



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

### “DESARROLLO DE UNA BACTERINA PARA LA PREVENCIÓN DE LA COLIBACILOSIS AVIAR A PARTIR DE CEPAS MEXICANAS DE *Escherichia coli* INVASIVAS EXTRAIESTINALES (ExIEC)”

#### TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

#### PRESENTA

**CARLOS ROBERTO RODRÍGUEZ MOLINA**

TUTORA

CECILIA ROSARIO CORTÉS

COMITÉ TUTORAL

NORMA LETICIA CALDERÓN APODACA

CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

*México, D.F.*

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.

## **DEDICATORIA**

**A DIOS.** Por permitirme la vida y darme la fortaleza para vencer todos los obstáculos en mí camino para poder llegar hasta donde he podido.

**A MI ESPOSA.** Por la paciencia y todo el amor que me ha tenido, gracias por estar siempre conmigo en la buenas y malas.

**A MI HIJO EMILIANO.** Por ser el motivo de mi superación y la alegría de mi vida.

**A MIS PADRES.** Por todo el apoyo que me han brindado, les agradezco infinitamente su preocupación por mi educación, espero en Dios poderles recompensar todo lo que han hecho por mi.

**A MIS SUEGROS.** Por todo el apoyo incondicional que me brindaron cuando no estuve, gracias por cuidar a mi esposa e hijo y hacerme sentir como otro hijo en su familia.

**A MIS HERMANAS.** Gracias preocuparse por mi cuando estuve lejos de la familia, espero recuperar todo ese tiempo de convivencia que no pude estar con ustedes, que Dios las bendiga.

**A MIS SOBRINOS.** Por darme esa felicidad cuando estoy con ellos, que esto sea un ejemplo para ustedes y sigan adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México.** Por ser una gran institución que abre sus puertas a todo aquel que busca superarse. Por permitirme formar parte de ella y poner mi granito de arena para que siga siendo NUESTRA MAXIMA CASA DE ESTUDIOS.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).** Por darme la oportunidad de recibir la beca, con la cual pude cubrir los gastos de mi estancia en la maestría.

**Al Departamento de Producción Animal: Aves.** Por abrirme sus puertas y hacerme formar parte de un gran equipo de profesionales. Especialmente a la Dra. Cecilia Rosario Cortés por aceptar ser mi tutora y creer en mí. También al Dr. José Antonio Quintana López, por brindarme su amistad, conocimiento y buenos consejos.

**Al Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina.** Al Dr. Armando Navarro Ocaña, por permitirme trabajar en su laboratorio y compartirme sus conocimientos. A su equipo de trabajo; Tec. Luis Antonio León Alamilla, Tec. Gabriel Pérez Soto y especialmente a la Biol. Delia Licona Moreno por su gran apoyo en la asistencia técnica para la realización de diversas técnicas. A la MC. Maritonia Ramírez Pérez y Biol. José Luis Méndez Sánchez gracias por su amistad (Torre de investigación). En posgrado al MC. Ulises Hernández Chiñas. Gracias a todos por su atención y conocimientos aportados para mi formación.

**Al comité tutorial.** Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca y especialmente al Dr. Carlos A. Eslava Campos por su valiosa aportación en mi formación, gracias por los buenos consejos.

**A los miembros del jurado.** Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Dr. Ángel Hipólito Manjarrez Hernández y Dr. Guillermo Valdivia Anda. Por enriquecer y mejorar la redacción de esta tesis con sus conocimientos y comentarios. Gracias.

## CONTENIDO

	pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	8
Objetivos	8
Objetivos particulares	9
II. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Cepas bacterianas	10
2.2 Tipificación serológica de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	10
2.3 Selección de cepas para la elaboración de la bacterina	11
2.4 Preparación de lotes de siembra de cepas vacunales de <i>E. coli</i>	12
2.5 Elaboración de la bacterina polivalente de <i>E. coli</i>	13
2.5.1 Prueba de esterilidad	14
2.5.2 Prueba de seguridad	14
2.6 Purificación del LPS de <i>Escherichia coli</i>	15
2.6.1 Electroforesis de los LPS en SDS-PAGE	16
2.6.2 Inmunotransferencia de los LPS con antisuero de conejo	17
2.6.3 ELISA con antisuero de conejo	18
2.7 Inmunización de pollos SPF	19
2.7.1 Evaluación de niveles de anticuerpos en suero de pollos preinmunes e inmunes	19
2.7.2 Inmunotransferencia con suero de pollos preinmunes e inmunes	20
2.8 Ensayo de actividad bactericida del suero	20
III. RESULTADOS	
3.1 Tipificación serológica de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	23
3.2 Selección de cepas para la elaboración de la bacterina	23
3.3 Preparación de lotes de semilla maestra	24
3.4 Elaboración de la bacterina polivalente de <i>E. coli</i> (O2, O78 y O84)	24
3.4.1 Prueba de esterilidad.	24
3.4.2 Prueba de seguridad	25
3.5 Purificación del LPS de <i>Escherichia coli</i>	25
3.6 Evaluación de anticuerpos en suero de pollos SPF	26
3.6.1 Inmunogenicidad inducida por la bacterina	26
3.6.2 Especificidad antigénica de anticuerpos anti-LPS en suero	27
3.7 Ensayo de actividad bactericida del suero	28
IV. DISCUSIÓN	29
V. CONCLUSIONES	35
a. REFERENCIAS	36
b. LISTA DE CUAROS	ii
c. LISTA DE FIGURAS	iii

## LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Serogrupos identificados en 69 cepas recuperadas de <i>Escherichia coli</i> aisladas partir de aves con infección de saco vitelino en un estudio previo.	42
Cuadro 2. Porcentaje de letalidad embrionaria de las cepas de <i>Escherichia coli</i> seleccionadas para la elaboración de la bacterina.	42
Cuadro 3. Viabilidad de las cepas de <i>Escherichia coli</i> seleccionadas para la elaboración de la bacterina polivalente antes y después de la liofilización.	43
Cuadro 4. Porcentaje de sueros positivos contra los lipopolisácaridos O2, O78 y O84 en pollos del grupo testigo no bacterinizado y experimental al que se le aplicó la bacterina experimental al día de edad (Bacterina), analizados mediante ELISA durante 7 semanas post-inmunización.	43

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de los lipopolisácaridos O2, O78 y O84 de las cepas de <i>Escherichia coli</i> seleccionados para la elaboración de una bacterina experimental.	44
Figura 2. Determinación de la Identidad de los lipopolisácaridos O2, O78 y O84 de <i>Escherichia coli</i> por inmunotransferencia, con antisueros de referencia, obtenidos de conejo.	45
Figura 3. Respuesta de anticuerpos IgY en suero contra el LPS O2 mediante la técnica de ELISA en aves SPF inmunizadas con una bacterina polivalente de <i>Escherichia coli</i> .	46
Figura 4. Respuesta de anticuerpos IgY en suero contra el LPS O78 mediante la técnica de ELISA en aves SPF inmunizadas con una bacterina polivalente de <i>Escherichia coli</i> .	46
Figura 5. Respuesta de anticuerpos IgY en suero contra el LPS O84 mediante la técnica de ELISA en aves SPF inmunizadas con una bacterina polivalente de <i>Escherichia coli</i> .	47
Figura 6. Especificidad antigénica de los anticuerpos IgY de pollos, antes y después de inmunizarlos con una bacterina.	48
Figura 7. Inmunotransferencia para la identificación de anticuerpos IgY contra los lipopolisácaridos O2, O78 y O84, en suero de gallinas de postura tipo leghorn utilizado para la obtención del complemento.	49

## RESUMEN

La colibacilosis aviar representa uno de los principales problemas económicos en la avicultura. Tradicionalmente, estas infecciones se han controlado mediante el uso de antimicrobianos, pero la resistencia de *Escherichia coli* a estos, dificulta su control. Como alternativa se proponen el uso de vacunas o bacterinas. En este estudio, se elaboró y evaluó una bacterina polivalente (O2, O78 y O84) a partir de cepas seleccionadas con base a su frecuencia de aislamiento y virulencia. Se inocularon 42 pollos SPF de un día de edad por vía subcutánea con una dosis de 0.1ml que contenía  $1 \times 10^7$  UFC de la bacterina adsorbida en hidróxido de aluminio. Otro grupo de 32 pollos (testigo) sólo recibió 0.1 ml de SSF estéril por la misma vía. Previo a la inmunización, se obtuvieron muestras de suero de todos los pollos y se evaluó mediante ELISA la respuesta humoral contra los tres lipopolisacáridos (LPSs) correspondientes a las cepas empleadas en la bacterina. Posteriormente, se midieron los títulos de anticuerpos semanalmente hasta las siete semanas. Al analizar los sueros, previo a la inmunización, se observó que de los 74 sueros, la mayoría (O2; 84%, O78; 61%, O84; 82%) reaccionaban contra los tres LPSs, estas reacciones fueron positivas contra los LPSs O78 y O84 hasta los 11 días y contra O2 hasta los 18 días de edad en los dos grupos de aves. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos generada por la bacterina se observó a partir de la sexta contra O2, mientras que contra O78 no se observó respuesta, y contra O84 se presentó a partir de la cuarta semana y hasta terminar el estudio. La inmunotransferencia demostró la especificidad antigénica de los anticuerpos contra los componentes del LPS, principalmente, con el antígeno O en un rango de 10 a 50 kDa. Si bien no se pudo evaluar la correlación entre la producción de anticuerpos y protección de las aves inmunizadas, los anticuerpos pueden jugar un papel importante en el control de la colibacilosis aviar, ya que pueden impedir la colonización, o bien, contribuir a la destrucción de la bacteria mediante fagocitosis post-opsonización o por la activación del sistema del complemento.

Palabras clave: Colibacilosis, LPS, anticuerpos IgY, ELISA, Inmunotransferencia.



## SUMMARY

Avian colibacillosis represents a major economic problem in the poultry industry. Traditionally, antimicrobials have been used to control clinical disease. Since the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* has increase in recent years, an alternative to avoid the effects of colibacilliosis could be the use of vaccines or bacterins. In the present study, a polyvalent bacterin (O2, O78 and O84) with strains selected based on their isolation frequency and lethality rate was developed. Forty two one-day-old SPF chickens were inoculated subcutaneously with a dose of 0.1 ( $1 \times 10^7$  CFU) of the bacterin adsorbed on aluminum hydroxide. Simultaneously, another group of 32 SPF chickens (control group) received 0.1 ml of sterile SSF through the same route. Before the immunization, serum samples from all chickens were obtained and evaluated by ELISA. Antibodies titres were evaluated weekly for seven weeks. Results show that pre-immune chickens reacted against O2 (84%), O78, (61%), and O84 (82%). These reactions remained positive against O78 and O84 until 11th day, and against O2 until 18th day of age in both groups. In the other hand, response to the bacterin against O2 started on the sixth week of age, while O78 antibodies were not seen and against O84 started from the fourth week until the end of the study. Immunoblotting demonstrated specificity of antibodies against LPS components. Although it was not possible to assess the correlation between antibody production and protection in immunized birds, the antibodies may play an important role in the avian colibacillosis control and may contribute to the clearance of bacteria through phagocytosis, post-opsonization or activating the complement system.

Keywords: Colibacillosis, LPS, IgY antibodies, ELISA, Immunoblotting.

## I. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*, especie *coli*; es un bacilo gram negativo móvil o inmóvil de 2 a 3 micras de longitud por 0.6 micras de ancho, aerobio o anaerobio facultativo y no esporulado; produce ácido y gas a partir de lactosa, es indol positivo, fermenta glucosa, manitol y lactosa; además, crece a temperaturas entre 15 y 45°C con un pH de 7.0; y en agar McConkey (McC) produce colonias brillantes, circulares y rosadas <sup>1-5</sup>.

Las cepas patógenas aviares se reúnen dentro del grupo denominado APEC (por sus siglas en inglés Avian Pathogenic *Escherichia coli*) <sup>6-12</sup>. Entre las propiedades relacionadas con la virulencia de estas cepas están la producción de colicina V (Col V), expresión de la fimbria tipo F1, presencia de la proteína Iss (increased serum survival), hemaglutinina termosensible (Tsh), resistencia al complemento, presencia de cápsula, sistema quelante de hierro aerobactina <sup>6-9,13-15</sup>, producción de toxinas (toxina citoletal distensionante <sup>16,17</sup>, factor citotóxico necrosante tipo 1 <sup>17</sup>, toxina autotransportadora vacuolizante <sup>18</sup>), así como la pertenencia a serogrupos específicos <sup>6,9,13,14,15,19,20</sup>. Por otro lado, Rosario *et al.* (2004) <sup>21</sup> identificaron cepas portadoras de los genes *ipaH*, *cdt* y *eae*, aisladas a partir de aves con infección del saco vitelino (ISV), estos genes codifican para el fenotipo de invasividad relacionadas con las cepas enteroinvasivas (EIEC), toxina citoletal distensionante y para la proteína intimina, respectivamente.

Aunque están disponibles métodos moleculares para identificar los genes de virulencia específicos, la serotipificación sigue siendo una herramienta útil para estudios epidemiológicos, ya que provee un medio para relacionar trabajos concluidos con estudios nuevos. Adicionalmente, es importante conocer el serotipo de una cepa APEC ya que la respuesta inmune en pollos se dirige, sobre todo, contra el antígeno O <sup>22</sup>. Se han realizado numerosos estudios para

determinar los serogrupos asociados a la colibacilosis aviar más frecuentes <sup>23,24,25</sup> y se ha observado que ocurren variaciones de acuerdo a la región geográfica, sin embargo, los serogrupos comunes han sido O1, O2, O35, O36, y O78 <sup>26,27</sup>.

