



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTÉCNIA

EFECTO DEL FRAGMENTO VARIABLE DE CADENA  
SENCILLA DEL ANTICUERPO ANTI-F5 EN ASAS  
INTESTINALES LIGADAS DE BOVINO DESAFIADAS  
CON *Escherichia coli* B41

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

LETICIA VELÁZQUEZ VÁZQUEZ

ASESORES: DR. MVZ ALFREDO SAHAGÚN RUIZ  
DRA. MVZ ELIZABETH MORALES SALINAS

MÉXICO

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## CRÉDITOS

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología; el Quirófano para grandes especies ubicado en el Hospital de Équidos; La Sala de Necropsias y los Laboratorios de Histopatología e Inmunohistoquímica del Departamento de Patología. Estas instalaciones pertenecen a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, campus Ciudad Universitaria.

El proyecto fue totalmente financiado por CONACYT-TEXAS A&M con el número de proyecto 143525.

Durante el desarrollo del trabajo la autora recibió una beca por parte de CONACYT-TEXAS A&M y PRONABES Beca-Tesis de Licenciatura.

Directores de tesis:

Dr. Alfredo Sahagún Ruiz

Dra. Elizabeth Morales Salinas

Sinodales:

Dr. Miguel Angel Blanco Ochoa

Dr. José Angel Gutierrez Pabello

Dr. Jaime Campuzano Granados

Dr. Alfredo Sahagún Ruiz

## AGRADECIMIENTOS.

A mis padres por apoyarme financiera y moralmente e impulsarme para llegar a la meta final, y junto con mis hermanas Miriam, Karen y Melody y mi sobrino David, con su amor, ocurrencias, comprensión y sugerencias puede abrirme paso ante las adversidades los amo.

Al resto de mi familia abuelos, tías y primos que como saben agradezco sus consejos y buena vibra.

A Giovanni por sostenerme y ayudarme en momentos difíciles, y por acompañarme cariñosamente en este largo trayecto jeje.

A mis amigos Mirna, Tania, José Luis, Chucho, Ilich, Angelia, Jhonatan, Dany, Oso, Manolo, Rojo, Moreno, Paty, Karina, Oscar, Esteban, Alejandro Benítez, Rulo, Hilda, Jiovani, etc. etc. Ustedes saben!!!

Al señor Miguel A. Martínez R, Luis A. Morales A. y Jaime Eugenio C. del depto. de Patología.

A mis asesores de tesis Alfredo y Elizabeth.

Al Dr. José Juan M. M. del depto. de Medicina preventiva y a la Dra. Graciela Tapia del depto. de Genética y Bioestadística

A los departamentos de microbiología e inmunología y de patología.

En fin a todos aquellos que se pusieron en mi camino y me ayudaron, desde explicarme, prestarme, regalarme, facilitarme algo, hasta contarme un chiste o jalarme las orejas, que con todo eso hicieron posible aligerar la carga (je je).

Con mucho cariño Lety.

*Imposible ganar sin saber perder.*

*Imposible andar sin saber caer.*

*Imposible acertar sin saber errar.*

*Imposible vivir sin saber revivir.*

*La gloria no consiste en no caer nunca, sino más bien en levantarse todas las veces que sea necesario.*

***Y ESO ES ALGO QUE MUY POCA GENTE TIENE EL PRIVILEGIO DE  
PODER EXPERIMENTAR.***

*Bienaventurados aquellos que ya consiguieron recibir con la misma naturalidad el ganar o el perder, el acierto y el error, el triunfo y la derrota...*

***Mario Benedetti***

## CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	6
Hipótesis.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
Material y Métodos.....	9
Resultados .....	17
Discusión.....	29
Conclusión.....	32
Bibliografía.....	33

## RESUMEN

VELAZQUEZ VAZQUEZ LETICIA. Efecto del Fragmento Variable de Cadena Sencilla del Anticuerpo Anti-F5 en Asas Intestinales Ligadas de Bovino Desafiadas con *Escherichia coli* B41. (Bajo la dirección de Dr. Alfredo Sahagún Ruiz y Dra. Elizabeth Morales Salinas).

La colibacilosis es una enfermedad diarreica infecciosa que afecta a múltiples especies y es causada por la bacteria *Escherichia coli*. En el ganado lechero, cerca del 22% de los casos de diarrea son debidos a colibacilosis lo que representa grandes pérdidas económicas a nivel mundial. En este estudio se evaluó la capacidad del fragmento variable de cadena simple anti-F5 (scFv anti-F5), de inhibir la adherencia *E. coli* al epitelio intestinal, determinada indirectamente valorando los cambios patológicos presentes en el intestino después del desafío con *E. coli* B41 en un modelo de asas ligadas en becerros; dichos cambios fueron corroborados midiendo las asas y por observación macroscópica, histopatológica e inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba estadística de Mann Whitney y mostraron que en los tratamientos con los scFv anti-F5 expresados en bacteria disminuyeron la relación de la longitud entre circunferencia multiplicado por el perímetro de las asas intestinales desafiadas con *E. coli* B41 comparadas con el control sin tratamiento ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, en el estudio histopatológico no se obtuvieron diferencias en la reducción de las lesiones intestinales ( $P > 0.05$ ). Para establecer la capacidad del scFv anti-F5 de inhibir la adherencia de *E. coli* al intestino del bovino y por lo tanto de evitar la enfermedad, es necesario realizar un mayor número de estudios *in vivo*.

## INTRODUCCIÓN

La colibacilosis es una enfermedad diarreica infecciosa que afecta a múltiples especies y es causada por la bacteria *Escherichia coli*. En bovinos, cerca del 22% de los casos de diarrea son originados por esta causa, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial; siendo quizá la causa más importante de la muerte de los becerros del ganado lechero.<sup>(1-3)</sup>

Esta bacteria fue descrita de manera inicial por Theodore Escherich en 1885 bajo el nombre de *Bacterium coli commune* para indicar la presencia de este microorganismo en individuos sanos, también la señaló como responsable de infecciones extraintestinales. Posteriormente su nombre cambio a *Escherichia coli*; sin embargo, no fue sino hasta finales de 1940 que se pudo establecer plenamente su participación como agente productor de diarrea.<sup>(4)</sup>

La *E. coli* forma parte de la familia Enterobacteriaceae; se encuentra como habitante normal del medio ambiente, es microbiota normal del tracto gastrointestinal y bajo ciertas condiciones puede ser un patógeno oportunista, es un bacilo Gram negativo, mide de 3-4  $\mu\text{m}$  de longitud, es anaerobio facultativo, no esporulado, posee fimbrias y flagelos peritricos, puede presentar cápsula por lo cual algunas colonias son mucoides.<sup>(5)</sup>

Los factores de virulencia que posee son: el antígeno somático “O” compuesto de la parte polisacárida del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular que está asociado a evasión de la fagocitosis y del complemento, además de estar físicamente relacionado con la endotoxina (lípidos A); el antígeno capsular “K” constituido de carbohidratos, favorece la adherencia de *E. coli* a los enterocitos además de actuar como factor antifagocítico; la fimbria o *pili* antígeno “F” conformada de pilina es una adhesina que permite la adherencia específica de *E. coli* a la mucosa intestinal; y el antígeno flagelar “H” compuesto de flagelina que permite la motilidad de la bacteria.<sup>(1,4, 5-8.)</sup>



La *E. coli* se clasifica en 7 tipos patológicos de acuerdo a la asociación de su patogenicidad y de sus factores de virulencia, así como la enfermedad clínica resultante: Enterotoxigénica (ETEC), Enteropatógena (EPEC), Enteroagregativa (EA<sub>g</sub>EC), Enteroinvasiva (EIEC), Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* que produce una toxina parecida a la shigatoxina (STEC) y Uropatogénica (UPEC).<sup>(1, 6-8)</sup>

La *E. coli* ETEC es el tipo patológico que causa las diarreas en los animales neonatos durante las primeras 4 semanas de vida.<sup>(1)</sup> Es productora de dos tipos de enterotoxinas, la termolábil (LT) con los subtipos I y II, y la termoestable (ST) que presenta los subtipos a y b. La toxina que afecta a los becerros es la STa, al estimular a la guanidil ciclasa, que se encuentra en la membrana de los enterocitos, incrementando su actividad lo que provoca un aumento en la concentración intracelular del monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) y con lo que, a su vez, se induce la secreción de líquido y electrolitos hacia la luz del intestino delgado.<sup>(4, 6-8)</sup>

