magnitud menor) de CFA/I es suficiente para inhibir el reconocimiento en un 50%

#### ELISAS CON EL PÉPTIDO 4 11 (SUBSECUENCIA DE CFA/I)

Se pensó que los resultados negativos obtenidos utilizando el péptido sintético 1 10 se podrían deber a la forma en que quedaba expuesto el epitopo al quedar unido el péptido a la fase sólida. Para eliminar la posibilidad de un impedimento estérico de la unión antígeno-anticuerpo, se realizó el acoplamiento de un segundo péptido, que comprendía las posiciones 4 a 11 de la secuencia de CFA/I, a albúmina sérica bovina, de manera tal que el extremo amino quedara libre, orientado hacia el medio, como se expondría en los "pins". (Aparentemente hubo unión de los péptidos en pins a los anticuerpos presentes en fluido de ascitis 1:6). Esto fue posible gracias al uso de MBS (éster N-maleimidobenzoilhidroxisuccinimídico) como agente acoplante y a que los péptidos fueron sintetizados con una cisteína en el extremo carboxilo. La molécula de MBS tiene un grupo que reacciona con aminas libres y otro que reacciona con sulfhidrilos. Dado el orden en el que se realizaron las reacciones, el MBS se uniría

primero a la albúmina, preferentemente a grupos amino, abundantes en esta proteína. De esta manera, después de la reacción con la albúmina, el grupo que quedaría libre para reaccionar sería principalmente el grupo reactivo a sulfhidrilos. El complejo ASB-MBS reaccionaría entonces con el sulfhidrido de la cisteína colocada para este propósito como aminoácido carboxilo terminal (fig. 5).

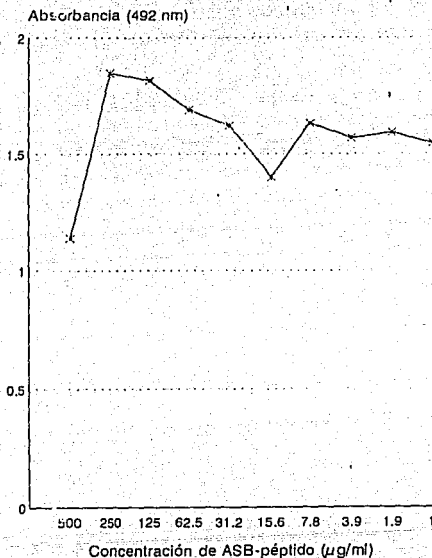
FIGURA 5



Esquema de las Reacciones de Acoplamiento de un Péptido con una Cisteína como Aminoácido N-Terminal a Albúmina Utilizando MBS como Agente Acoplante

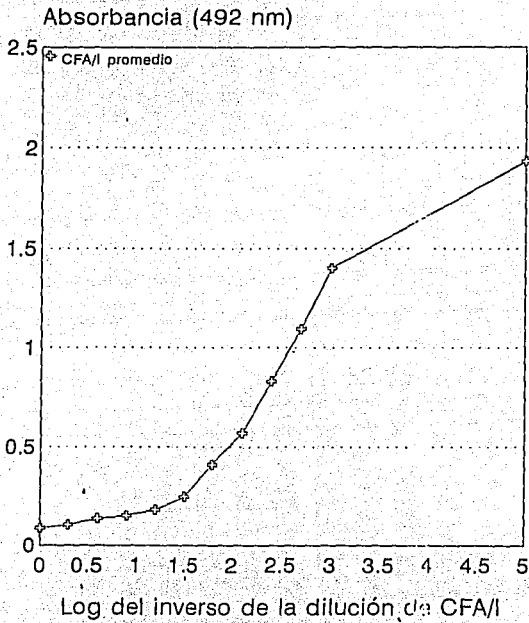
Los resultados con este péptido acoplado a albúmina sérica bovina son contradictorios. Por una parte, el complejo ASB-péptido es incapaz de inhibir la unión del monoclonal con su antígeno, al igual que el péptido 1-10. Como control, el mismo CFA/II en solución sí es capaz de inhibir dicha unión (figuras 6 y 7). Por otra parte, al sensibilizar microplacas de ELISA con el complejo ASB-péptido 4-11, hay unión de inmunoglobulinas a la fase sólida (fig.8), resultado completamente inesperado.

FIGURA 6



ELISA-inhibición con el péptido 4-11 acoplado a albúmina sérica bovina.  
Promedio de dos determinaciones separadas, cada una por duplicado.

FIGURA 7



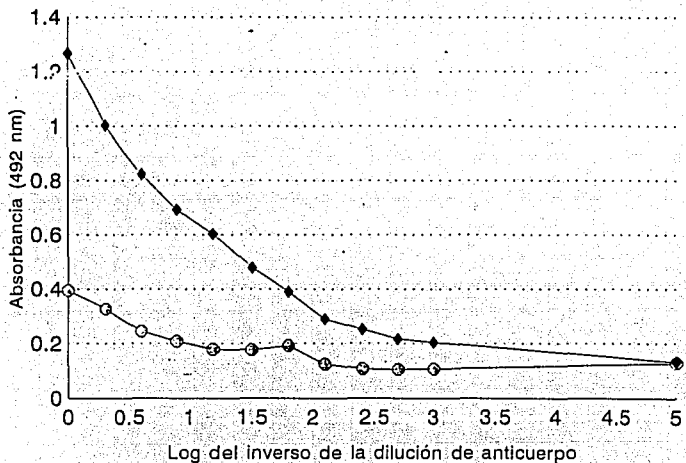
Control de ELISA inhibición con CFA/I

La concentración inicial de CFA/I (antígeno crudo) fue 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Promedio de dos determinaciones separadas, cada una por duplicado.



FIGURA 8



ELISA indirecto del péptido 4-11 acoplado a albúmina sérica bovina con el monoclonal 1:6 obtenido como fluido de ascitis.

Promedio de dos determinaciones simultáneas. ◆ ASB-péptido ◆ ASB

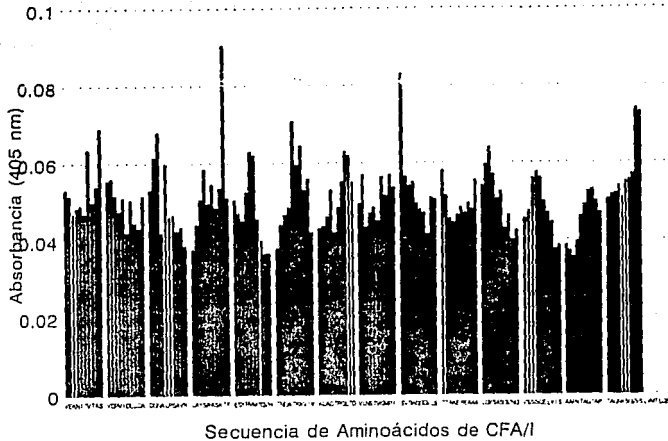
Es improbable que este único resultado positivo con los péptidos solubles de CFA/I se deba a que se trata del epítipo del anticuerpo monoclonal. El mismo conjugado péptido 4 11-albúmina fue incapaz de inhibir la unión del monoclonal a su antígeno. La unión de inmunoglobulinas a la fase sólida sensibilizada con el conjugado se podría deber a la presencia de otros productos de las reacciones para acoplar, como restos de MBS acoplados a la albúmina pero con grupos reactivos libres que podrían haber quedado sin reaccionar después de la adición del péptido y que podrían estar ocasionando la unión inespecífica de las inmunoglobulinas del sobrenadante de cultivo de hibridomas.

#### PEPSCAN CON PÉPTIDOS UNIDOS COVALENTEMENTE A "PINS" SINTETIZADOS EN EL LABORATORIO

Un resultado más apoya la idea de que ningún péptido de los sintetizados (en pins o solubles) es el epítipo del monoclonal 1:6. Además de los octapéptidos unidos covalentemente a "pins" utilizados en los experimentos mencionados arriba (sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc.), se sintetizaron en el laboratorio (como parte de este trabajo de tesis) nuevos péptidos unidos a pins, por duplicado (ver métodos). El monoclonal, en una concentración alta ( $\log 1/\text{dilución} = 2$ ) no se une a ninguno de estos péptidos (fig. 9). Los valores de absorbancia obtenidos son aún menores a los que da la unión inespecífica del conjugado anti ratón utilizado.

En suma, no se demostró en toda esta serie de experimentos la unión específica del anticuerpo monoclonal anti CFA/I 1:6 a ningún péptido que fuera subsecuencia de esta proteína, lo cual indica que el epítipo reconocido por ese monoclonal es discontinuo o conformacional.

FIGURA 9



Pepsan CFA/I con anticuerpo monoclonal 1:6 obtenido como sobrenadante de cultivo de hibridomas,  $1/10_3$  dil = 2. Se utilizaron los péptidos sintetizados por duplicado en el laboratorio. Se presenta el promedio de dos determinaciones, una con cada copia de los péptidos.