El serotipo se determina de acuerdo al esquema descrito por Kauffman-White, en el cual se analizan los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (K). El primero está formado por la porción polisacárida de la molécula del lipopolisacárido presente en la membrana externa de la bacteria; de éste se reconocen al menos 181 variedades. El antígeno H se encuentra formado por una proteína codificada por el gen *fliC* (flagelina), el principal componente del filamento flagelar que constituye el órgano de locomoción de la bacteria, y se han identificado 60 antígenos. Finalmente, el antígeno K se encuentra como envoltura de la bacteria y se conocen al menos 80 antígenos <sup>22,28-32</sup>. El antígeno F (fimbrial) se incluye en el esquema de serotipificación sólo cuando se considera importante <sup>22</sup>. Finalmente, la designación serotipo se utiliza para la expresión de los tres grupos de antígenos presentes en una cepa, cuando se hace referencia únicamente al O, se usa el término serogrupo. Las múltiples combinaciones de todos estos antígenos muestran la gran diversidad que existe de esta bacteria <sup>30</sup>.

*E. coli* forma parte de la biota intestinal de diferentes especies, principalmente mamíferos, aves y animales de sangre fría. Durante el proceso evolutivo, han surgido clonas patógenas para humanos y animales; en el caso de las cepas APEC, pueden actuar como agente causal, o bien, como patógeno secundario junto con enfermedades inmunodepresoras o del tracto respiratorio. También se ha demostrado que, tanto las cepas comensales, como las patógenas pueden colonizar y persistir eficientemente en el tracto intestinal, y la translocación extraintestinal ocurre en presencia de factores de virulencia, así como de factores estresantes en el huésped <sup>33</sup>. Las cepas de *E. coli* que causan enfermedad fuera del tracto digestivo de algunas especies y con algunas características comunes

son llamadas ExPEC (por sus siglas en inglés extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*)<sup>34</sup>.

La colibacilosis aviar se manifiesta como una infección localizada o generalizada, causada total o parcialmente por *Escherichia coli*, cuya patogenia depende de la virulencia de la cepa, estado del hospedero y factores ambientales. La manifestación más severa es la septicemia (colisepticemia) que ocurre frecuentemente en parvadas afectadas por infecciones respiratorias; se cree que *E. coli* puede actuar como patógeno oportunista después de la acción de *Mycoplasma gallisepticum* o de virus como el de la Bronquitis infecciosa y Laringotraqueítis aviar<sup>35,36</sup>. Aunque la patogénesis de la colibacilosis es muy diversa, el desarrollo de una bacteremia parece ser importante<sup>33,37</sup>. Las manifestaciones más comunes asociadas a esta enfermedad son perihepatitis, aerosaculitis y pericarditis; aunque también pueden ser encontradas otras como peritonitis, salpingitis, orquitis, coligranuloma, onfalitis, celulitis, síndrome de la cabeza hinchada, osteomielitis, artritis, panoftalmitis, e infección del saco vitelino<sup>38</sup>.

En conjunto, las infecciones causadas por *E. coli* representan un gran problema económico en la industria avícola; especialmente en pollos de engorda las pérdidas son debidas a retraso en el crecimiento, conversión alimenticia ineficiente, aumento de la mortalidad (mayor a 5% en parvadas comerciales<sup>2,7, 20</sup>) y aumento en el porcentaje de decomisos en rastro. Por ejemplo, en Gran Bretaña el 43% de las aves de engorda decomisadas por enfermedad durante el procesamiento tienen lesiones que corresponden a colisepticemia<sup>39</sup>. En Estados Unidos de Norteamérica se estima que las pérdidas ocasionadas por *E. coli* superan los cien millones de dólares anualmente<sup>7,9</sup>. Aunque en México no se tiene calculado el impacto económico causado por la colibacilosis, se estima que es cuantioso y repercute tanto en los costos, como en la calidad de los productos avícolas.

Actualmente, la manera de controlar estas infecciones es mediante el empleo de antimicrobianos como ampicilina, tetraciclina, sulfonamida y enrofloxacina; ésta última, es una de las quinolonas usada más ampliamente en la industria mexicana de pollo de engorda <sup>21</sup>. Sin embargo, estos tratamientos representan un costo muy elevado en la producción avícola y tienen repercusiones importantes en la selección de bacterias resistentes, lo que a la postre, ocasiona un problema mayor. En relación a la resistencia antimicrobiana, en México se han realizado algunos estudios sobre el papel de *E. coli* en infección del saco vitelino por Rosario *et al.* (2005) <sup>21</sup> y Ramírez *et al.* (2007) <sup>11</sup>. En el primero, el 55 % de las cepas fueron resistentes a enrofloxacina, 65 % a ampicilina y el 88 % a tetraciclina, además, se identificaron 25 patrones de multiresistencia a diferentes antimicrobianos; mientras que en el segundo, el 88 % de la cepas fueron resistentes a tetraciclina, 87 % a doxicilina, 62 % a sulfametoxazol/trimetoprim y 61 % a ampicilina, y se encontraron 56 patrones de multiresistencia. Lo anterior ha dado lugar a que resurja el interés para el desarrollo de métodos alternativos para la protección de las aves contra estas infecciones.

La inmunización se encuentra entre los métodos alternativos para la protección de las aves contra estas infecciones al estimular la respuesta de tipo celular (mediada por linfocitos T), humoral (por linfocitos B), o bien, inducir ambas. En la primera, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) reconocen antígenos endógenos en conjunto con el complejo principal de histocompatibilidad-I (MHC-I). Por otro lado, los linfocitos T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> (colaboradores) pueden diferenciarse en dos tipos de células efectoras: T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2; esta diferenciación es determinada por la naturaleza del estímulo antigénico y es mediada por proteínas solubles denominadas citocinas. Las células T<sub>H</sub>1 promueven la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, activan macrófagos, aumentan la actividad microbicida y también están implicadas en la inmunidad humoral, además facilitan la producción de inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos específicos con fuertes propiedades de opsonización. Asimismo, las

células T<sub>H2</sub> también ayudan a los linfocitos B a producir Igs específicas de varios isotipos después de haber sido estimulados por las células presentadoras de antígenos (CPA), a través de su receptor para MHC-II <sup>40</sup>.

Las moléculas de Ig tienen dos tipos distintos de cadenas polipeptídicas. La cadena ligera es común en todas las clases de Igs, mientras que la cadena pesada es estructuralmente distinta, lo que determina su función biológica. En las aves existen tres tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgY e IgA. La primera se encuentra en la superficie de la mayoría de las células B y es el primer anticuerpo producido después del contacto primario con el antígeno; a medida que la respuesta inmune progresa, se detiene la producción de IgM y comienza la de IgY o IgA, lo que se conoce como variación de clase. La IgM e IgY se encuentran principalmente en el suero o el plasma de la sangre, mientras que la IgA se encuentra en mayor cantidad en secreciones y está implicada en la inmunidad de mucosas <sup>40</sup>.

Por otro lado, los anticuerpos maternos usualmente son acarreados en la circulación materna durante el desarrollo del ovocito y, subsecuentemente, transportados a la yema del huevo a través de la membrana del saco vitelino dentro de la circulación embrionaria <sup>41-43</sup>. Los anticuerpos transferidos son, predominantemente, de la clase IgY, ya que la transferencia de IgA e IgM usualmente ocurre en bajos niveles <sup>42-45</sup>. El pico de anticuerpos maternos en pollos jóvenes se presenta a los 3 ó 4 días de nacidos, y después decrecen gradualmente a niveles no detectables entre la segunda y tercera semana de edad <sup>42,43</sup>.

La exposición de las aves a microorganismos patógenos estimula la producción de anticuerpos específicos, los cuales, a su vez, reaccionan con los microorganismos y aceleran su destrucción mediante tres mecanismos; la neutralización, en la cual los anticuerpos se unen y neutralizan patógenos específicos haciéndolos incapaces de unirse a los receptores de superficie de la

célula blanco y con esto previene la colonización. En segundo lugar, la opsonización se presenta en bacterias patógenas extracelulares, las cuales son rápidamente internalizadas y destruidas por fagocitos si están cubiertas por anticuerpos. Por último, en la activación del complemento, los anticuerpos se unen a los receptores de superficie de los patógenos, y pueden activar al complemento y producir nuevas proteínas de éste, hasta formar poros en la membrana celular bacteriana, denominado complejo de ataque a membrana (MAC); o bien, estas proteínas pueden unirse a receptores de fagocitos para facilitar la destrucción del patógeno <sup>40</sup>. Por estas razones, las inmunoglobulinas juegan un papel importante en la inmunidad contra *E. coli*, ya que, generalmente, no es un patógeno intracelular.

Para estimular la respuesta inmune, el diseño de vacunas ha sido objeto de un intenso trabajo de investigación en las últimas décadas; prueba de ello, es la gran cantidad de trabajos científicos publicados sobre el tema <sup>46-55</sup>. Una gran variedad de vacunas y métodos de vacunación han sido desarrollados incluyendo inmunización activa y pasiva; para ello se han usado productos vivos o inactivados (bacterinas), vacunas recombinantes y la inmunización contra factores de virulencia específicos <sup>22</sup>. Por ejemplo, Lynne *et al.* (2006) <sup>46</sup> desarrollaron una vacuna experimental con la proteína recombinante Iss fusionada con la enzima glutation S-transferasa (GST-Iss), con la que obtuvieron buenos niveles de anticuerpos contra la proteína de fusión GST, pero no directamente contra Iss, debido a que GST es tres veces más grande que Iss. Por otro lado, Peighambari *et al.* (2001) <sup>56</sup> evaluaron una vacuna atenuada mutante derivada de dos cepas de *E. coli* septicémicas aviarias, serogrupos O2 y O78, las cuales fueron atenuadas mediante la delección de los genes *cya* y *crp*, que codifican para adenilato ciclasa y la proteína receptora de 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (cAMP), respectivamente, las cuales están implicadas en la producción de energía. Esta vacuna fue aplicada por aspersión; sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la respuesta local de IgA e IgY, ni de esta última en el

suero entre los animales vacunados y los grupos testigo. En otro estudio realizado por Aziz *et al.* (1998) <sup>47</sup>, hiperinmunizaron pollos con la cepa J5 la cual confirió protección cruzada contra el desafío con una cepa del serogrupo O78 de *E. coli*. La cepa J5 es una mutante rugosa genéticamente estable que ha perdido la enzima uridina difosfato galactosa 4-epimerasa, la cual es requerida para unir las cadenas laterales somáticas al core de las bacterias gram negativas.

Las vacunas con bacterias muertas, o bacterinas, son preparaciones del agente patógeno que se ha hecho inofensivo debido a la inactivación de sus proteínas por medios químicos o físicos. Éstas tienen la ventaja de inducir un buen nivel de inmunidad humoral (si se aplican dosis de refuerzo), no existen posibilidades de mutación, recombinación o reversión a la virulencia; además de que se pueden usar en animales inmunodeprimidos. Sin embargo, requieren un control de calidad sumamente estricto para garantizar su correcta inactivación, además de que normalmente producen una respuesta predominantemente de tipo humoral y necesitan la adición de adyuvantes para estimular una respuesta rápida y sostenida de la inmunidad, lo que incrementa su costo y complica su aplicación <sup>57</sup>. Existen antecedentes del desarrollo de bacterinas efectivas contra varios serotipos de *E. coli*, como O2:K1 y O78:K80 <sup>48-50</sup>, que proveen protección contra serogrupos homólogos, pero no una protección cruzada significativa contra serogrupos heterólogos <sup>22</sup>. En consecuencia, para lograr una vacunación satisfactoria es necesario inmunizar con las cepas bacterianas específicas de un brote o por la frecuencia de aislamiento del microorganismo; por lo que el empleo de bacterinas polivalentes elaboradas a partir de mezclas de distintos tipos antigénicos representa la alternativa más segura para lograr un mayor margen de protección <sup>40</sup>. Por ello, es importante contar con estudios epidemiológicos que permitan identificar los serogrupos más frecuentes de cada región donde se desea utilizar la bacterina. En México existen pocos estudios al respecto; sin embargo, se han realizado trabajos por Rosario *et al.* (2004) <sup>23</sup> y Ramírez *et al.* (2009) <sup>58</sup> en los que se identificó la presencia de los serogrupos O19, O84, O8, O78, así como de O2, O20, O100, O8, O131, O84, O25 y O78 respectivamente,



como los más comunes en infecciones de aves. Ramírez *et al.* (2009)<sup>58</sup> demostraron que estas cepas poseían genes de virulencia y causaron un porcentaje de letalidad entre 60 y 80%, que permitió clasificarlas como virulentas. De hecho, se puede considerar al ensayo de letalidad embrionaria la prueba de oro para discriminar entre una cepa comensal y una patógena<sup>15</sup>.

Implementar sistemas de protección que permitan disminuir los procesos infecciosos ocasionados por *E. coli* en aves resulta de gran importancia por el enorme impacto económico que dichas infecciones representan. En el presente trabajo, se plantea el desarrollo de una bacterina polivalente elaborada con algunos de los serogrupos de mayor incidencia en las infecciones de aves en México.

### **Hipótesis**

El empleo de una bacterina polivalente con los serogrupos O2, O78 y O84 de *Escherichia coli* que se han identificado comúnmente en México permitirá inducir una respuesta inmune contra estos microorganismos y protegerá a las aves de infecciones ocasionadas por el grupo APEC.