La mayoría de las colonias de *E. coli* ETEC aisladas de becerros presentan la adhesina F5 (antes denominada K99), que es el factor de virulencia promotor de colonización y proliferación de la bacteria en el intestino delgado.<sup>(9-11)</sup> Algunos estudios muestran que al evitar la adherencia de *E. coli* al epitelio del huésped a través del bloqueo de la adhesina F5, la producción de la diarrea disminuye junto con la mortalidad de los becerros.<sup>(10)</sup> Para este efecto se han empleado anticuerpos monoclonales, policlonales y calostro enriquecido con anticuerpos anti-F5, así como la aplicación de vacunas a las madres para inducir la producción de anticuerpos anti-F5, con el fin evitar la enfermedad. Sin embargo los costos de estos profilácticos son elevados.<sup>(11-13)</sup>

Recientemente se ha obtenido mediante ingeniería genética una proteína recombinante consistente en un fragmento de cadena simple de la región variable del anticuerpo anti-F5 (scFv anti-F5), el cual demostró ser capaz de inhibir la aglutinación de eritrocitos de caballo que expresan un receptor para F5 al igual que los enterocitos bovinos.<sup>(9)</sup>

## **Fragmento variable de cadena simple (scFv)**

El fragmento de cadena simple de la región variable del anticuerpo (scFv por sus siglas en inglés) es la mínima parte de un anticuerpo que tiene el sitio de unión al antígeno con la misma especificidad del epítipo que el anticuerpo completo parental, es monovalente y está construido por las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas (VL y VH) de la inmunoglobulina unidas covalentemente por un péptido ligador flexible.<sup>(9, 14-15)</sup> Los scFv se han usado para la detección del virus de la fiebre aftosa y el bacilo del ántrax.<sup>(14)</sup> Para su producción a gran escala, los fragmentos de los genes de la inmunoglobulina (VH y VL) que codifican para estos scFv pueden ser clonados y expresados en varios sistemas.<sup>(9,14)</sup>

Un modo de obtener una alta producción de anticuerpos monoclonales es mediante el uso de un hibridoma en cultivo celular, sin embargo ésta es costosa. Por otro lado, también se puede producir una alta concentración de anticuerpos monoclonales inoculando las células del hibridoma en la cavidad peritoneal del ratón induciéndole ascitis; sin embargo este procedimiento tiene implicaciones éticas importantes, considerando el bienestar animal y de hecho, algunos países europeos han decidido limitar la producción de anticuerpos en ratón.<sup>(16, 14)</sup>

Un método alternativo, es la producción por ingeniería genética de fragmentos de inmunoglobulinas en bacterias, los cuales presentan algunas ventajas como es el menor costo de producción y que no se emplean necesariamente animales como vectores de producción masiva en contraste con los anticuerpos monoclonales producidos en ratón.<sup>(14, 17)</sup> Otro método de producción es el uso de algunas plantas transgénicas, las cuales han demostrado que son adecuadas para la fabricación de proteínas heterólogas, incluyendo anticuerpos recombinantes que han sido expresados en el tejido verde (hojas) y en las semillas del tabaco así como en otros modelos de plantas dicotiledóneas; también se ha descrito la producción de scFv en el tubérculo de la papa.<sup>(18)</sup>

El arroz y el trigo son cereales muy importantes con prácticas agrícolas bien establecidas para su crecimiento, cosecha y procesamiento en todo el mundo, por lo que tienen un gran potencial para ser usados en la producción a gran escala de proteínas recombinantes. Una de las ventajas de estos cereales como vectores es que sus semillas secas son fáciles de almacenar y distribuir, y se ha demostrado que las semillas transgénicas pueden mantenerse al menos durante cinco meses a temperatura ambiente sin pérdidas significativas de actividad del scFv. Por lo que los cereales podrían ser usados como sistemas para producir moléculas para uso oral en Medicina Veterinaria.

(18)

## JUSTIFICACIÓN

La diarrea neonatal en becerros, originada por *E. coli* ETEC, ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial, ya que genera cerca del 22% del total de los casos de diarrea en bovinos, particularmente en becerras de remplazo del ganado lechero, en ganado de carne y de lidia <sup>(1,3, 13, 19-22)</sup>.

La colibacilosis provoca una alta mortalidad (hasta un 60%) y su elevada morbilidad (10-50%) implica pérdidas por tratamientos veterinarios, tiempo y mano de obra. Los animales afectados que logran recuperarse manifiestan retraso en el desarrollo corporal, por lo tanto se incrementan los costos de producción y la productividad de las empresas ganaderas disminuye. <sup>(13,23)</sup>

Con el fin de encontrar nuevas formas de combatir este problema se han implementado múltiples actividades en el manejo de las madres así como de las crías como son la vacunación, el enriquecimiento del calostro, la administración de anticuerpos específicos para evitar la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal del bovino. Sin embargo todas estas prácticas tienen un alto costo, por lo que se requieren técnicas más económicas y eficaces. <sup>(3,13,14,22-24)</sup>

En el Instituto de Investigación Biofarmacéutica de la Universidad de Texas A&M se han desarrollado fragmentos recombinantes conformados por una cadena simple de la región variable (scFv) del anticuerpo anti-F5, y se demostró que los scFv anti-F5 inhiben *in vitro* la unión de las fimbria F5 de *E. coli* a receptores específicos en eritrocitos de equino homólogos a los de enterocitos bovinos.<sup>(9)</sup> Posteriormente realizaron la clonación y

expresión del scFv anti-F5 en una planta de arroz (*Oryza sativa*) transgénica con el fin de obtener la producción masiva de los scFv anti-F5 de forma más económica.

Este estudio está dirigido a evaluar la capacidad de estos scFv anti-F5 para inhibir la adherencia de *E. coli* al epitelio intestinal bovino *in vivo* en un modelo de asas ligadas.

## **HIPÓTESIS**

El fragmento variable de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo anti-F5 será capaz de inhibir la adherencia de *E. coli* B41 evitando así el daño al epitelio intestinal bovino después de su inoculación en asas intestinales ligadas.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la capacidad del scFv anti-F5, de disminuir el daño al epitelio intestinal bovino por *E. coli* B41.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Comparar la respuesta de las asas intestinales inoculadas con los scFv anti-F5 expresados en arroz, scFv anti-F5 expresados en bacteria, anticuerpo monoclonal de ratón anti-F5 y desafiadas con *E. coli* B41, determinando la relación del peso, longitud y circunferencia [(L/C)\*P].
- Comparar mediante histopatología el grado de daño al tejido incluyendo la lesión epitelial y el grado de reacción inflamatoria ocasionados por *E. coli* B41 administrada después de los diferentes tratamientos.
- Identificar la presencia de *E. coli* adherida a las vellosidades intestinales de los diferentes tratamientos mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo específico anti-F5 de *E. coli*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevo a cabo en: el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología; el Quirófano para grandes especies ubicado en el Hospital de Équidos; la Sala de Necropsias y los Laboratorios de Histopatología e Inmunohistoquímica del Departamento de Patología. Estas instalaciones pertenecen a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, que está ubicada en Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D. F.

**Población de estudio.** Se utilizaron 5 becerros machos de raza Holstein Friesian sanos, de un día de edad, privados de calostro, adquiridos en Cuautitlán, Estado de México. Los animales al nacer fueron alimentados con 2 litros de leche descremada ultra pasteurizada comercial; y posteriormente se mantuvieron en ayuno 3 h antes de la cirugía. Se realizaron hemogramas preoperatorios de cada sujeto.

**Microorganismo.** Se utilizó la cepa B41 de *E. coli* enterotoxigénica (O101:K:K99<sup>+</sup>:F41<sup>+</sup>)\*, la cual fue cultivada en medio líquido Luria-Bertani con tetraciclina (50µg/ml)<sup>(25)</sup> para preparar alícuotas de 1.5 ml en microtubos con 15% glicerol que fueron almacenados a -70°C hasta su uso. Antes de cada cirugía se prepararon inóculos con una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC en 1 ml en jeringas para tuberculina.

**Concentración bacteriana.** Se determinó la concentración bacteriana usando la técnica de cuenta viable en placa a partir de *E. coli* B 41 cultivada por 1, 2 y 3 horas con el fin de alcanzar  $2 \times 10^8$  UFC/ml requerida para el inóculo.<sup>(26,27)</sup>

\*Donado por Dr. Suryakant D. Waghela. Department of Veterinary Pathobiology, Texas Veterinary Medical Center, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA

**Tratamientos.** Para cada segmento intestinal se utilizó una concentración de 60 µg de extracto de hojas de arroz expresando el scFv anti-F5, 30 µg anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-F5 de ratón; 60 µg scFv anti-F5 de sobrenadante de cultivo bacteriano y 60 µg de scFv de extracto bacteriano de la cepa HB2151 de *E. coli*. Como testigo de cada uno de estos tratamientos se utilizaron respectivamente: extracto de hojas de arroz no transgénico, anticuerpo monoclonal IgG anti-Pseudorrabia<sup>¥</sup> y *E. coli* B41 no recombinante inactivada por calor. Estos materiales fueron donados por el Dr. Suryakant D. Waghela del Departamento de Patobiología Veterinaria, del College Veterinary Medicine de la Universidad de Texas A&M.