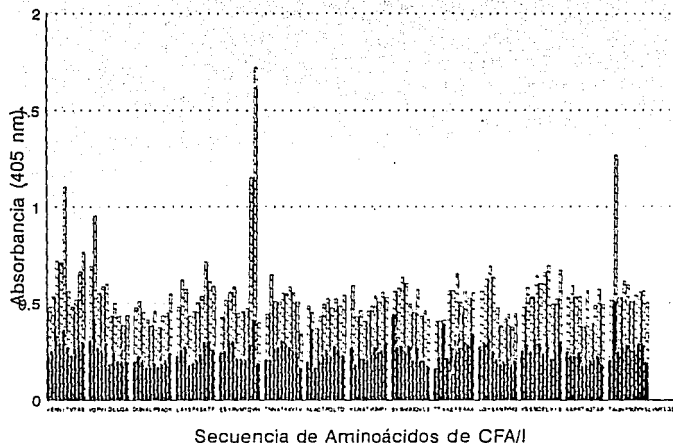
#### 4 EPIPOPOS LINEALES EN LA RESPUESTA HUMANA

Hasta ahora se han reportado solamente epítopos lineales de células B en un modelo de respuesta de simios a la inoculación parenteral de CFA/I purificado (57). La finalidad de este tipo de estudios es caracterizar la respuesta humana a la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica. En este trabajo de tesis se hace un avance más definitivo en este sentido. El modelo central de esta búsqueda de epítopos es la comparación de los anticuerpos presentes en sueros humanos antes y después de la exposición a ETEC que expresa CFA/I en su superficie durante una infección. Hay que aclarar que lo que se identifica al detectar inmunoglobulinas en sueros son los determinantes antigénicos de células B.

PEPSCAN CON EL PRIMER GRUPO DE PARES DE SUEROS (VER "MÉTODOS")

Se observó un aumento en los valores de absorbancia para todos los octapéptidos (aumento en la cantidad de moléculas de inmunoglobulinas que se unen a los péptidos) asociado a la infección por E.coli enterotoxigénica portadora de CFA/I, especialmente en ciertas regiones de la secuencia de aminoácidos (figs. 10, 11, 12).

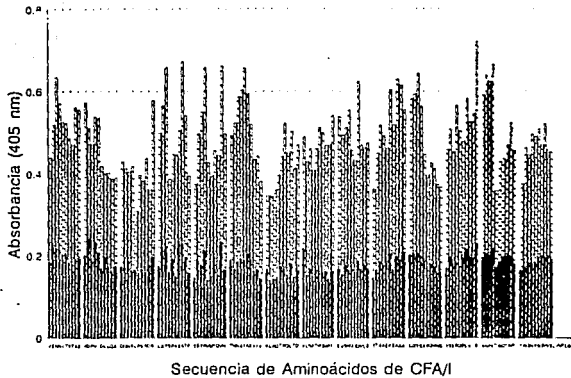
FIGURA 10



Pepscan con par de sueros antes y después de una infección por ETEC CFA/1+.  
Se utilizaron los octapéptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc.  
Se graficó el promedio de dos determinaciones con cada suero. Niño R 220 (ver métodos, tabla 1).

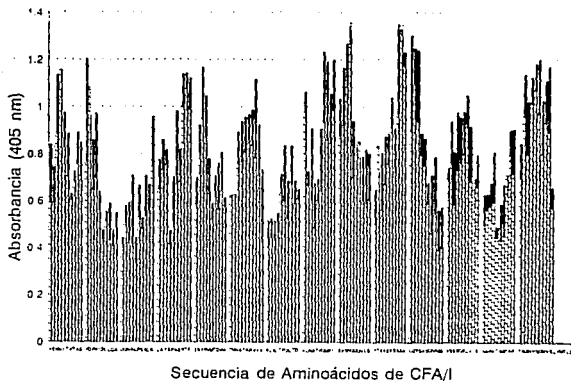
■ preinfección    ▨ postinfección

FIGURA 11



Pepsacan con par de sueros antes y después de la infección por ETEC CFA I - Octapéptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc. Se presenta el promedio de dos determinaciones con cada suero. Niño S-318 (ver métodos, tabla I) ■ preinfección ▨ postinfección

FIGURA 12



Pepsacan con par de sueros pre y post infección. Octapéptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc. Se graficó el promedio de dos determinaciones con cada suero. Niño D 573 (ver métodos, tabla I) ■ preinfección ▨ postinfección

Obsérvese que en algunos casos parece haber anticuerpos anti péptidos de CFA/I antes de la infección. Su presencia podría deberse a una infección previa no detectada o a la presencia de anticuerpos de origen materno en la sangre. El suero preinfección que dio mayores valores en la prueba (fig. 12) provenía de un niño que no había sido alimentado al pecho (D573), lo cual sugiere que el primer contacto con la bacteria pudo haber sido a una edad más temprana. Sin embargo, este niño tenía menos de tres meses en el momento de obtención del suero pre infección (ver tabla). A esta edad están todavía presentes en la sangre los anticuerpos IgG provenientes de la madre. Es muy posible que en el caso de este niño lo que se ha detectado son los anticuerpos maternos.

Con el objeto de discernir las regiones más importantes y para eliminar valores que pudieran corresponder a uniones inespecíficas de inmunoglobulinas, se escogieron los péptidos que cumplieran con criterios (ver Métodos) de repetibilidad, razón valor/fondo alta y seroconversión asociada a la infección. Los péptidos seleccionados fueron los siguientes:

### FIGURA 13

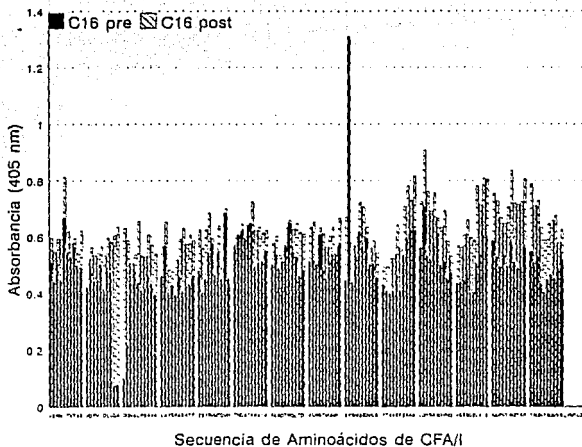
- 33- YSPASKTF
- 44- RVMTQVHT
- 48- QVHTNNAT
- 49- VHTNNATK
- 98- AAALGYSA
- 120- SAAPKTAG
- 122- APKTAGTA
- 124- KTAGTAPT
- 132- AGNYSQVW

Péptidos seleccionados como posibles epitopos en CFA/I reconocidos por la respuesta de anticuerpos humana a la infección por ETEC portadora de CFA/I

**Nota:** Existen diferencias en los aminoácidos asignados a las posiciones 52 y 74 en la secuencia de CFA/I por Klemm (30) y los asignados más tarde por Karjalainen et al. (31) y confirmados por Cassels et al (57). Los resultados obtenidos con los péptidos equivocados que abarcan dichas posiciones (los sintetizados inicialmente por Cambridge Research Biochemicals) no se tomaron en cuenta.

**CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS ANTERIORES CON CUATRO PARES MÁS DE SUEROS**  
Se realizaron Pepscanes sólo con los péptidos correspondientes a las regiones seleccionadas, ya que no había muestra suficiente para ensayar todos los péptidos. A pesar de esto, fue posible observar en esta siguiente serie de experimentos que los valores de absorbancia en los pepscan con sueros post infección son siempre mayores a los obtenidos con sueros preinfección para los múltiples péptidos (figs 14 a 21).

FIGURA 14

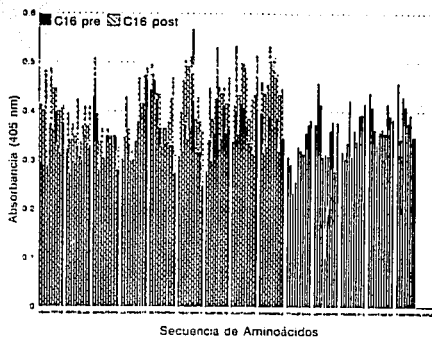


Copia 1 de los péptidos. Dilución del suero 1/2700 (log 1/dil = 3.43)

Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Se utilizaron los octapéptidos sintetizados en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán por duplicado, unidos covalentemente a "pins" de polietileno. En cada gráfica se observan los resultados de una determinación con cada suero en una de las dos copias de péptidos. Los sueros utilizados en el pepscan con la copia 1 eran reutilizados en el pepscan con la copia 2, por lo que los resultados no son promediables. Las diluciones de cada par fueron diferentes y se indican en cada gráfica.



