

12,
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA EL PILUS LONGUS DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGENICA

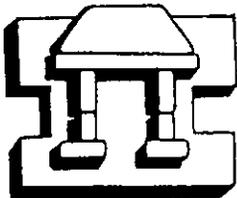
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUAN CARLOS CARPIO PEDROZA



IZTACALA

ASESORES: M. EN C. YOLANDA MEDINA FLORES,
DR. JORGE A. GIRON ORTIZ

MEXICO, D.F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

278811



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 MI PADRE:

A quien admiro, por su sapiencia.

A MI MADRE:

Por todo su apoyo.

A MIS HERMANOS:

Gabi, Fermin, Paula, Carmen, Tere, Andrés y Pati; por todos los momentos compartidos y su apoyo.

A LOLA Y YOLA:

Por todo el apoyo y comprensión que han mostrado para el buen término de este trabajo.

PARA ALGUIEN ESPECIAL:

Por que durante esa etapa de mi vida recibí muchas alegrías, te dedico este trabajo, me hubiese gustado terminarlo y seguir contigo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis, se realizó en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA.



DE FORMA MUY ESPECIAL:

A la M. en C. Yolanda Medina Flores, por su amistad, apoyo y constantes indicaciones, que lograron llevar a buen término esta tesis.

A la Doctora Dolores Correa, por su apoyo y el permitirme participar en este proyecto, así como, por la revisión y comentarios a este trabajo.

Al Doctor Jorge A. Girón, por sus acertadas dirección y opiniones del trabajo.

A MIS SINODALES:

Los maestros, Martha O. Salcedo A, Ramón V. Moreno Torres, David González Pantaleón, Rafael Jiménez Flores, quienes revisaron y participaron con sus críticas y sugerencias en el presente trabajo.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO:

Por que todos ellos de alguna manera, en algún momento, me apoyaron:

América, Ricardo, Gilberto, Sandra, Dulce, Edith, Olga, Zoila, Toño, Chelo, Tere N., Sra. Hilda, Héctor, Sonia, Rosaura, Magda, Raquel, Isabel, Laura, Lolita L., Lolita T., Rosalba, Alejandro, Armando, Juan Carlos, Roberto, Araceli, Arturo y Sr. José Luis. Así, también agradezco a todos aquellos que sin desearlo he omitido.

INDICE

RESUMEN	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	VI
1.- INTRODUCCION	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Clasificación serológica de <i>Escherichia coli</i>	3
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)	5
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	6
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	7
1.2.4 <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	8
1.2.5 <i>Escherichia coli</i> Difuso Adherente (DAEC)	8
1.2.6 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	9
1.2.6.1 Factores de colonización de ETEC	10
1.2.6.2 Longus	14
2.- LOS ANTICUERPOS	16
2.1 Inmunoglobulinas y su función biológica	16
2.2 Los Anticuerpos Monoclonales	22
2.2.1 Aplicaciones de los Anticuerpos Monoclonales	29
3.- JUSTIFICACION	31
4.- OBJETIVOS	31

5.-	MATERIAL Y METODOS	32
5.1	Inmunización y sangrado	32
5.2	Determinación del título de anticuerpos por ELISA	34
5.3	Cultivo de celular	36
5.4	Fusión de celular	38
5.5	Selección y mantenimiento de híbridos en cultivo	39
5.6	Clonación de hibridomas.	40
5.7	Caracterización de los AcMs	40
5.7.1	Inmunoelectrotransferencia (IET)	41
6.-	RESULTADOS	44
6.1	Inmunización	44
6.2	Fusión Celular	45
6.3	Clonación	45
6.4	Caracterización inmunoquímica	46
6.4.1	Determinación de isotipo	46
6.4.2	Reactividad de los AcMs a Longus	47
6.4.3	Determinación de reacciones cruzadas	57
7.-	DISCUSION	63
8.-	CONCLUSIONES	66
9.-	REFERENCIAS	67

R E S U M E N

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es una causa importante de diarrea en niños de países en desarrollo y en viajeros a estos países. Uno de los determinantes de virulencia de ETEC son los factores de colonización (CFAs), que consisten en proteínas en forma de pelos que se encuentran en la superficie de las bacterias, y que les permiten adherirse al tejido del huésped. En cepas ETEC provenientes de animales y de seres humanos se han descrito más de cuarenta CFAs. Longus es un pilus que se encontró en la cepa E9034A, cuya característica principal es su longitud de más de 20 μm , muestra homología con los pili tipo IV de algunos patógenos Gram-negativos. Longus tiene una alta prevalencia (19-38%) en cepas ETEC de diversos orígenes geográficos. En el presente trabajo se describe la producción de anticuerpos monoclonales (AcMs) contra el pilus longus de ETEC. Con el pilus purificado se inmunizaron ratones Balb/c, y mediante ELISA se les determinó el título de anticuerpos. Células esplénicas de estos ratones se fusionaron con células de mieloma X63Ag8.653 utilizando polietilenglicol. Después de la selección con medio HAT, se determinó que teníamos 6 pozos con células productoras de anticuerpos anti-longus por ELISA. Esos pozos se clonaron de dos a cuatro veces por dilución limitante. Los anticuerpos son de las subclases IgG1 e IgG3. Mediante inmunoelectrotransferencia y ELISA se determinó que 5 AcMs son específicos para longus de cepas ETEC, sin reacción cruzada con cepas *E. coli* no productoras de longus, ni con *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus mirabilis*. Sólo un AcM presentó reacción cruzada con cuatro cepas de ETEC productoras de CFA/III.

Lista de Abreviaturas

AcM	Anticuerpo monoclonal
°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
12.27	Anticuerpo monoclonal anti-Longus
12.29	Anticuerpo monoclonal anti-Longus
13.6	Anticuerpo monoclonal anti-Longus
13.66	Anticuerpo monoclonal anti-Longus
31-10	Cepa ETEC CFA/III*
8.40	Anticuerpo monoclonal anti-Longus
8.48	Anticuerpo monoclonal anti-Longus
933	Cepa EHEC
A/E	Attaching and effacing (adherencia y destrucción), tipo de lesión causada por las cepas EPEC.
ACF	Adyuvante completo de Freund
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcMs	Anticuerpos monoclonales
ADP	Adenosin difosfato
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
ATP	Adenosin trifosfato
B171 LA⁻	Cepa EPEC
B171 LA⁺	Cepa EPEC
B2C	Cepa ETEC Longus*
BFP	Bundle Forming Pilus, tipo de pilus producido por cepas EPEC.
CAB	Agar sangre
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
CFA	Antígeno factor de colonización

C_H	Cadena pesada constante
C_L	Cadena ligera constante
cm	Centímetro
cm²	Centímetro cuadrado
CO₂	Bióxido de carbono
CS	Antígeno coli de superficie
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusoadherente
DH5a	Cepa ETEC Longus ⁻
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2348/69	Cepa EPEC
E9034A	Cepa ETEC Longus ⁺
E9034P	Cepa ETEC Longus ⁻
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST	Toxina termoestable producida por algunas cepas de <i>E. coli</i> EAEC y EPEC
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immunosorbant assay)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
Fab	Fragmento que se une al antígeno (Fragment antigen binding)
Fc	Factor cristalizante
H 10407	Cepa ETEC CFA/II ⁺
h	Horas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HAT	Hipoxantina aminopterina timidina
Hep2	Línea celular tipo epitelial derivada de carcinoma de laringe.
HGPRT	Hipoxantina-guanidín-fosforribosil-transferasa

HT	Hipoxantina-timidina
IET	Inmunolectrotransferencia
Ig	Inmunoglobulina
Igs	Inmunoglobulinas
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
kDa	kilodaltons
L	Cadena ligera
LB	Agar Luria Broth
LngA	Longina, unidad estructural del pilus Longus
lngA	Unidad génica que codifica para el pilus Longus
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Toxina termolábil
M442	Cepa ETEC CFA/III ⁺
M447 C4	Cepa ETEC Longus ⁺
M452	Cepa ETEC Longus ⁺
M633	Cepa ETEC Longus ⁺
mL	Mililitros
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MP 215-1	Cepa ETEC CFA/III ⁺
MP179-2	Cepa ETEC CFA/III ⁺
nm	Nanómetro
O:H	Sistema de tipificación de <i>E. coli</i> , basado en los antígenos somáticos (O) y flagelares (H).
O35128	Cepa EAEC

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PBS T-	Amortiguador salino de fosfatos como testigo negativo
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCF	Antígeno putativo factor de colonización
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PPLO	Organismos tipo pleuroneumonía
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio de cultivo para células linfoides desarrollado por el Instituto Roswell Parque Memorial
S T+	Suero testigo positivo
ShET₂	Enterotoxina <i>Shiga</i>
ST	Toxina termolábil
STx	Toxina tipo <i>Shiga</i>
TCP	Pilis corregulado de la toxina colérica
TK	Timidin cinasa
TSAB	Agar soya tripticaseína con sangre
U/ml	Unidades por mililitro
V_H	Cadena pesada variable
V_L	Cadena ligera variable
W286-1-4	Cepa EAEC
W452-1-1	Cepa EAEC
WC172-1-4	Cepa EAEC
X63Ag8.653	Línea celular de mieloma de ratón
Z108-2	Cepa ETEC CFA/III*
Z14-2	Cepa ETEC CFA/III*
Z26 5/6	Cepa ETEC CFA/III*
Z284-1	Cepa ETEC CFA/III*

Índice de tablas y figuras

Página	Tablas y figuras
2	Tabla 1. Determinantes patogénicos de <i>Escherichia coli</i>
4	Tabla 2. Serotipos asociados a grupos patógenos de <i>E. coli</i> .
13	Tabla 3. CFA's de ETEC de origen humano.
15	Tabla 4. Características de los pili tipo IV clase B.
21	Tabla 5. Resumen de las características de las inmunoglobulinas del ratón.
25	Tabla 6. Líneas celulares de mieloma más utilizadas en la producción de AcMs.
34	Tabla 7. Esquema de inmunización de los ratones.
43	Tabla 8. Cepas ETEC utilizadas.
45	Tabla 9. Resumen de resultados de la fusión
46	Tabla 10. Híbridos originales y los grupos de clones obtenidos.
47	Tabla 11. Isotipos de los anticuerpos producidos por las diferentes clones.
61,62	Tabla 12. Resumen de resultados de especificidad y reacciones cruzadas, por ELISA (E) y por (IET).
21	Figura 1. Representación de un anticuerpo.
26	Figura 2. Principales pasos en la producción de AcMs.
28	Figura 3. Acción del HAT en las vías sintéticas del ADN.
30	Figura 4. Fragmentos de inmunoglobulinas de interés en el empleo en la clínica y el diagnóstico
33	Figura 5. Diseño experimental.
36	Figura 6. Esquemización del ELISA.
44	Figura 7. Respuesta inmune humoral del ratón .
48	Figura 8. Detección de Longus purificado usando cada una de las clones de los AcMs.
49	Figura 9. Producción de LngA en las cepas E9034A y E9034P.
50	Figura 10. Producción de Longus por diferentes cepas ETEC.

- 51 **Figura 11.** Reconocimiento de Longus por los AcMs en la cepa E9034A.
- 52 **Figura 12.** Reactividad de los AcMs a la cepa E9034P.
- 53 **Figura 13.** Reconocimiento de LngA por los AcMs en las cepas ETEC B2C y M447 C4.
- 54 **Figura 14.** Reconocimiento de LngA por los AcMs en las cepas de ETEC M452 y M633 .
- 55 **Figura 15.** Reconocimiento de longus en tres cepas ETEC LngA*, por los AcMs de todas las clonas.
- 56 **Figura 16.** Reconocimiento de LngA por los AcMs en tres cepas ETEC productoras de Longus.
- 57 **Figura 17.** Ejemplos del reconocimiento de los AcMs anti-longus por IET en cepas ETEC CFA/III*.
- 58 **Figura 18.** ELISA que muestra como no existen reacciones cruzadas entre los AcMs anti-LngA y la cepa Z26-5/6.
- 59 **Figura 19.** IET's que muestran las reacciones cruzadas con las cepas EPEC B 17 y EHEC 933.

1. INTRODUCCION

1.1 *Escherichia coli*

Cuando un microorganismo trata de establecerse en el intestino delgado de un hospedero le hace frente a los mecanismos naturales de defensa tales como, peristalsis, producción de mucina, ácidos biliares, IgA secretora, flora normal, descamación epitelial, entre otras. Por su parte el microorganismo posee factores de virulencia tales como toxinas, adhesinas, invasinas, hemolisinas, etc. Así el tracto gastrointestinal es un excelente ejemplo del delicado balance entre los mecanismos de defensa del hospedero y los de invasión del microbio (Duncan & Edberg, 1995).

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria anaerobia facultativa, de forma bacilar, Gram-negativa, adaptada como comensal en animales. Forma parte de la flora intestinal normal; coloniza el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente a las pocas horas de que éstos nacen. El humano normalmente es colonizado dentro de las primeras 40 h después del nacimiento, y estas cepas pueden permanecer durante meses o años (Hinson, 1989).

Entre algunas de sus características, *E. coli* puede formar cadenas cortas de bacilos, es móvil, forma colonias circulares, planas, lisas y con bordes bien definidos, no viscosas, fermentan la lactosa, teniendo una mezcla característica de ácido y gas como productos finales y algunas cepas producen hemólisis en gelosa sangre (Jawest, 1988).

E. coli ha sido asociada desde hace varias décadas con brotes de enfermedades diarreicas. Además también es capaz de causar infecciones del tracto urinario y meningitis neonatal, cada una de éstas clases de *E. coli* posee determinantes patogénicos o de virulencia particulares. (Tabla 1)

Tabla 1. Determinantes patogénicos de *Escherichia coli*.