**Técnica quirúrgica.** Los becerros fueron tranquilizados con Xilacina al 2%<sup>+</sup> con una dosis de 0.05 mg/kg de peso.<sup>(28)</sup> Posteriormente, fueron canalizados en la vena yugular con un catéter conectado a un equipo de venoclisis y se administro solución salina fisiológica (SSF) para inducir la anestesia vía intravenosa (IV) utilizando Pentobarbital sódico<sup>Y</sup> al 63% a una dosis de 2 mg/kg de peso.

La laparotomía se realizó a través de la región del hígado derecho, el íleon fue ligado con hilo de seda estéril, para formar de cinco a seis secciones intestinales, de 7 cm de longitud cada una y con una separación entre ellas de 1 cm.

Una vez realizadas las ligaduras, cada asa fue inoculada con uno de los tratamientos o sus respectivos testigos: scFv anti-F5 expresado en hojas de arroz ó extracto de hojas de arroz no recombinante; anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-F5 de ratón o isotipo del AcMo<sup>¥</sup>

¥ Pseudorabies MoAb 6D8-MB4; VMRD

+ PROCIN® Uso Veterinario. Xilacina 2%

Y Anestesal® Uso veterinario



(anticuerpo monoclonal anti pseudorrabia IgG); scFv anti-F5 de sobrenadante de cultivo bacteriano o de extracto bacteriano de la cepa HB2151 de *E. coli* o con *E. coli* B41 no recombinante inactivada; tal como se muestra en el cuadro 1. Transcurridos 10 minutos postinoculación todas las asas fueron desafiadas con *E. coli* B41 a una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC/1ml.

Durante el proceso quirúrgico la cavidad se mantuvo hidratada con SSF, por último fue cerrada suturando con nylon y al termino de la cirugía se aplicaron 4 ml/kg vía intramuscular del analgésico Vetalgina®<sup>±</sup>.

Los becerros fueron sacrificados mediante sobredosis de Pentobarbital Sódico vía IV, 12 horas después de la inoculación de *E. coli*; enseguida se realizó la recuperación de las asas intestinales.

± Vetalgina® Intervet.

No. Becerro	1	2	3
TRATAMIENTOS	scFv anti-F5 de extracto Bacteriano scFv anti-F5 de sobrenadante bacteriano Anticuerpo monoclonal anti-F5 ratón Anticuerpo monoclonal testigo isotipo Sin tratamiento	scFv anti-F5 de sobrenadante bacteriano Lisado de <i>E. coli</i> B41 Anticuerpo monoclonal testigo isotipo Anticuerpo monoclonal anti-F5 ratón* <i>E. coli</i> B41	scFv anti-F5 de extracto Bacteriano scFv anti-F5 de sobrenadante Bacteriano Lisado de <i>E. coli</i> B41 scFv anti-F5 en Arroz Arroz no transgénico <i>E. coli</i> B41
No. Becerro	4	5	
TRATAMIENTOS	scFv anti-F5 de extracto Bacteriano scFv anti-F5 de sobrenadante bacteriano Lisado de <i>E. coli</i> B41 scFv anti-F5 en Arroz Arroz no transgénico <i>E. coli</i> B41	scFv anti-F5 de extracto Bacteriano scFv anti-F5 de sobrenadante bacteriano Anticuerpo monoclonal anti-F5 ratón Anticuerpo monoclonal testigo isotipo <i>E. coli</i> B41 Sin tratamiento	

**Cuadro 1.** Experimento de asas ligadas. Cada asa intestinal fue inoculada con uno de los tratamientos, diez minutos postinoculación fueron desafiados con  $2 \times 10^8$  UFC de *E. coli* B41. Dos asas se mantuvieron sin tratamiento ni desafío, como testigos.

\* Esta muestra no fue considerada para el estudio debido a problemas técnico

**Toma de muestras y revisión macroscópica.** En cada tratamiento se midió longitud, circunferencia y peso del segmento intestinal correspondiente, y se obtuvo una proporción dividiendo la circunferencia entre la longitud y multiplicando por el peso  $[(C/L)*P]$  (Waghela comunicación personal). Esta proporción se considero, en este estudio, como la respuesta de las asas intestinales ligadas al desafío con *E. coli* B41. Se obtuvo el contenido de cada una de las asas en tubos individuales para realizar la cuantificación bacteriana. Cada muestra de tejido fue incluida en un frasco con formalina al 10% como medio de conservación para su posterior estudio histopatológico.

**Análisis histopatológico.** De cada segmento intestinal se cortaron cuatro fracciones de 3 mm de grosor, para colocarlos en cápsulas, las cuales se sometieron a los procesos de deshidratación, aclaración e infiltración en parafina. Posteriormente los tejidos incluidos en parafina fueron seccionados a 5  $\mu$ m de grosor utilizando un micrótopo y fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (HE), para posteriormente ser observados en un microscopio fotónico para su interpretación histopatológica.<sup>(29)</sup>

Para evaluar el grado de lesión se utilizó el siguiente criterio: 0+ Lesiones no aparentes, 1+ Ligero infiltrado inflamatorio, edema en submucosa, 2+ moderado infiltrado inflamatorio, edema en submucosa y atrofia de vellosidades, 3+ moderado infiltrado inflamatorio, edema en submucosa, necrosis y atrofia de vellosidades, 4+ severo infiltrado inflamatorio, edema en submucosa, necrosis, trombosis vascular y atrofia de vellosidades.<sup>(30)</sup>

Se uso la prueba estadística de Mann Whitney con el programa de computo XLSTAT 2009.1 para evaluar los resultados de los estudios de la respuesta de las asas y el histopatológico.

**Análisis inmunohistoquímico.** La técnica de Inmunohistoquímica que se empleó fue la del complejo Avidina Biotina Peroxidasa (ABC), utilizando un anticuerpo monoclonal IgG hecho en ratón anti-F5 , y con una IgG biotinilada de origen caprino anti-IgG de ratón .<sup>(31,32)</sup>

Los tejidos fueron seccionados a 5 µm de grosor y colocados en portaobjetos electrocargados positivamente; posteriormente fueron desparafinados en horno convencional de calor seco durante 1 hora a 60°C, se lavaron dos veces con Xilol durante 30 minutos cada vez.

Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas fueron sumergidas en alcohol etílico en concentraciones decrecientes de 100, 96, 80, 70 y 50%, realizando 3 lavados de 3 minutos cada uno, por cada concentración utilizada. Finalmente, se hicieron 3 lavados de 3 minutos cada uno con agua destilada a temperatura ambiente (TA).

Con el fin de inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos, las laminillas se trataron con una solución 1:5 de peróxido de hidrógeno y metanol absoluto respectivamente, realizando 1 cambio de 30 minutos a TA. Posteriormente, las laminillas se lavaron con la solución amortiguadora TRIS (pH 7.6), 3 veces durante 3 minutos cada uno a TA.

La recuperación antigénica se llevó a cabo mediante la inmersión de las laminillas en la solución de citratos (pH 6.0) y posteriormente, el tratamiento físico (calor) en horno de microondas convencional, a potencia “alta” por 3 minutos, la reacción fue detenida inmediatamente al sumergir las laminillas en solución TRIS fría.

*E. coli* K99 (6911): mouse monoclonal IgG1, MCA SANTA CRUZ  
Biotin-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Conjugate (Zymed™ Grade) Zymed® LAB-SA invitrogen immunodetection  
FELISA MOD FE-291A No. de Serie \*0301077 Hecho en México

A fin de bloquear la biotina y la avidina endógenas se utilizó la solución bloqueadora de avidina y biotina , se aplicaron 50 µl de cada solución por laminilla y se incubaron en cámara húmeda por 30 minutos a TA. Se realizaron tres lavados con TRIS de 3 minutos cada uno, posteriormente se decanto la solución para colocar el anticuerpo primario.