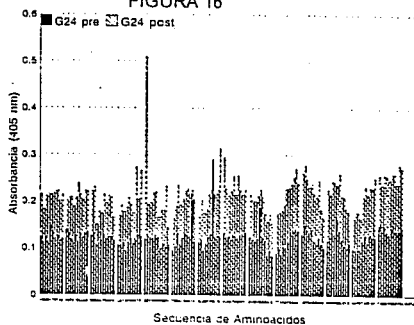
FIGURA 15



Copia 2 de los péptidos. Sueros previamente utilizados en las pruebas con la copia 1

Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Ver nota a pie de la figura 14.

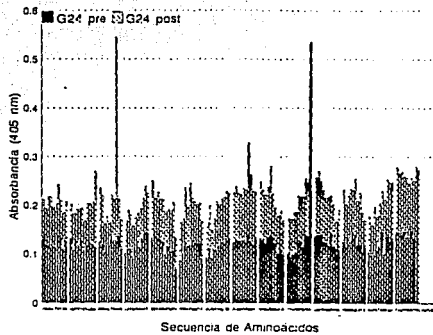
FIGURA 16



Copia 1 de los octapéptidos. Dilución de los sueros: 1/8 154 (log 1/51=3.91)

Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Ver nota a pie de la figura 14.

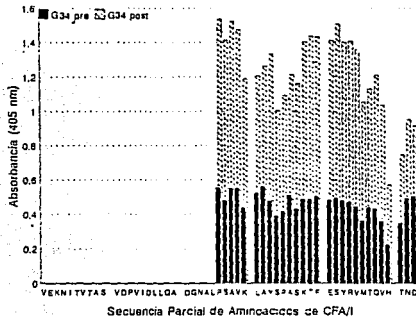
FIGURA 17



Copia 2 de los péptidos. Sueros previamente utilizados en los pepscan con la copia 1.

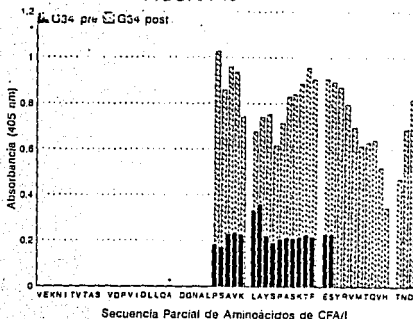
Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Ver nota a pie de la figura 14.

FIGURA 18



Copia 1 de los péptidos. Dilución de los sueros: 1/100 (log t.c.i. = 3)

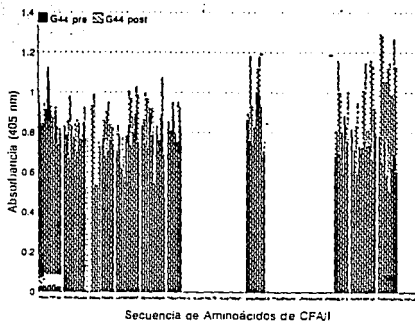
FIGURA 19



Copia 2 de los péptidos. Sueros usados previamente en las determinaciones con la copia 1.

Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Ver nota a pie de la figura 14.

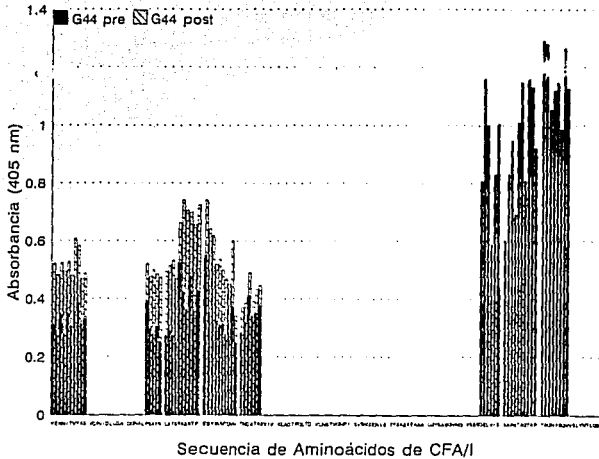
FIGURA 20



Copia 1 de los péptidos. Dilución de los sueros: 1/1000 (log 1/ml = 3)

Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Ver nota a pie de la figura 14.

FIGURA 21



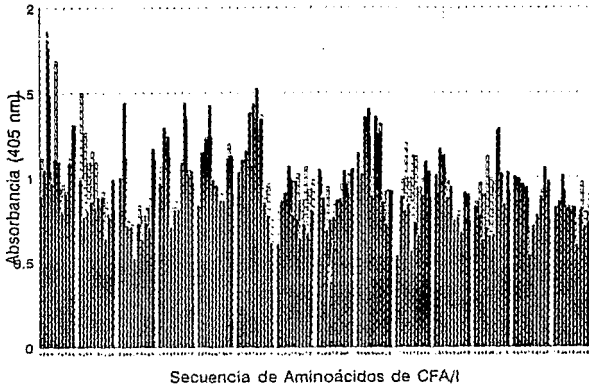
Copia 2 de los péptidos. Sueros utilizados previamente en las determinaciones con la copia 1.

Pruebas de pepscan con la segunda serie de pares de sueros pre-post infección (ver "Métodos", tabla II). Ver nota a pie de la figura 14.

#### SOBRE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO OBSERVADO

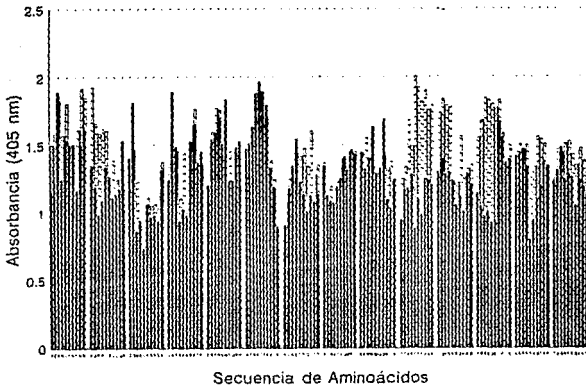
Se han planteado objeciones importantes al uso de sueros humanos en pruebas de Pepscan (64). Se ha objetado el fondo tan alto en estas pruebas, con lo que se obtiene una razón valor/fondo muy baja para los supuestos epítomos que se encuentran. Se ha observado también que los epítomos que se reportan son regiones que daban valores altos de absorbancia antes de la inmunización. Frente a estos problemas se tienen varias consideraciones que dan validez a los resultados obtenidos en este trabajo. Primero, se observó con un suero de un adulto humano de una zona endémica para ETEC (México) que aún aumentando drásticamente las condiciones de bloqueo en el pepscan, el aparente fondo se mantenía en los mismos valores (fig. 22).

FIGURA 22



Efecto de las condiciones de bloqueo en pepsan con suero humano:  ASB 1%  
 mayor bloqueo=(ASB1%+ovalbúmina1%+suero bovino 1/625 en PBS tween).  
 Péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc.

FIGURA 23



Efecto de la purificación de IgG en pepsan con un suero humano.  
 suero diluido 1/625,  IgG humanas 1/1000 (45 minutos de reacción).  
 Péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc.

Al utilizar en el pepscan IgG purificadas a partir de este suero, la reacción de fondo no se modificó (fig. 23).

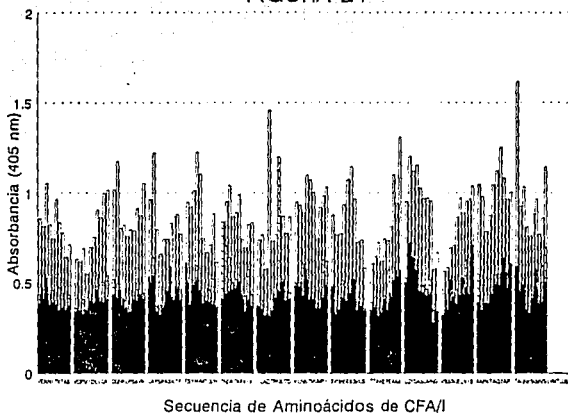
Estos dos resultados están a favor de la especificidad de la unión de inmunoglobulinas observada en los pepscan con sueros humanos.