<p>Adhesinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> * CFAs * Fimbria tipo 1 * BFP * Fimbrias P, S, G, M, Dr * Intimina: (adhesina no fimbrial) 	<p>Proteínas de superficie o secretadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Hemolisinas * Sistemas de sideróforos * Invasinas tipo "<i>Shigella</i>" para la invasión intracelular y propagación * Proteínas secretadas * Aparato de secreción tipo III.
<p>Motilidad/Quimiotaxis</p> <ul style="list-style-type: none"> * Flagelos 	<p>Toxinas</p> <ul style="list-style-type: none"> * Toxina termoestable (ST) * Toxina termolábil (LT) * Toxina tipo Shiga (STx) * Endotoxina (LPS) * EAST * ShET₂
<p>Propiedades antifagocíticas de superficie contra el suero antibactericida y defensas contra la respuesta inmune:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Antígenos K * LPS 	<p>Atributos genéticos</p> <ul style="list-style-type: none"> * Intercambio genético por transducción y conjugación. * Plásmidos transmisibles * Plásmidos de resistencia a drogas * Plásmidos con factores de virulencia y toxinas

1.2 Clasificación serológica de *E. coli*

La clasificación de *E. coli* comenzó con su asociación a síndromes diarreicos, mediante la tipificación serológica de sus antígenos O y H (Klemm, 1985):

- I) Antígenos (O) o Somáticos: Compuestos principalmente por lipopolisacáridos complejos. Deben su inmunogenicidad a la repetición de sus unidades de polisacáridos; presentan una reactividad cruzada muy estrecha con cepas del género *Shigella*. Aproximadamente son 170 diferentes antígenos somáticos.
- II) Antígenos (H) o Flagelares. Con su diversidad antigénica basada en los diferentes tipos de flagelina (proteínas). Se han reconocido aproximadamente 55 antígenos flagelares.

El término serotipo es usado sólo cuando se combinan los antígenos O y H. Relacionando los 170 antígenos O con los 55 H, tendríamos aproximadamente 9,000 serotipos posibles, pero en realidad sólo un grupo restringido de combinaciones antigénicas somatoflagelares están asociados a enfermedad diarreica en humanos (Cravioto A. y Eslava C. 1992). (Tabla 2)

Tabla 2 Serotipos asociados a grupos patógenos de *E. coli*.

GRUPOS <i>E. Coli</i> .	SEROGRUPOS	ANTIGENOS H ASOCIADOS
ENTEROPATOGENA (EPEC)	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125ac	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM
	O128	H2, H12
ENTEROTOXIGENICA (ETEC)	O142	H6
	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
ENTEROHEMORRAGICA (EHEC)	O159	H20
	O173	NM
	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111ab	H8, NM
ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	O113	H21
	O117	H14
	O157	H7
	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O77	NM
ENTEROINVASIVA (EIEC)	O86	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O28ac	NM
	O29	NM
	O112ac	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
ADHERENTE DIFUSA (DAEC)	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
	O167	H4, H5, NM
	O126	H7

Tomado de Nataro & Kaper, 1998

Hasta 1987, Levine había clasificado a las cepas de *E. coli* enteropatógenas en cuatro grandes categorías y apenas en 1998, Nataro & Kaper propusieron reclasificar a las cepas causantes de diarrea en seis grandes grupos con base en sus características patogénicas:

1.2.1 *E. coli* Enteropatógena (EPEC)

En los años cuarenta se aislaron cepas de *E. coli* que causaban diarrea en niños y una década después se comprobó su patogenicidad en voluntarios (Bray, 1945; Bray and Beavan, 1948; Ferguson and June, 1952; June, Ferguson and Worfel 1953; Koya et al 1954; Koya et al 1955). Se propuso el término enteropatógena para designarla (Neter et al 1955). Posteriormente se comprobó que estas cepas se adherían al enterocito y provocaban la destrucción de las microvellosidades intestinales, lo que se conoce lesión de adherencia y destrucción (attaching and effacing A/E) (Knutton, Lloyd, & McNeish, 1983). Estas cepas se adherían a células HEP-2 en cultivo (Cravioto, et al, 1979). A este tipo de cepas no se le conocía factores de colonización, hasta que se demostró que producen haces de fimbrias llamadas Bundle Forming Pilus (BFP) cuya producción está codificada en genes plasmídicos. Este pilus es bioquímica y morfológicamente similar a los pili tipo IV de *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*, y pilus Longus de ETEC (Girón, Ho & Schoolnik 1991). El BFP aparentemente está involucrado en la formación de microcolonias de bacterias sobre la célula hospedera, a través de enlaces interbacterias (Girón, Ho & Schoolnik, 1991).

Además, EPEC se adhiere íntimamente al enterocito por medio de una proteína de 94 kDa, llamada intimina; cuya información genética se halla codificada en el cromosoma (Jerse et al 1990).

1.2.2 *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Su principal mecanismo de patogenicidad es la invasión y el número de serotipos que incluye son pocos. Sus características metabólicas son similares a las del género *Shigella*, con la cual comparte características antigénicas y genéticas. EIEC y *Shigella* requieren la presencia de un plásmido de 140 kDa, para presentar el fenotipo invasivo. Muestran reacciones cruzadas entre ellas en los antígenos O.

Las características clínicas de la enfermedad se manifiestan por fiebre, severo dolor abdominal, diarrea acuosa, que sugiere la producción de algún tipo de enterotoxina, seguido de diarrea tipo disentería con sangre y moco. Todos estos rasgos patógenos son idénticos a los de *Shigella sp.* Un modelo propuesto del mecanismo de invasión para EIEC y *Shigella sp.* incluye: a) penetración del epitelio celular, b) lisis de la vacuola endocítica, c) multiplicación intracelular, d) movimiento direccional a través del citoplasma, y e) extensión a células epiteliales adyacentes. (Levine, 1987; Nataro, & Kaper, 1998). Se le aísla de manera poco frecuente como agente causal de diarrea y se le identifica preferentemente después del sexto mes de vida (Cravioto, et al 1990).

1.2.3 *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

En los años 70 se aislaron algunas cepas productoras de una exotoxina termolábil y que causaba lesiones hemorrágicas en asas ligadas del intestino de cerdo. Estas cepas eran del serotipo O26:H11, y se les incluyó en el grupo EPEC, porque se aislaron a partir de niños y adultos con diarrea.

Posteriormente se observó que esta toxina es capaz de destruir monocapas de células Vero, y se le llamó toxina vero (VT), por otra parte se demostró que era idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* por lo que se nombró toxina tipo Shiga (SLT), actualmente se le conoce como toxina STx. A diferencia de *Shigella* que sólo produce toxina Shigá, EHEC produce tres variantes antigénicas: STx1, STx2 y STx2v, cuyos mecanismos de acción son similares a los de la toxina LT de ETEC (Scotland, et al 1983; Marquez, et al 1987).

Se considera al serotipo O157:H7 como el prototipo del grupo y se sabe que son causantes del síndrome urémico hemolítico, de la colitis hemorrágica y de la púrpura trombótica trombocitopénica. Estos padecimientos se han observado más en países de clima templado como EEUU, Canadá, Inglaterra, Argentina, Australia y Alemania y las cepas involucradas pertenecían a los serogrupos O26, O111, O121, O145 y particularmente al serotipo O157:H7 (Scotland, et al 1980; Karmali, et al 1983). En México, las EHEC se relacionan con diarrea de tipo secretor leve o moderada, los serogrupos involucrados son O111, O26, O119 y O128, aunque en el país no se ha aislado al serotipo O157:H7 (Cravioto, et al 1988).

1.2.4 *E. coli* Enteroagregativa (EAEC)

Se asocia a diarrea persistente en niños de más de 14 días de edad y también se ha asociado a casos de niños con diarrea con sangre (Vial, et al, 1987). Se sabe que poseen fimbrias codificadas en plásmidos denominadas AAF/I y AAF/II (Eslava et al 1998) y que producen al menos dos toxinas diferentes, una que induce la secreción de líquidos en modelos experimentales, y la otra favorece la expresión de proteínas fosforilantes que movilizan el calcio extracelular (Savarino, et al, 1991; Baldwin, et al, 1991).

1.2.5 *E. coli* Adherencia Difusa (DAEC)

Las DAEC poseen una fimbria denominada F1845, cuyo gene que la codifica muestra homología con el grupo Dr de adhesinas fimbriales. También tienen una adhesina AIDA-1, pero ninguna de las dos se encuentra en todas las cepas examinadas.

En un estudio realizado en Chiapas, México, se aisló este último tipo de cepas de niños con diarrea y en sus controles pareados por sexo y edad sugiriendo que podrían causar diarrea (Girón JA, et al 1991).

1.2.6 *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)

E. coli enterotoxigénica (ETEC) es el patógeno causante de la diarrea del viajero, pero sobre todo en niños menores de cinco años, en los que causa una gran mortalidad y morbilidad en países en vías de desarrollo. La incidencia anual de casos de diarrea por ETEC se calcula en 650 millones de casos y en 800,000 la mortalidad en niños menores de 5 años en países subdesarrollados (Gaastra & Svennerholm, 1996). Se ha observado en estudios prospectivos que en los tres primeros años de vida pueden presentarse de dos a tres infecciones por ETEC. Las características clínicas de la infección incluyen dolor abdominal, náusea, diarrea tipo cólera y fiebre leve.

Las ETEC, se descubrieron a mediados de la década de los 50's, cuando se observó distensión en asas ligadas de intestinos de conejos inoculados con ultrafiltrados de cultivos de cepas aisladas de individuos con diarrea tipo cólera (De et al, 1956), demostrándose con ello que esas cepas de *E. coli* son capaces de producir exotoxinas. La infección es adquirida por la ingestión de agua o alimentos contaminados. La bacteria coloniza el intestino delgado y ahí elabora dos tipos de exotoxinas, una termolábil (LT) y una termoestable (ST). La LT es una proteína de 86.5 kDa de peso molecular, muy similar a la toxina colérica en cuanto a estructura, función y mecanismos de acción. Estructuralmente se compone de la subunidad A y 5 subunidades B.

La subunidad A se forma por las fracciones A1 y A2; la primera penetra en la célula e induce ADP-ribosilación que incrementa los niveles de AMPc intracelular, provocando la hipersecreción de agua y electrolitos; la segunda participa en la unión de la subunidad A con la B, así como en el proceso de internalización de A1. La subunidad B forma un pentámero que se une a receptores (gangliósido GM₁) de la célula intestinal.

Existen dos tipos de toxina ST, STa y STb que son péptidos de bajo peso molecular (2 y 5.1 kDa respectivamente), no son inmunogénicas y como su nombre lo indica son resistentes al calor. Ambas toxinas se encuentran codificadas en plásmidos transferibles. De todas las cepas ETEC aisladas en el mundo 35% expresan LT y ST, 35% sólo ST, y el resto sólo LT (Gaastra, & Svennerholm, 1996).

1.2.6.1 Factores de Colonización de ETEC

Uno de los mecanismos mediante el cual las bacterias patógenas se adhieren de manera específica a los tejidos del hospedero, es produciendo moléculas (llamadas adhesinas) que se unen a receptores de las células del huésped, existiendo una selectividad muy marcada a los tejidos celulares y hospederos a los que se unen. Las adhesinas pueden ser proteínas de membrana o proteínas poliméricas arregladas en filamentos llamados pili o fimbrias.

En el caso de ETEC, se ha demostrado que se valen de los llamados factores de colonización (CFAs), estructuras proteínicas filamentosas localizadas en la superficie de la bacteria, de manera polar o peritrica (Gaastra, 1996 y Klemm

1985). Las moléculas que le sirven de receptores en las células hospederas a los CFAs son glicoconjugados que exhiben una enorme diversidad en secuencia de sus oligosacáridos. En cepas ETEC aisladas de animales se han descrito varios pili y para el humano aproximadamente unos 20 y aunque muestran algunas diferencias importantes en estructura y propiedades, todos tienen algunas características comunes, como son:

- Generalmente están codificados en plásmidos de alto peso molecular, acompañados de información para la producción de enterotoxinas.
- Su producción está regulada por factores ambientales por ejemplo: temperatura, (excepto el pilus P que se produce a cualquier temperatura), pH, fuente de carbono, hierro, etc. (Mekalanos, 1992).
- Presentan patrones específicos de aglutinación en eritrocitos de diferentes especies
- La mayoría produce inmunidad de tipo protector.
- Están involucrados en la adherencia al intestino del hospedero.

En las cepas de ETEC de origen humanos, se conocen: CFA/I, CFA/II, CFA/III, CFA/IV y 16 antígenos fibrilares conocidos como factores putativos de colonización (PCF) o antígenos coli de superficie (CS). La mayoría de ellos se han identificado al cultivar cepas de ETEC en agar CFA a 37°C (Evans et al, 1975; 1977).

CFA/I. Es un pilus recto, rígido, compuesto de una subunidad proteínica ensamblada con una configuración helicoidal. Estos pili son altamente prevalente en cepas de ETEC de muchas regiones del mundo y están codificados en plásmidos de alto peso molecular, en los que también se encuentran codificadas las enterotoxinas ST y LT . Otros CFAs del mismo tipo morfológico son CS 1, CS 2, CS4, CS14, CS17 y CS19 (Evans, 1975; 1977; Gaastra & Svennerholm, 1996). (Tabla 3)

CFA/II. Compuesto por un grupo de adhesinas denominadas CS1, CS2 y CS3, las dos primeras de tipo fimbrial y la tercera fibrilar. Es el determinante común de cepas CFA/II⁺ que se puede presentar solo o en combinación con CS1 o CS2 (Evans et al, 1978; Klemm et al, 1985; Levine M, 1987). (Tabla 3)

CFA/III. Sólo se presenta en los serotipos O25:H16 y O25:H⁻. Pertenece a la familia de pili tipo IV, que incluye además a longus, BFP de EPEC, TCP de *V. cholerae* y otros pili de bacterias Gram-negativas. No aglutina eritrocitos humanos a diferencia de otros CFA's (Honda et al, 1984; Taniguchi et al, 1995). (Tabla 3)

CFA/IV. Esta formado de los antígenos CS6, CS4 y CS5 (Thomas et al,1982).

PCF. El PCFO166 se encuentra los serogrupos O20, O71, O98 y O166 (McConnell et al, 1989); el PCFO9 en los serogrupos O9 y O143 (Heuzenroeder et al, 1990) ; el PCFO20 en el serogrupo O20 (Viboud et al, 1993); PCFO148 del serogrupo O148 (Knutton et al, 1987), y el PCFO159 en el serogrupo O159 (Schmidt et al, 1985).

Se ha propuesto otra nomenclatura para los CFAs. En la tabla 3 se presentan esos nombres y se agrupan de acuerdo a su morfología (Nataro & Kaper, 1998; Gaastra & Svennerholm, 1996).

Tabla 3 CFAs de ETEC de origen humano.