Para identificar la presencia de *E. coli* en la mucosa intestinal, se utilizo un anticuerpo primario monoclonal anti-F5\* a una concentración de 0.0033 µg/µl (1:30 de acuerdo a las sugerencias del laboratorio) hecho en ratón diluido en solución de TRIS. Las laminillas fueron incubadas en una cámara húmeda 17 horas a TA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con solución TRIS de 3 minutos cada uno.

En seguida se aplico el anticuerpo secundario biotinilado de origen caprino anti-IgG de ratón a una concentración de 0.015 µg/µl (1:100 de acuerdo a las sugerencias del laboratorio)<sup>§</sup> y fue incubado por 30 minutos en cámara húmeda a TA. Después se hicieron 3 lavados con solución TRIS de 3 minutos cada uno.

A continuación se aplicó a cada laminilla un conjugado enzimático de estreptoavidina<sup>γ</sup>, y se incubo en cámara húmeda por 30 minutos a TA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TRIS de 3 minutos cada uno.

Con el fin de evidenciar la reacción, se utilizo el cromógeno aminoetilcarbazol (AEC)<sup>γ</sup>, diluyendo una gota de cada reactivo en 1 ml de agua destilada y dejándolo actuar durante 4 minutos 30 segundos.

SIGMA-ALDRICH  
Endogenous Avidin/Biotine Blocking Kit Zymed Histochemical Reagents  
\* *E. coli* K99 (6911): mouse monoclonal IgG1, MCA SANTA CRUZ

Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada sobre cada laminilla para detener la reacción y luego fueron sumergidas en agua destilada. Como contraste las laminillas se tiñeron con hematoxilina de Meyer<sup>Y</sup>, durante 5 minutos. Finalmente se realizó el montaje, colocando un cubreobjetos en las muestras de tejido sellado con la resina hidrosoluble<sup>Y</sup>.

Los testigos para la inmunohistoquímica fueron las siguientes:

- A) Testigo positivo: Secciones de tejido intestinal bovino tratado solo con *E. coli* B41
- B) Testigo negativo: Secciones de tejido intestinal bovino sin la aplicación del anticuerpo primario.

La presencia o ausencia de *E. coli* sobre el borde de las vellosidades intestinales (adherencia) se identificó mediante la reacción colorimétrica positiva (evidenciada por una coloración rojiza) y se documentó con el analizador de imágenes Motic images Plus Version 2.0 ML.

El criterio de evaluación fue: Inmunopositivo ó inmunonegativo.

<sup>§</sup> Biotin-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Conjugate (Zymed™ Grade)  
Zymed® LAB-SA invitrogen immunodetection

<sup>Y</sup> HISTOSTAIN® –SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System

## RESULTADOS

La concentración aproximada de  $2 \times 10^8$  UFC/ml se alcanzó en 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , con agitación de 150 rpm. Esta concentración fue utilizada como la dosis de desafío en todos los tratamientos.

Los hemogramas preoperatorios reflejaron valores normales para todos los becerros utilizados en este estudio, por lo que se deduce que los animales no presentaban alguna enfermedad infecciosa.

Se presentan los resultados de los grupos: A) scFv anti-F5 de extracto bacteriano; B) scFv anti-F5 de sobrenadante de cultivo bacteriano; C) *E. coli* B41 inactivada, D) scFv anti-F5 de extracto de hojas de arroz; E) Extracto de hojas de arroz no transgénico; F) Anticuerpo monoclonal IgG anti-F5 de ratón; G) Anticuerpo monoclonal IgG anti-pseudorabia; y H) *E. coli* B41 desafiante.

### ***Revisión macroscópica***

Se determinó la capacidad de los diferentes tratamientos para disminuir la proporción de la longitud entre la circunferencia por el peso, a lo que se consideró como la respuesta de las asas ligadas al desafío con *E. coli* B41.

Durante la inspección macroscópica de la cavidad abdominal de los becerros, las asas intestinales ligadas en todos los tratamientos se observaron enrojecidas (congestión), de superficie brillante y húmeda (edema) y dilatadas (Figura 1 y 2).



Figura 1. Experimentos de asas ligadas. Secciones intestinales recuperadas correspondientes al íleon de los becerros tratados, observándose en todos congestión y edema.



Figura 2. Segmento intestinal correspondiente a un asa ligada.



Los resultados promedio de la respuesta intestinal se muestran en el cuadro 2.

Tratamientos		Long (cm)	Circ. (cm)	Peso (g)	Proporción
A	ScFv de Ext. Bac.	5.38	4.38	5.87	4.77
B	scFv de Sob. Bac.	5.64	4.36	5.18	4.01
C	<i>E. coli</i> B41 inactivada	5.83	4.50	6.82	5.26
D	scFv de Arroz	7.75	5.40	11.50	8.01
E	Arroz no transg.	9.50	6.00	11.58	7.31
F	AcMo anti F5	7.30	4.50	7.30	4.50
G	Isotipo AcMo	6.13	4.73	6.98	5.39
H	<i>E. coli</i> B41	6.23	5.28	8.76	7.42

Cuadro 2. Proporción entre circunferencia, longitud y peso de las asas intestinales. Los promedios de las medidas por tipo de tratamiento fueron utilizados para obtener la proporción  $(C/L)*P$ .

La respuesta de las asas intestinales del grupo A (scFv anti-F5 de extracto bacteriano) y del grupo B (scFv anti-F5 de sobrenadante de cultivo bacteriano) fue menor al ser comparada contra el grupo H (*E. coli* B41 viva) ( $P < 0.05$ ). En la comparación del grupo A con su testigo el grupo C (*E. coli* B41 inactivada) a pesar de que se observa reducción en la respuesta del grupo A estas diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ), sin embargo, en la comparación del grupo B con el C, la reducción de la respuesta si fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (Figura 3 y 4).

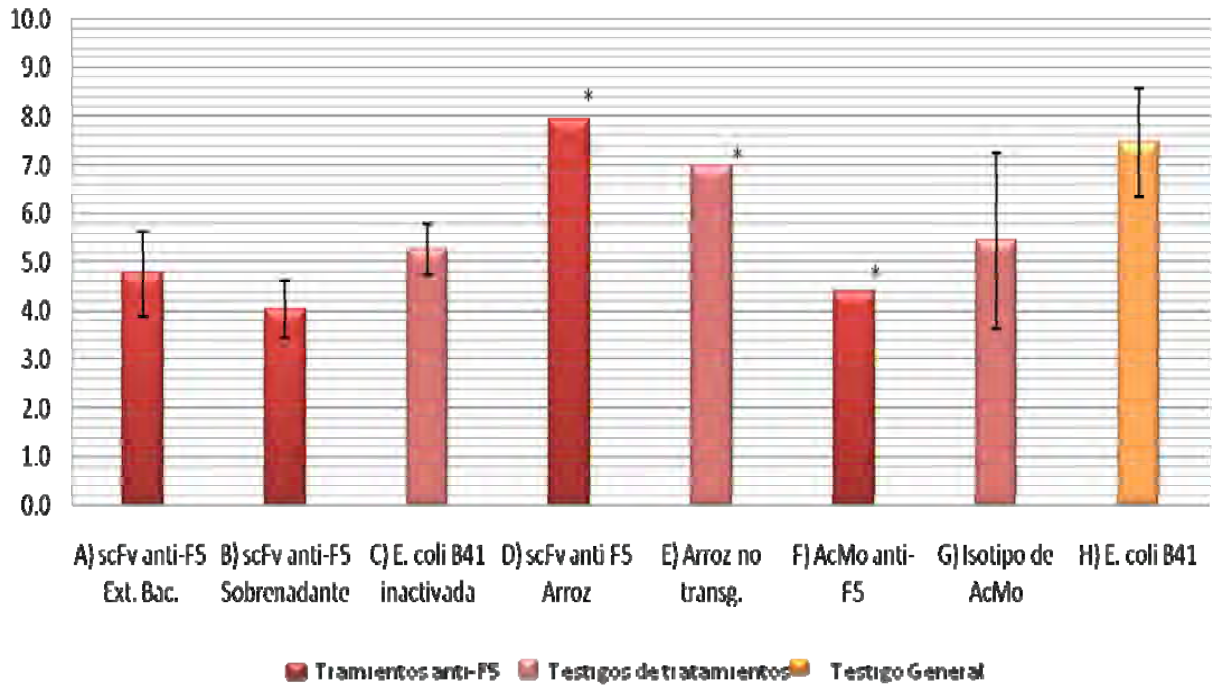


Figura 3. Promedio de la respuesta intestinal. A vs H y B vs H si mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ); mientras que los grupos D vs H y F vs H no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). En el caso de los testigos por grupo B vs C si hubo diferencia estadística ( $P < 0.05$ ); mientras que A vs C, D vs E y F vs G no presentaron diferencia ( $P > 0.05$ ) con la prueba de Mann Whitney. \*Debido al reducido número de repeticiones la desviación estándar no puede ser determinada.