Es posible que el aumento observado en los valores de absorbancia para los octapéptidos de CFA/I después de la infección fuera un efecto inespecífico de dicha infección. Esto se puede pensar si se considera que el aumento fue global, es decir, en todos los péptidos. Hay que resaltar que en todos los casos el único evento al que se podía asociar el aumento en absorbancia (aumento en inmunoglobulinas) para los péptidos era simplemente la infección por una cepa de ETEC que expresaba en su superficie CFA/I, no la enfermedad como tal, la cual se presentó en menos de un 30% de los casos (dos de siete estudiados). A pesar de todo esto, la posibilidad de un efecto inespecífico sólo podrá descartarse si el efecto no es observado con controles internos. Estos controles internos pueden consistir en pepscanes con sueros provenientes de niños del mismo grupo de edad, obtenidos antes y después de infecciones por agentes patógenos diferentes de ETEC. Las pruebas con controles de este tipo aclararían en forma definitiva esta cuestión. Otra explicación del aumento en los valores de absorbancia para todos los octapéptidos en los sueros de niños post infección puede ser que todas las subsecuencias de CFA/I con el tamaño mínimo necesario pueden actuar como determinantes antigénicos, con distintos grados de inmunogenicidad. Esto resulta más plausible si se toma en cuenta que la subunidad de CFA/I es una proteína pequeña (140 aminoácidos, MW=15 090 Da). Sin embargo, la posibilidad de un efecto inespecífico de la infección (ver arriba) no podrá ser descartada mientras no se realicen suficientes pruebas con sueros control.

## SUEROS DE ADULTOS HUMANOS

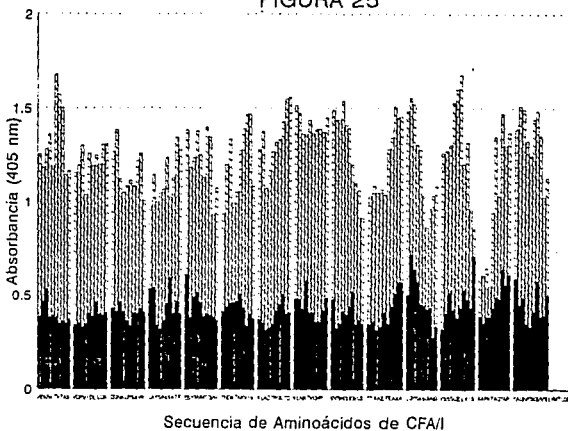
Con el objeto de obtener más evidencias de la especificidad de los anticuerpos que se unen a las regiones de CFA/I detectadas, se realizaron pepsanones con sueros de adultos humanos provenientes de una zona endémica para ETEC (México) y un suero proveniente de una zona no endémica (Suecia). Se observó que todos los sueros de zona endémica daban valores de absorbancia más altos, lo cual es atribuible a la presencia de una mayor concentración de anticuerpos anti CFA/I, que reconocen epítomos continuos de esta proteína, en esos sueros, que en el suero proveniente de una zona no endémica (figuras 24 y 25). Estos resultados apoyan los obtenidos con los pares pre y post infección; sin embargo, no hay una correlación entre estos resultados de pruebas de pepsan con los títulos de los mismos sueros obtenidos en ELISAs utilizando CFA/I purificado como antígeno (figs. 26 y 27). Esto se explica fácilmente si se toma en cuenta que los epítomos lineales son apenas una fracción pequeña del total de epítomos en una proteína (64), sin que esto pueda tener implicaciones sobre la importancia relativa de cada epítomo. Esta importancia relativa podría ser evaluada en estudios posteriores en los que se buscara una asociación de la presencia de anticuerpos contra ciertos epítomos y protección contra diarrea o colonización del intestino por bacterias que expresan CFA/I, así como presencia de anticuerpos contra ciertos epítomos en leche materna asociada a menor incidencia de diarrea en los niños alimentados con ella, por ejemplo. la identificación de epítomos asociados a protección puede ser un problema a abordar partiendo de los resultados de este estudio.

FIGURA 24



Pepscan con sueros de adultos humanos. ■ EC107 (suero de Suecia), ▨ Cervantes (suero de México)  
 □ Trujillo (suero de México).

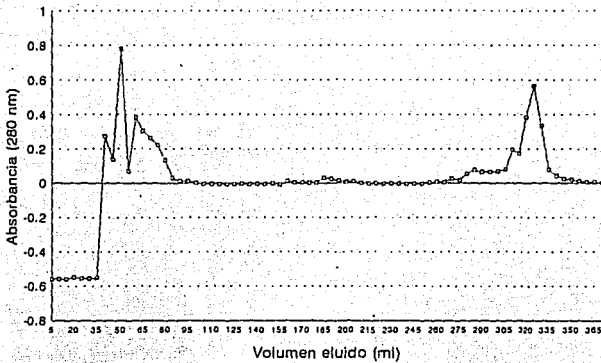
FIGURA 25



Pepscan con sueros de adultos humanos. ■ EC107 (suero sueco), ▨ Espinosa (suero mexicano).

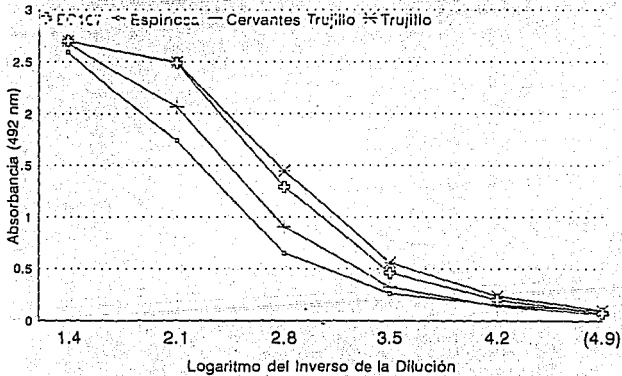


FIGURA 26



Purificación de CFA/I por cromatografía en DEAE-Sephadex G50  
 CFA/I eluye en los primeros 140 ml, después de los cuales se cambió a amortiguador con NaCl 1M  
 Se eluyó con amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M (Evans et al. 1979, ref. 15)

FIGURA 27



ELISA indirecto con sueros adultos humanos. Pozos sensibilizados con CFA/I purificado.  
 Promedio de dos determinaciones individuales, cada una por duplicado.

#### DIFERENCIAS Y SIMILITUDES CON EL MODELO SIMIANO

Se han reportado ya los epítomos lineales de células B reconocidos por la respuesta a la administración parenteral de CFA/I purificado en monos (57). Los hallazgos de este estudio muestran que la importancia relativa de distintas regiones de CFA/I es diferente en el modelo simiano y en la respuesta humana a la infección, si bien hay regiones detectadas considerados importantes en ambos estudios, como las posiciones 33-40 y 132-139 (ver figura 35 y anexo 1), además de que varias regiones de ambos casos se traslapan. Las diferencias podrían indicar que hay influencia de la vía de exposición al antígeno y la especie expuesta en las secciones de una proteína que van a ser reconocidas por una respuesta de anticuerpos, aunque las regiones preferentemente involucradas tienden a ser las mismas. Las regiones de CFA/I detectadas en ambos estudios podrían ser las más inmunogénicas de esta proteína. Si se demuestra en el futuro que la respuesta inmune estas regiones de CFA/I está involucrada en protección a la infección, el uso de estos determinantes antigénicos en vacunas contribuiría notablemente a la prevención de la diarrea ocasionada por ETEC.

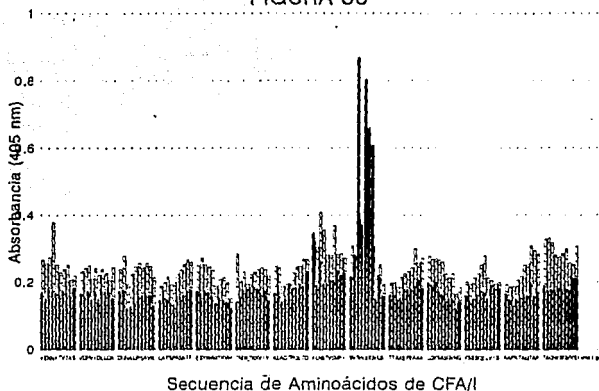
## 5 EPITOPOS LINEALES COMUNES

El criterio para seleccionar epitopos lineales comunes a partir de resultados de pepsan con los sueros hiperinmunes heterólogos obtenidos (ver métodos) fue también la seroconversión. Se compararon los resultados de los sueros inmunes con sus correspondientes sueros basales. Se encontró en algunos sueros preinmunes anticuerpos con gran afinidad por algunos péptidos de CFA/I. Esto se podría deber a que los conejos hubieran tenido infecciones por cepas de ETEC con fimbrias que comparten epitopos con CFA/I o simplemente que hubieran estado expuestos a cualquier agente que compartiera esos epitopos (figs. 28, 29, 30, 31, 32 y 33).

Se puede observar que la respuesta del conejo 52 a la inmunización con ETEC CFA/II+ dio lugar al aumento en los anticuerpos que reconocen la sección para la que ya había anticuerpos antes de inmunizar (alrededor de la posición 80). Esta región podría ser importante en reactividad cruzada, lo cual explicaría la presencia de anticuerpos contra ella temprano en la vida del animal. Si esto fuese cierto, este epitopo sería compartido por cepas de ETEC con especificidad para animales distintos. Debe hacerse notar que la respuesta varía mucho de animal a animal, por lo que se prefirió mostrar las gráficas por separado. Debido a esta diferencia en las respuestas en los diferentes animales, es necesario obtener resultados inmunizando más animales, para poder evaluar la importancia real de los posibles determinantes antigénicos comunes. Sería interesante una búsqueda en bancos de secuencias de las regiones para las que aparentemente ya había una respuesta al empezar el esquema de inmunización, aunque debe tenerse siempre en mente que el no encontrar ninguna homología con ninguna secuencia en un banco dado no es garantía de que no haya homología antigénica entre los CFAs estudiados y algún otro antígeno al que hayan podido estar expuestos los conejos.