Nombre Original/ Morfología	Nombre CS	Diámetro en nm	Peso en kDa
Varilla Rígida			
CFA/I	CFA/I	7	15.0
CS1	CS1	7	16.5
CS2	CS2	7	15.3
CS4	CS4	6	17.0
PCFO159	CS12	7	19.0
PCFO166	CS14	7	15.5/17.0
CS17	CS17	7	17.5
PCFO20	CS18	7	25.0
CS19	CS19	7	16.0
CS20	CS20	7	20.8
Formador-Haces			
CFA/III	CS8	7	18.0
LONGUS	CS21	7	22.0
Fibrilares			
CS3	CS3	2-3	15.1
CS5	CS5	5	21.0
CS7	CS7	3-6	21.5
PCFO148	CS11	3	27.0
PCFO9	CS13		
No Fimbriales			
CS6	CS6		14.5/16.0
2230	CS10		16.0
8786	CS15		16.3

Modificada de Nataro & Kaper, 1998; Gaastra & Svennerholm, 1996.

1.2.6.2 L O N G U S

Es un pilus, que fue aislado por primera vez en 1994 por Girón et al de la cepa E9034A (O8:H9) que produce toxinas LT y ST. Longus es un pilus de 7nm de diámetro que alcanza más de 20 µm de longitud y tiende a formar haces.

El gen estructural de Longus está codificado en un plásmido y el pilus que produce está formado por una subunidad estructural de 22 kDa, llamada longina o LngA. La secuencia de aminoácidos en su porción amino terminal tiene homología con las pilinas tipo IV de otras bacterias Gram-negativas, como el "Toxin Corregulated Pilus" (TCP) de *Vibrio cholerae*, el BFP de EPEC, el CFA/III de ETEC, los pili de *Pseudomonas aeruginosa*, *Eikenella corrodens* y otras (Girón et al, 1994; 1997) (Tabla 4).

El gen *lngA* que codifica para Longus se encontró en 19-38% de cepas de diverso origen geográfico. No se ha encontrado Longus en cepas de ETEC de animales o en cepas de EPEC (Girón et al, 1995). Estas características hacen de Longus un pilus con potencial para ser usado en estudios epidemiológicos, así como inmunógeno en la elaboración de una vacuna.

Tabla 4 Características de los pili tipo IV clase B.

Características	LONGUS	CFAs de ETEC	TCP	BFP
Morfológicas				
* Estructura	Filamentosa	Varilla o fibrilar	Varilla	Varilla
* Diámetro	7 nm	2-7 nm	7 nm	7 nm
* Longitud	>20 µm	1-2 µm	10-15 µm	15-20 µm
* Distribución	Polar	Peritricos	Polar	Polar
* Forma Haces	+	-♦	+	+
Expresión				
* Temperatura	37°C	37°C	30°C	37°C
* Tipo de Medio	CAB	Agar CFA	LB pH 6.5	TSAB
Expresión				
* Localización genómica †	P	P/C	C	P
* Subunidad (kDa)	22	14-22	18.5	19.5
* Homología amino terminal con pili tipo IV	+	-♦	+	+
Función				
* Colonización o factores de agrupamiento	+	+	+	+

♦ Excepto CFA/III.

† Plásmido (P) ó Cromosoma (C)

Tomado de: Girón JA, Levin MM and Kaper JB, 1994.

2. LOS ANTICUERPOS

2.1 LAS INMUNOGLOBULINAS Y SUS FUNCIONES BIOLÓGICAS

Los anticuerpos (Ac) son moléculas glicoprotéicas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), producidos por las células plasmáticas y junto con los receptores de las células T juegan un papel central dentro de la respuesta inmunológica. Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas idénticas pesadas (H) de 55 a 80 kDa unidas entre sí por enlaces disulfuro; y por dos cadenas ligeras (L) de 25 kDa, unidas a las pesadas también por enlaces disulfuro. Todas las cadenas se organizan en dominios constantes y variables denominados C_H y C_L, cada uno de ellos con \approx 110 aminoácidos. Las cadenas L poseen un dominio variable y uno constante, mientras que las pesadas cuentan con uno variable y varios constantes, esto dependiendo del isotipo. La región amino terminal varía enormemente entre diferentes moléculas, se le conoce como región variable y constituyen el sitio de unión al antígeno y se les designa V_H, V_L, región variable pesada y variable ligera respectivamente, y cada una de ella posee habitualmente tres regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR por sus siglas en inglés) que establecen interacción con el antígeno específico (Davies & Metzger, 1983; Goding, 1995; Gavilondo, 1995; Moreno, 1996).

Cuando los anticuerpos son digeridos con la enzima papaína, se obtienen tres fragmentos, dos de ellos idénticos. Los cuales contienen una cadena ligera y la mitad de una pesada; estos fragmentos corresponden a las regiones amino

terminal y se unen al antígeno en forma monovalente y por lo tanto constituyen los sitios funcionales del anticuerpo y se les denomina fragmentos Fab (fragment antigen binding). La tercera fracción obtenida mantiene la mitad de las cadenas pesadas y la región carboxilo terminal, no se une al antígeno y en el se encuentran las funciones biológicas de los anticuerpos, se le ha denominado región factor cristalizabile (Fc).

La digestión de los anticuerpos con la enzima pepsina resulta en sólo dos fragmentos, uno bivalente con la mitad amino terminal de las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras se le denomina F(ab')₂. (Goding, 1995; Moreno, 1996; Turner , 1997)

En la mayoría de los mamíferos superiores se conocen cinco clases o isotipos de Igs: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Las diferencias entre ellas están en el tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos, además de las diferencias entre clases existen diferencias intra clase. En general la IgG es la que muestra más heterogeneidad.

En el ser humano hay seis subclases IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, y en el ratón se encuentran cuatro diferentes subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Los anticuerpos difieren funcionalmente debido a sus cadenas H denominadas μ , γ 1, γ 2a, γ 2b, γ 3, α , δ , ϵ . Las cadenas ligeras sólo pueden ser de dos tipos kappa (κ) o lambda (λ). (Goding, 1996; Moreno, 1996; Turner, 1997).

IgA. Representa del 15-20% del total de Ig's. En el hombre 80% se presenta como un monómero, pero en la mayoría de los animales es un dímero que se mantiene unido por medio de una cadena J. Es la Ig mayoritaria en las mucosas, en donde se encuentra en su forma secretoria, forma dada por una proteína denominada componente secretor (Goding, 1996; Turner, 1997).

IgE. Se halla principalmente en la superficie de mastocitos, basófilos y eosinófilos y se sabe juega un papel primordial en la inmunidad activa frente a parásitos helmintos (Goding, 1996; Turner, 1997) .

IgD. Su concentración es de menos del 1% del total de Ig's, no se sabe cual es su función biológica exacta pero se piensa que juega un papel importante en la diferenciación linfocitaria desencadenada por los antígenos. Se encuentra en grandes cantidades en la membrana de las células B (Goding, 1996; Turner, 1997).

IgM. Es filogenéticamente la Ig más antigua, y ontogénicamente la primera. Su cadena μ tiene cuatro regiones constantes. En los mamíferos la IgM consiste en una molécula pentamérica, con un peso de 180,000 kDa cada monómero que la forma; sin embargo, el receptor de membrana IgM es un monómero, donde la cadena H en su porción carboxilo posee una extensión hidrofóbica. La IgM pentamérica posee una cadena J, que es un polipéptido de 15,000 kDa rico en carbohidratos y cisteínas, y está involucrada en la polimerización de la IgM.

La IgM constituye aproximadamente el 10% del total de Ig's del suero, y sus niveles varían de acuerdo a la estimulación antigénica, su vida media en el ratón es de 10 días, y es el primer Ac en aparecer en la respuesta inmune. Estos anticuerpos poseen una relativamente baja afinidad por el antígeno, lo cual se ve compensado por su gran avidéz dada por su multivalencia en su forma pentamérica, además es muy efectiva al mediar la lisis celular por el complemento (Goding, 1996; Turner, 1997).

IgG. Es la Ig más abundante en el suero, representa entre el 70-75% del total de Ig's. Tiene un peso de aproximadamente 160,000 kDa. Las cuatro subunidades existentes en el ratón y en el hombre son virtualmente del mismo peso. Sin embargo, se ha encontrado que la subclase IgG3 son un poco mayor, y esto se debe a que su cadena γ_3 es un poco más pesada.

La IgG es característica de una respuesta secundaria, y aunque es bivalente, su vida media en el suero de 3 semanas y su alta concentración, la hacen la más importante. Entre las funciones que se le conocen están: neutralización, activación la vía clásica del complemento, y, a través de receptores para su Fc, se fija una gran variedad de células, provocando algunas reacciones inmunes como la opsonización, la activación celular y el transporte intracelular.

Los Ac realizan la neutralización de los agentes infecciosos extracelulares o de sus productos solubles (toxinas), que requieren unirse a los receptores de la superficie de las células, para iniciar su proliferación local, penetrar la célula, o modificar su fisiología. El término neutralización se refiere a que el Ac impide la unión del antígeno con su receptor, ya que se une al primero modificándolo. En el interior del organismo este proceso se lleva a cabo por la IgG, la IgM o la IgA. En las mucosas la neutralización la realiza principalmente la IgA secretora, que es la forma secretoria de la IgA, esto es de fundamental importancia ya que así se evita la adherencia y penetración de muchos agentes infecciosos y sus productos.

La reacción antígeno-anticuerpo, cuando participan las clases IgG e IgM activa la vía clásica del complemento. Este sistema es un complejo sérico de proteínas que media las reacciones inflamatorias, iniciando una serie de fenómenos decisivos para el control y la eliminación de las infecciones. En el hombre todas las clases de IgG cruzan la placenta y le confieren un alto grado de inmunidad pasiva al recién nacido. Ver Tabla 5 y Figura 1.

Tabla 5 Resumen de las características de las inmunoglobulinas del ratón.

	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
Concentración en suero mg/mL	0.1-1.0	0.001-0.01	3-20	0.0001-0.001	1-3
Cadenas Ligeras	κ ó λ				
Cadenas Pesadas [Peso Mol. (Da)]	μ [80 000]	δ [65 000]	γ [55 000]	ϵ [80 000]	α [70 000]
Peso molecular	900 000	180 000	160 000	190 000	170 000-500 000
Vida Media en días	1	~1	2-4	~1	1
Hidratos de carbono	9-12 %	12-15%	2-3%	12%	7-11%
Citotoxicidad mediada por complemento	+	-	+	-	-
Subclases	1	1	4	1	1
Unión a Proteína A	-	-	+	-	-
Unión a Proteína G	-	-	+	-	-

Tomado de Goding, 1993.

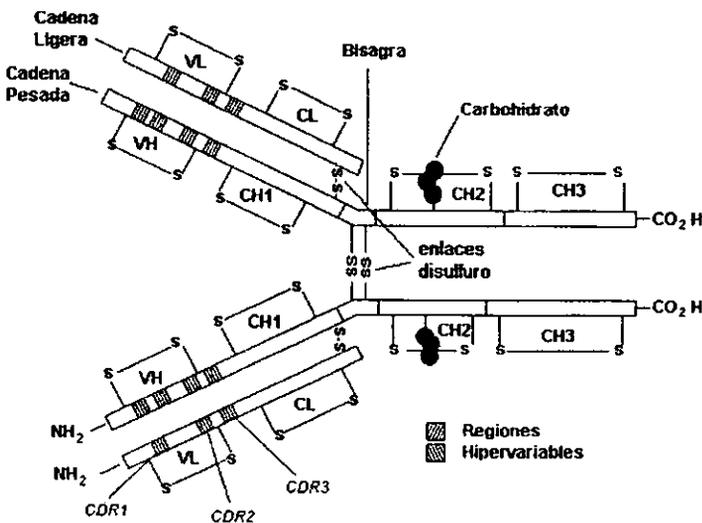


Figura 1. Representación de un anticuerpo como una IgG

Las Ig's muestran un complejo grado de interacciones con varios tipos de células, que cuentan con receptores para el Fc de las Ig. Si la célula involucrada es un fagocito, los anticuerpos se comportan como opsoninas específicas y el agente es endocitado. La consecuencia inmediata de la interacción agente-inmunoglobulina-receptor-célula es la fijación del agente a la superficie celular (Ravetch & Kinet, 1991). Hay varios tipos celulares que reconocen a las células blanco por que poseen receptores para el Fc y el complemento, a este fenómeno se le conoce como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y contribuye a eliminar células neoplásicas, las que están infectadas con virus y a helmintos parásitos (Sissons & Oldstone, 1980; Butterworth, 1984)

2.2 ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (AcMs), son inmunoglobulinas homogéneas secretadas por clones celulares derivados de un única célula, capaces de proliferar en cultivo y/o propagarse en animales genéticamente compatibles (Gavilondo, 1987). Son producidos por células híbridas producto de la fusión de células B de un ratón inmunizado con células de mieloma. Esas células híbridas o hibridomas heredan dos características principales de las células que les dieron origen; de la célula B heredan la capacidad de producir anticuerpos y de las célula de mieloma su característica de crecer indefinidamente en cultivo.

Para comprender mejor todas las ventajas que ofrecen los AcMs se menciona a continuación las características de los anticuerpos policlonales. Al inmunizar un ratón con un antígeno, se produce la activación de varias células B con diferentes receptores específicos para los epitopos del antígeno. La proliferación de estas células lleva a la generación de células plasmáticas secretoras de los respectivos anticuerpos, por lo que la sangre del animal posee una mezcla de inmunoglobulinas de distinta subclase, afinidad, y especificidad para el antígeno. El resultado es un suero con anticuerpos demasiado heterogéneos en términos del isotipo, afinidad y epítipo reconocido; además, difieren de un individuo a otro, e incluso en el mismo animal a distintos tiempos de inmunización.

Es de tomarse en cuenta que si el antígeno comparte epitopos con otros antígenos de diferente origen, las preparaciones policlonales resultantes pierden la capacidad de discriminar entre los dos antígenos. Esto es poco deseable en el caso de tipificación de células, microorganismos y moléculas complejas (Campbell, 1991; Gavilondo, 1995).

En el caso de los anticuerpos monoclonales las preparaciones tienen las siguientes propiedades: reconocen un solo epítipo, las reacciones cruzadas sólo se dan cuando el antígeno comparte epitopos con otros antígenos; se pueden preparar en grandes cantidades, es un producto homogéneo, y se pueden congelar por largos periodos. Las desventajas de los AcMs: sólo se pueden hacer

en laboratorios con cierto nivel tecnológico, el costo se eleva por el uso de técnicas de cultivo celular, el tiempo de producción es de mínimo seis meses, en algunos casos se llega a tener AcMs poco específicos (Gavilondo, 1987; Harlow & Lane, 1988; Campbell, 1991; Goding, 1995; Gavilondo, 1995).