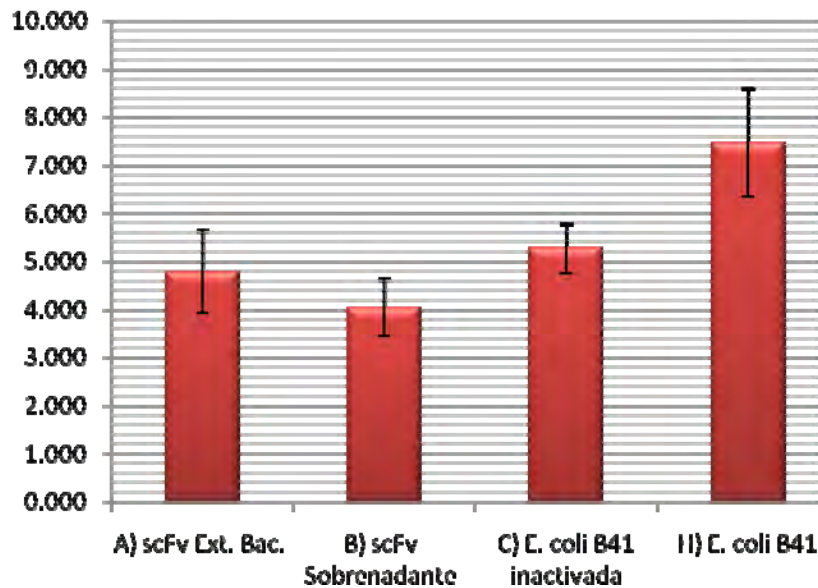


Figura 4. Promedio de la respuesta intestinal de los grupos A, B, C y H. A vs C no mostraron diferencia ( $P > 0.05$ ), B vs C si fueron diferentes estadísticamente. así como A y B vs H si mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con la prueba de Mann Whitney.

Similarmente, esta diferencia fue significativa considerando los grupos A y B, como un solo grupo, contra el grupo H ( $P < 0.05$ ) (figura 5). La comparación de los grupos D (scFv anti-F5 de extracto de hojas de arroz) y F (anticuerpo monoclonal anti-F5 producido en ratón) contra el grupo H no denotaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Al considerar los grupos A, B, D y F como un solo grupo, que son los que recibieron alguna forma de anticuerpo anti-F5, contra el grupo H no se observó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) (Figura 3 y 5).

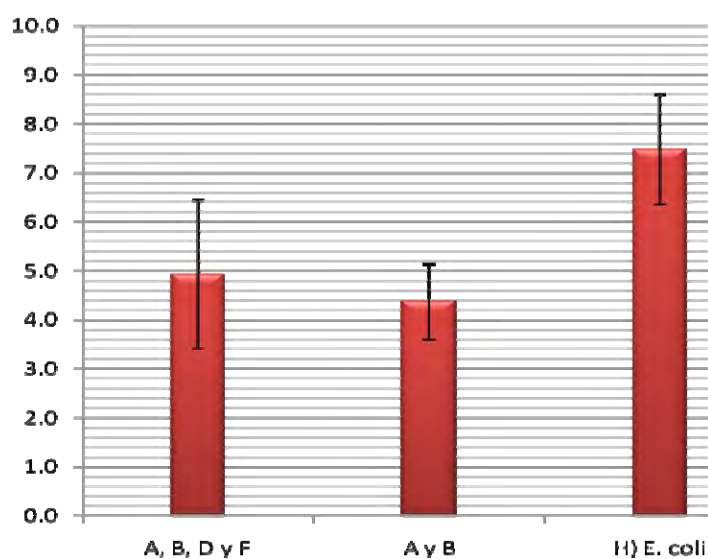


Figura 5. Promedio de la respuesta intestinal. Los grupos A, B, D y F considerados en un solo grupo vs H no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ); los grupos A y B vs H sí mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con la prueba de Mann Whitney.

Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación del grupo D (scFv anti-F5 de extracto de hojas de arroz) contra el grupo E (extracto de de hojas de arroz no transgénico) ( $P > 0.05$ ), y el grupo F (anticuerpo monoclonal anti-F5 producido en ratón) contra el grupo G (testigo de isotipo anticuerpo monoclonal anti-Pseudorabia) ( $P > 0.05$ ).

### ***Cuantificación Bacteriana***

Se realizó la cuantificación bacteriana de cada uno de los segmentos intestinales y los resultados indican que la *E. coli* B41 recuperada tanto de las asas no tratadas como de las tratadas con alguna forma de anticuerpo anti-F5, se desarrollo eficientemente. Las unidades formadoras de colonias promedio por grupo se muestran en el cuadro 3.

	Volumen (ml)	UFC
Ext. Bac. scFv	0.86	1.74x10 <sup>9</sup>
Sobrenadante scFv	1.18	1.17x10 <sup>9</sup>
Lisado de <i>E. coli</i> B41	3.00	6.9x10 <sup>8</sup>
Arroz scFv anti-F5	4.75	1.071x10 <sup>6</sup>
Arroz no transg.	4.25	7.44x10 <sup>5</sup>
AcM anti-F5	1.75	4.29x10 <sup>3</sup>
Isotipo AcM	2.90	1.47x10 <sup>9</sup>
<i>E. coli</i> B41	3.88	1.95x10 <sup>9</sup>

Cuadro 3. Cuantificación bacteriana del contenido de cada una de las asas expresado en unidades formadoras de colonias (UFC).

### ***Estudio histopatológico***

Se determino la capacidad de los diferentes tratamientos de disminuir las lesiones en el epitelio intestinal bovino de las asas ligadas al inhibir la adherencia de *E. coli* B41; se considero el daño al tejido incluyendo la lesión epitelial (exfoliación, atrofia y fusión de vellosidades) y el grado de reacción inflamatoria ocasionados por la bacteria (cuadro 4).

Los grupos A (scFv anti-F5 de extracto bacteriano), B (scFv anti-F5 de sobrenadante bacteriano), D (scFv anti-F5 de extracto de hojas de arroz) y F (anticuerpo monoclonal anti-F-5 producido en ratón), fueron comparados por separado con el grupo H (no tratado) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) (Figura 6).

## Lesiones Histológicas

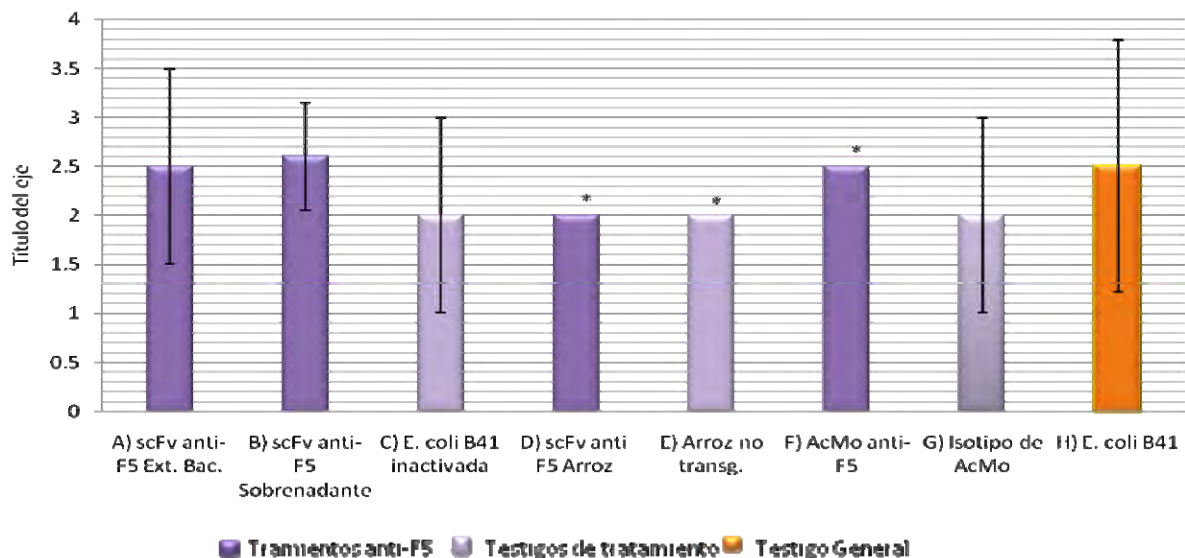


Figura. 6 Promedios de las lesiones histológicas por grupos. No se encontraron diferencias estadísticas con la prueba de Mann Whitney. \*Debido al reducido número de repeticiones la desviación estándar no puede ser determinada.