### **Objetivo**

Desarrollar una bacterina polivalente con cepas APEC que se identifican frecuentemente en el campo mexicano, que sea inocua, estimule una buena producción de anticuerpos y que estos tengan actividad protectora contra los serogrupos utilizados; lo que permitirá proteger a las aves inmunizadas, disminuir la mortalidad de las aves, y en consecuencia, los costos relacionados a infecciones por APEC

## **Objetivos particulares**

Realizar la serotipificación de 76 cepas existentes en el cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción Animal: Aves para seleccionar las cepas que se utilizarán en la elaboración de la bacterina polivalente.

Elaborar los lotes de semilla de referencia y semilla de trabajo de las cepas seleccionadas, mediante el método de liofilización para su conservación.

Elaborar una bacterina polivalente experimental de acuerdo a las normas de seguridad descritas en la NOM-047-ZOO-1995.

Inmunizar pollos SPF de 1 día de edad para evaluar la producción de anticuerpos mediante ensayos ELISA.

Analizar la actividad protectora de los anticuerpos generados mediante un ensayo de actividad bactericida del suero.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas Bacterianas

Se realizó la recuperación y se confirmó la identidad mediante pruebas bioquímicas de 76 cepas de *E. coli* aisladas en un estudio previo a partir de granjas de reproductoras, incubadora y pollo de engorda <sup>21</sup>, Dichas cepas se encuentran conservadas en medio Dorset, en el cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### 2.2 Tipificación serológica de las cepas de *Escherichia coli*

La serotipificación se realizó de acuerdo al procedimiento empleado en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo con Orskov y Orskov <sup>31</sup>, mediante la utilización de sueros específicos (SERUNAM) que fueron obtenidos de conejo Nueva Zelanda blanco.

Las reacciones de aglutinación se realizaron en microplacas<sup>a</sup>. Se analizó el antígeno somático de cada cepa, empleando una batería de 181 sueros monovalentes obtenidos de antígenos somáticos conocidos de *E. coli* y 47 para diferentes especies de *Shigella*. Los sueros utilizados se encontraban diluidos 1:100.

Para la obtención del antígeno somático (O), las bacterias se sembraron individualmente en tubos con 10 ml de agar de soya tripticaseína (TSA)<sup>b</sup> (pH de 7.2), los cuales se incubaron por 24h a 37°C; posteriormente, el crecimiento

---

<sup>a</sup> Microplaca 96 pozos fondo U. Greiner bio-one. Lot. 5665692

<sup>b</sup> Agar de Soya Tripticaseína. Acumedia® 7100 A Lot. 101,700 B. Neogen® corporation

bacteriano se cosechó en 10 ml de solución salina 0.15M; la suspensión obtenida se colectó en otro tubo y se inactivó por calentamiento con vapor fluente a 100°C con 3 a 5 libras de presión durante 1h. Una vez que el antígeno se enfrió, se adicionó solución salina fisiológica (SSF) con formaldehído<sup>c</sup> al 0.6% (v/v). Por último, los tubos fueron sellados con parafilm y almacenados para ser usados como antígeno somático.

Por medio de un dispensador automático<sup>d</sup>, se llenaron las microplacas con 50µl del suero monovalente en cada pozo y se adicionaron 50µl del antígeno previamente preparado. Después, las placas se envolvieron con papel adherente para evitar la evaporación y se incubaron a 50°C por 24h. Posteriormente, se revisaron para interpretar los resultados de aglutinación; se consideró como positivo cuando se observó aglutinación en el fondo del pozo. Así mismo, se identificaron los sueros que reconocieron al antígeno bacteriano y se hicieron diluciones de éstos desde 1:100 hasta 1:12800. Cuando se presentó reacción cruzada, el antígeno se enfrentó con sueros absorbidos y diluidos 1:50. El serogrupo se definió al determinar el mayor grado de aglutinación en la dilución más alta del suero en comparación con la que presenta el antígeno homólogo. Se consideró como “sin aglutinación” cuando se observó un botón de antígeno en el fondo del pozo, OR (rugosa) cuando la reacción de aglutinación fue contra todos los antisueros y OND (No Determinadas) cuando no reaccionó con ningún antisuero del esquema.

### **2.3 Selección de cepas para la elaboración de la bacterina**

Una vez confirmada la identidad de las cepas, fueron seleccionados los serogrupos O2, O78 y O84 para elaborar la bacterina. Los criterios de selección fueron: porcentaje de letalidad embrionaria determinado en el estudio de Ramírez

---

<sup>c</sup> Formaldehído. Sigma-Aldrich USA Lot.78H35573

<sup>d</sup> Quick Spense Controller Mod. 96-200, Dynatech Laboratories

*et al.* (2009)<sup>58</sup> y los serogrupos identificados más frecuentemente en el estudio de Rosario *et al.* (2005)<sup>21</sup>.

#### **2.4 Preparación de lotes de siembra de cepas vacunales de *Escherichia coli***

Para elaborar los lotes de siembra de los serogrupos O2, O78 y O84 se empleó el sistema de lotes de siembra en dos niveles<sup>59</sup>, con algunas modificaciones. A partir del medio de Dorset, las cepas fueron sembradas en caldo de soya tripticaseína (TSB)<sup>e</sup> y se incubaron por 3h; cuando se apreció el crecimiento bacteriano por la turbidez del medio de cultivo, se impregnaron hisopos estériles con el cultivo bacteriano y se sembraron en placas de TSA durante 18h a 37°C; el crecimiento bacteriano se cosechó con 2 ml de leche descremada<sup>f</sup> al 5% con un asa triangular de cristal estéril; una vez que la mezcla se homogeneizó, se colocó en viales, los cuales se sellaron con parafilm y se perforaron con una aguja estéril para permitir la sublimación durante el proceso de liofilización; posteriormente, se congelaron al sumergirlos en acetona con hielo seco hasta que se formó una escarcha alrededor del vial, lo que indicó que la muestra ya estaba congelada. Para la obtención de semillas se utilizó una liofilizadora<sup>g</sup>, la cual se ajustó a una temperatura aproximada de -50 °C y a una presión de  $57 \times 10^{-3}$  milibares (MBAR) y las muestras se liofilizaron por 18h. A continuación, los viales se sellaron con tapones de hule estériles y de aluminio e identificaron; por último, se almacenaron a temperatura ambiente.

---

<sup>e</sup> Caldo Soya Trypticaseína. BDBioxon® 211670 Lot. 7107217

<sup>f</sup> Skim Milk. Difco™ Ref.232100 Lot.7081959, Becton, Dickinson and Company USA

<sup>g</sup> Freeze Dry System/Freezone® 4.5 LABCONCO

## 2.5 Elaboración de la bacterina polivalente de *E. coli*

Para la elaboración de la bacterina polivalente, las cepas de los serogrupos O2, O78 y O84 fueron sembradas en TSB durante 24h a 37°C; posteriormente, los cultivos fueron centrifugados por 15 min a 1200 g a 4°C; el sobrenadante se eliminó y las células bacterianas se lavaron tres veces en solución salina fisiológica estéril (SSF). Después del tercer lavado, las células bacterianas se resuspendieron en 5 ml de SSF y la concentración bacteriana se ajustó mediante la medición de absorbancia con un espectrofotómetro<sup>h</sup> a 450 nanómetros con una densidad óptica (DO) de 1.050, equivalente a  $1 \times 10^9$  UFC/ml, aproximadamente. Las bacterias presentes en la suspensión se mezclaron con 25 ml de SSF y se inactivaron mediante calentamiento a 80°C por 1h con vapor fluyente. Antes de inactivarlas, se tomó 1 ml de cada cultivo y se hicieron diluciones décuples seriadas para hacer cuentas viables y corroborar la concentración bacteriana ajustada por el espectrofotómetro. Una vez inactivadas, las tres suspensiones bacterianas fueron sembradas en agar sangre (GS) e incubadas durante 18h a 37 °C, para corroborar que estuvieran libres de bacterias vivas y otros microorganismos contaminantes. Después, se mezclaron para obtener la suspensión final de 90 ml. Una vez homogeneizadas, se llenaron alícuotas con 2 ml ( $1 \times 10^8$  bacterias/ml) y se congelaron a -80°C por 3h. Posteriormente, las alícuotas se liofilizaron por 18h con las constantes descritas previamente. Para preparar el producto final, las pastillas obtenidas se hidrataron con 2 ml de SSF, y se adicionó igual cantidad de hidróxido de aluminio<sup>i</sup> (1:1); es decir, la bacterina para su aplicación contenía una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC por dosis de 0.1 ml, aproximadamente.

---

<sup>h</sup> Milton Roy Spectronic 20D

<sup>i</sup> Aluminum Hydroxide Gel. Sigma-Aldrich USA, Cat.A8222 Lot.018k0761

### 2.5.1 Prueba de esterilidad

Para demostrar que el producto estuviera libre de cualquier contaminante vivo o activo se procedió a sembrar 1 ml de muestra en un tubo con 15 ml de caldo tioglicolato<sup>j</sup> y 1 ml de muestra en un tubo con 15 ml de TSB, los cuales se incubaron a 35°C y a 22°C, respectivamente. Además, se sembró 0.5 ml de muestra en cajas con agar dextrosa sabouraud<sup>k</sup> y agar dextrosa papa<sup>l</sup>, y fueron incubadas a 22°C. Todos los cultivos se revisaron durante 14 días para observar si existía algún cambio en la turbidez de los medios líquidos de cultivo o si existía crecimiento en los agares<sup>60,61</sup>. Esta prueba se realizó por duplicado en 3 productos: el liofilizado de bacterias (hidratadas con SSF estéril), hidróxido de aluminio (adyuvante) y para la emulsión completa (bacterina preparada). De forma paralela se hizo la prueba de esterilidad de los medios de cultivo que se utilizaron.

### 2.5.2 Prueba de seguridad

Para verificar que el producto no causara reacciones desfavorables atribuibles al mismo, y así poder realizar la inmunización de las aves experimentales, se realizó la prueba de seguridad descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-047-1995<sup>60</sup> con algunas modificaciones. Se utilizaron diez pollos libres de patógenos específicos<sup>m</sup> (SPF) de 1 día de edad procedentes de la misma parvada, los cuales fueron alojados en una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (FMVZ: UNAM) y se les administró agua de bebida y alimento a libre acceso. Estas aves fueron inoculadas con 10 dosis del producto, es decir, 1.0 ml ( $1 \times 10^8$  UFC) de la bacterina por vía subcutánea en el tercio medio del cuello; fueron observadas diariamente durante

---

<sup>j</sup> Medio líquido tioglicolato. BDBioxon® 211300 Lot.7041668

<sup>k</sup> Agar Dextrosa Saboraud BDBioxon® 213450 Lot.7332213

<sup>l</sup> Agar Dextrosa Papa. Acumedia® 7149A Lot.102,176. Neogen® corporation

<sup>m</sup> Pollos libres de patógenos específicos ALPES1 S.A. de C.V.

4 semanas post-inoculación para determinar la aparición de signos, lesiones o mortalidad asociada con la aplicación de la bacterina.

## **2.6 Purificación del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli***

Para evaluar los títulos de anticuerpos en el suero de los pollos se decidió diseñar y estandarizar ensayos de ELISA. Para ello, se empleó como antígeno el LPS purificado de cada uno de los serogrupos incluidos en la bacterina. El método para la purificación del LPS fue descrito por Westphal y Jann. (1965)<sup>62</sup> con algunas modificaciones. Brevemente, los cultivos de *E. coli* fueron sembrados en 5 placas de TSA por cada cepa (O2, O78 y O84) y se incubaron a 37°C por 18h. Después de la incubación, el crecimiento del cultivo bacteriano se cosechó en un tubo con 10 ml de agua destilada. La suspensión bacteriana se calentó entre 75 y 80 °C durante 10 a 15 min. Una vez que la suspensión bacteriana alcanzó esta temperatura, se adicionó 10 ml de fenol redestilado<sup>n</sup> precalentado a la misma temperatura y se mezcló con agitación vigorosa durante 15 min. Posteriormente, la suspensión se enfrió en hielo a 10°C y se centrifugó a 4,000 g por 15 min, la fase superior (acuosa) se almacenó en hielo y se hizo una segunda extracción con la fase inferior (fenólica) como se describió previamente, adicionando 10 ml de agua destilada y 10 ml de fenol. La fase acuosa se mezcló con la de la primera extracción, y se colocaron entre 20 y 25 ml en una membrana de diálisis<sup>o</sup> de 6000 a 8000 Daltons de tamaño de poro y fueron dializadas durante 18 a 24h con agitación en agua destilada. Posteriormente, el LPS se liofilizó durante 18h. Para la purificación el LPS se hidrató nuevamente con 5 ml de agua destilada estéril. Después de esto, se trató con 20 µg/ml de RNAsa<sup>p</sup> y 20 µg/ml de DNAsa<sup>q</sup> y se

---

<sup>n</sup> Phenol, redistilled 99+%. Sigma-Aldrich USA, Cat.328111 Lot.01929MH

<sup>o</sup> Spectra/Por® Membrane, Spectrum® Laboratories Inc. Cat.132660 Lot.3216267

<sup>p</sup> Ribonuclease A. Sigma-Aldrich USA, Cat.R5000 Lot.084K1844

<sup>q</sup> Deoxiribonuclease I. Sigma-Aldrich USA, Cat.D4527 Lot.024K7510



incubó a 37°C con agitación durante 3h; después se adicionó proteinasa K<sup>r</sup> a una concentración de 200 µg/ml y se incubó de nuevo a 60° C por 3h. El LPS se centrifugó a 85,000 g durante 3h, la pastilla se resuspendió en agua destilada estéril (2 ml) y se liofilizó durante 18h; posteriormente, se pesó con una balanza analítica para rehidratarlo con agua destilada estéril en una proporción 1:1p/v y se almacenó en congelación hasta su uso.