En 1973, Cotton y Milstein, realizaron la primera fusión de dos líneas celulares de mieloma productoras de anticuerpos, en experimentos que buscaban conocer los mecanismos de la formación de los anticuerpos. La posibilidad de tener preparaciones puras de anticuerpos de especificidad conocida; se hizo realidad en 1975, cuando George Köhler y Cesar Milstein, establecieron las bases de la producción de anticuerpos monoclonales (AcMs) tal y como las conocemos actualmente, sus métodos han sido modificados poco a poco, al principio buscando líneas de mieloma que no produjeran ni secretaran ningún tipo de cadena de inmunoglobulina (Köhler, Howe & Milstein, 1976; Köhler & Milstein, 1976); y posteriormente en el agente fusionante que fue cambiado por polietilenglicol, ya que se usaba el virus Sendai para fusionar los dos tipos celulares (Pontecorvo, 1975, Margulies & Scharff, 1977), También se llegó a ensayar una técnica minielectro fusión, la producción *in vivo* de los AcMs en ratones y su optimización también ha avanzado (Mueller, Hawes & Jones, 1986; Gillette, 1987; Castillo & Veloso, 1990).

Desde principios de la década de los 80's, se tienen toda una serie de artículos y libros que detallan qué son y la manera de hacer AcMs, (Milstein, 1980; Fazekas de St. Groth & Scheidegger, 1980; Galfré & Milstein, 1981; Reading, 1982; Gavilondo, 1987; Harlow & Lane, 1988; Campbell, 1991; Coyle et al, 1992; Goding, 1995; Gavilondo, 1995; Medina 1997; entre otras).

Las líneas celulares de mielomas derivadas de ratón más utilizadas en la producción de los anticuerpos monoclonales se pueden ver en la siguiente tabla 6:

Tabla 6 Líneas celulares de mieloma más utilizadas en la producción de AcMs.

Línea Celular	Derivada de	Cadenas expresadas	Secreta
X63Ag8.653	P3X63Ag8	Ninguna	No
Sp2/0-Ag14	P3X63Ag8 X Balb/c	Ninguna	No
FO	Sp2/0-Ag14	Ninguna	No
NSI/1-Ag4-1	P3X63Ag8	Kappa	No
NSO/1	NSI/1-Ag4-1	Ninguna	No
FOX-NY	NSI/1-Ag4-1	Kappa	No

Los pasos generales a seguir en la producción de AcMs son los siguientes (Campbell, 1991; Harlow & Lane, 1988; Gavilondo, 1995; Goding, 1995): Ver figura 2 de la siguiente página.

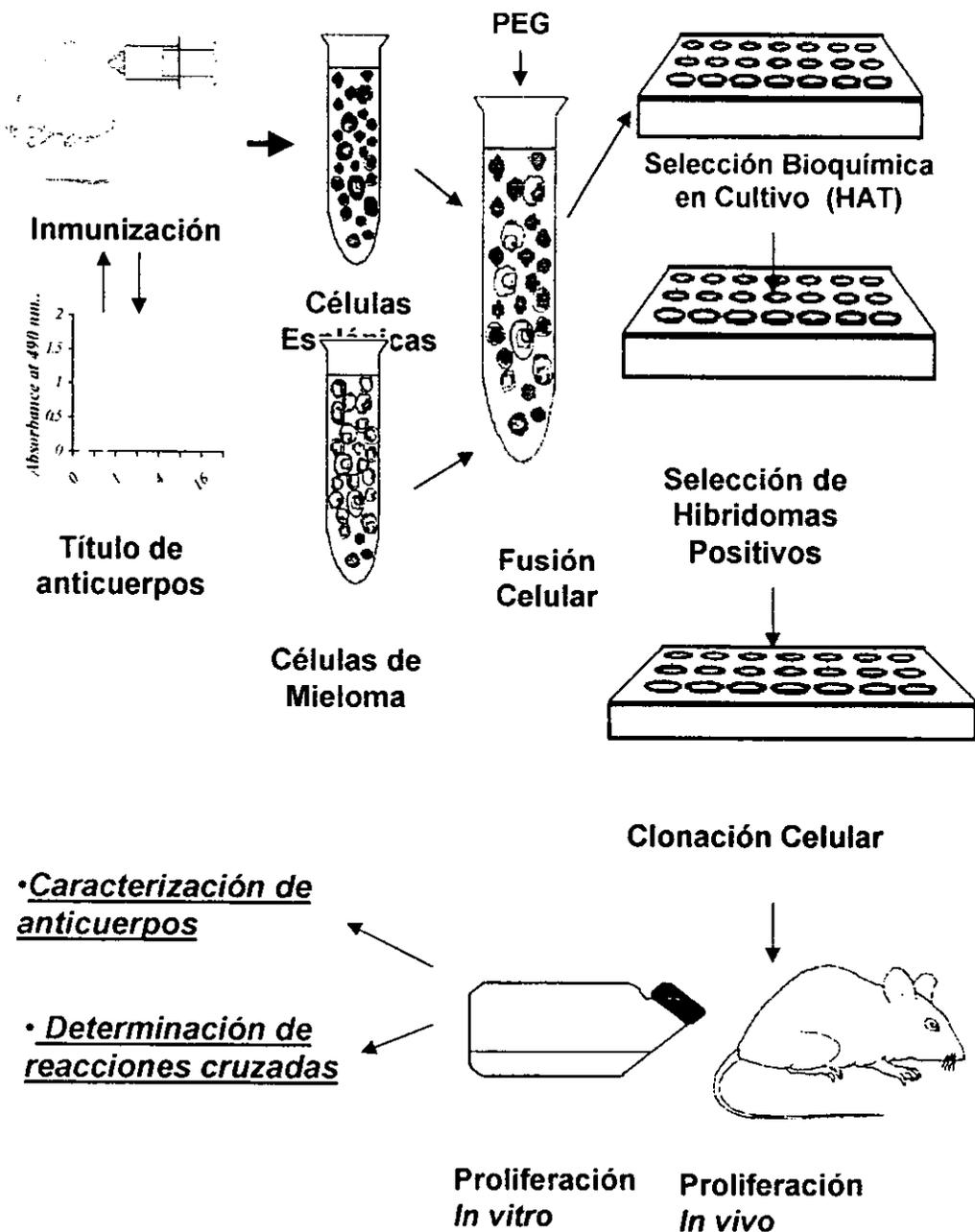


Figura 2 Principales pasos en la producción de AcMs.

Posteriormente a la fusión, no solo se obtienen híbridos B-M (célula B-Mieloma), sino además B-B, M-M y todas las posibles combinaciones: A diferencia de las combinaciones B-B, que mueren en cultivo a los pocos días; los híbridos M-M pueden vivir en cultivo indefinidamente; para eliminar estas combinaciones los mielomas utilizados tiene un marcador bioquímico, que es la deficiencia de la enzima hipoxantin-guanosin-fosforribosil-transferasa (HPGRT), que participa en la vía alterna de la síntesis de ácidos nucleicos. Al crecer la células en medio HAT (hipoxantina-aminopterin-timidina) después de la fusión, la aminopterin bloquea la vía normal de la síntesis de ácidos nucleicos, obligando a las células a utilizar la vía alterna. Todos los mielomas no fusionados y sus combinaciones $M(n)$ morirán, y sólo sobrevivirán y proliferarán aquellos híbridos en los que el linfocito haya aportado el gen para la HPGRT, o sea las combinaciones B-M (Goding J, 1995; Harlow E and Lane D, 1988). Ver fig 3.

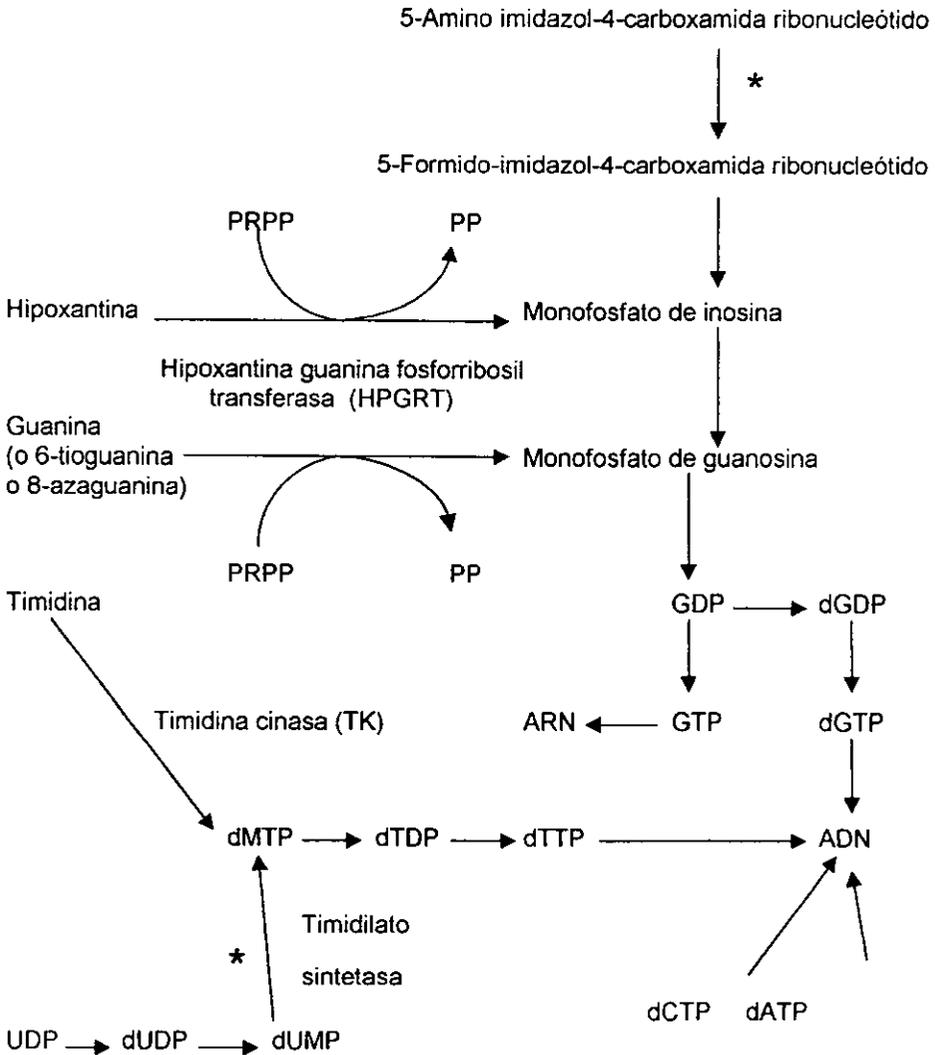


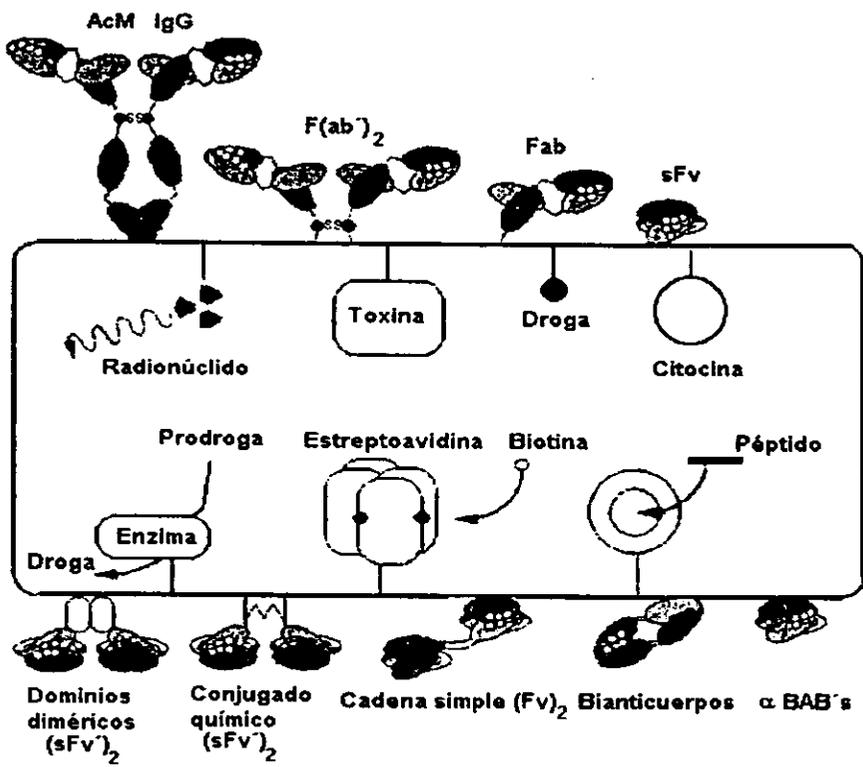
Figura 3 Diagrama que muestra las vías sintética y alternativa de la síntesis de ácidos nucleicos, el nivel al que afecta la aminopterina está marcado con un asterisco (*). En presencia del medio HAT (hipoxantina-amopterina-timidina) sólo van a sobrevivir aquellas células que posean las enzimas TK y HPGRT. Los mielomas mueren pues carecen de esta última.