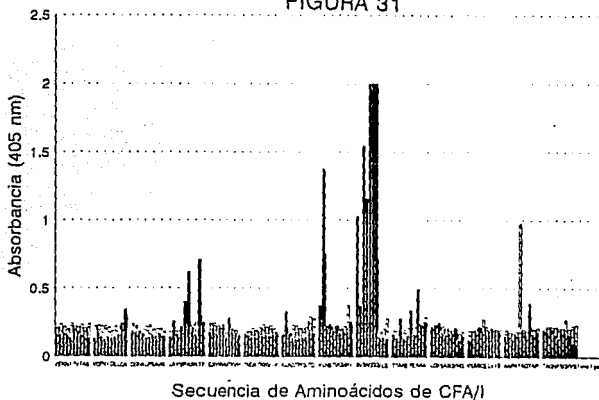


FIGURA 30



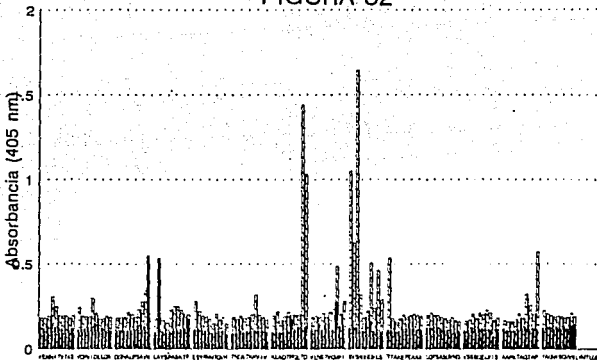
Pepscan de CFA/I con policlonal anti CS3 del conejo 52 (suero 3) ▨ y basal correspondiente ■  
 Promedio de dos determinaciones por suero, una con cada copia de cada péptido.  
 Péptidos sintetizados por duplicado en el Departamento de Infectología del INNSZ.

FIGURA 31



Pepscan de CFA/I con policlonal anti CS3 del conejo 53 (suero 4) ▨ y preinmune correspondiente ■  
 Promedio de dos pruebas por suero, una con cada copia de cada péptido.  
 Péptidos sintetizados por duplicado en el Departamento de Infectología del INNSZ.

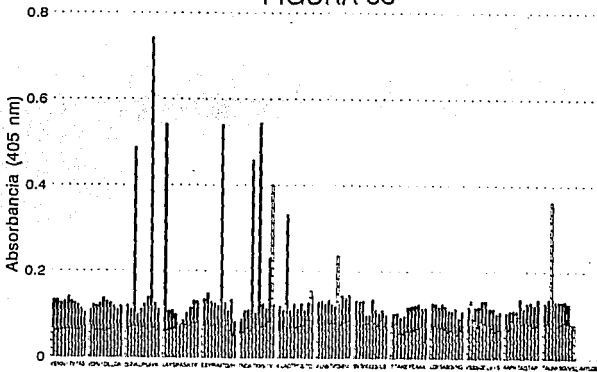
FIGURA 32



Secuencia de Aminoácidos de CFA/I

Pepsacan de CFA/I con policlonal anti CS4 del conejo 54 (suero 9) ▨ y basal correspondiente ■  
 Promedio de dos determinaciones por suero, una con cada copia de cada péptido  
 Péptidos sintetizados por duplicado en el Departamento de Infectología del INNSZ

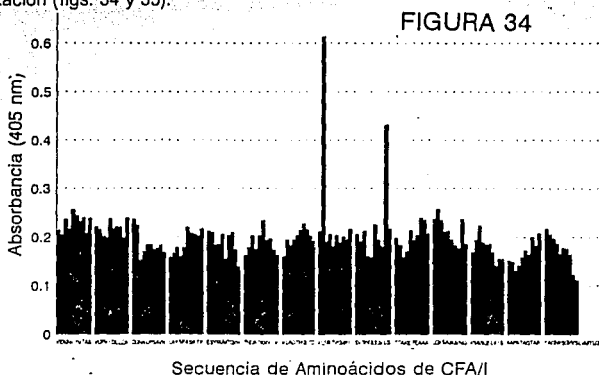
FIGURA 33



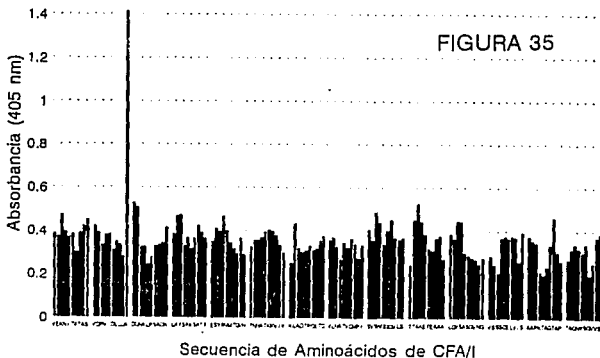
Secuencia de Aminoácidos de CFA/I

Pepsacan de CFA/I con policlonal anti CS4 del conejo 55 (suero 10) ▨ y basal correspondiente ■  
 Promedio de dos determinaciones por suero, una con cada copia de cada péptido  
 Péptidos sintetizados por duplicado en el Departamento de Infewctologia del INNSZ.

No se contaba con el suero preinmune correspondiente a los policlonales anti O166 y anti CS2. Por esta razón no es posible atribuir con certeza la presencia de anticuerpos que reconocen subsecuencias de CFA/I a la inmunización con estos factores de colonización (figs. 34 y 35).



Pepsan de CFA/I con policlinal anti CS2 (R1593Rowe). No se contó con el basal correspondiente. Promedio de dos determinaciones, una con cada copia de cada péptido. Péptidos sintetizados por duplicado en el Departamento de Infectología del INNSZ



Pepsan de CFA/I con policlinal anti PCF O166. No se contó con el suero basal correspondiente. Promedio de tres determinaciones independientes. Péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc.

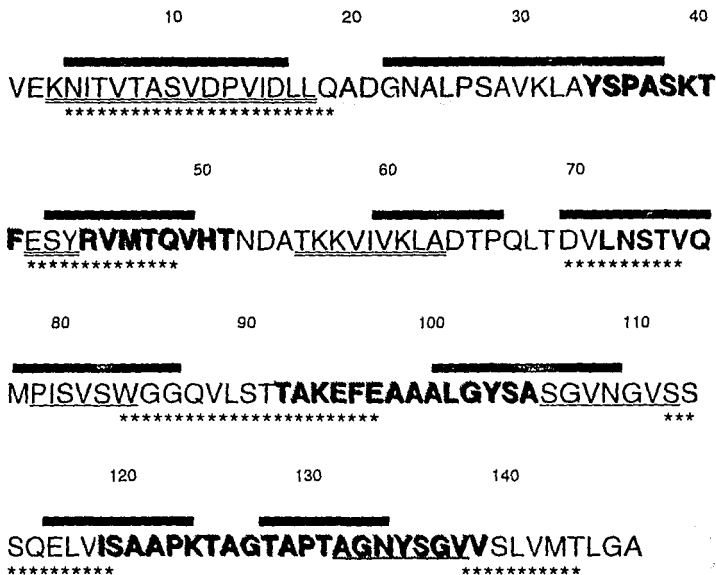
## REGIONES SELECCIONADAS

A partir de estos resultados se hizo una selección de epítomos comunes, con base en el criterio de seroconversión y en la repetibilidad de los resultados (fig. 36). Estas regiones pueden ser la causa de la homología antigénica entre varias fimbrias diferentes (ver Introducción), que a su vez puede ser una consecuencia de la relación genética que existe entre ellas (63). Llama la atención que no todos los péptidos seleccionados como epítomos comunes corresponden a zonas de homología.

La explicación de esto no es fácil, pero se puede ofrecer una conjetura válida: Se ha propuesto en otro tipo de estudios un "teoría de reconocimiento molecular", la cual propone el concepto de *péptidos complementarios*. Estos son péptidos que, además de estar codificados por secuencias complementarias, se unen de manera específica como resultado de tener perfiles hidropáticos invertidos; es decir, plantea que el perfil hidropático determina la capacidad de unión específica de los péptidos, más que la secuencia de aminoácidos por sí misma (76, 77, citados en 78). Por ejemplo, se ha demostrado que un péptido codificado por la secuencia inversa del RNA mensajero de la corticotropina se une en forma específica a los receptores de esta hormona y tiene actividad esteroideogénica, a pesar de tener una secuencia de aminoácidos bastante diferente. Este péptido (de 24 aminoácidos) tiene un perfil hidropático equivalente al de la hormona que mimetiza (78). Sería interesante ver si los aparentes epítomos comunes localizados en CFA/II presentan un perfil hidropático similar al de alguna o algunas subsecuencias de los factores de colonización con los que se obtuvieron los sueros heterólogos. Desafortunadamente, los programas de computadora que hacen dicho cálculo requieren secuencias mayores a los péptidos seleccionados para calcular dichos perfiles y no fue posible incluir esas predicciones en este trabajo.