De igual forma no se presentaron diferencias comparando el grupo H contra la suma de todos estos grupos que recibieron alguna forma del anticuerpo A, B, D y F ( $P > 0.05$ ) (Figuras 7, 8 y 9).

	Tratamientos	Grado de Lesión
A	Ext. Bac. scFv	2.5
B	Sobrenadante scFv	2.6
C	<i>E. coli</i> B41 inactivada	2
D	Arroz scFv a F5	2
E	Arroz no transg.	2
F	AcMo a F5	2.5
G	Isotipo AcMo	2
H	<i>E. coli</i> B41	2.6

Cuadro 4. Lesiones histopatológicas de las asas intestinales de los tratamientos y testigos. El valor la lesión presentado es un promedio de las repeticiones por tratamiento, a las cuales se les dio calificaciones de 1, 2, 3, y 4 cruces.

Asimismo, en la comparación de cada uno de los tratamientos con sus controles individuales respectivos, el grupo A (scFv anti-F5 de extracto bacteriano) comparado con el grupo C (*E. coli* B41 inactivada); el grupo B (scFv anti-F5 de sobrenadante bacteriano) contra el grupo C; el grupo D (scFv anti-F5 de extracto de hojas de arroz) contra el E (extracto de hojas de arroz no transgénico), y el grupo F (anticuerpo monoclonal anti-F-5 producido en ratón) contra el G (anticuerpo monoclonal anti-Pseudorabia); tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ). (Cuadro 4).

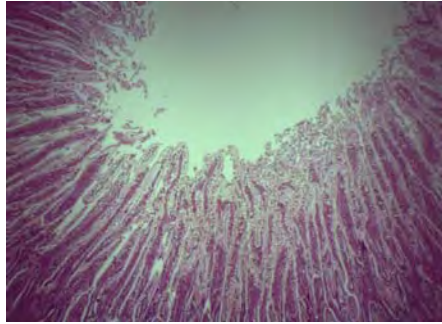


Fig. 7 a. Grupo A ScFv anti-F5 de sobrenadante de cultivo bacteriano  
H y E, 4X.

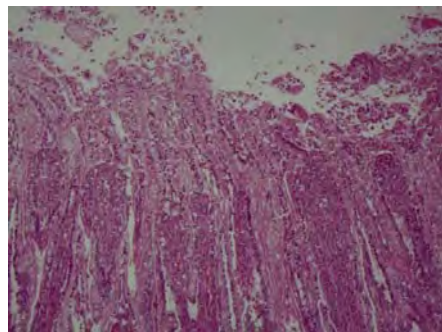


Fig. 7 b. Grupo B ScFv anti-F5 de extracto periplásmico bacteriano  
H y E, 30X.

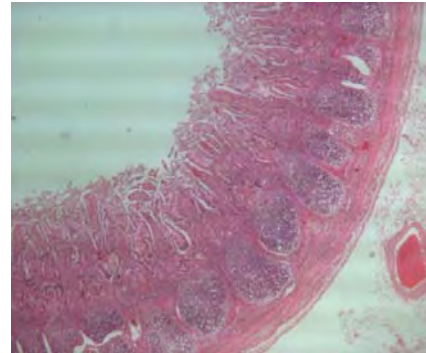


Fig. 7 c. Grupo C *E. coli* B41 inactivada.  
Testigo individual.  
H y E, 4X.

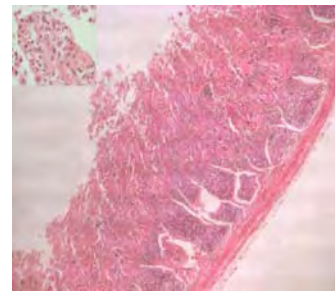


Fig. 7 d. Grupo H *Escherichia coli* B41  
Testigo general  
H y E, 4X

Figura 7 a, b, c y d. Secciones histológicas de íleon correspondientes a los grupos A y B con scFv anti-F5 expresado en bacteria comparadas contra su testigo grupo C con *E. coli* B41 lisada y contra el testigo general grupo H con *E.coli* B41 desafiante.



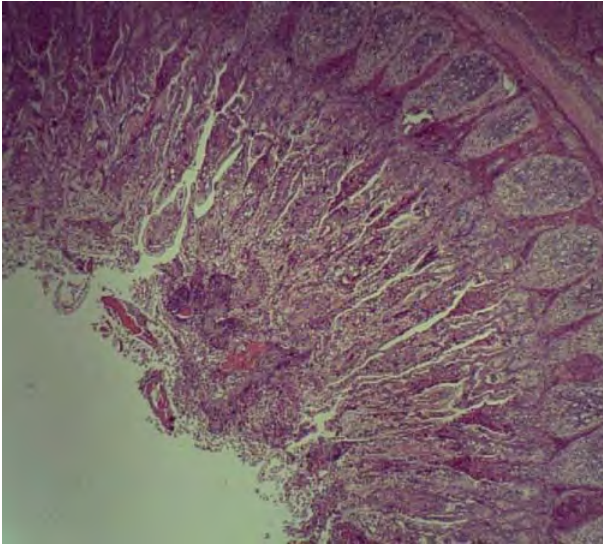


Fig. 8 a. Grupo D ScFv anti-F5 de arroz  
H y E, 4X

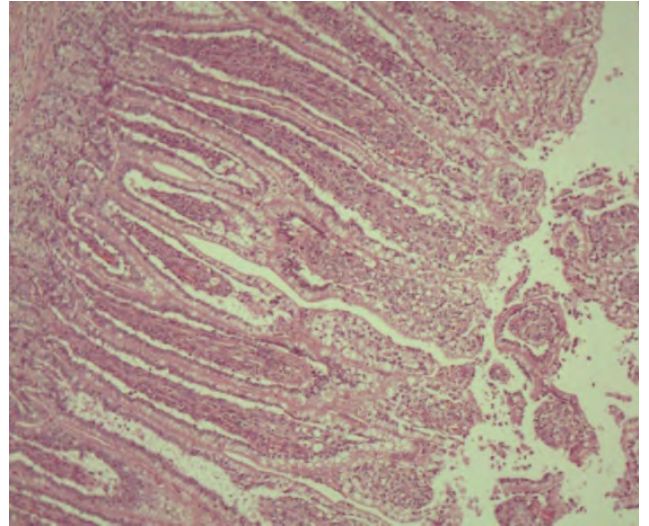


Fig. 8 b. Grupo E Arroz no transgénico  
Testigo  
H y E, 30X

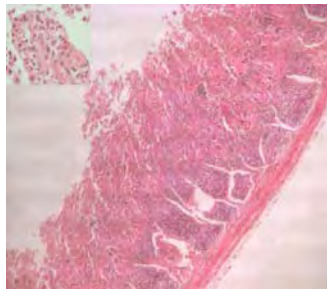


Fig. 8 c. Grupo H *Escherichia coli* B41  
Testigo general  
H y E, 4 X

Figura 8 a, b y c. Secciones histológicas de íleon que muestran al grupo D con scFv anti-F5 expresado en arroz comparado contra su testigo individual Grupo E extracto de hojas de arroz no transgénico, y con el testigo general grupo H *E. coli* B41 desafiante.