2.2.1 APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Las aplicaciones de los AcMs, son tan variadas y tan útiles como lo permita la imaginación: tan sólo se necesita una molécula que tenga que ser reconocida, y que sea capaz de provocar una respuesta inmune de tipo humoral. Por lo tanto sus aplicaciones se extienden a virtualmente todas las áreas de la biología y la medicina, así como la industria biotecnológica. Por ejemplo:

- a) En el diagnóstico de virus, bacterias y parásitos patógenos, han venido a simplificar enormemente su búsqueda e identificación en muestras de origen clínico (Campbell, 1991; GF Nowinski et al, 1983).
- b) En la identificación de antígenos y marcadores de superficie celular de linfocitos y tumores, auxiliando las técnicas de imagen de tumores y su tratamiento (Campbell, 1991; Blakey et al, 1995; Bischof & Delaloye, 1995)
- c) En la terapéutica de enfermedades virales, bacterianas, parasitarias, etc. por medio de la inmunización pasiva (Campbell, 1991; Casadevall, 1996; Harris, 1995; Östberg, 1995; Boleti, George & Epenetos, 1995; Cosimi, 1995; Alegre, Lenschow & Bluestone, 1995).
- d) Como herramientas de purificación de productos y moléculas en las áreas medica y biológica (Campbell, 1991).
- e) En el diagnóstico forense, en la detección de aditivos no declarados en bebidas, en la búsqueda de cantidades traza de drogas ilícitas en medicina (Campbell, 1991).

f) Aprovechando las capacidades catalíticas de los AcMs, se les puede generar para que mimeticen el estado de transición entre un sustrato y su producto, provocando que se acelere la reacción enzimática (Campbell, 1991). Ver figura 4



(tomado de Geroge y col. 1994)

Figura 4 Fragmentos de inmunoglobulinas de interés en el empleo en la clínica y el diagnóstico

3. JUSTIFICACION

Longus es una estructura de superficie aparentemente con alta prevalencia en cepas de ETEC de diverso origen geográfico. En México se desconoce la frecuencia de cepas de ETEC productoras de longus.

La producción de anticuerpos monoclonales contra longus, permitiría el desarrollo de métodos de diagnóstico, que podrían ser utilizados como herramientas en estudios epidemiológicos y en la identificación de dominios antigénicos protectores.

4. OBJETIVOS

- Obtener anticuerpos monoclonales contra el pilus longus de *Escherichia coli* enterotoxigénica
- Caracterizar inmunoquímicamente dichos anticuerpos

5. MATERIAL Y METODOS

La producción de anticuerpos monoclonales abarca toda una serie de técnicas que consisten desde inmunizar a los ratones con el antígeno de interés, hasta la obtención de hibridomas, así como la detección del anticuerpo monoclonal deseado, su purificación y su caracterización (Figura 5).

5.1 Inmunización y Sangrado.

Se inmunizaron ratones hembras Balb/c de seis semanas de edad, semanalmente por vía intraperitoneal con pilus longus purificado proporcionado por el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se aplicaron 6 dosis de 25 µg de longus en 200 µL de PBS + 200 µL de adyuvante completo de Freund (ACF) para la primera inmunización e incompleto (AIF) para las siguientes. Además, se les dio un reto de 5 µg de longus en 50 µL de PBS por vía intravenosa. Los sangrados para evaluar la respuesta inmune de los ratones se hizo por vía retroocular. (Tabla 7).

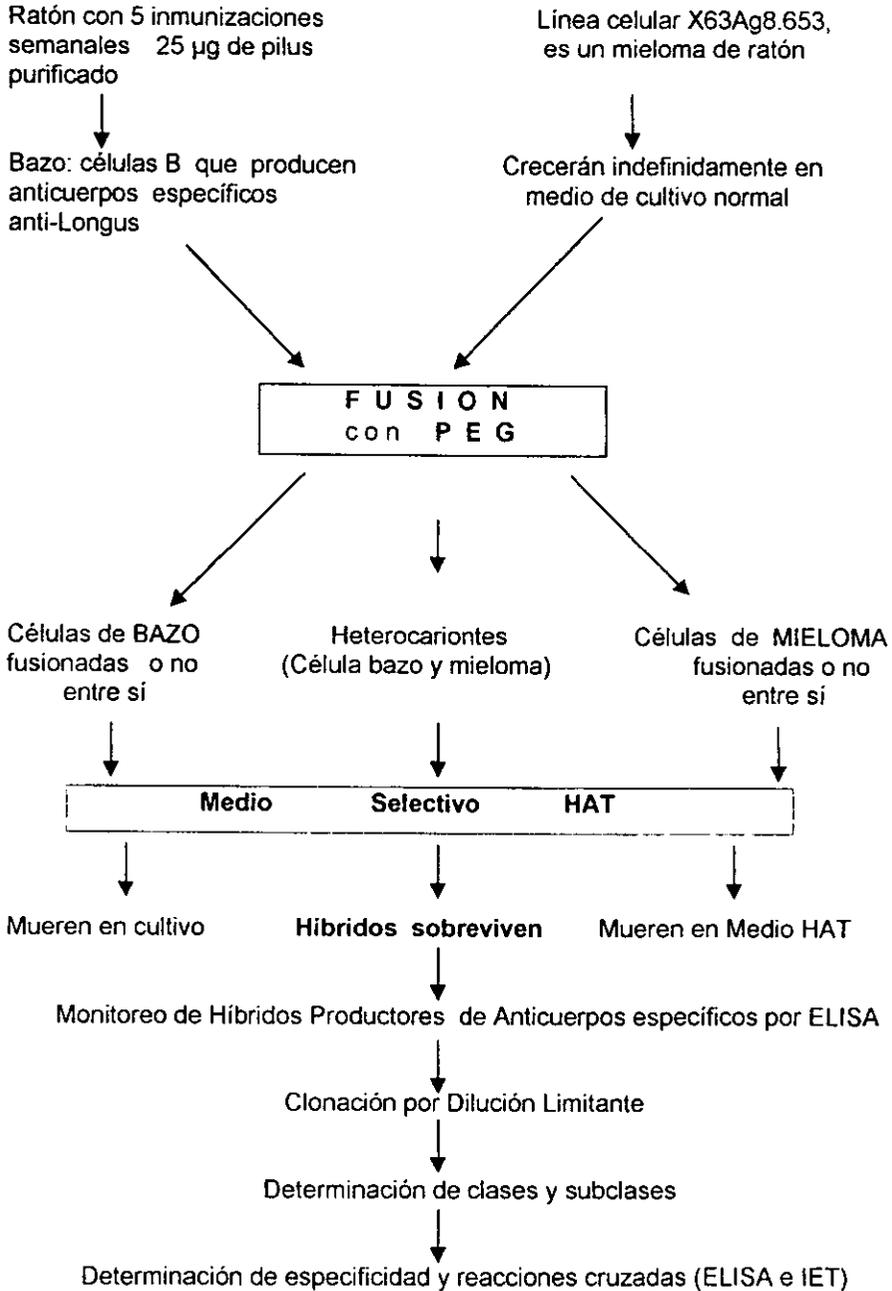


Figura 5. Diseño experimental.

Tabla 7 Esquema de inmunización de los ratones.

DIA	DOSIS DEL ANTIGENO	OBSERVACIONES
1	25 µg en 200 mL PBS + ACF (v/v) INTRAPERITONEAL	Sangrado preinmune 200µL
7	25 µg en 200 mL PBS + ACF (v/v) INTRAPERITONEAL	
14	25 µg en 200 mL PBS + ACF (v/v) INTRAPERITONEAL	Segundo sangrado 200µL
21	25 µg en 200 mL PBS + ACF (v/v) INTRAPERITONEAL	
28	25 µg en 200 mL PBS + ACF (v/v) INTRAPERITONEAL	
31	05 µg en 50 µL de PBS estéril INTRAVENOSA	Reto final
34	F U S I O N	Ultimo sangrado

5.2 Dtreminación del título de anticuerpos por ELISA.

El título de anticuerpos de los ratones inmunizados se determinó por ELISA (Medina, 1997):

1. En placas de 96 pozos de poliestireno, se colocaron 100 µL de solución del antígeno a 2.5 µg/ml en amortiguador de carbonatos pH 9.6, y se incubaron por dos horas a 37 °C o a 4 °C por toda la noche.
2. Posteriormente se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%.

3. Las placas fueron bloqueadas por 30 min con 200 μ L de leche descremada al 5% en PBS.
4. Se procedió como en el paso 2 y se agregaron 100 μ L de diluciones dobles seriadas del suero del ratón a titular a partir de 1: 1,000 y se incubaron 2 h a 37°C o a 4°C toda la noche.
5. Se repitió el paso 2 y se colocó 100 μ L del conjugado anti-IgG e IgM de ratón acoplado a peroxidasa, se incubaron 2 h a 37°C o a 4°C toda la noche.
6. El paso 2 se repitió y se procedió a agregar el sustrato (ortofenilendiamina 4 μ g en 5 mL de ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M y 4 μ L de peróxido de hidrógeno).
7. La reacción fue detenida al agregar 100 μ L de ácido sulfúrico al 2N.

La absorbancia se leyó en un lector de ELISA (Marca Bio-Rad Modelo 3550) a 490 nm.

Nota: Como testigo positivo en los ELISA se utilizó el suero del ratón inmunizado con mejor título. En todos los ELISA siempre se colocó un blanco, que es PBS-Tween 20, en lugar de muestra. Los sueros siempre se ensayaron con su correspondiente suero preinmune. Ver figura 6.

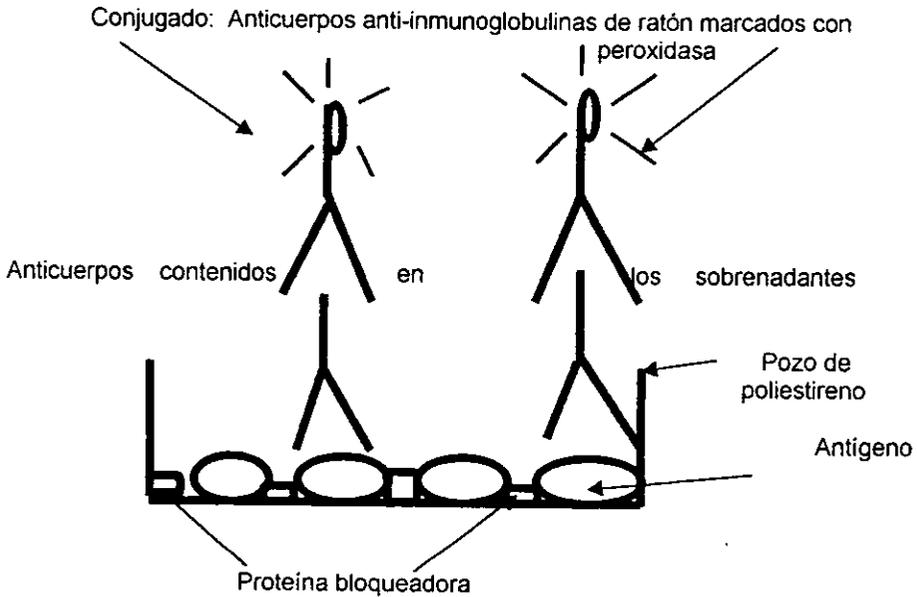


Figura 6 Esquemización del ELISA.

5.3 Cultivo celular.

El manejo de los cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar, manteniéndolos a 37° C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO₂. Las células del mieloma X63Ag8.653 se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco), enriquecido con suero de bovino fetal (SBF) (Gibco) al 10 %, 100 U/mL de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomycin (Gibco) y L-Glutamina 200mM (Gibco). Los cultivos se revisaron diariamente al microscopio invertido, vigilando la morfología celular, así como las posibles fuentes de contaminación

bacteriana y / o fúngica. Se realizó el cambio de medio cuando éste viraba de anaranjado a amarillo, lo que indicaba un cambio en el pH por acidificación.

Cuando los cultivos se encontraron confluentes, esto es cuando la proliferación celular fue máxima, las células se resebraron en cajas nuevas o se congelaron a -196°C en nitrógeno líquido.

Células. Se determinó la presencia de anticuerpos anti-longus en los ratones inmunizados por ELISA. El ratón de mejor título (mayor de 1:4,000); se sacrificó por dislocación cervical y se le extrajo el bazo de manera aséptica. Se colocó el bazo en una caja de petri estéril, con aproximadamente 5 mL de medio RPMI y un cuadro de 5 x 5 cm de tela de organza estéril (o tamiz que sirvió para disgregar el bazo). Los siguientes pasos se realizaron en la campana de flujo laminar. El bazo se disgregó sobre la tela de organza, de forma suave con el émbolo de una jeringa de 5 mL y por último se resuspendió con una pipeta Pasteur colocando la suspensión de células en un tubo de 15 mL y se lavaron dos veces con medio de RPMI sin SBF a 1200 rpm durante 10 min y por último se resuspendió la pastilla en 5 mL de RPMI. Se emplearon 4 botellas de 75 cm² con células del mieloma X63Ag8.653 en cultivo (un día anterior se realizó la resiembra para tener las células en fase logarítmica) las cuáles se despegaron mediante agitación suave con una pipeta de 5 mL y se lavaron dos veces con medio RPMI sin complementar a 1200 rpm durante 10 min, colocándolas en 5 mL de medio en un tubo cónico de 50 mL.

Nota: Las células de mieloma se lavaron al mismo tiempo que las células de bazo.

5.4 Fusión.

Se realizaron tres fusiones, pero en todas los siguientes pasos se hicieron de la misma manera. En un tubo de 50 mL, se mezclaron los linfocitos y las células de mieloma a una proporción de 10:1 ó 5:1, y se completó con medio RPMI-1640 sin suero (medio de lavado) hasta tener 50 mL; y se centrifugó durante 10 min a 1,000 r.p.m. El sobrenadante se desechó y el botón celular se disgregó suavemente. Para realizar la fusión se agregó gota a gota durante un minuto 1 mL de PEG al 42% (Sigma Hybri-max) precalentado a 37°C, agitando suavemente. Se adicionaron 5 mL de medio de lavado durante 3 min, manteniendo la agitación; y luego 15 mL de medio de lavado en 1 min Se centrifugó a 1,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en medio RPMI-1640 con SBF al 15%, adicionado con HAT (Sigma Hybri-max) a un volumen que nos permitiera colocar 5×10^5 células/mL. Se sembraron placas de cultivo de 96 pozos con 200µL de la suspensión celular, se sembraron 13 placas.

La eficiencia de fusión se tomó como el número de pozos con híbridos entre el número total de pozos sembrados y multiplicado por cien.

5.5 Selección y mantenimiento de híbridos en cultivo.

Las placas de cultivo con las células de la fusión se revisaron diariamente para identificar los pozos que contenían híbridos viables por medio de un microscopio invertido. El medio se cambió de acuerdo a las necesidades del cultivo. Cuando las células viraron el color del medio de cultivo se les cambió por medio nuevo, durante los primeros diez días se mantuvieron con medio HAT, posteriormente por siete días con medio HT (Sigma Hybri-max) y después con medio sin aditivos.