FIGURA 36



Epítomos lineales de células B en CFA/I. Los diferentes caracteres indican diferentes epítomos:

**Principales epítomos de respuesta humana**

Valores altos con sueros adultos de zona endémica

Epítomos compartidos con CS1

Epítomos compartidos con CS3

Epítomos compartidos con CS4

Posibles epítomos comunes con O166

Posibles epítomos comunes con CS2

## EPÍTOPOS COMUNES Y RESPUESTA EN HUMANOS

Algunas de las regiones seleccionadas como epítomos lineales reconocidos por la respuesta humana se sitúan en el extremo amino de la proteína, que es una zona de homología entre distintas fimbrias (ver Introducción). Además, algunos de estos epítomos están en regiones identificadas como epítomos compartidos con otros factores de colonización: posiciones 40-50 y 119-134 (fig. 29). Estas subsecuencias de CFA/I serían de gran valor formando parte de una vacuna dirigida a despertar una protección cruzada frente a varias cepas de ETEC, especialmente si se encuentra que están involucradas en la inmunidad protectora. De aparente importancia son dos regiones. La que comprende las posiciones 11 a 21 aparece consistentemente como epítomo común en este estudio y aparece también en la respuesta parenteral en simios a CFA/I (ver anexo I). Esta región, si bien no está entre las que se consideran en este estudio como las más importantes en respuesta humana (ver "Epítomos Lineales en respuesta Humana"), sí corresponde a péptidos que dan una absorbancia alta en las pruebas de pepsan con sueros de adultos humanos provenientes de zonas endémicas a ETEC. La región que va de las posiciones 119 a 134, además de haber sido seleccionada en este estudio como importante en la respuesta humana, contiene octapéptidos reconocidos por la respuesta parenteral de simios a CFA/I purificado.

### SOBRE LOS MÉTODOS PREDICTIVOS

Se hizo una predicción de los tres subsecuencias de seis aminoácidos de longitud con más probabilidad de ser determinantes antigénicos, utilizando el método de Hopp y Woods (45), el cual se basa en los valores promedio de hidrofiliidad de secciones de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estudiadas. Los determinantes antigénicos predichos por este método fueron las secciones que van de las posiciones 52 a 57 (hidrofiliidad promedio= 1.38), 92 a 97 (hidrofiliidad promedio= 0.93) y 90 a 95 (hidrofiliidad promedio= 0.83). Estas predicciones no corresponden completamente con las observaciones de este estudio, especialmente con las de la respuesta humoral humana a la infección (ver fig. 29). En cambio, la mayoría de las regiones que, de

acuerdo a este estudio, son importantes en la respuesta humana tienen una probabilidad alta de tener una conformación de hoja  $\beta$ , de acuerdo al método de Chou y Fasman (citado en ref. 46, predicciones realizadas previamente, ref. 55. (Este método tiene una eficiencia predictiva de 76%). Aparentemente, en este modelo la estructura secundaria tiene más correlación con la inmunogenicidad que el perfil hidropático. Ver anexo II.

#### POSIBILIDAD DE CONFIRMAR LOS RESULTADOS

Una confirmación más completa de estos resultados se puede hacer inmunizando conejos con péptidos solubles correspondientes a las subsecuencias seleccionadas y analizar la capacidad de los anticuerpos obtenidos de reconocer a CFA/I y a las otras adhesinas estudiadas. Esto es necesario para poder llegar a conclusiones más firmes.

## CONCLUSIONES

- La subsecuencia KNITVTAS, muy conservada en las fimbrias de *E. coli* enterotoxigénica y presente en otras proteínas, podría ser un motivo con una función determinada.
- Contra lo que se pensaba al inicio del trabajo y de acuerdo a las evidencias presentadas, el anticuerpo monoclonal 1:6 (56), no reconoce un epítipo lineal de CFA/I.
- Las regiones que comprenden las posiciones 33 a 56, 98 a 105 y 120 a 139 podrían ser epítipos lineales de células B reconocidos por la respuesta humana a la infección por *E. coli* enterotoxigénica que expresa esta adhesina.
- Dado que la respuesta de anticuerpos humana a la exposición a CFA/I durante una infección puede tener similitudes y diferencias con la respuesta de otros primates a la exposición a CFA/I por administración parenteral de bacterias muertas, las conclusiones sobre la respuesta inmune en humanos a las que se puede llegar utilizando modelos animales están limitadas.
- Las subsecuencias de CFA/I que son reconocidas por anticuerpos heterólogos pueden ser la causa de la reactividad cruzada entre distintas fimbrias. Esto debe ser corroborado con experimentos en los que se evalúe la capacidad de anticuerpos contra péptidos correspondientes a dichas subsecuencias de reconocer a la proteína completa.
- Las regiones de CFA/I que comprenden las posiciones 4 a 21, 40 a 50 y 119 a 134 son posibles epítipos de respuesta humana y a la vez posibles epítipos comunes. De estas, la última es además confirmada por los resultados en simios y la primera comprende una región inmunogénica en simios (posiciones 11 a 21). Péptidos

homólogos a estas regiones serían útiles como parte de una vacuna que protegiera contra diferentes cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica a la vez.

## PERSPECTIVAS

Son indispensables pruebas de Pepscan con un control interno, consistente en sueros de niños menores de dos años obtenidos antes y después de infecciones entéricas por microorganismos diferentes de *Escherichia coli* enterotoxigénica, para poder descartar la posibilidad de una respuesta inespecífica a los péptidos de CFA/I, con lo que se confirmarían los resultados sobre respuesta humana.

Dicha confirmación abriría camino a estudios sobre epítopos protectores (buscados a partir de los hallazgos sobre epítopos en respuesta humana). Dichos epítopos podrían ser la base de vacunas efectivas contra *Escherichia coli* enterotoxigénica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Levine, M.M. 1987 "*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, entero-hemorrhagic, and enteroadherent." J. Infect. Dis. 155(3):377-389.
- 2.- López-Vidal, Y. 1990 "Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* (with special reference to monoclonal antibodies and methods for epidemiological studies)." Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología Médica e Inmunología, Universidad de Göteborg, Suecia.
- 3.- Krogfelt K.A. 1991 "Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*." Rev. Infect. Dis. 13:721-35.
- 4.- Klemm, P. 1985 "Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*." Rev. Infect. Dis. 7(3): 321-340.
- 5.- Isaacson R.E. 1988 "Mol. and genetic basis of adherence for enteric *Escherichia coli* in animals". en "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens", James A. Ruth, editor. 1988 American Association for Microbiology, Washington, D.C., Capitulo 2, pp. 28-44.
- 6.- Hinson G., Williams P.H. 1990 "Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*." en "Genetics of Bacterial Diversity" Hopwood D.A. y Chater K.E., editores. 1990.
- 7.- McConnell M.M., Thomas L.V., Willshaw G.A., Smith H.R. Rowe B. 1988 "Genetic control and properties of Coli surface Antigens of Colonization Factor Antigen IV (PCF 8775) of enterotoxigenic *Escherichia coli*" Infect. Immun. 56: 1974-1980
- 8.- Willshaw G.A., McConnell M.M., Smith H.R. Rowe B. 1990 "Structural and regulatory genes for Coli Surface Associated antigen 4 (CS4) are encoded by separate plasmids in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of serotype O25:H42" FEMS Microbiol. Lett. 68: 255-260.
- 9.- Saveikoul P.H., Willshaw G.A., McConnell M.M., Smith H.R., Hamers A.M., van der Zijst B.A.M., Gaastra W. 1990 "Expression of CFA/I is positively regulated." Microb. Pathogenesis 8:91-99