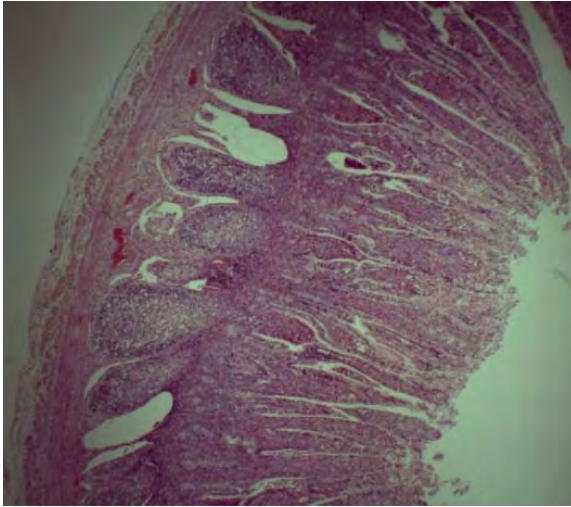


Fig. 9 a. Grupo F Anticuerpo monoclonal anti-F5

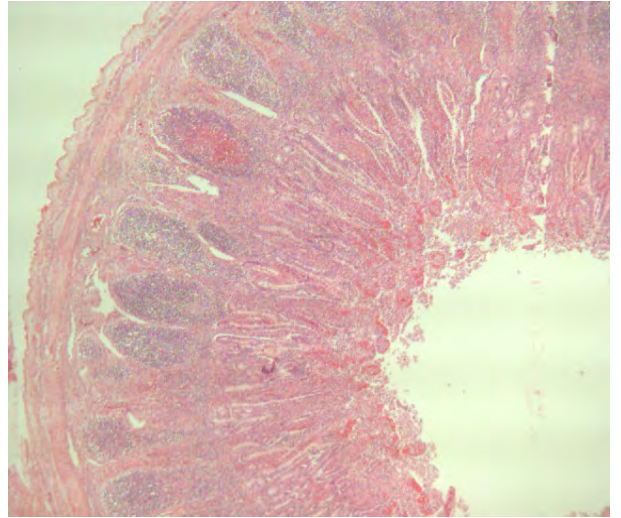


Fig. 9 b. Grupo E Isotipo de Anticuerpo monoclonal Testigo

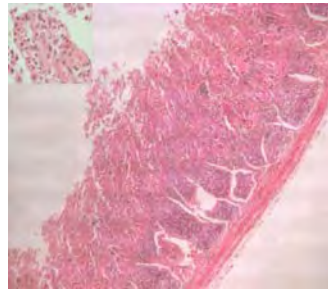


Fig. 9 c. Grupo H *Escherichia coli* B41 Testigo general

Figura 9. Secciones histológicas de íleon presentando al grupo F Anticuerpo monoclonal anti-F5 comprado con su testigo individual grupo G isotipo de anticuerpo monoclonal IgG anti-pseudorrabia; y contra el testigo general grupo H *E. coli* B41 desafiante. H y E, 4X.

### ***Estudio Inmunohistoquímico***

En este estudio se determino la presencia o ausencia de *E. coli B41* adherida al borde de cepillo del epitelio intestinal por la detección específica de la fimbria F5 con el anticuerpo monoclonal IgG anti-F5. Las muestras de todos los grupos fueron inmunopositivas observándose un color café rojizo en el borde de cepillo de los enterocitos (Figuras 10 a y b); con esto se demuestra que las lesiones descritas tanto en el estudio de respuesta de las asas intestinales como en el estudio histopatológico, están relacionadas con el efecto de *E. coli B41*.

Aunque fue más fácil encontrar positividad en las asas intestinales no tratadas que en las tratadas con alguna forma de anticuerpo anti-F5, esta diferencia no fue suficientemente clara para realizar un análisis cuantitativo.

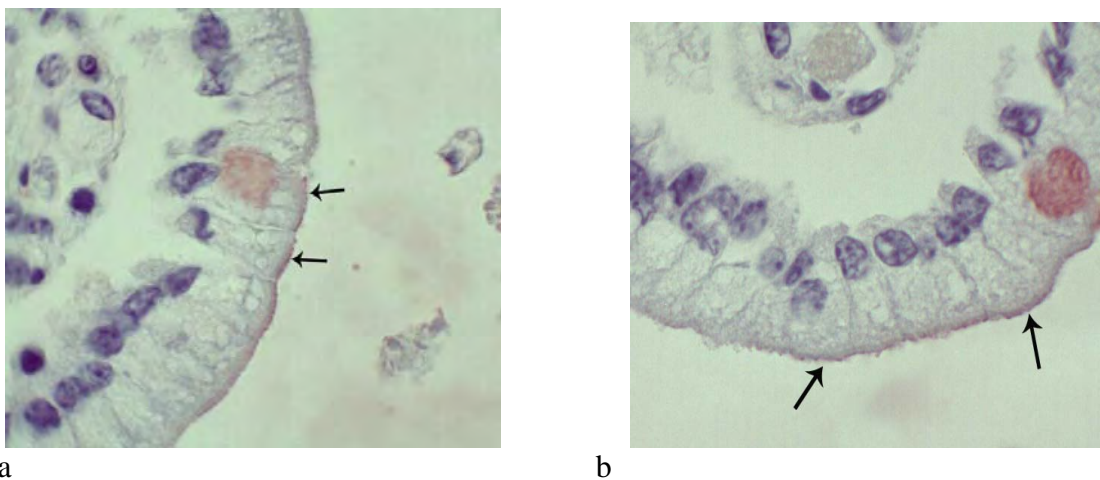


Figura 9 a y b. Secciones histológicas de tejido intestinal, donde se evidencia la inmunopositividad de color café rojizo en el borde de los enterocitos. ABC, con anticuerpo monoclonal anti-F5. 100X

## DISCUSIÓN

La fimbria F5 es responsable de la adherencia de *E. coli* ETEC a los enterocitos de bovino lo cual es un paso crítico en la patogénesis de la colibacilosis bovina. Los efectos de la colibacilosis pueden reducirse si se administran anticuerpos anti-F5 en las primeras 24 horas de vida, disminuyendo la mortalidad neonatal al interferir con la adherencia de la bacteria al receptor glicocilado encontrado en los enterocitos de la mucosa intestinal bovina.<sup>(10,33)</sup> Similarmente se ha demostrado que los fragmentos Fab preparados de anticuerpos monoclonales, que reaccionan con la fimbria F5 de *E. coli* ETEC, pueden inhibir la adherencia de *E. coli* al epitelio intestinal<sup>(34,35)</sup>. Asimismo, las moléculas de scFv desarrolladas a partir de la tecnología de anticuerpos recombinantes han demostrado su efectividad de inhibir la adherencia de ligandos a sus receptores respectivos<sup>(17,36)</sup>. Este estudio fue dirigido a determinar el efecto del scFv anti-F5, en asas intestinales de bovino desafiadas con *E. coli* B41.

En la presente investigación se observó que en los tratamientos con 60 µg de scFv anti-F5 de extracto bacteriano (grupo A) y de sobrenadante bacteriano (grupo B) disminuyeron la respuesta de las asas intestinales desafiadas con *E. coli* B41 en una concentración de  $2 \times 10^8$  comparadas con el testigo sin tratamiento (grupo H) y estas diferencias fueron estadísticamente significativas, posiblemente porque los scFv anti-F5 se unieron a la bacteria inhibiendo la unión de esta al epitelio intestinal bovino. Similarmente Bhaskaran et al. 2005, encontró que utilizando  $0.26 \times 10^{-4}$  µM de scFv anti-F5 fueron capaces de inhibir totalmente la aglutinación de eritrocitos de equino inducida con 32 ηg F5. Sin embargo, en

este estudio cuando se compararon los tratamientos de scFv anti-F5 de extracto bacteriano (A) y de sobrenadante bacteriano (B) con el testigo *E. coli* B41 inactivada (grupo C), se presento una disminución de la respuesta intestinal de 7 y 17% respectivamente pero solo fue estadísticamente significativa para el tratamiento de scFv de sobrenadante de cultivo bacteriano (B). Se esperaba que esta disminución (A y B comparados con C) fuera mayor, suponiendo que la bacteria inactivada no interferiría con la adherencia de *E. coli* B41. Es posible que el F5 de *E. coli* B41 inactivada compitiera con la bacteria viva al desafío por los receptores. Un estudio realizado por Jay et al, en el 2004<sup>(37)</sup>, demostró una inhibición de la adherencia de *E. coli* B41 a enterocitos fetales de bovino, previamente tratados con 20 µg de fimbria F5 purificada, explicando que las moléculas purificadas competían por los receptores encontrados en los enterocitos por lo cual había menos disponibilidad de receptores al realizar el desafío con 10<sup>7</sup> UFC *E. coli* B41. Un testigo más adecuado podría ser una cepa de *E. coli* que no exprese la fimbria F5, y aun mejor la cepa HB2151, la cual se utilizó en de producción del scFv anti-F5, no obstante, esta cepa no estuvo disponible al momento de hacer estos experimentos.

Contrariamente a los datos reportados acerca de que el scFv antiF-5 expresado en bacteria, es capaz de inhibir la hemaglutinación de eritrocitos de equino (Bashkaran *et al.* 2005) y de que el scFv antiF-5 expresado en arroz (Sunilkumar, *et al.* 2008) es capaz de inhibir la hemaglutinación de eritrocitos de caballo y la adherencia de *E. coli* a enterocitos fetales de bovino *in vitro*; en este estudio, el scFv anti-F5 expresado en arroz no mostro un efecto en la reducción del daño al intestino, ni en las lesiones histológicas, esto puede estar relacionado con la concentración utilizada (60 µg), ya que no existen estudios anteriores *in vivo* que indiquen una concentración del scFv anti-F5 optima de la inhibición de la

adherencia de *E. coli* al intestino bovino. Cabe mencionar que solo se realizaron 2 repeticiones con el scFv anti-F5 expresado en arroz, debido a que el material fue insuficiente para realizar más repeticiones, por lo que el análisis estadístico no es concluyente en este punto.