Después de aproximadamente dos semanas de realizada la fusión, se seleccionaron los hibridomas que sobrevivieron y crecieron lo suficiente para poder detectar aquellos de interés por su capacidad de sintetizar el anticuerpo específico. Se obtuvieron los sobrenadantes y por medio de ELISA se determinó la presencia de anticuerpos. El procedimiento es el mismo que el descrito para evaluar el suero del ratón, la diferencia es que se le agregan los sobrenadantes del cultivo, en lugar de la diluciones del suero. Se tomaron como positivos aquellos sobrenadantes de cultivo que dieron una lectura de absorbancia a 490 nm similar a la del suero del ratón inmunizado que se utilizó para la fusión, dicho suero se usó como testigo positivo; y como negativo se utilizó sobrenadante de cultivo del mieloma X63Ag8.653.

5.6 Clonación de hibridomas.

Se utilizó la técnica conocida como dilución limitante, para clonar los híbridos positivos al pílus. En una placa de cultivo de 96 pozos se llenó la primera hilera con 100µL de medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con SBF al 10%. Se tomaron 100µL de la suspensión celular y se hicieron diluciones dobles seriadas en la primera hilera de la placa; posteriormente se contaron las células en los pozos y se escogió el pozo que tuviera aproximadamente 30 células, éstas se resuspendieron en 8.5 mL del mismo medio de cultivo, y se sembraron 100µL de esa suspensión en cada uno de los pozos restantes de la placa, una vez sembradas todas las células a todos los pozos se les agregaron 100 µL de medio de cultivo para dejarlos con 200µL.

Los cultivos se revisaron al microscopio invertido y se localizaron aquellos que tuvieran sólo una célula. Se dejaron crecer en la incubadora de CO₂.

5.7 Caracterización de los AcMs.

5.8

Se determinó la clases y las subclases de AcMs por medio de ELISA, utilizando anticuerpos de conejo anti-Ig's de ratón, y utilizando un anti-Ig's de conejo conjugado a peroxidasa para revelar.

La determinación de la especificidad y las reacciones cruzadas de los AcMs, se realizaron por ELISA, utilizando como antígeno cepas de *E. coli* con o sin longus, además de *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*. A partir de cultivos

bacterianos se hacen suspensiones celulares con D.O600=1.0 en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6, y con ellas se sensibilizaron microplacas para ELISA, se siguió el procedimiento del ELISA como se describió anteriormente.

Como parte, de los ensayos de especificidad y reacciones cruzadas de los AcMs, también se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia (IET) de la siguiente manera:

5.7.1 Inmunoelectrotransferencia.

Los diferentes antígenos (Longus purificado o extractos bacterianos), fueron sometidos a electroforésis en un equipo Bio-Rad. Se prepararon geles de poliacrilamida al 16%, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970) y posteriormente se procedió a realizar la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en un equipo Bio-Rad, por medio del método de Towbin (1979).

Al término de la transferencia la membrana se colocó en un recipiente con rojo de Ponceau para detectar las proteínas transferidas y se bloqueó con PBS-Tween-20 leche al 5% por 2 h a temperatura ambiente en agitación continua. Se lavó tres veces con PBS-Tween-20 y se cortó la membrana en tiras de 3-5 mm. Para probar los sobrenadantes de los diferentes AcMs se procedió así:

- 1 Las tiras se incubaron con los sobrenadantes de los hibridomas a 4°C por 12 h.
- 2 Posteriormente a las tiras se les hicieron tres lavados con PBS-Tween-20 y se les agregó anti-IgM o anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido en PBS-Tween-20, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con agitación continua.
- 3 Se hicieron tres lavados como se indicó arriba, después se le agregó el substrato para peroxidasa, (diaminobencidina al 0.05%, H₂O₂ al 3 X 10⁻⁶ %), se esperó a que aparecieran las bandas, se enjuagó y se dejó secar.

Las cepas de ETEC productoras o no de longus, las de otros tipos de *E. coli*, así como *P. aeruginosa* y *P. mirabilis* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Laboratorio de Microbiología Molecular del INDRE (Tablas 8a y 8b).

Todas las cepas ETEC LngA⁺ fueron crecidas en agar PPLO (Agar Pleuropneumonia-like organisms, Difco), y las CFA/III+ en agar CFA (Evans et al, 1975). La cepa de *P. aeruginosa* se sembró en medio McConkey (Difco), y *P. mirabilis* se creció en medio Luria Broth (Difco).

Tabla 8a Cepas ETEC utilizadas en los experimentos.

Cepas ETEC	CFA	LngA
E9034A	CS3	+
B2C	CFA/II	+
M447 C4		+
M452		+
M633	CFA/I	+
E9034P	--	-
DH5 α	--	-
M442	CFA/I	-
Z108-2	CFA/III	-
Z284-1	CFA/III	-
Z26 5/6	CFA/III	-
Z14-2	CFA/III	-
MP 215-1	CFA/III	-
MP179-2	CFA/III	-
31-10	CFA/III, CS6	-
H 10407	CFA/I, CS2	-

Tabla 8b. Cepas utilizadas en los ensayos de reacciones cruzadas con los AcMs anti-Longus.

Cepas EAEC	Cepas EPEC	Cepas EHEC
W286-1-4	B171 (O111:NM)	933 (O157:H7)
WC172-1-4		Otras cepas
W452-1-1	E2348/69 (O127:H6)	<i>P. mirabilis</i>
O35128		<i>P. aeruginosa</i>

6. RESULTADOS

6.1 Inmunización.

Se evaluó la respuesta inmune desarrollada por los ratones Balb/c inmunizados con LngA por ELISA y como se ve en la figura el ratón que fue utilizado en la fusión tuvo un título de 1:64,000. (Figura 7)

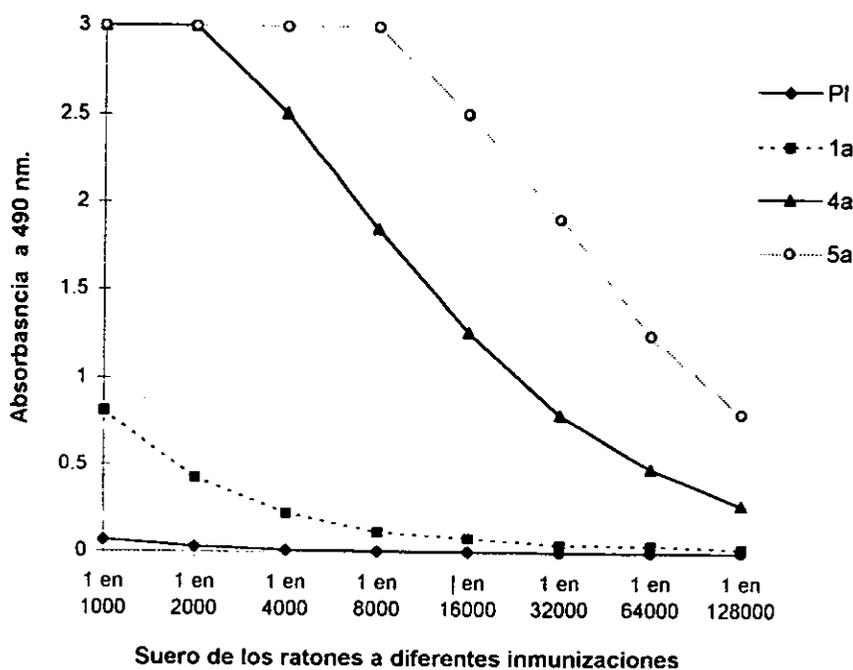


Figura 7 Respuesta inmune humoral del ratón inmunizado después de cinco inmunizaciones, y que utilizado para la obtención de AcMs contra Longus. (Suero preinmune PI; 1^a, 4^a, y 5^a son los sueros del ratón obtenidos una semana después de las inmunizaciones.

6.2 Fusión Celular.

Después de la fusión se sembraron 13 placas de cultivo de 96 pozos, porque la cantidad de células utilizadas fue de aproximadamente 4.4×10^8 y se tuvo una eficiencia de fusión de 44.95 % (Tabla 9).

Se obtuvieron 6 híbridos productores de anticuerpos anti-LngA.

Tabla 9 Resumen de resultados de la fusión

	Resultados
Título de Ac's anti-longus al fusionar	1 : 64,000
Células. Bazo	396×10^6
Células. Ag. 8	40×10^6
Relación Bazo:Mieloma	5 : 1
Número de placas sembradas	13
Eficiencia de Fusión	44.95 %
Número de Híbridos Positivos a Longus	6
Número de Clonas Obtenidas	30
Observaciones	Se prosiguió la caracterización

6.3 Clonación.

Se clonaron los 6 híbridomas que se obtuvieron de la segunda fusión, el híbrido 8.40 dió origen a cinco clonas, el 8.48 a cuatro, el 12.27 a cinco, el 12.29 a uno, el 13.6 a 4 y por último el híbrido 13.66 a once clonas, dando un total de 30 clonas. (Tabla 10)

Tabla 10 Híbridos originales y los grupos de clonas obtenidos.

Híbridos	Clonas obtenidas	Híbridos	Clonas obtenidas
8.40	8.40.28.11.30	8.48	8.48.11.89.13.33
	8.40.28.74.38		8.48.11.89.39.32
	8.40.28.74.93		8.48.11.89.54.14
	8.40.28.31.39		8.48.11.89.54.15
	8.40.28.31.50		
12.27	12.27.24.32.69	13.6	13.6.14.14
	12.27.24.32.77		13.6.23
	12.27.24.35		13.6.39.93
	12.27.24.47		13.6.45.15
	12.27.24.78		13.6.45.29
12.29	12.29.75		13.6.45.67
13.66	13.66.32.27		13.6.64
	13.66.58.95		13.6.67
	13.66.66		13.6.90.53
	13.66.92.15		13.6.81
		13.6.81.26	

6.4 Caracterización inmunoquímica

6.4.1 Determinación del isotipo.

A todas las clonas se les determinó la clase y subclase de anticuerpo a la que pertenecen, mediante ELISA (Tabla 11). Todos los anticuerpos corresponden a la clase IgG. Las clonas derivadas del híbrido 8.40 producen anticuerpos del isotipo IgG3. Todas las clonas que se derivaron de los híbridos 8.48, 12.27, 12.29, 13.6 y 13.66 producen anticuerpos del isotipo IgG1.

Tabla 11 Isotipos de los anticuerpos producidos por las diferentes clonas.

Clona	Subclase	Clona	Subclase
8.40.28.11.30	IgG3	13.6.14.14	IgG1
8.40.28.31.39		13.6.23	
8.40.28.31.50		13.6.39.93	
8.40.28.74.38		13.6.45.15	
8.40.28.74.93		13.6.45.29	
8.48.11.89.13.33	IgG1	13.6.45.67	
8.48.11.89.39.32		13.6.64	
8.48.11.89.54.14		13.6.67	
8.48.11.89.54.15		13.6.90.53	
12.27.24.32.69	IgG1	13.6.81	
12.27.24.32.77		13.6.81.26	
12.27.24.35		13.66.32.27	
12.27.24.47		13.66.58.95	
12.27.24.78		13.66.66	
12.29.75	IgG1	13.66.92.15	

6.4.2 Reactividad de los AcMs a LngA

Se confirmó la reactividad al pilus purificado por los AcMs de cada una de las clonas mediante un ensayo de IET y se demostró que todas reconocían una banda 22 kDa que corresponde a la pilina de Longus (Figura 8).

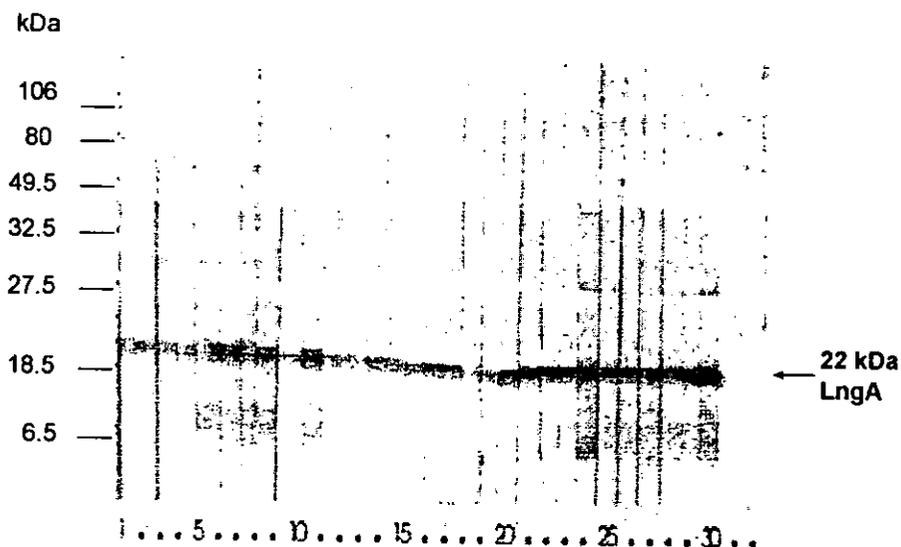


Figura 8 Detección de Longus purificado usando cada una de las clonas de los AcMs. Cada carril corresponde a un número de la clona productora de anticuerpos (En el mismo orden de la tabla 10). Se utilizó suero hiperinmune de ratón inmunizado con longus 1 : 1,000 (carril 24), como testigo positivo. Los carriles 31 y 32 corresponden a PBS utilizado como testigo negativo, de la reactividad del conjugado.

Para confirmar que las cepas de referencia utilizadas producen Longus, se hicieron diferentes IET's. (Figuras 9 y 10)

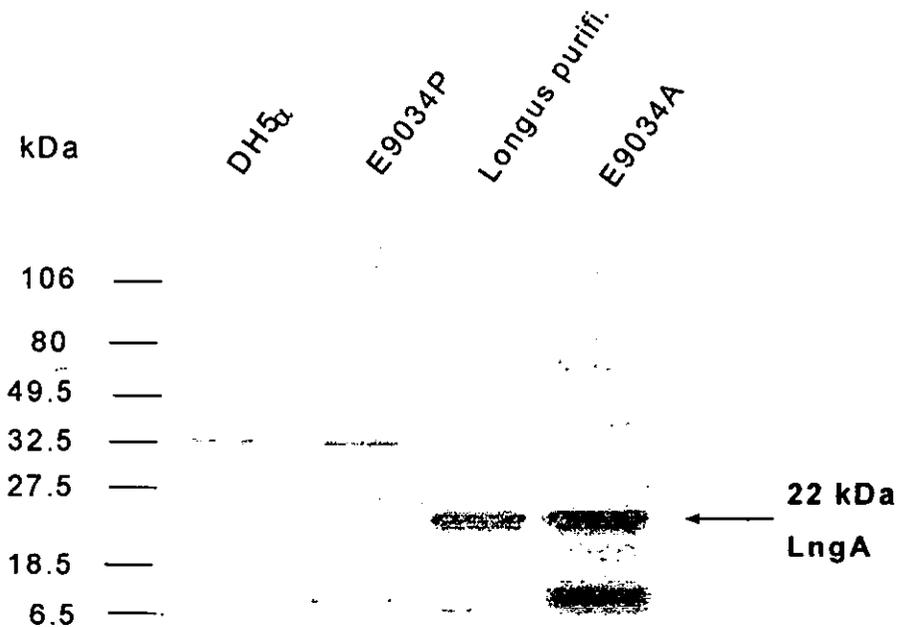


Figura 9 Producción de LngA por la cepa E9034A. Como testigo positivo está la proteína purificada, las cepas E9034P y DH5 α . El ensayo se realizó con el suero hiperinmune de ratón diluido 1:1000.