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 10.- Gaastra W., Jordi J.A., Mul E.M.A., Hamers A.M., McConnell M.M., Willshaw G.A., Smith H.R., van der Zeijst B.A.M. 1990 "A silent regulatory gene *cfa D'* on region 1 of the CFA/II plasmid NTP 113 of enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Microb. Pathog.* 9: 285-291
- 11.- Hibberd M.L., McConnell M.M., Willshaw G.A., Smith H.R., Rowe B. 1991 "Positive regulation of Colonization Factor Antigen I (CFA/I) production by enterotoxigenic *Escherichia coli* producing the colonization factors CS5, CS6, CS7, CS17, PCFO9, PCFO159:H4, and PCF O166." *J. Gen Microbiol.* 137: 1963-1970
- 12.- Karjalainen T.K., Evans D.G., Evans Jr. D.J., Graham D.Y., Chao-Hung Lee 1991 "Iron represses the expression of CFA/II fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*." *Microb. Pathogenesis* 11:317-323
- 13.- Urbina G., Cavazza M.E., Pérez Schael I. 1989 "Heterogeneous plasmid population from enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Venezuelan children with acute diarrhoea." *gen (Revista Venezolana de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología)* 43(3):194-201
- 14.- Moch T., Hoschützky H, Hacker J., Kröncke K.-D., Jann K. 1987 "Isolation and characterization of the -sialyl- $\beta$ -2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3462-3466.
- 15.- Evans D.G., Evans Jr. D.J., Clegg S., Pauley J. 1979 "Purification and characterization of the CFA/II antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Infect. Immun.* 25(2): 738-748.
- 16.- Honda T., Cakir N., Arita M., Miwatani T. 1989 "Purification and characterization of the CS2 pili of Colonization Factor Antigen II produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Microbiol. Immunol.* 33(4): 265-275.
- 17.- Levine M.M., Ristaino P., Marley G., Smyth C., Knutton S., Boedeker E., Black R., Young C., Clements M.L., Cheney C., Patnaik R. 1984 "Coli surface antigens 1 and 3 of Colonization Factor Antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans." *Infect. Immun.* 44(2): 409-420.
- 18.- Evans D.G., Evans Jr. D.J. 1978 "New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8." *Infect. Immun.* 21(2): 638-647.

- 19.- Honda T., Arita M., Miwatani T. 1984 "Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor." *Infect Immun.* 43(3): 959-965.
- 20.- McConnell M.M., Thomas L.V., Scotland S.M., Rowe B. 1986 "The possession of Coli Surface Antigen CS6 by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O25, O27, O148, and O159: a possible colonization factor? *Current Microbiol.* 14: 52-4.
- 21.- McConnell M.M., Chart H., Field A.M., Hibberd M., Rowe B. 1989 "Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O166." *J. Gen Microbiol.* 135: 1135-1144.
- 22.- Darfeuille-Michaud A., Forestier C., Joly B., Cluzel R. 1986 "Identification of a nonfimbrial adhesive factor of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain." *Infect. Immun.* 52(2): 468-475.
- 23.- Tacket C.O., Maneval D.R., Levine M.M. "Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4." *Infect Immun.* 55(5): 1063-69.
- 24.- Caron J., Coffield L.M., Scott J. 1989 " A plasmid-encoded regulatory gene, *rns*, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:963-967.
- 25.- Caron, J. y Scott, J.R. 1990 "A *rns*-like regulatory gene for colonization factor antigen I (CFA/I) that controls expression of CFA/I pilin." *Infect. Immun.* 58(4): 874-878.
- 26.- Caron J., Maneval D.R., Kaper J.B., Scott J.R. 1990 "Association of *rns* homologs with colonization factor antigens in clinical *Escherichia coli* isolates." *Infect. Immun.* 58(10): 3442-3444.
- 27.- Mooi F.R. y de Graaf F.K. 1985 "Molecular biology of fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118:119-138.
- 28.- Hultgren S.J., Normark S., Abraham S.N. 1991 "Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pilii". *Ann. Rev. Microbiol.* 45:383-415.
- 29.- Evans, D.J. y Evans, D.G. 1983 "Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factors, with special reference to colonization-factor antigens." *Rev. Infect. Dis.* 5(suppl. 4): S692-S700.



- 30.- Klemm, P. 1982 "Primary structure of the CFA 1 fimbrial protein from human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains." Eur. J. Biochem.
- 31.- Karjalainen T.K., Evans D.G., So M., Lee C.-H. 1989 "Molecular cloning and nucleotide sequence of colonization factor antigen I gene of *Escherichia coli*." Infect. Immun. 57(4): 1126-1130.
- 32.- Perez-Casal J., Swartley J.S., Scott J.R. 1990 "Gene encoding the major subunit of CS1 pill of human enterotoxigenic *Escherichia coli*." Infect. Immun. 58 (11): 3594-3600.
- 33.- Klemm P., Gastra W., McConnell M.M., Smith H. 1985 "The CS2 fimbrial antigen from *Escherichia coli*, purification, characterization, and partial covalent structure." FEMS Microbiol. Lett. 26: 207-210.
- 34.- Jalajakumari, Thomas C.J., Halter R., Manning P.A. 1989 "Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pill of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. Mol. Microbiol. 3(12): 1685-1695.
- 35.- Aubel D., Darfeuille-Michaud A., Joly B. 1991 "New adhesive factor (antigen 8786) on a human enterotoxigenic *Escherichia coli* 117:H4 strain isolated in Africa." Infect. Immun. 59(4): 1290-1299.
- 36.- Heuzenroeder M.W., Elliot T.R., Thomas C.J., Halter R., Manning P.A. 1990 "A new fimbrial type (PCFO9) on enterotoxigenic *Escherichia coli* 09:H-LT<sup>+</sup> isolated from a case of infant diarrhea in Central Australia." FEMS Microbiol. Letters 66: 55-60.
- 37.- Klemm, P. 1984 The *fim* A gene encoding the Type-1 fimbrial subunit of *Escherichia coli* (nucleotide sequence and primary structure of the protein). Eur. J. Biochem. 143: 395-399.
- 38.- Forestier C., Welinder K., Darfeuille-Michaud A., Klemm P. 1987 Afimbrial adhesin from *Escherichia coli* strain 2230: purification, characterization and partial covalent structure." FEMS Microbiol. Letters 40: 47-50.
- 39.- Heuzenroeder M.W., Neal B.L., Thomas C.J., Halter R., Manning P.A. 1989 "Characterization and molecular cloning of the PCF8785 CS5 antigen from an enterotoxigenic *Escherichia coli* 0115:H40 isolated in Central Australia." Mol. Microbiol. 3(3): 303-310.

- 40.- Clark C.A., Heuzenroeder M.W., Manning P.A. 1992 "Colonization factor antigen CFA/IV (PCF8775) of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the CS5 determinant" *Infect. Immun.* 60(3): 1254-1257.
- 41.- Karch H., Leying H., Goroncy-Bermes P., Kroll H.-P., Opferkuch W. 1985 "Three dimensional structure of fimbriae determines specificity of immune response" *Infect. Immun.* 50(2): 517-522.
- 42.- McConnell M.M., Chart H., Rowe B. 1989 "Antigenic homology within human enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial colonization factor antigens: CFA/II, col-surface-associated antigens (CS)1, CS2, CS4 and CS17." *FEMS Microbiology Letters* 61: 105-108.
- 43.- Geysen H.M., Rodda S.J., Mason T.J., Tribbick G., Schoof P.G. 1987 "Strategies for epitope analysis using peptide synthesis" *J. Immunol. Meth.* 102: 259-274.
- 44.- Feng D.F., Johnson M.S., Doolittle R.F. 1985 "Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods." *J. Mol. Evol.* 21: 112-125.
- 45.- Hopp T.P., Woods K.R. 1981 "Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(6): 3824-3828.
- 46.- Buseta B., Hospital M. 1982 "An analysis of the prediction of secondary structures" *Biochim Biophys. Acta* 701: 11-118.
- 47.- Kabsch W., Sander C. 1983 "How good are predictions of protein secondary structure?" *FEBS Letter* 155(2): 179-182.
- 48.- Geysen H.M., Rodda S.J., Mason T.J. 1986 "A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant" *Molec. Immunol.* 23(7): 709-715.
- 49.- Hoepflich P.D., Langton B.C., Zhang J.-w., Tam J.P. 1989 "Identification of immunodominant regions of transforming growth factor " *J. Biol. Chem.* 264(32): 19086-19091.
- 50.- Ogert R.A., Gentry M.K., Richardson E.C., Deal C.d. Stewart Abramson S.N., Alving C.R., Taylor P., Doctor B.P. 1990 "Studies on the topography of the catalytic site of acetylcholinesterase using polyclonal and monoclonal antibodies" *J. Neurochem.* 55(3): 756-763.