### 2.6.1 Electroforesis de los LPS O2, O78 y O84

Para confirmar la purificación de LPS, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida<sup>s</sup> con duodecil sulfato de sodio<sup>t</sup> (SDS-PAGE) descrito por Laemmli, (1970)<sup>63</sup> con 6 y 15 % de poliacrilamida en el gel concentrador y gel separador, respectivamente. Las muestras de LPS extraído por el método de Westphal y Jann. (1965)<sup>62</sup> se hidrataron con agua destilada estéril a una relación 1:1 p/v. Por cada pozo del gel concentrador se utilizaron una mezcla de 15 µl de LPS y 3 µl de buffer de Laemmli 5X, previamente tratados a 100 °C por 5 min. Posteriormente, se realizó la electroforesis a 80 mA en el gel concentrador y a 70 mA en el gel separador hasta que la línea formada por el azul de bromofenol corrió 13 cm en el gel (3h aproximadamente). Para poder visualizar la migración del LPS y la separación de sus componentes, el gel se tiñó con nitrato de plata<sup>u</sup> usando el método descrito por Tsai *et al.* (1982)<sup>64</sup>, para lo cual se fijó el LPS en el gel con una solución con 40 % etanol, 5 % ácido acético (200 ml) en un recipiente limpio durante toda la noche. A continuación, se retiró la solución y se adicionó una solución con 0.7 % de ácido periódico en 40 % de etanol y 5 % de ácido acético para oxidar el LPS por 5 min. Inmediatamente, se retiró la solución anterior y se hicieron 3 lavados de 15 min cada uno con abundante agua

---

<sup>r</sup> Proteinase K. Sigma-Aldrich USA, Cat.P8044 Lot.054K8602

<sup>s</sup> Acrylamide, 99.9%. Bio-Rad laboratorios Inc. Cat.161-0107 Lot.210002104

<sup>t</sup> Lauryl Sulfate SDS. Sigma-Aldrich USA, Cat.L5750 Lot.61H0252

<sup>u</sup> Silver Nitrate. Sigma-Aldrich USA, Cat.S-0139 Lot.108h3495

destilada. Una vez que transcurrió el tiempo de lavado, se eliminó el agua y se agregaron 150 ml de la solución de nitrato de plata recién preparada (2 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado en 28 ml de NaOH 1N), y se agitó vigorosamente por 10 min. Después, se adicionaron a la primera mezcla 5 ml al 20% de nitrato de plata hasta que se formó un precipitado color café; posteriormente, se diluyó con 115 ml de la primera mezcla hasta que el precipitado fue disuelto. A continuación se realizaron 3 lavados como se mencionó anteriormente y se reemplazó el agua por 200 ml de solución reveladora (50 mg de ácido cítrico y 0.5 ml de formaldehído al 37 %, 1000 ml de agua destilada), en la cual permaneció el gel hasta que el LPS fue teñido. Por último, el gel se lavó con abundante agua destilada y se almacenó.

### **2.6.2 Inmunotransferencia de LPS con antisueros de conejo**

Para confirmar que el LPS extraído corresponde a cada uno de los diferentes serogrupos (O2, O78 y O84) que integran la bacteria, se utilizó la técnica de inmunotransferencia descrita por Towbin *et al.* (1979)<sup>65</sup>, se transfirió el LPS del gel a una membrana de nitrocelulosa<sup>v</sup> con un tamaño de poro de 0.45 µm y se enfrentaron contra antisueros de conejo específicos contra cada LPS utilizado. La transferencia se realizó a 200mA por 4h. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras correspondientes a cada carril del LPS transferido y los espacios libres se bloquearon con leche descremada al 5 % en PBS 1x y se incubaron toda la noche con agitación. Después, se lavaron tres veces con PBS- Tween 20 al 0.1 % durante 5 min, la membrana se incubó por 2h a temperatura ambiente con el antisuero de conejo específico diluido 1:50 en leche descremada al 5 % con PBS. Después de lavar tres veces con PBS- Tween 20 al 0.1%, (5 min) se incubó con el anticuerpo secundario, un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina<sup>w</sup> diluido 1:1000 en leche descremada al 5 % con PBS. Las membranas de nitrocelulosa se lavaron

---

<sup>v</sup> Trans-Blot® Pure Nitrocellulose Membrane (0.45µm). Bio-Rad, Cat.162-0115 Lot.BR26949

<sup>w</sup> AP-Goat Anti-Rabbit IgG. ZYMED® Laboratories

tres veces con PBS- Tween 20 al 0.1 %, durante 5 min, una vez con TB para eliminar sales y subsiguientemente con buffer de fosfatasa. Posteriormente, a las muestras se le adicionó el sustrato<sup>x</sup> por 15 min (1 tableta por 10 ml de agua destilada); una vez que reaccionó la enzima y el sustrato se detuvo la reacción haciendo un lavado con abundante agua destilada.

### 2.6.3 ELISA con antisuero de conejo

Para evaluar la reactividad de los antisueros de conejo específicos contra cada uno de los diferentes LPS en las placas de ELISA<sup>y</sup> se realizó el ensayo descrito por Chart *et al.* (1991)<sup>66</sup>. De manera breve, la placa de ELISA se recubrió con 1 µg del LPS (ya sea, O2, O78 u O84) en 100µl de amortiguador de carbonatos (0.16 g NaCO<sub>3</sub>, 0.29 g NaCHO<sub>3</sub>, 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada, pH 9.6) y se incubaron por 2 h a 37 °C; y después a 4 °C durante toda la noche. A continuación, la placa se lavó 3 veces con 100 µl de PBS-Tween (PBS, Tween 20 0.5 % v/v), los espacios donde el LPS no se adsorbió fueron bloqueados adicionando 200 µl de albumina sérica bovina<sup>z</sup> al 1% (p/v) en PBS por cada pozo durante 2h a 37 °C, después de lo cual la placa se lavó 3 veces con PBS-Tween (200 µl por pozo). Se hicieron diluciones de los sueros de conejo específicos para cada LPS desde 1:100 a 1:12800 empezando en el carril 2 hasta el 10 respectivamente (100 µl por pozo); el carril 1 sirvió como blanco, para lo cual se dejó incubando 2h a 37 °C. Después se hicieron 3 lavados con PBS-Tween. Para generar la reacción, fueron adicionados en cada pozo 100 µl de IgG de cabra anti IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina a una concentración 1:1000, y se incubó por 2h a 37°C y posteriormente, la placa se lavó como se describió anteriormente. Para visualizar la reacción se adicionaron 200 µl de sustrato<sup>aa</sup> (1 mg/ml) en buffer de

---

<sup>x</sup> Sustrato fosfatasa alcalina. SIGMAFAST™ BCIP/NBT Cat.b5655 Lot.046k8214

<sup>y</sup> Immulon® 1B Flat Bottom Microtiter® Plates. Thermo Electron Corporation USA Cat.3355 Lot.s2522909

<sup>z</sup> Albumin, Bovine Serum, Colin Fraction V pH7 (BSA). United States Biological, Cat.A1310 Lot.8071069

<sup>aa</sup> Phosphatase Substrate. Sigma-Aldrich USA, Cat.S0942 Lot.028K8209

dietanolamina<sup>bb</sup> (pH 9.8) y la placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La reacción se detuvo adicionando 30 µl de NaOH 3M. Las reacciones fueron medidas en un lector<sup>cc</sup> de microplacas de ELISA a 405 nm.

## **2.7 Inmunización de pollos libres de patógenos específicos (SPF)**

Para evaluar la inmunogenicidad de la bacterina, se alojaron 74 pollos SPF de un día de edad, en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (FMVZ: UNAM), donde se les proporcionó agua de bebida y alimento a libre acceso, además de calefacción durante las 3 primeras semanas. Se formaron dos grupos: el experimental con 42 pollos SPF, los cuales fueron inmunizados con 0.1 ml de la bacterina que contenía aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC por dosis por vía subcutánea en el tercio medio del cuello; mientras que el grupo testigo, formado por 32 pollos SPF, sólo recibieron 0.1 ml de SSF estéril. Antes de aplicar los tratamientos, se tomaron muestras de sangre (1 día de edad) de todos los pollos (200 µl aproximadamente), posteriormente al tratamiento de las aves, se obtuvieron muestras sanguíneas semanalmente durante 7 semanas. Los sueros colectados de todas las muestras se identificaron adecuadamente y se almacenaron en congelación hasta su empleo.

### **2.7.1 Evaluación de niveles de anticuerpos en suero de pollos preinmunes e inmunes**

Los títulos de anticuerpos específicos en el suero de pollos se evaluaron contra los tres lipopolisacáridos de manera individual (O2, O78 y O84). Se analizaron las muestras de suero de todos los pollos al día de edad (preinmunes),

---

<sup>bb</sup> Diethanolamine. Sigma-Aldrich USA, Cat.D8885 Lot.128K0222

<sup>cc</sup> Bio-Tek ELx800 Software Gen5®

y después de la inmunización con la bacterina y de los que recibieron SSF (Testigo) durante 7 semanas. Para esto, se empleó la técnica de ELISA descrita anteriormente <sup>66</sup> con algunas modificaciones. La técnica se hizo por duplicado utilizando los sueros de las aves a una dilución 1:50 y como anticuerpo secundario, un anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo conjugado con fosfatasa alcalina<sup>dd</sup> en una dilución 1:1000. El punto de corte se estableció con el promedio de absorbancia de sueros negativos (muestras de animales no inmunizados) más tres desviaciones estándar.

### **2.7.2 Inmunotransferencia con sueros de pollos preinmunes e inmunes**

Para evaluar los perfiles antigénicos reconocidos por los anticuerpos IgY anti-LPS O2, O78 y O84 de *E. coli*, los extractos de LPS fueron separados por SDS-PAGE y después se llevó a cabo la inmunotransferencia usando el mismo procedimiento descrito anteriormente <sup>65</sup>. Para este ensayo se utilizaron cuatro sueros; un suero preinmune, y tres sueros de las semanas 1, 6 y 7 respectivamente, estos se evaluaron previamente mediante el ensayo de ELISA. Esta vez el anticuerpo secundario fue de conejo anti-IgY de pollo conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen) en una dilución 1:1000.

## **2.8 Ensayo de actividad bactericida del suero**

Dado que en México el complemento aviar no está disponible comercialmente, se decidió utilizar un modelo descrito por Orhan *et al.* (2001) <sup>67</sup>; para ello, se utilizó suero obtenido de 3 gallinas adultas (DPA:Aves), estos deben estar libres de anticuerpos contra los antígenos usados. Para determinar la presencia de

---

<sup>dd</sup> AP-Rabbit Anti Chicken/Turkey IgG. Invitrogen® USA, Cat.61-3122 Lot.532397A

anticuerpos específicos en los sueros las muestras se analizaron mediante una inmunotransferencia con los diferentes LPS descrita anteriormente con algunas modificaciones, los sueros de las aves se utilizaron a una dilución 1:50, y un anticuerpo secundario de conejo anti-IgY de pollo conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen) en una dilución 1:1000.

Para eliminar gran parte de los anticuerpos específicos que resultaron positivos en la inmunotransferencia, se decidió hacer una absorción de los sueros, ésta se realizó siguiendo el procedimiento del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM con algunas modificaciones. Brevemente, se sembró cada cepa liofilizada (O2, O78 y O84) en tubos con caldo infusión cerebro corazón<sup>ee</sup> (ICC) a 37°C, después de 18h cada cultivo se sembró en cajas con TSA y se incubó a 37°C por 18h; posteriormente, se cosechó el crecimiento de las tres cajas correspondientes a cada cepa en un tubo con 10 ml de SSF estéril. La suspensión bacteriana se calentó a 110°C por 30 min y se dejó enfriar. A continuación, se centrifugó a 9000 g durante 10 min y el pellet formado se resuspendió con 4 ml de SSF estéril, en el cual se adicionó 1 ml del suero y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 24h, después se centrifugó a 9,000 g durante 10 min, y el sobrenadante se pasó por un filtro<sup>ff</sup> estéril con diámetro del poro de 0.45µm y después se almacenó a -80°C en un termo con nitrógeno líquido hasta requerirse. El tercer suero de gallina, se congeló sin ser absorbido para ser usado como control positivo de actividad bactericida. Para verificar la actividad del complemento después de la absorción, se hizo un ensayo descrito por Orhan *et al.* (2001)<sup>67</sup> con algunas modificaciones. Los sueros absorbidos y sin absorber, se diluyeron desde 1:5 a 1:80 y se depositaron 50µl en cada pozo de la placa de 96 pozos con tapa estéril<sup>gg</sup>. Después se adicionó 50µl de una suspensión de *E. coli* O84 de aproximadamente  $2 \times 10^4$  UFC/ml;

---

<sup>ee</sup> Caldo infusión cerebro corazón. BDBioxon® 211200 Lot.6207181

<sup>ff</sup> Durapore® PVDF Membrane (0.45µm). MILLIPORE® Irland. Lot.P5nw13860

<sup>gg</sup> 96U Untreated Straight W/LID. NUNC® Cat.268200 Lot.102612

posteriormente se adicionaron 10µl de suero de pollos inmunizados, sin diluir y calentados a 56°C por 30 min. Al final, cada pozo contenía 50µl de suero absorbido o suero sin absorber en las diferentes diluciones, más 50µl de suspensión bacteriana y 10µl de suero de pollos sin diluir. Estos últimos con valores en ELISA contra O84, de 0.014, 1.15 y 2.31; el primero como control negativo, y los dos más para reacciones con el suero absorbido y sin absorber respectivamente. Después se incubó a 37°C por 1h. Posteriormente, se sembró 100µl de cada reacción (pozo) por vertido en TSA y se incubó a 37°C por 24h. Por último, se hicieron cuentas de UFC para evaluar la actividad bactericida de cada reacción.