Solamente en la cepa de E9034A y en la muestra del pilus purificado se detectó la pilina de 22 kDa. En todas las muestras colocadas se detectan otras bandas de diferente peso molecular, esto probablemente se deba a que fue utilizado un suero policlonal de ratón y por lo tanto este reconociendo otros epitopos comunes a ETEC, aparte de los de la pilina de Longus.

Se hicieron extractos de cuatro cepas LngA⁺ (B2C, M447 C4, M452 y M633), en IET se demostró que producen el pilus, ya que todas las cepas LngA⁺, reaccionaron con el suero hiperinmune de ratón. (Figura 10).

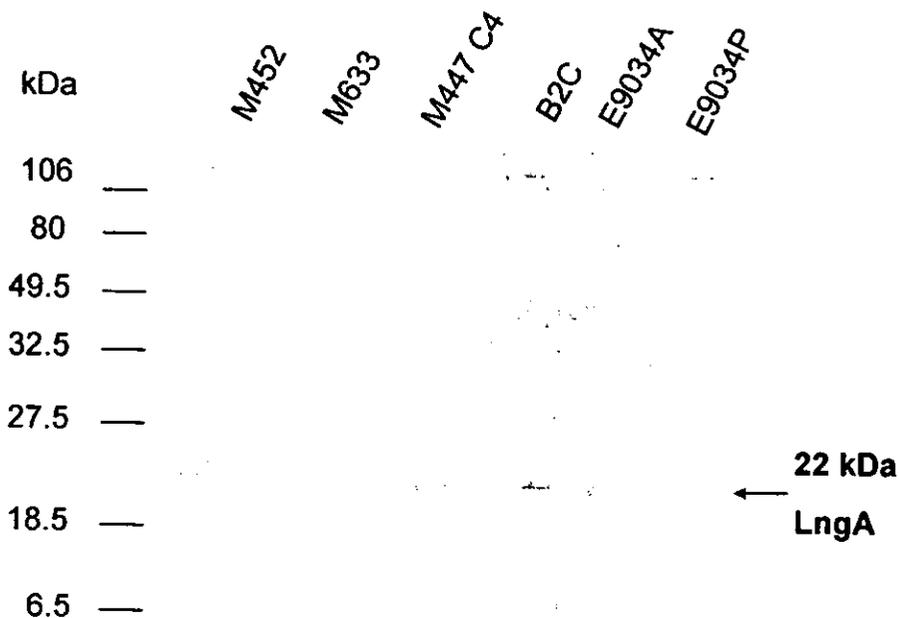


Figura 10 Producción de LngA por diferentes cepas de ETEC, en la IET se incluyen como testigo positivo de la producción del pilus a la cepa E9034A y como testigo negativo a la cepa E9034P. El ensayo se realizó con el suero hiperinmune del ratón diluido 1:1,000.

Las diferentes clonas reactivas con Longus purificado, también reconocieron a la pilina producida por la cepa de referencia E9034A. Como testigo negativo se usó a la cepa E9034P (LngA⁻). Como se puede observar en la figura 11, todas las clonas reconocieron a LngA en la cepa E9034A y no en la cepa E9034P que no tiene el gen *lngA* (Figura 12). Se utilizó nuevamente el suero del ratón 1 como testigo positivo (carril 31) anti-LngA y PBS como testigo negativo (carril 32). (Figuras 11 y 12)

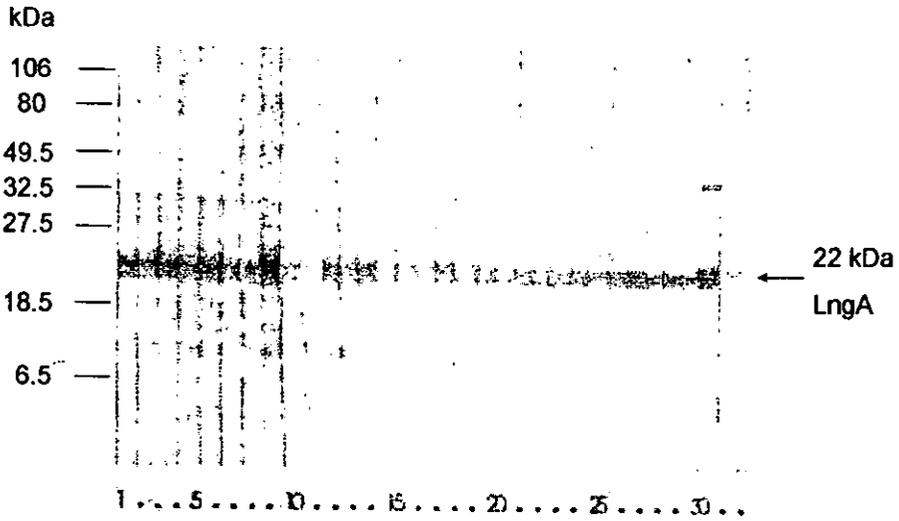


Figura 11 Reconocimiento de Longus por los AcMs anti-LngA de las diferentes clonas (indicadas por los números en la parte inferior de los carriles) en la cepa de referencia E9034A, como testigo positivo esta el suero de ratón inmunizado en el carril 31, el testigo negativo es PBS (carril 32).

La cepa E9034P no tiene el plásmido que alberga los genes para la producción de Longus, por lo tanto no produce Longus. La débil reactividad de aproximadamente 2 kDa por los AcMs debe ser inespecífica (Figura 10).

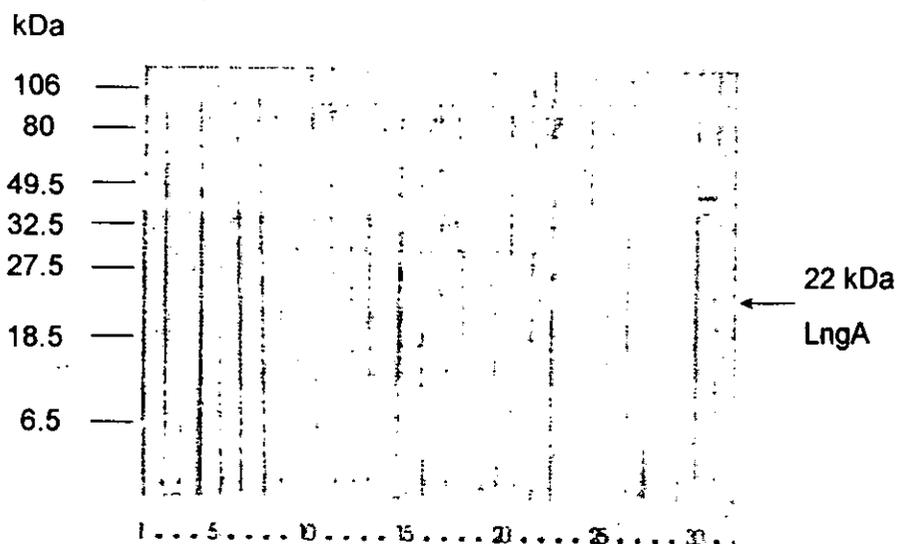


Figura 12 Reactividad de las diferentes clonas de los AcMs a la cepa E9034P (LngA). Como testigos están el suero hiperinmune del ratón (carril 31), y PBS (carril 32).

A partir del experimento anterior, para las siguientes IET's se seleccionaron uno o dos anticuerpos monoclonales de cada grupo. En la figura 13 se muestra el reconocimiento por cada uno de los AcMs de cada grupo hacia Longus producido por las cepas B2C (a) y M447 C4 (b). La mayoría de los AcMs reconoce LngA de la cepa M447 C4 mientras que la reactividad e intensidad a Longus de B2C es menor.

Esto sugiere que existen diferencias bioquímicas y por lo tanto antigénicas entre LngA de las diferentes cepas de ETEC.

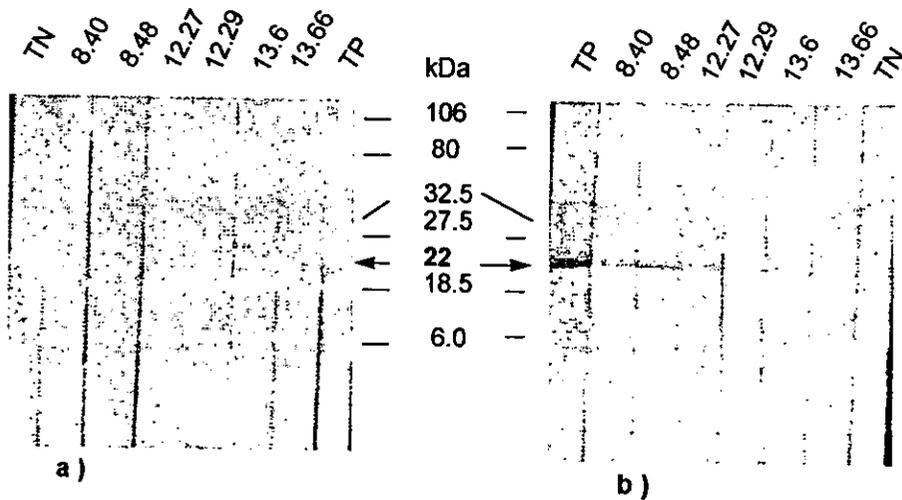


Figura 13 Reconocimiento de LngA por los AcMs en las cepas ETEC B2C (a) y M447 C4 (b). Se utilizó PBS como testigo negativo (TN), y suero hiperinmune del ratón 1 diluído 1:1000 como testigo positivo (TP).

Cuando se usaron las cepas M452 y M633, de los AcMs seleccionados sólo el AcM 8.40 reconoció Longus. Esto apoya la hipótesis de las diferencias antigénicas de LngA producido por diferentes cepas de ETEC. (Figura 14)

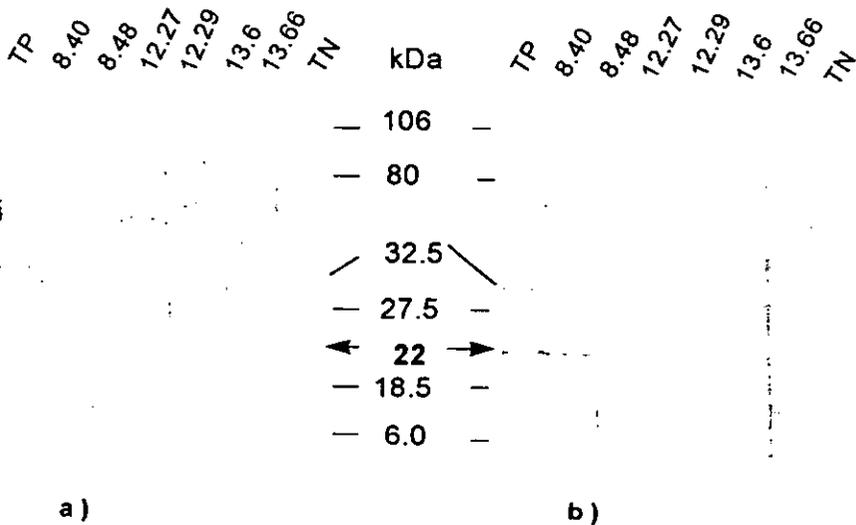


Figura 14 Reconocimiento de LngA por los AcMs en las cepas de ETEC M452 (a) y M633 (b). Se utilizó PBS como testigo negativo (TN), y suero hiperinmune del ratón 1 diluido 1:1000 como testigo positivo (TP).

La especificidad de los AcMs se confirmó por ELISA. Se cultivaron las cepas E9034A, B2C, M447 C4 (todas LngA+) en condiciones que producen Longus y se hicieron reaccionar por ELISA con los AcMs . Todos los AcMs reconocieron Longus en las tres cepas y no en E9034P (LngA-). Los resultados de reconocimiento de longus por los AcMs en ELISA, se muestran en la figura 15. La gráfica representa las absorbancias obtenidas por cada uno de los AcMs de las diferentes clonas al reconocer LngA en las cepas E9034A, B2C y M447 C4, además se incluyó la cepa E9034P (LngA⁻). Como se puede observar todos los AcMs reconocen a las cepas LngA⁺, con diferente intensidad; no así a la cepa E9034P.

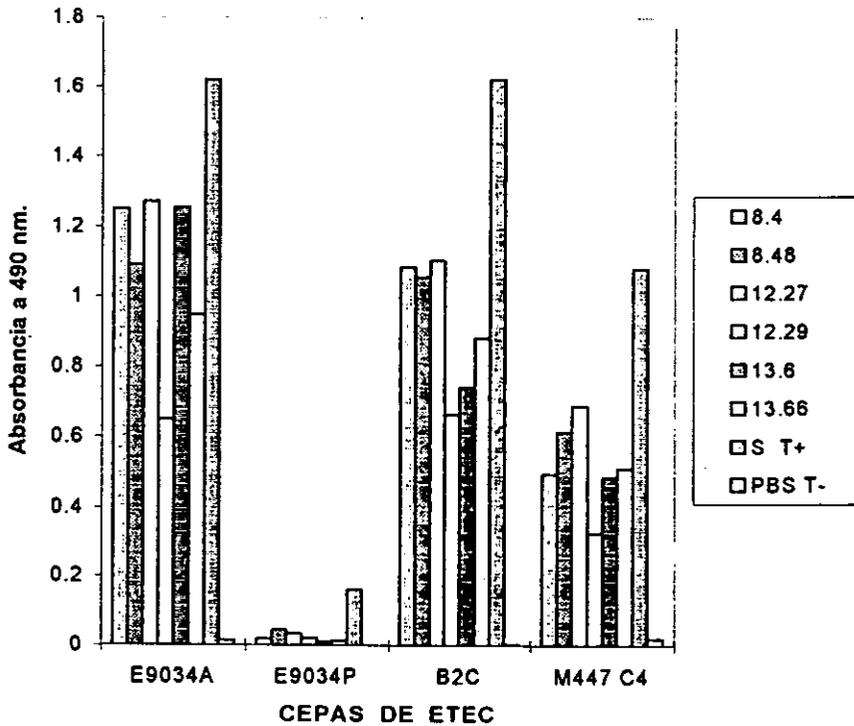


Figura 15 Reconocimiento de longus en tres cepas ETEC LngA⁺, por los AcMs de todas las clonas. La barra más alta en cada grupo de barras corresponde al suero del ratón inmunizado. Se incluyó la cepa E9034P como testigo negativo de la presencia del pili.