- 51.- Geysen H.M., Tainer J.A., Rodda S.J., Mason T.J., Alexander H., Getzoff E.D., Lerner R. A. 1987 "Chemistry of antibody binding to a protein" *Science* 235:1184-1190.
- 52.- Getzoff E.D., Geysen H.M., Rodda S.J., Alexander H., Tainer J. A., Lerner R.A. 1987 "Mechanism of antibody binding to a protein" *Science* 235: 1191-1196.
- 53.- Tribbick G., Triantafyllou B., Lauricella R., Rodda S.J., Mason T.J., Geyen H.M. 1991 "Sytematic fractionation of serum antibodies using multiple antigen homologous peptides a affinity ligand" *J. Immunol. Meth.* 139: 155-166.
- 54.- Horal P., Svennerholm B., Jeanson ., Rymo L., Hall W.W., Vahline A. 1991 "Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides repreenting various HIV-1 isolates." *J. Virol.* 65(5): 2718-2723.
- 55.- Klemm P., Mikkelsen L. 1982 "Prediction of antigenic determinants and secondary structures of the K88 and CFA1 fimbrial proteins from enteropathogenic *Escherichia coli*." *Infect. Immun.* 38(1): 41-45.
- 56.- López-Vidal Y., Klemm P., Svennerholm A.-M. 1988 "Monoclonal antibodies against different epitopes on colonization factor antigen I of enterotoxin-producing *Escherichia coli*." *J. Clin. Microbiol.* 26(10): 1967-1972.
- 57.- Cassels F.J., Deal C.D., Reid R.H., Jarobe D.L., Nausss J. L., Carter J.M., Boedeker E.C. (1992) "Analysis of *Escherichia coli* colonization factor antigen I linear B-cell epitopes, as determined by primate responses, following protein sequence verification." *Infect. Immun.* 60(6): 2174-2181.
- 58.- Elsinghorst E.A., Kopecko D.E. 1992 "Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Infect. Immun.* 60(6): 2409-17.
- 59.- O'Farrelly C., Branton D., Wanke C.A. 1992: "Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain" *Infect. Immun.* 60(7) 2593-2597.
- 60.- Nagy B., Casey T.A., Whipp S.C., Moon H.W. 1992 "Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age." *Infect. Immun.* 60(4): 1285- 1294.

- 61.- Wennerås, Svennerholm A.M., Árén C., Czerkinsky C. 1992 "Antibody-secreting cells in human peripheral blood after oral immunization with an inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine" *Infect. Immun.*
- 62.- Baldwin T.J., Knutton S., Sellers L., Manjarrez Hernández H.A., Aitken A., Williams P.H. 1992 "Enteraggative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin." *Infect. Immun.* 60: 2092-2095.
- 63.- Sommerfelt H., Grewal H.M.S., Svennerholm A. M., Gastra W., Flood P.R., Viboud G., Bhan M.K. 1992 "Genetic relationship of putative colonization factor 0166 to colonization factor antigen I and Coli Surface Antigen 4 of enterotoxigenic *Escherichia coli*". *Infect. Immun.* 60(9): 3799-3806.
- 64.- Horsfall A.C., Hay F.C., Soltys A.J., Jones M.G. 1991 "Epitope mapping" (*Revisión*) *Immunol. Today* 12(7): 211-213.
- 65.- Evans D.G., Graham D.Y., Evans Jr. D.J., Opekun A. 1984 "Administration of purified colonization factor antigens (CFA/I, CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers, response to challenge with virulent enterotoxigenic *Escherichia coli*" *Gastroenterology* 87: 934-40
- 66.- Árén C.M., Svennerholm A.-M. 1985 "Experimental enterotoxin-induced *Escherichia coli* diarrhea and protection induced by previous infection with bacteria of the same adhesin or enterotoxin type" *Infect. Immun.* 50(1): 255-261.
- 67.- Svennerholm A.-M., Holmgren J., Sack D.A. 1989 "Development of oral vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea" *Vaccine* 7:196-198
- 68.- Lipman D.J., Pearson W.R., 1985 "Rapid and Sensitive protein similarity searches" *Science* 227:1435-1441
- 69.- Devreux, Haeberli, Smithies 1984 *Nucleic Acids Research* 12(1): 387-395
- 70.- Pearson W.R., Lipman D.V. 1988 *PNAS* 85:2448-
- 71.- Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. 1981 "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at a 3 Å resolution" *Nature* 289: 366-373
- 72.- Wiley D.C., Skehel J.J. 1987 "The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus" *Ann. Rev. Biochem.* 56:365-394.
- 73.- Robertson J.S., Nicolson C., Bootman J.S., Major D., Robertson E.W., Wood J.M. 1991 "Sequence analysis of the hemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses

present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus" J. Gen. Virol. 72: 2671-2677

74.- Chothia C. 1974 "Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins" Nature 248 (marzo): 333-334.

75.- Kyte J., Doolittle R.F. 1982 "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein." J. Mol. Biol. 157: 105-132.

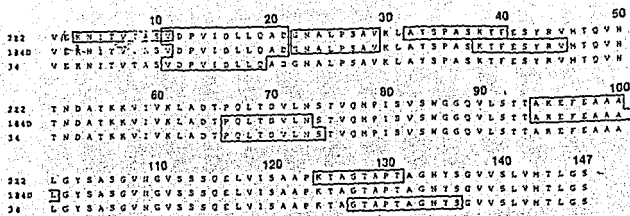
76.- Bost, K.L., Smith, E.M., Blalock, J.E. 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1372-1375 (citado en 60)

77.- Blalock, J.E. y Smith, E.M. 1984 Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 203-207 Citado por Clarke y Blalock (60)

78.- Clarke B.L. y Blalock J.E. 1990 "Steroidogenic activity of a peptide specified by the reversed sequence of corticotropin mRNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9708-9711

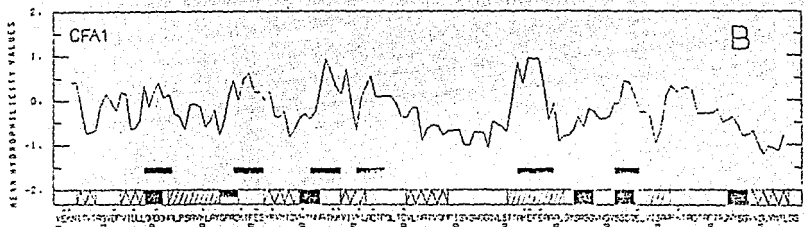
79.- van Regenmortel M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plaué S. Editores "Synthetic polipeptides as antigens" Elsevier, Amsterdam, 1988.

## ANEXO I



EPÍTOPOS LINEALES DE CÉLULAS B EN CFA/I DETECTADOS CON EL MODELO UTILIZADO POR CASSELLS ET AL. (57)

## ANEXO II

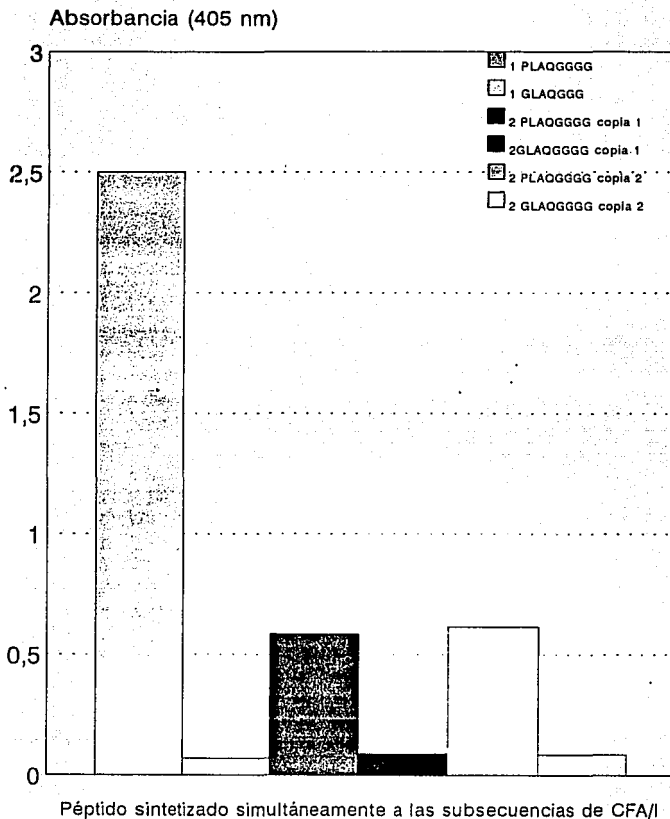


PERFIL HIDROPÁTICO Y PREDICIONES DE ESTRUCTURA SECUNDARIA REPORTADOS POR KLEMM (55). ■ VUELTA CON ALTO POTENCIAL, ▨ VUELTA CON BAJO POTENCIAL. Δ HOJA β. HELICOIDAL RANDOM COIL

PERFIL HIDROPÁTICO Y PREDICIONES DE ESTRUCTURA SECUNDARIA EN LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA SUBUNIDAD DE CFA/I

# ANEXO III

## FIGURA 37



Control de síntesis de péptidos por ELISA con monoclonal control. 1: pruebas con péptidos sintetizados por Cambridge Research Biochemicals Inc., 2: péptidos sintetizados en el INNSZ (por duplicado) PLAQ reacciona con el monoclonal, GLAQ no reacciona (síntesis simultánea a los péptidos de CFA/I)