Así mismo se hizo otro ensayo en el cual se evaluaron otras reacciones, como fueron, el suero de gallina sin absorber más bacterias, un suero positivo calentado más bacteria y suero positivo sin calentar más bacterias, para evaluar la reactividad de los diferentes sueros.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Tipificación serológica de las cepas de *Escherichia coli*

La etapa inicial del estudio consistió en corroborar la pureza e identidad de las cepas candidatas para la elaboración de la bacterina. En esta fase se analizó un lote de 76 cepas aisladas en un estudio previo, de éstas se logró recuperar 69 cepas (90.78%), y se confirmó el serogrupo previamente reportado en 55 (79.71%) de ellas. En las 14 (20.28%) restantes se identificaron serogrupos diferentes a los previamente reportados por Rosario *et al.* (2005)<sup>21</sup>. En el caso de dos cepas originalmente reportadas como rugosas (**OR**) en este estudio se identificaron como **O56 y O78**; adicionalmente, otras siete no aglutinaron con los 181 sueros anti **O** por lo que se describen como **OND** (O no determinado); por su parte, una que anteriormente se identificó como **OND** en el presente estudio fue **O165** y las cuatro restantes no expresaron el lipopolisacárido por lo que se reportan como **OR**. Los resultados de las 69 cepas tipificadas (Cuadro 1), mostraron al serogrupo **O2** (28.98%) como el más frecuente seguido por las cepas **OND** (21.73%), **OR** (15.94%), **O78** (7.24%) y **O84** (7.24%).

#### 3.2 Selección de cepas para la elaboración de la bacterina

Al llevar a cabo la selección de las cepas de *E. coli* para la preparación de la bacterina se consideró la frecuencia de aislamiento de diferentes serogrupos. En los resultados previos se encontró que los serogrupos O2, O78 y O84 fueron los que presentaron las frecuencias más altas (Cuadro 1). Por otro lado en un trabajo sobre letalidad embrionaria realizado en un estudio paralelo a éste, con el lote de cepas previamente referido, se observó que las cepas de los serogrupos O2, O78 y O84 mostraron índices de letalidad embrionaria que los clasificó como virulentos (Cuadro 2). Por tal motivo, se consideró que estos serogrupos cubrían los requisitos para ser utilizados en el desarrollo de la bacterina.



### **3.3 Preparación de lotes de semilla maestra**

Se elaboraron los lotes de semilla de referencia y de trabajo de las cepas de *Escherichia coli* serogrupos **O2**, **O78** y **O84**, la cual es primera etapa de la elaboración de una bacterina polivalente contra la colibacilosis aviar. Se liofilizaron 15 viales por cada cepa como semilla de referencia, y 10 viales como semilla de trabajo. Lo anterior para contar siempre con muestras del cultivo original y que no existieran variables que pudiesen influir en los resultados. Lo anterior se confirmó evaluando la viabilidad y pureza de los diferentes lotes antes y después del proceso de liofilización. La viabilidad antes y después de la liofilización se mantuvo en  $10^{10}$  UFC/ml; sin embargo, al realizar las cuentas al mes de liofilizadas se observó una disminución de un logaritmo en las UFC (Cuadro 3).

### **3.4 Elaboración de la bacterina polivalente**

La suspensión de cada una de las cepas que originalmente tenía  $2 \times 10^8$  al realizar la preparación de la bacterina y antes de inactivar los cultivos mostraron que la cepa **O2** tenía  $1.2 \times 10^8$  UFC/ml, **O78**  $1.96 \times 10^8$  UFC/ml y **O84**  $2 \times 10^8$  UFC/ml. Estos cultivos se inactivaron por calor y se mezclaron para preparar alícuotas en volúmenes de 2.0 ml que fueron liofilizados. Para la preparación final de la bacterina se rehidrató el liofilizado con 2 ml de SSF y esto se mezcló con el hidróxido de aluminio en una relación 1:1 v/v. Con este procedimiento se obtuvieron 40 dosis de 0.1 ml por vial, por lo que la concentración final de bacterias fue de aproximadamente  $10^7$  UFC/dosis.

#### **3.4.1 Prueba de esterilidad**

En la elaboración de una bacterina es importante garantizar la esterilidad del producto asegurando la correcta inactivación y que, además, en el proceso de elaboración este no se contaminó. Los resultados mostraron ausencia de

crecimiento bacteriano al inocular tubos con caldo tioglicolato y de soya tripticaseína. Tampoco se observó crecimiento de hongos o levaduras en los medios agar dextrosa saboraud y agar dextrosa papa. El crecimiento de microorganismos se evaluó hasta los 14 días posteriores a la inoculación. Lo anterior se confirmó al sembrar cada muestra en agar sangre en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en cuyo caso tampoco se identificó crecimiento, lo que confirmó que la bacterina fue inactivada correctamente y no se contaminó durante el proceso de elaboración.

### **3.4.2 Prueba de seguridad**

Otro requisito en la elaboración de bacterinas es demostrar la seguridad del producto; para ello, se inocularon 10 pollos SPF de un día de edad con 1 ml de la bacterina por ave. Los resultados mostraron que ninguno de los animales murió, ni tampoco se observaron signos o lesiones atribuibles al producto durante las 4 semanas de observación de acuerdo a lo que se menciona en la NOM-047-ZOO-1995, la cual fue tomada como base para la elaboración de la bacterina.

### **3.5 Purificación del LPS de *Escherichia coli***

Para medir los niveles de anticuerpos de aves inmunizadas con la bacterina y del grupo control se utilizó el ensayo de ELISA. Como antígeno se utilizaron los LPS de cada serogrupo referido previamente. Los resultados obtenidos mostraron que se obtuvieron 8.81mg del LPS **O2**; 6.23mg de **O78**; y 7.25mg de **O84**. Al analizar los perfiles electroforéticos de los LPS, se observaron las diferencias en las cadenas laterales del antígeno O, así como el core y el lípido A (Figura 1). Para confirmar la identidad de cada LPS se utilizó un ensayo de inmunotransferencia (immunoblotting), el resultado obtenido fue positivo ya que se comprobó que cada LPS transferido a la membrana de nitrocelulosa correspondía al serogrupo específico y que no se presentaban reacciones contra los otros LPS (Figura 2); lo

anterior se determinó al utilizar de manera cruzada los diferentes sueros de conejo y no observar reactividad contra las cadenas laterales del antígeno O, aunque si hubo reactividad contra el core y el lípido A (Datos no mostrados).

### **3.6 Evaluación de los niveles de anticuerpos de pollos SPF previos a la aplicación de la bacteria**

Se obtuvieron muestras de suero de los 74 pollos SPF de un día de edad antes de la inmunización; posteriormente, se analizaron los niveles de anticuerpos y se consideró que una respuesta era positiva cuando la lectura del ensayo de ELISA era  $\geq$  a 0.2 DO. El 84% de los sueros mostraron reacción positiva contra O2, 61% contra O78 y 82% con O84. Otra observación consistió en que la respuesta contra O2 presentó un promedio de lecturas de DO más altas que contra los otros dos LPS analizados (Figura 3). Los 74 animales fueron separados en dos grupos, el experimental (n=42), al que se le administró la bacteria y el testigo (n=32) a los que únicamente se les inoculó SSF estéril.

#### **3.6.1 Inmunogenicidad inducida por la bacteria**

Después de la inmunización se evaluó la respuesta a la bacteria de cada pollo semanalmente hasta las 7 semanas, el mismo análisis se realizó con los pollos del grupo testigo. Al considerar el mismo punto de corte (0.2 DO) que en la fase anterior del estudio, se observó que en la primer semana post-inoculación el 81% de los pollos del grupo experimental mantenían una respuesta positiva contra **O2**, 50% contra **O78** y 57% contra **O84**. Con relación al grupo testigo sin inocular, se observó que el suero de todos los pollos presentaban una respuesta positiva contra **O2**, 75% contra **O78** y 62.5% contra **O84**. En la segunda semana el número de sueros con respuesta positiva contra **O78** y **O84** disminuyó considerablemente en los dos grupos de pollos, mientras que **O2**, aunque se

presentó disminución en el número de sueros positivos, ésta se mantuvo tanto en los de pollos inmunizados (52%) como en los del grupo testigo (66%) (Cuadro 4).

Dado que en avicultura se analiza la inmunidad de parvada mediante la determinación del promedio en las lecturas del ELISA del total de aves, se decidió hacer este tipo de análisis con lo que se pudo observar que la respuesta de anticuerpos contra **O2**, se mantiene positiva hasta la segunda semana y media de edad (18 días) y con lecturas negativas a partir de la semana 3, 4 y 5 en ambos grupos. A partir de la semana 6 se observó respuesta positiva con lectura de 0.23 y a la semana 7 con 0.38 DO en el grupo experimental (figura 3).

Por su parte, la respuesta contra los LPS **O78** y **O84** mostró lectura positiva de ambos grupos durante la primera semana y media de edad (Figura 4 y 5), la respuesta contra **O78** dio resultados negativos a partir de la semana 2, los cuales se mantuvieron igual en los dos grupos de pollos hasta concluir el estudio a la semana 7 (Figura 4). Con relación a la respuesta de los sueros contra **O84**, en ambos grupos los resultados fueron negativos las semanas 2 y 3, mientras que a partir de la semana 4, y hasta la séptima semana, se observaron resultados positivos solo en el grupo experimental (Figura 5). Durante la fase experimental no hubo mortalidad; adicionalmente, ninguno de los 42 pollos inmunizados mostró reacciones adversas atribuibles a la bacterina.

### **3.6.2 Especificidad antigénica de anticuerpos anti-LPS en suero**

Para conocer que fracción de los LPS son reconocidas por los anticuerpos en suero de los pollos, se realizó un ensayo de inmunotransferencia. Para esto, fue seleccionado un suero obtenido antes de la inmunización el cual mostró reacción positiva en la prueba de ELISA contra los 3 LPS, adicionalmente, se enfrentaron 3 sueros, de la semanas 1, 6 y 7 de animales inmunizados, todos se

probaron contra los tres LPS. En la inmunotransferencia se confirmó que el suero pre-inmune reaccionó contra los diferentes componentes de los tres diferentes LPS. La respuesta contra O78 sólo fue positiva en el suero pre-inmune, mientras que con O2 se observó reactividad con los sueros de las semanas 1, 6 y 7; con O84, sólo se apreció en las aves de las semanas 6 y 7 (Figura 6).

### **3.7 Ensayo de actividad bactericida del suero**

Para evaluar si los anticuerpos generados por la bacterina eran de tipo protector se realizó un ensayo de actividad bactericida. Debido a que no se contó con complemento aviar comercial, para realizar el ensayo se siguió un modelo descrito por otros autores, quienes utilizan como fuente de complemento, suero de pollos libres de anticuerpos contra el antígeno en estudio. Para corroborar que los sueros de tres gallinas utilizadas en esta fase del trabajo estaban libres de anticuerpos contra los serogrupos O2, O78 y O84, se analizaron estos mediante un ensayo de inmunotransferencia utilizando los tres diferentes LPSs. El resultado mostró que los sueros reaccionaban con los LPSs O2 y O84 (Figura 7). Ya que no fue posible obtener suero libre de anticuerpos anti O2 y anti O84 se decidió eliminar estos mediante absorción con los antígenos referidos. Después de la absorción se hizo el ensayo de actividad bactericida para determinar la presencia del complemento; sin embargo, el resultado fue negativo, ya que al parecer, el complemento se inactivó durante el procedimiento de absorción. Lo anterior se concluyó ya que en otro ensayo con el suero que no fue absorbido se observó actividad bactericida contra *E. coli* O84. Por otro lado, para determinar si el suero de gallina por sí solo inducía la actividad bactericida, se llevó a cabo otro ensayo en el que se enfrentaron el suero de gallina sin absorber más bacterias, un suero de pollo positivo calentado más bacterias y un suero de pollo positivo sin calentar más bacterias; en este ensayo se observó actividad bactericida únicamente con el suero de gallina sin absorber.

#### IV. DISCUSIÓN

A pesar de que no existen estudios sobre el impacto económico de la colibacilosis en México, las infecciones asociadas a *E. coli* representan pérdidas de millones de dólares al año en los Estados Unidos <sup>7,9</sup>. El interés por métodos alternativos para el control de esta enfermedad, ha dado lugar a una gran cantidad de estudios enfocados a activar la respuesta inmune contra este patógeno. Se han elaborado bacterinas <sup>49-51</sup>, vacunas subunitarias <sup>52,53</sup> o incluso aquellas creadas a partir de microorganismos vivos atenuados <sup>54</sup>, todas han inducido buena protección contra la colibacilosis aviar, la cual en muchos casos se atribuyó a la producción de anticuerpos en suero. Pero debido a que usualmente no se observa protección cruzada con los serogrupos de *E. coli* responsables de la enfermedad <sup>49,68</sup> muchos de estos inmunógenos sólo han sido efectivos contra desafíos homólogos.