En el caso de las asas tratadas con el anticuerpo monoclonal anti-F5 se presentó una reducción en la respuesta de las asas al desafío con *E. coli* B41 del 39.5% con respecto a la presentada en el asa sin tratamiento, sin embargo, esta no fue estadísticamente significativa. De igual forma se observó una disminución del 12% en la respuesta al desafío de las asas tratadas con el anticuerpo monoclonal anti-F5 (grupo F) en comparación con las asas tratadas con el isotipo del monoclonal (grupo G), pero, estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas. Aunque la capacidad del anticuerpo monoclonal de inhibir la adherencia al epitelio intestinal bovino ha sido plenamente demostrada <sup>(36, 35)</sup>, en este estudio no se pudo observar con claridad, posiblemente debido al reducido número de repeticiones. La concentración y la actividad de los reactivos utilizados en los tratamientos (scFv y AcMo) fueron determinadas previamente en la Universidad de Texas A&M, pero es posible que dichos valores se pudieran afectar durante su traslado a la FMVZ, UNAM.

Por último se sugiere que se realicen más estudios in vivo, como podría ser la administración de diferentes dosis del scFv anti-F5 bacteriano o expresado en arroz a becerros neonatos previo a un desafío controlado o natural, para probar si son capaces de evitar la enfermedad o no; en el caso de contundentemente su efectividad, implementar un modo en que este pueda ser administrado en la práctica como suplemento en la crianza artificial de la primera semana de vida del becerro.

## CONCLUSIÓN

En esta investigación, el tratamiento con scFv anti-F5 expresado en el sobrenadante de cultivo bacteriano, fue capaz de reducir la respuesta del asa intestinal al desafío con *E. coli* B41, en contraste, no fue posible demostrar una reducción a esta respuesta con los tratamientos de scFv expresado en el extracto bacteriano y en el extracto de arroz; con el fin de establecer la capacidad de los scfv's anti-F5 de evitar la presentación de la enfermedad, inhibiendo la adherencia bacteriana a las células epiteliales del intestino bovino, es necesario realizar un mayor número de estudios *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. William C. Rebhun. Enfermedades del Ganado Lechero. Traducido por Manuel Ramos Vergés. España: Acribia, S. A. 1999.
2. Chin, James. El control de las Enfermedades Transmisibles. Informe oficial de la asociación Estadounidense de la Salud Pública. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica y técnica No. 581. 17<sup>ma</sup> ed. 2001.
3. Olguin, Arturo. Diarrea en Becerros.  
Disponibile en: URL: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliG0003.pdf>
4. Sussman M. *Escherichia coli*. Mechanisms of virulence. Cambridge University Press. 1997.
5. Carter G. R, Chengappa MM. Bacteriología y Micología Veterinarias, Aspectos Esenciales. 2<sup>a</sup> Ed. en español. Traducida de la 4<sup>a</sup> Ed. en Inglés. México D. F.: El Manual Moderno, S. A. de C. V. 1994.
6. Gyles C. L, Prescott J F, Songer J G, Thoen C O. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3 Ed. USA: Blackwell Publishing. 2004.
7. Hirsh D. C., MacLachlan N J, Walker R L. Veterinary Microbiology. 2<sup>a</sup> Ed., Iowa USA: Blacwell Publishing. 2004.
8. Quin P. J., Markey B K, Carter M E, Donnelly W J, and Leonard F C. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Iowa USA: Blacwell Science. 2002.
9. Bhaskaran S, Jay C. M., Bergman, Wagner G. G. and Waghela. A Single-chain fragment variable recombinant antibody against F5 fimbria of enterotoxigenic

- Escherichia coli* inhibits agglutination of horse red blood cells induced by F5 protein. Vet Res Comm. 2005, 29:463-476.
10. Morter R, L. Genetically engineered monoclonal antibody for *E coli* diarrhea in calves. Mod Vet Pract, 1984; 65:427-428.
  11. Klemm, Per. Fimbriae: Adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines. Fl, US: CRC press, 1994.
  12. Acres S. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. J Dairy Sci 1985 68:229-256.
  13. Cantú C. A. Manejo sanitario de becerros y recomendaciones prácticas. Disponible en:  
[http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=317&Itemid=140](http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=317&Itemid=140)
  14. Kanitpun R., Wagner G. and Waghela S. Characterization Of Recombinant Antibodies Developed For Capturing Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7. Southeast asian j trop med public health, 2004, 35:902-911.
  15. Bird, R. E. et al.. Single-Chain antigen binding proteins. Sci. 1988 242:423-426.
  16. Marx U, Embleton MJ, et al. Monoclonal antibody production. The report and recommendations of ECVAM work shop 23. ATLA; 1997 25:121-137.
  17. Casavilla R, et al. A bacterial single-chain Fv antibody fragment that inhibits binding of its parental anti-E-Selectin monoclonal antibody to activated human endothelial cells. J Biotechnol. 1999 72:1-12.
  18. Söger Eva, et all. Cereal crops as viable production and storage system for pharmaceutical scFv antibodies. Plant Molecular Biology 2000 42:583-590.



19. Ocampo, CL Páez, ED. Fisiopatología de diarreas en becerros y sus tratamientos. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Buiatría; 1993 Noviembre 11-13; México DF. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1993:26-28.
20. Arriola J., et al. Eficiencia reproductiva y pérdida de becerros en siete ganaderías de lidia del Edo. De Tlaxcala. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría 1997 Julio 9-12. Colima, Colima. 1997:562-565.
21. Guzman S Peziale, C. Pronostic indicators in neonatal calf Diarrhea. Memorias del XV Congreso Mundial de Buiatría, Tomo I. 1988 Octubre; Palma de Mallorca, España. 1988:62-65.
22. Kondracki M, et al. Prophylactic effect of NOBI-VAC K99 Vaccine against *E. coli* Diarhorrea in New Born Calves. Memorias del XV Congreso Mundial de Buiatría, Tomo I. 1988 Octubre; Palma de Mallorca, España. 1988:74-76.
23. Margueritte, J. et al; Diarrea Neonatal en Terneros: su Prevención y Tratamiento. Vet-Uy Agro y Veterinaria.Laboratorios Provet, Colombia. Disponible en: <http://www.vet-uy.com/articulos/bovinos/050/0023/bov023.htm>
24. Disney Pino. Vacunacion de la madre y proteccion pasiva del Becerro. Memorias del X Congreso Mundial de Buiatría 1978 Agosto 16-19, México D.F. 1978:391-394.
25. Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2a Ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
26. Atlas R, et al. Microbiología: Fundamentos y aplicaciones. Trad. Tay Z. Jorge. México: Compañía editorial continental, 1990.

27. Miles AA, Misra SS, Irwin J. O. The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. J Hyg. 1938 38:732-749.
28. Terrance Hawak C, Leary S L. Formulary for Laboratory Animals. 2a Edición. Iowa State University Press / AMES. USA, 1999.
29. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobón LH. Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América. AFIP. E. U. A. 1995.
30. Bellamy J. E. C, Acres S. D., A comparison of histopathological changes in calves associated with k99<sup>-</sup> and ka99<sup>+</sup> strains of enterotoxigénica *Escherichia coli*. Can J Comp Med 1983; 47:143-149.
31. Haines, D., Chelack B. Review article Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. J Vet Diagn Invest 1991 3:101-112.
32. Ramos-Vara J. A. Review article Technical aspects of immunochemistry. Vet Pathol 2005 42:405-426.
33. Sherman et al. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administering *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. Infect. Immun. 1983 42:653-658.
34. Isaacson R. E., et al. *In vitro* adhesión of *Escherichia coli* to porcine small intestinal epithelial cells: pili as adhesive factors. Infect. Immun. 1978 21:392-397
35. Sun R, et al. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88ac fimbria to its receptor, intestinal mucine-type glycoproteins, by a monoclonal antibody directed against a variable domain of the fimbria. Infect. Immun. 2000 68:3509-3515.
36. Cirino N M, et al. Disruption of anthrax toxin binding with the use of human antibodies and competitive inhibitors. Infect. Immun. 1999 67:2957-2963.

37. Jay C, et al. Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Vet. Microbiol.* 2004 101:153-160.
38. Sunilkumar, Waghela, Campbell, Rathore. Expression of anti-K99 scFv in transgenic rice tissues and its functional characterization. *Transgenic Res.* 2009 18:347-370.