En trabajos realizados por Melamed *et al.* (1991) <sup>51</sup> y Kwaga *et al.* (1994) <sup>70</sup>, sugieren la conveniencia de elaborar una vacuna que contenga los serogrupos más comunes asociados a la colibacilosis aviar. Es por ello que en el presente trabajo se propuso el desarrollo de una bacterina polivalente con los serogrupos O2 O78 y O84, los cuales, además de haberse identificado como los más comunes tanto en México <sup>23,58</sup>, como en otros países <sup>10,19,22</sup>, poseían genes de virulencia y causaron un porcentaje de letalidad embrionaria entre 60 y 80%, que permitió clasificarlos como virulentos en un estudio realizado por Ramírez *et al.* (2009) <sup>58</sup>.

En general, las pruebas esterilidad y seguridad a los que se sometió la bacterina, fueron satisfactorias de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-047-ZOO-1995), Requisitos mínimos para las vacunas, bacterinas y antígenos empleados en la prevención y control de la salmonelosis aviar. Al no existir alguna regulación mexicana para *E. coli*, se siguieron los procedimientos ahí descritos, por tratarse

de la elaboración de una bacterina con una enterobacteria y además de ser para uso en aves.

En el análisis de sueros de los pollos antes de la administración de la bacterina, se observó que la mayoría de los sueros, aunque en diferente proporción, reaccionaban contra los tres diferentes LPSs de los serogrupos bacterianos empleados en la elaboración del inmunógeno (**O2**: 84%, **O78**: 61%, **O84**: 82%). Además, al calcular el promedio de las lecturas de DO de los sueros de los 74 pollos, se pudo observar que la respuesta contra **O2** (1.04 DO) fue superior a la observada contra **O78** (0.35 DO) y **O84** (0.46 DO). La observación en realidad no es sorprendente, ya que como se ha mencionado, estos serogrupos son los que se han aislado con alta frecuencia en diferentes estudios hechos en México <sup>23,58</sup>, en particular **O2**. Este hallazgo pudo deberse a la presencia de una infección previa en las reproductoras que indujo la respuesta inmune contra las bacterias causantes y que los anticuerpos hayan sido transferidos a la progenie, de acuerdo a lo reportado por Brambel (1970) <sup>71</sup>, quien fue uno de los primeros en reportar que las aves reproductoras transfieren inmunidad materna a su progenie; estudios más recientes llevados a cabo por Loeken *et al.* (1983) <sup>72</sup> y Al-Natour *et al.* (2004) <sup>73</sup>, determinaron que, la cantidad de IgY transferida al vitelo del huevo es proporcional o incluso mayor a la concentración de IgY maternal en suero.

En un estudio realizado por Yoshiharu *et al.* (1987) <sup>74</sup> demostraron que la protección transferida de reproductoras vacunadas a su progenie dura hasta los 21 días después de la eclosión. En este estudio, al hacer el análisis de los sueros semanalmente hasta la séptima semana se observó que las respuestas positivas en los sueros del primer día de edad (pre-inmunes), se mantienen positivos hasta los 11 días edad contra los serogrupos O78 y O84 y hasta los 18 días de edad contra O2, a pesar de que las madres, por ser libres de patógenos específicos, no son vacunadas. Estos resultados sugieren que estas respuestas pudieran corresponder a los anticuerpos maternos transferidos por las reproductoras.

Para evaluar la capacidad inmunogénica de la bacterina inoculada en pollos de un día de edad, como se mencionó previamente, se analizaron los sueros de pollos hasta la séptima semana. En esta fase del estudio se pudo observar el poco y retardado estímulo inducido por la bacterina, lo que se atribuye a la temprana edad de los pollos al momento de la inmunización como lo señalan Trampel *et al.* (1997)<sup>48</sup> y Frommer *et al.* (1994)<sup>54</sup>. Una posible explicación a lo antes referido pudiera ser que la presencia de anticuerpos transferidos por la madre contra los tres LPSs, inhiben la respuesta inmune al reaccionar con los antígenos de la bacterina, tal y como ha sido referido por Heller *et al.* (1990)<sup>75</sup>.

Lo anterior se puede sugerir con base a los resultados en la respuesta de anticuerpos en suero de pollos del grupo experimental (bacterina) obtenidos en este trabajo, en el que la respuesta de anticuerpos maternos registraron la media más alta (0.86 DO) contra el serogrupo O2, el cual se mantuvo positivo hasta los 18 días, y la respuesta a la inmunización se presentó hasta la semana 6 sólo en el grupo experimental. A diferencia de lo observado contra el serogrupo O84 en el que la media de títulos de anticuerpos maternos son más bajos (0.43 DO), y desaparecen a los 11 días de edad, por lo que la respuesta a la inmunización fue evidente a partir de la semana 4 y se mantuvo positivo hasta la semana 7 y con títulos más altos que los generados contra el serogrupo O2, sólo en el grupo experimental. Es decir, a mayor título de anticuerpos maternos, la respuesta a la bacterina se retarda y los títulos de anticuerpos generados por esta son más bajos. En cuanto al serogrupo O78 a pesar de que la media en los títulos de anticuerpos maternos (0.29 DO) fueron aun más bajos que contra O84, este no estimuló respuesta alguna, manteniendo títulos negativos en los dos grupos de pollos a partir de la semana 2 hasta completar el experimento. Los resultados anteriores coinciden con lo reportado por Heller *et al.* (1990)<sup>75</sup> quienes señalan que a mayor respuesta de anticuerpos maternos el estímulo de la bacterina se retarda, ya que la respuesta contra **O2** aparece dos semanas después de **O84**.



Con estos datos, se considera factible que la baja respuesta observada podría estar relacionada con la neutralización inicial del inmunógeno administrado; ya que posteriormente, se presenta una reactivación en la respuesta en los animales inmunizados. Melamed *et al.* (1991)<sup>51</sup> y Deb *et al.* (1976, 1978)<sup>49,50</sup> inmunizaron aves con una bacterina después de la segunda semana de edad y sus resultados fueron favorables en cuanto a protección contra cepas homólogas. Lo antes expuesto plantea la posibilidad de utilizar la bacterina a partir de la segunda o tercer semana de edad cuando no hay presencia de anticuerpos maternos contra los LPSs seleccionados.

Los resultados obtenidos contra **O78** fueron interesantes, ya que al igual que **O2** y **O84** fue uno de los serogrupos identificados con más frecuencia; sin embargo, la respuesta de anticuerpos antes de la inmunización fue la más baja de todas; adicionalmente, no se observó respuesta posterior a la administración de la bacterina. Por su parte, Deb *et al.* (1976)<sup>49</sup> elaboraron una bacterina contra **O78** adsorbida en hidróxido de aluminio y demostraron que la protección no se relacionó con la producción de aglutininas anti O y K en suero, lo que sugiere que la respuesta inmune generada no va dirigida contra el LPS **O78**. Por ello, los resultados del presente trabajo pudieran deberse a que la respuesta contra **O78** va dirigida hacia otros componentes de superficie de la bacteria. Al respecto, un estudio realizado por Abdul-Aziz *et al.* (1998)<sup>47</sup>, muestra que la inmunización activa y pasiva con una cepa rugosa de *E. coli* (J5) protege contra la infección por **O78**. Estos autores sugieren que, probablemente, la respuesta va dirigida contra el core, lo que podría explicar la respuesta observada por ELISA y en el ensayo de inmunotransferencia contra el LPS. Sin embargo, si bien, sólo se observó reacción de los anticuerpos contra **O78** en los animales antes de la aplicación de la bacterina, no se puede asegurar que no hubo respuesta inmune contra los serogrupos empleados en la bacterina ya que no se realizaron ensayos de protección (desafío). Por tal motivo resulta conveniente elaborar una bacterina exclusivamente contra **O78** y medir la respuesta inmune tanto humoral (contra

otros componentes de superficie bacteriana) como celular para definir los factores que pudieran estar involucrados en la protección.

El ensayo de inmunotransferencia se realizó para evaluar la respuesta cualitativa de los sueros de diferentes semanas. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el ensayo de ELISA, ya que los sueros pre-inmunes reaccionaron contra los tres LPS, mientras que contra **O78** fue de menor intensidad (Figura 6A). Uno de los sueros a la primera semana posterior a la inoculación de la bacterina mostró reactividad únicamente contra el LPS **O2**. Así mismo los sueros de las semanas 6 y 7 sólo reaccionaron contra los LPS **O2** y **O84**. Los resultados anteriores correlacionan con el ensayo de ELISA, lo que indica que la respuesta contra **O78** inducida por la bacterina no va dirigida contra el LPS O78, tal y como se demostró en los dos ensayos.

Aunque los resultados obtenidos muestran que se indujo respuesta contra los LPS **O2** y **O84**, no se evaluó si ésta era de tipo protector, ya que el ensayo de actividad bactericida del suero no se realizó de manera conveniente, debido la IgY no activa al complemento mamífero <sup>76</sup> y no se contó con complemento aviar.

Los resultados obtenidos muestran que la bacterina utilizada fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral; sin embargo, es importante que en futuros estudios la bacterina se aplique una vez que los títulos de anticuerpos maternos no interfieran con ella; de igual manera, se sugiere hacer desafíos para evaluar la protección de este inmunógeno. Por ello, también debe considerarse la aplicación en reproductoras para incrementar los títulos de anticuerpos que se transfieren a la progenie, y de este modo, protegerlos durante las primeras 3 a 4 semanas, cuando el pollito es más susceptible a las infecciones causadas por *E. coli*. Aunque la producción de anticuerpos fue baja, y no se probó directamente la correlación entre la producción de anticuerpos y protección, los anticuerpos pueden jugar un papel importante en el control de la colibacilosis aviar <sup>55</sup> ya que

pueden impedir la colonización, o bien, contribuir a la destrucción de la bacteria mediante fagocitosis post-opsonización o activando al sistema del complemento.

## V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró preparar una bacterina capaz de inducir una respuesta humoral en pollos; sin embargo, esta respuesta se presentó a partir de la semana 4 y 6 sólo contra **O84** y **O2**, respectivamente.

Los sueros obtenidos previos a la inmunización reaccionaron contra los LPSs O2, O78 y O84. Estos resultados muestran la presencia de anticuerpos maternos contra serogrupos APEC en las aves y proporcionan datos para futuras investigaciones sobre el papel que juegan los anticuerpos maternos en la protección de pollitos contra la colibacilosis.

Para obtener mejores resultados con esta bacterina, podría aplicarse en los pollos a partir de la tercera semana de edad o cuando los títulos de anticuerpos maternos sean negativos.

La aplicación de la bacterina en las reproductoras podría ser otra alternativa para la protección contra la colibacilosis aviar en aves adultas (inmunización activa), y al mismo tiempo, inducir una respuesta inmune pasiva en la progenie.

Finalmente, es necesario realizar un ensayo de desafío posterior a la aplicación de la bacterina para evaluar su posible efecto protector.

## REFERENCIAS

1. Collins CH, Lien PM. Métodos microbiológicos, España: Acribia, 1989.
2. Fantanatti F, Silveria WD, Castro AFP. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 1994; 41:75-86.
3. Jordan FTW, Pattison M. Enfermedades de las Aves. 3ª Edición: 1998; Manual moderno.
4. Freeman BA. Microbiología de Burrows. 22ª ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 1989.
5. Nicole T, Glasner V. *Escherichia coli* the organism. In: *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Edited by Michael Donnenberg. Ed. Academic Press. 2002:3-34.
6. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 1999; 30: 299-316.
7. Rosenberg JK, Fries PA, Cloud SS, Wilson RA. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis*; 29: 1094-1107.
8. Delicado ER, Guimaraes de Brito B, Gaziri LCJ, Vidotto MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 2003; 94: 97-103.
9. Gibbs PS, Wooley RE. Comparison of the intravenous chicken challenge method with the embryo lethality assay for studies in avian colibacillosis. *Avian Dis* 2003; 47:672-680.
10. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, García V, Vázquez ML, Blanco J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet Microbiol* 1998; 61: 229-235.
11. Ramírez GB. Serotipificación y detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras obtenidas en una empresa avícola integrada. (tesis de licenciatura) México, D.F. FMVZ. UNAM, 2007.
12. Dias da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, de Hollanda LM, Pestana de Castro A F, Tatsumi YA, Lancellotti M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 2002-1; 85: 47-53.

13. Peighambari SM, Vaillancourt JP, Wilson RA, Gyles CL. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis* 1994;39:116-124.
14. Mellata M, Bakour R, Jacquemin E, Mainil JG. Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. *Avian Dis* 2001;45:670-679.
15. Gibbs PS, Maurer JJ, Nolan LK, Wooley RE. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of the increased serum survival gene cluster (iss). *Avian Dis* 2003-2; 47: 370-379.
16. La Ragione RM, Woodward MJ. Virulence factor of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* 2002; 73:27-25.
17. Rodríguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 2005; 36:241-256.
18. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticaemia in poultry. *Vet Microbiol* 2004; 104:91-101.
19. Dias da Silveira W, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IGCD, Leite DS, de Castro AFP, Brocchi M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet Microbiol* 2002-2; 89: 323-328.
20. Stehling EG, Yano T, Brocchi M, Dias da Silveria W. Characterization of plasmid-encoded adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). *Vet Microbiol* 2003; 95:111-120.
21. Rosario CC, Puente JL, Verdugo-Rodríguez A, Anderson RC, Eslava CC. Phenotypic characterization of *ipaH+* *Escherichia coli* strains associated with yolk sac infection. *Avian Dis* 2005; 49:409-417.
22. Nolan LK, Vaillancourt JP, Barnes HJ. Colibacillosis. 2009; 18:691-715.
23. Rosario CC, López CC, Téllez IG, Navarro OA, Anderson RC, Eslava CC. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos and chicken with yolk sac infection. *Avian Dis* 2004; 48:791-802.
24. Heller ED, Drabkin N. Some characteristics of pathogenic *E. coli* strains *Br Vet J* 1997;133:572-578.

25. Sojka WJ. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureau. Farnham Royal, England. 1965; 1-231.
26. Sharada R, Krishnappa G, Upendra HA. Serological O grouping and drug susceptibility of *Escherichia coli* strain for chickens. *Indian Vet J* 2001; 78:78-79.
27. Thangapandian E, Vijayarani K, Ramadass P, Nainar AM. Distribution of virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from Tamil Nadu. *Indian J Anim Sci* 2006; 76:284-287.
28. Landaverde OM. Aislamiento y tipificación de *Escherichia coli* del interior y exterior del huevo de gallina. México FMVZ-UNAM, 1962.
29. Levine MN. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigen, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987.
30. López AJ, Moreno CR. *Escherichia coli*: mecanismos de patogenicidad. En: *Ciencia Veterinaria Vol. 1* México: FMVZ-UNAM, 1976.
31. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods of microbiology*, vol.14 T. Bergan, ed. Academic Press, London 1984;43-112.
32. Orskov F, Orskov I, Evans DJ, Sack RB, Sack DA, Wadström T. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains. *Med Microbiol Immunol* 1976; 162:73-80.
33. Leitner, G. & Heller, E.D. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. *Avian Dis* 1992; 36:211-220.
34. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*" *J Lab Clin Med* 2002;139:155-162.
35. Gross WB. Colibacillosis. In: *Diseases of poultry*. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW (eds.) Iowa State University Press. Ames Iowa. 1991; 138-144.
36. Majó N, Gilbert X, Vilafranca M, O Loan CJ, Costa LI, Pagés AG, Costa L, Pagés A, Ramis A. Turkey rhinotracheitis virus and *Escherichia coli* experimental infection in chickens: histopathological, immunocytochemical and microbiological study. *Microbiol Vet* 1997; 57:29-40.
37. Cheville, N. F., and L. H. Arp. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173:584-587.
38. Barnes, H. J. 2000. Pathological manifestation of colibacillosis in poultry. Proc 21<sup>st</sup> World's poultry congress, Montreal, Canada, aug 20-24.

39. Yogaratnam V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Vet Rec* 1995; 137:215-217.
40. Tizard, IR. *Inmunología veterinaria* <sup>6ta</sup> ed. México: Interamericana McGraw-Hill 2002; cap.22 p. 285-286.
41. Buxton A. On the transference of bacterial antibodies from hen to the chick. *J Gen Microbiol* 1952; 7:268–286.
42. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, and Roth TF. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 1985;54:755–762.
43. Linden CD, Roth TF. IgG receptors on fetal chick yolk sac. *J Cell Sci* 1978; 33:317–328.
44. Kramer TT, Cho HC. Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg. *Immunology* 1970; 19:157–167.
45. Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their secretion in yolk and white. *Eur J Immunol* 1974; 4:521–523.
46. Lynne AM, Foley SL, Nolan LK. Immune response to recombinant *Escherichia coli* lss protein in poultry. *Avian Dis* 2006; 50:273-276.
47. Abdul-aziz TA, El-zukhon SN. Chickens hyperimmunized with *Escherichia coli* J5 strain are protected against experimental challenge with *Escherichia coli* O78 serotype. *Vet Res* 1998; 22:7-9.
48. Trampel DW, Griffith RW. Efficacy of alum hydroxide-adjuvanted *Escherichia coli* bacterin in turkey poults. *Avian Dis* 1997; 41:263-268.
49. Deb JR, Harry EG. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* O78:K80 infection in fowls. *Res Vet Sci* 1976; 20:131–138.
50. Deb JR, Harry EG. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* O2:K1 infection in fowls. *Res Vet Sci* 1978; 24:308–313.
51. Melamed D, Leitner G, and Heller ED. A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. *Avian Dis* 1991; 35:17–22.
52. Gyimah JE, Panigrahy B. Immunogenicity of an *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. *Avian Dis* 1985; 29:1078–1083.
53. Gyimah JE, Panigrahy B, Williams DJ. Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. *Avian Dis* 1986; 30:687–689.



54. Frommer A, Freidlin PJ, Bock RR, Leitner G, Chaffer M, Heller ED. Experimental vaccination of young chickens with a live, non-pathogenic strain of *Escherichia coli*. Avian Pathol 1994; 23:425–433.
55. Yaguchi K, Ohgitani T, Noro T, Kaneshige T, Shimizu Y. Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Vaccine by eye drop or coarse spray administration. Avian Dis 2009; 53:245-249.
56. Peighambari SM, Hunter DB, Shewen PE, Gyles CL. Safety, immunogenicity, and efficacy of two *Escherichia coli* cya crp mutants as vaccines for broilers. Avian Dis 2002;46; 287-297.
57. Lara, P. J. Vacunología: Métodos convencionales y alternativos, Memorias Actualidades de la vacunología aviar, laboratorio Avi-Mex S.A de C.V 2008; p. 32
58. Ramírez GB. Asociación entre letalidad embrionaria y presencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves. (Tesis de Maestría). México, D.F. FMVZ. UNAM, 2009
59. European Communities. Pharmaceutical Legislation. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Good Manufacturing Practices. 1998 (Vol. 4).
60. Norma Oficial Mexicana NOM-047-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las vacunas, bacterinas y antígenos empleados en la prevención y control de la salmonelosis aviar. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural: Diario Oficial de la Federación. México DF. 8 enero 1997.
61. Cruz RK. Trabajo profesional supervisado: Aseguramiento de calidad. (Tesis de licenciatura) México DF. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
62. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydrate Chemistry 1965; 5:83–91.
63. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
64. Tsai, C. M., and C. E. Frasch. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1982; 119:115-118.
65. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4354.

66. Chart H, Smith HR, Scotland SM, Rowe B, Milford DV, Taylor CM. Serological identification of *Escherichia coli* O157:H7 infection in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 1991; 74:138–140.
67. Orhan S, Qijing Z, Jerrel CM, Brian SH, Teresa YM, Mohan R. Prevalence, Antigenic Specificity, and Bactericidal Activity of Poultry Anti-*Campylobacter* Maternal Antibodies. *Appl Environ Microbiol* 2001; 3951–3957.
68. Arp LH. Consequences of active or passive immunization of turkeys against *Escherichia coli* 078. *Avian Dis* 1980; 24:808-815.
69. Kapur V, White DG, Wilson RA, and Whittam TS. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O2 and 078 strains that cause avian septicemia. *Infect Immun* 1992; 60:1687-1691.
70. Kwaga JKP, Allan BJ, van den Hurk JV, Seida H, Potter AA. A *carAB* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys. *Infect Immun* 1994; 62:3766–3772.
71. Brambel FWR. The transmission of passive immunity from mother to young. *Frontiers Biol* 1970; 18:1-19.
72. Loeken MR, Roth TF. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology* 1983; 49:21–28.
73. Al-Natour MQ, Ward LA, Saif YM, Stewart B, Keck LD. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 2004;48:177–182.
74. Yoshiharu O, Jensen AE, Cheville NF. Immunity of chicks against colibacillosis by vaccination of parent breeders. *Bull Univ Osaka* 1987; 40:38-44.
75. Heller ED, Leitner G, Drabkin N, Melamed D. Passive immunization of chicks against *Escherichia coli*. *Avian Pathol* 1990; 19:345-354.
76. Larsson A, Wejaker P, Forsberg P, Lindahl T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J Immunol Methods* 1992; 156:79-83.

## CUADROS

**Cuadro 1. Serogrupos identificados en 69 cepas recuperadas de *Escherichia coli* aisladas partir de aves con infección de saco vitelino en un estudio previo**

Serogrupo	Numero (%)
O2	20 (28.98%)
OND	15 (21.73%)
OR	11 (15.94%)
O78, O84	5 (7.24%)
O112, O152 y O167	2 (2.89%)
O9, O56, O8, O81, O165, O146 Y O155	1 (1.44%)

Numero = No. de cepas de cada serogrupo

(%)= porcentaje total

OND= sin reacción con ninguno de los antisueros del esquema

OR= sin expresión del antígeno O

**Cuadro 2. Porcentaje de letalidad embrionaria de las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas para la elaboración de la bacterina**

Identificación	Lugar de aislamiento	Serogrupo	%Letalidad embrionaria*
SR-CR00282	hígado	<b>O2</b>	73%*
SR-CR00338-A	saco vitelino	<b>O78</b>	82%*
SR-CR00342-A	hígado	<b>O84</b>	64%*

\*Ramírez *et al.* (2009) <sup>58</sup>

**Cuadro 3. Viabilidad de las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas para la elaboración de la bacterina polivalente antes y después de la liofilización**

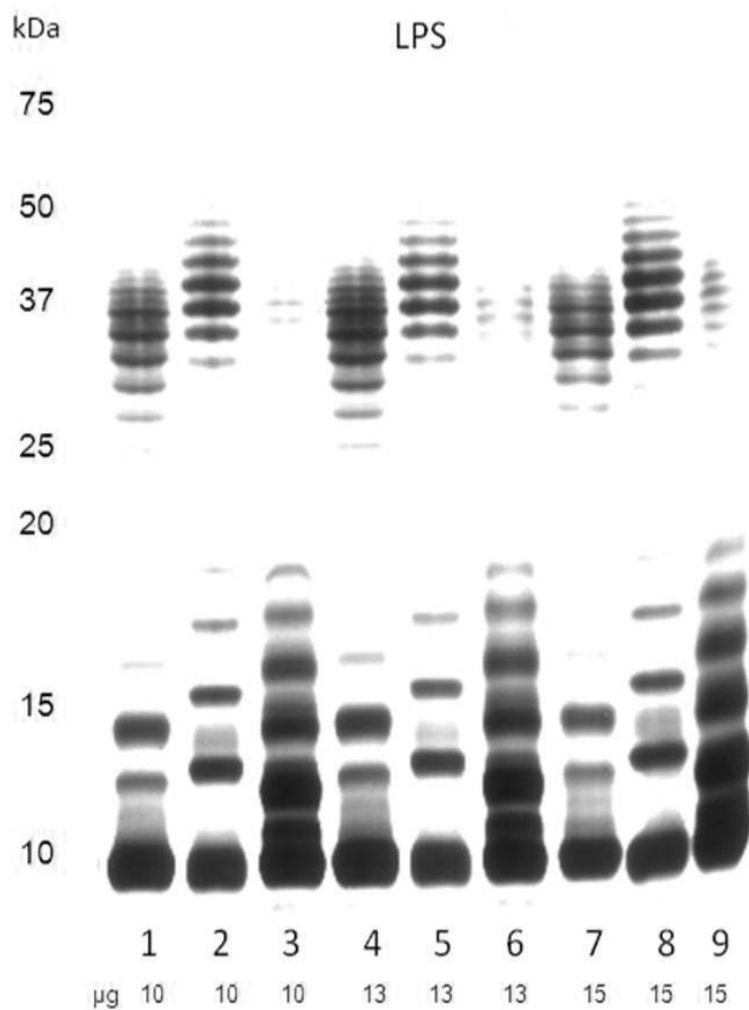
Serogrupo	ANTES	1 DIA	1 SEMANA	1 MES
O2	5.56X10 <sup>10</sup>	2.24X10 <sup>10</sup>	2.12X10 <sup>10</sup>	9X10 <sup>9</sup>
O78	15.4X10 <sup>10</sup>	2.2X10 <sup>10</sup>	6X10 <sup>9</sup>	1.8X10 <sup>8</sup>
O84	12.4X10 <sup>10</sup>	3X10 <sup>10</sup>	8X10 <sup>9</sup>	5X10 <sup>8</sup>

Liofilización con 2ml de leche descremada al 5%

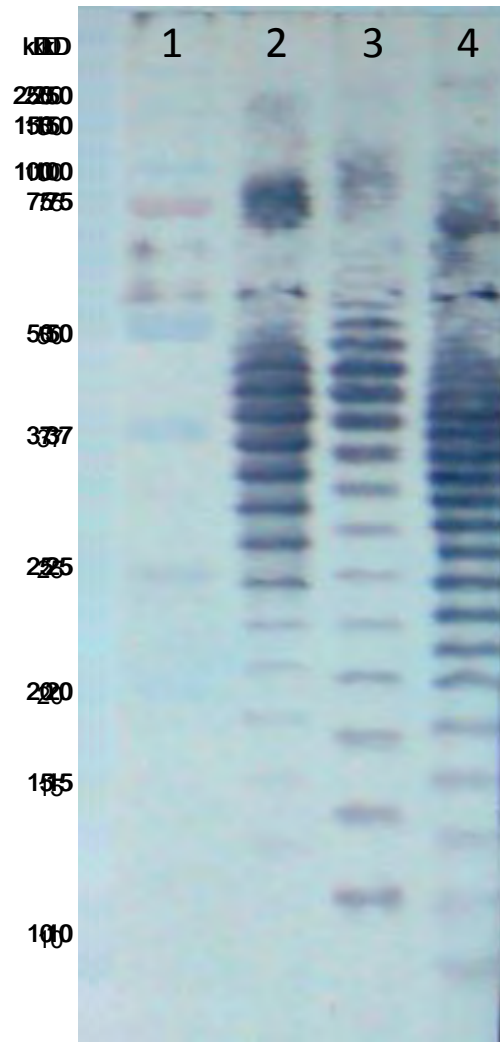
**Cuadro 4. Porcentaje de sueros positivos contra los lipopolisácaridos O2, O78 y O84 en pollos del grupo testigo no bacterinizado y experimental al que se le aplicó la bacterina experimental al día de edad (Bacterina), analizados mediante ELISA durante 7 semanas post-inmunización**

No. Pollos	Tratamiento	ELISA LPS	Pre-tratamiento	Post-tratamiento						
			1 Día	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4	SEM5	SEM6	SEM7
32	SSF	O2	30 (94%)	32 (100%)	21 (66%)	2 (6%)	1 (3%)	0	0	0
		O78	26 (81%)	24 (75%)	2 (6%)	0	0	0	0	0
		O84	28 (88%)	20 (63%)	6 (19%)	0	0	0	0	0
42	BACTERINA	O2	32 (76%)	34 (81%)	22 (52%)	7 (17%)	4 (10%)	10 (24%)	12 (29%)	17 (40%)
		O78	19 (45%)	21 (50%)	2 (5%)	0	2 (5%)	2 (5%)	3 (7)	4 (10%)
		O84	32 (76%)	24 (57%)	8 (19%)	3 (7%)	15 (34%)	18 (43%)	18 (43%)	11 (26%)

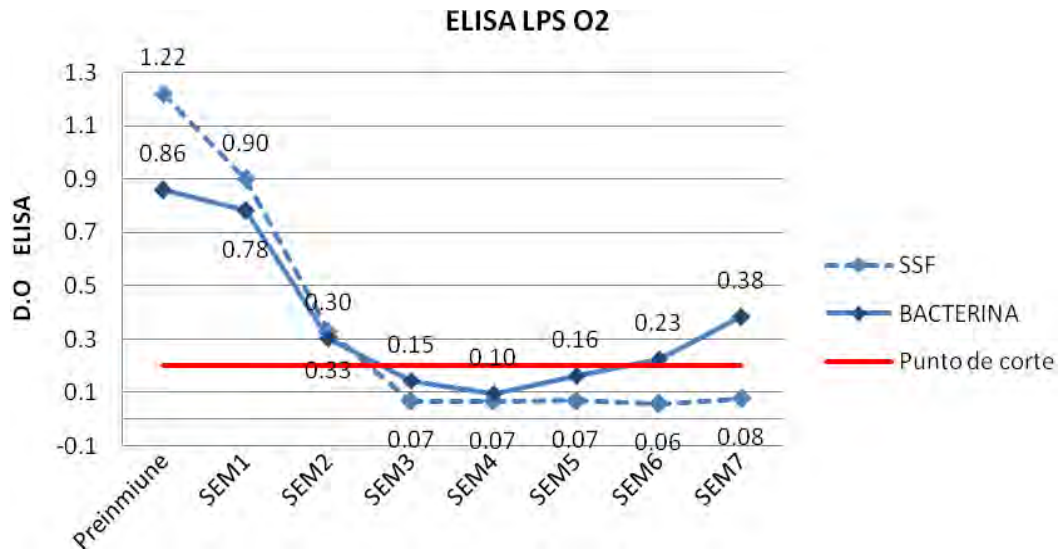
## FIGURAS



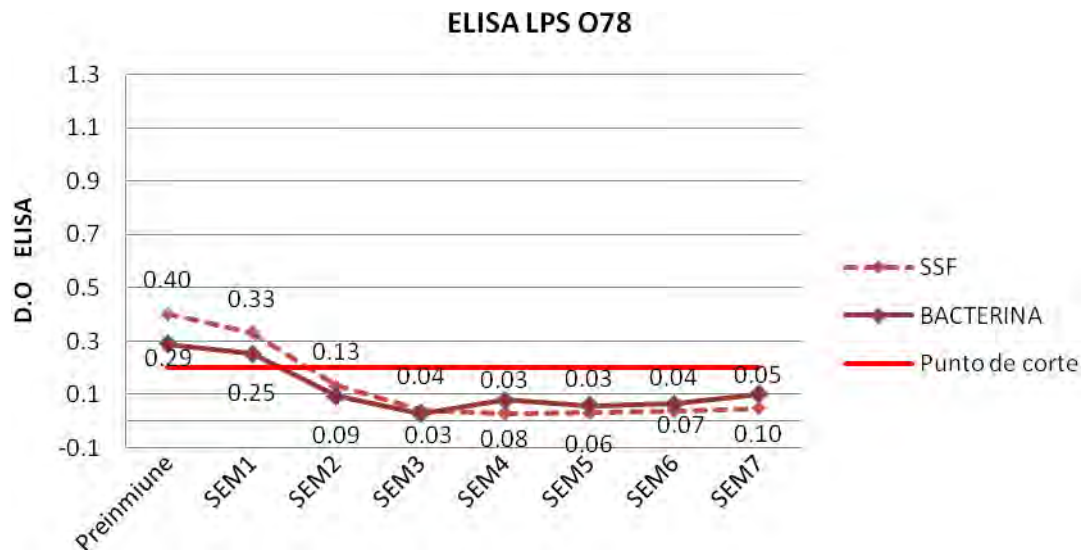
**Figura 1. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de los lipopolisacáridos O2, O78 y O84 de las cepas de *Escherichia coli* seleccionados para la elaboración de una bacterina experimental**  
Líneas 1, 4 y 7 (LPS O2); 2, 5 y 8 (LPS O78); 3, 6 y 9 (LPS O84) respectivamente.



**Figura 2. Determinación de la Identidad de los lipopolisácaridos O2, O78 y O84 de *Escherichia coli* por inmunotransferencia, con antisueros de referencia, obtenidos de conejo. Líneas 1) Marcador de peso molecular; 2) O2; 3) O78; 4) O84.**

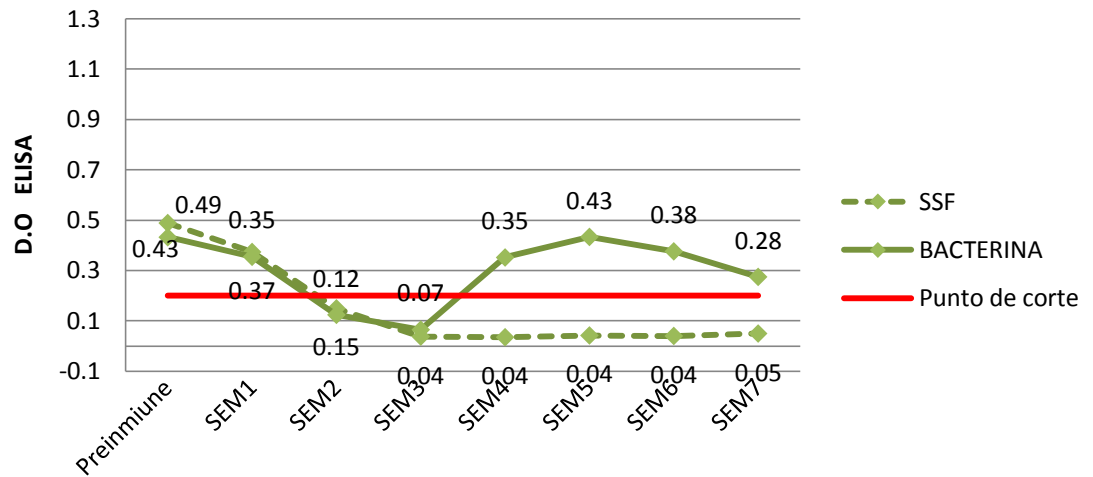


**Figura 3. Respuesta de anticuerpos IgY en suero contra el LPS O2 mediante la técnica de ELISA en aves SPF inmunizadas con una bacterina polivalente de *Escherichia coli*. Sueros preinmunes y sueros de 1 a 7 semanas después de la inmunización. Se considero un valor de 0.2 (DO) para definir como positiva la respuesta (3 DS).**



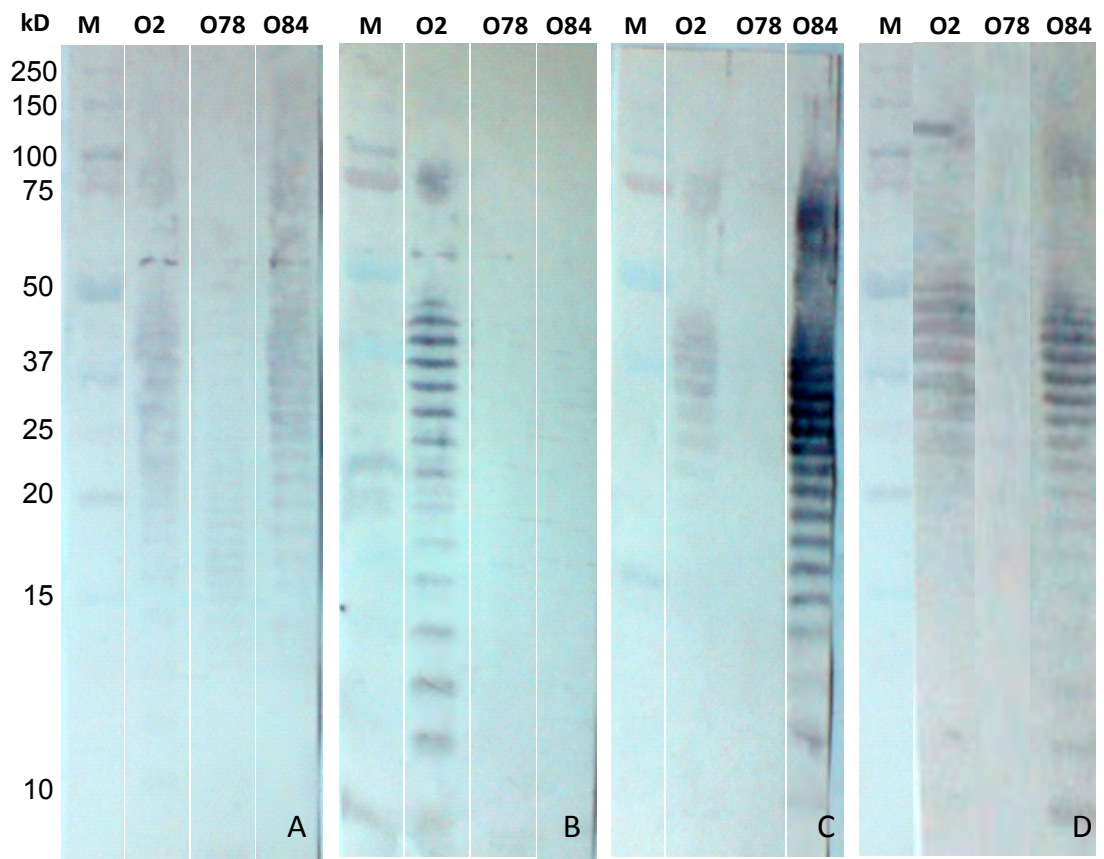
**Figura 4. Respuesta de anticuerpos IgY en suero contra el LPS O78 mediante la técnica de ELISA en aves SPF inmunizadas con una bacterina polivalente de *Escherichia coli*. Sueros preinmunes y sueros de 1 a 7 semanas después de la inmunización. Se considero un valor de 0.2 (DO) para definir como positiva la respuesta (3 DS).**

## ELISA LPS O84

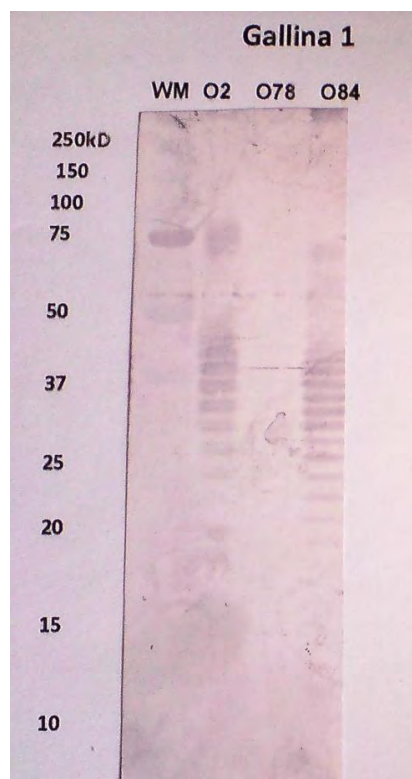


**Figura 5. Respuesta de anticuerpos IgY en suero contra el LPS O84 mediante la técnica de ELISA en aves SPF inmunizadas con una bacteria polivalente de *Escherichia coli*. Sueros preinmunes y sueros de 1 a 7semanas despues de la inmunización. Se considero un valor de 0.2 (DO) para definir como positiva la respuesta (3 DS).**





**Figura 6. Especificidad antigénica de los anticuerpos IgY de pollos, antes y después de inmunizarlos con una bacteria.** Inmunotransferencia de los LPSs O2, O78 y O84, los LPSs fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa a 200mA por 4 h. posteriormente se enfrentaron con los diferentes sueros (1:50) analizados previamente mediante ELISA. La reacción se hizo aparente con anti IgY de pollo marcada con fosfatasa alcalina (1:1000). Membranas A) suero preinmune; B) suero semana 1; C) suero semana 6 y D) suero semana 7.



**Figura 7. Inmunotransferencia para la identificación de anticuerpos IgY contra los lipopolisácaridos O2, O78 y O84, en suero de gallinas de postura leghorn utilizado para la obtención del complemento.**