Como se puede observar en la figura 16, ninguno de los AcMs reconoció al pilus longus en la cepa M452, y sólo el AcM 8.40 reconoció LngA en la cepa M633. Ninguno de los demás anticuerpos lo reconocieron.

Esto indica que Longus de las cepas M633 y M452 son aún más distintos a los de las cepas probadas anteriormente.

Esto indica que Longus de las cepas M633 y M452 son aún más distintos a los de las cepas probadas anteriormente.

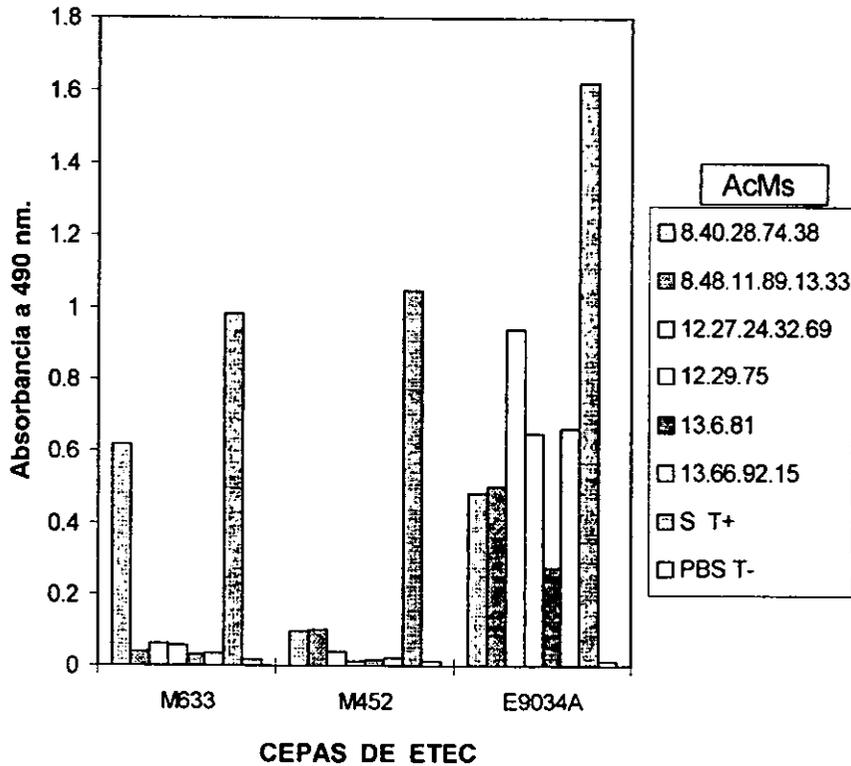


Figura 16 Reconocimiento de LngA por los AcMs en tres cepas ETEC productoras de Longus. Las barras más altas corresponden al suero policlonal anti-LngA de ratón.

6.4.3 Determinación de Reacciones cruzadas

Se determinaron las reacciones cruzadas de los AcMs, por IET y ELISA utilizando cepas de ETEC productoras de CFA/III, que es un pili tipo IV como Longus. También se analizaron cepas de *E. coli* de otros grupos patógenos así como *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*.

En las cuatro cepas ETEC CFA/III⁺ (31-10, MP179-2, Z14-2 y Z26 5/6) probadas, el AcMo 8.40 reconoció una banda de aproximadamente 22 kDa (Figura 17). En las otras cuatro cepas ETEC CFA/III⁺ (Z108-2, Z284-1 y MP215-1) ninguno de los AcMs presentó reacción positiva (Tabla 12).

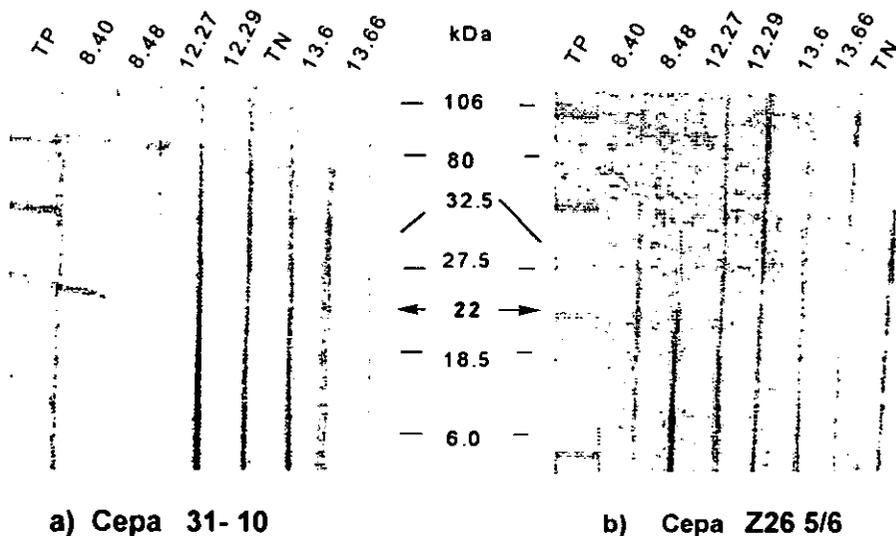


Figura 17. Ejemplos del reconocimiento de los AcMs anti-Longus por IET en cepas ETEC CFA/III⁺. Se incluyen suero de ratón inmunizado como testigo positivo (TP), y como testigo negativo PBS (TN).

Los AcMs anti-Longus no reaccionaron con cepas: ETEC CFA/III⁺, EPEC, EHEC, EAggEC, EIEC, así como, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*, por ELISA, ni por IET (Figura 18).

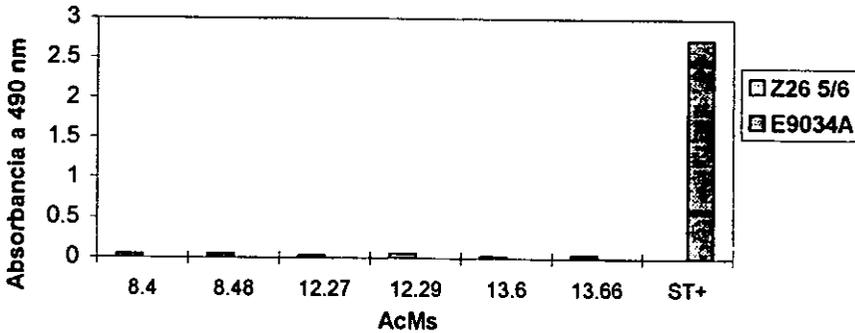


Figura 18. ELISA que muestra como no existen reacciones cruzadas entre los AcMs anti-LngA y la cepa Z26-5/6. ST⁺ corresponde al suero policlonal hiperinmune del ratón.

Los ensayos de reacciones cruzadas contra cepas de diferentes grupos de *E. coli*, fueron negativos en IET. Sucede lo mismo cuando los AcMs son probados con las cepas de *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*. En la figura 19 se muestran las IET's de la cepa de EPEC B171 y la cepa de EHEC 933, en donde se puede observar, que ninguno de los AcMs reconoce algún antígeno. Esta figura representa la respuesta de las diferentes cepas de *E. coli* de otros grupos patogénicos y de *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*.

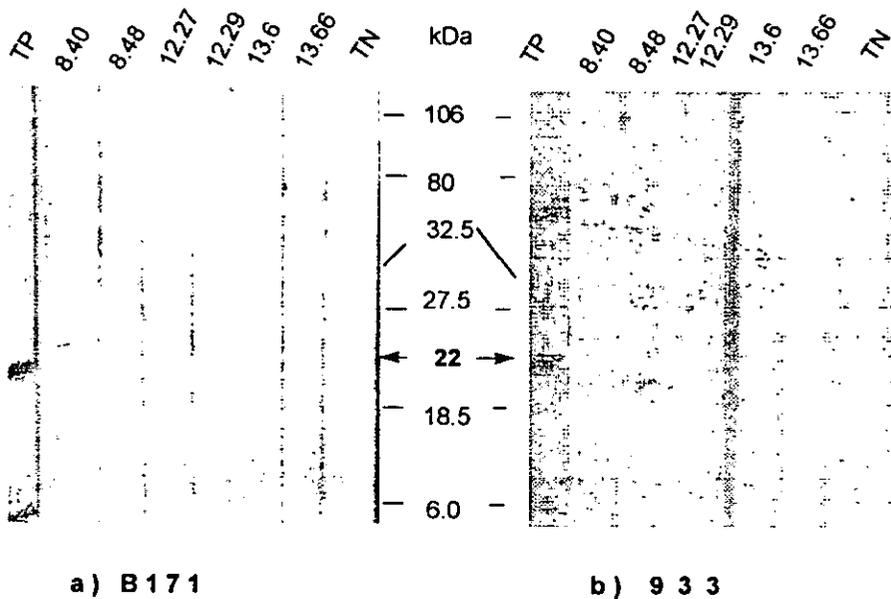


Figura 19 IET's que muestran las reacciones cruzadas con las cepas EPEC B 171 (a) y EHEC 933 (b). TP corresponde al suero hiperinmune del ratón 1 con la cepa E9034A. TN corresponde al testigo negativo utilizado en el ensayo (PBS).

En ELISA también se obtuvieron resultados negativos al probar los AcMs anti-LngA contra las cepas de otros grupos patogénicos de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, en donde se obtuvieron gráficos similares a la figura 18.

En la tabla 12 se muestra el resumen de resultados. Como se puede observar, los anticuerpos anti-LngA reconocen todos a longus en cuatro cepas ETEC LngA+, y solo el Ac Mo 8.40 reconoce a las cepas M633 por IET y la cepa M452 por IET y ELISA. El mismo Ac Mo 8.40 también reconoce a cuatro cepas ETEC CFA/III+ por IET. Los demás AcMs no presentan reacciones cruzadas con ninguna cepa de los diferentes grupos de *E. coli*, ni con *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*.

Tabla 12 Resumen de Resultados de especificidad y reacciones cruzadas de los AcMs anti-LngA con cepas de ETEC, por ELISA (E) y por (IET).

Ac's Mo ⇒	8.40		8.48		12.27		12.29		13.6		13.66	
Cepas ↓	E	IET	E	IET	E	IET	E	IET	E	IET	E	IET
ETEC LngA⁺												
E9034A												
B2C												
M447 C4												
M452			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M633	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETEC LngA⁻												
E9034P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-12 DH5 α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H 10407	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETEC CFA/III⁺												
Z108-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z284-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z26 5/6	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z14-2	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP 215-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP179-2	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31-10	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 12 (continuación) Resumen de Resultados de especificidad y reacciones cruzadas de los AcMs anti-LngA con cepas de *E. coli* de otros grupos patogénicos, así como, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, por ELISA (E) y por (IET).

Ac's Mo ⇒	8.40		8.48		12.27		12.29		13.6		13.66	
	E	IET	E	IET	E	IET	E	IET	E	IET	E	IET
EPEC												
B171 LA+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B171 LA-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2348/69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EHEC												
933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAEC												
W286-1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WC172-1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W452-1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O35128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OTRAS												
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

9. DISCUSION

En el presente trabajo se obtuvieron AcMs anti-Longus utilizando el pilus purificado, el cual, resultó ser un excelente inmunógeno dando títulos de anticuerpos anti-Longus altos en los ratones inmunizados. Esto concuerda con los resultados obtenidos con otros CFA's que son muy buenos inmunógenos.

Dado que las clonas originadas de cada híbrido producen Acs del mismo isotipo (IgG3 e IgG1) y además se observó que todas reconocen las mismas bandas en IET (Tabla 11 y figura 8), se sugiere que realmente sólo se cuenta con seis AcMs.

Es necesario hacer notar, que la mayoría de los anticuerpos monoclonales que se han producido contra otros pili de ETEC han sido del isotipo IgG1, como los AcMs anti-CS6 (Helander et al, 1997), los anti-CFA/III, los CS7, CS17 y PCFO166 (Viboud et al, 1993), contra el CFA/I (Rudin et al, 1994), ó contra diferentes subcomponentes del CFA/II (López-Vidal y Svennerholm, 1990); los AcMs contra el BFP producidos por Girón et al (1995), también son de subclase IgG1; en el presente trabajo nosotros obtuvimos 5 AcMs contra el pilus Longus de ETEC de la misma subclase. Se han reportado AcMs de isotipo diferente: IgG2a anti-CFA/III (Honda et al, 1989) e IgG2b anti-PCFO159 (Viboud et al, 1993)

Nuestros AcMs reconocen diferentes epitopos (por lo menos dos), algunos de ellos reconocidos por cinco de los AcMs (8.48, 12.27, 12.29, 13.6, y 13.66) por ELISA e IET en cepas de ETEC LngA+. El AcM 8.40 reconoce además de Longus en ELISA e IET, al CFA/III de ETEC por IET. La intensidad tan distinta con la que los AcMs reconocen a Longus en las cepas ETEC tanto por ELISA como por IET, puede tener su origen a la cantidad de pili que es producida por las cepas (López-Vidal y Svennerholm, 1990). Se ha sugerido que las diferencias que presentan las cepas en la producción de Longus sea debido a variaciones en los mecanismos regulatorios que presentan las diferentes cepas (Ruiz-Tagle, 1998).

Otra posibilidad es que se encuentren diferencias estructurales en Longus de diferentes cepas, esto es apoyado por que el AcM 8.40 reconoce por ELISA a cuatro de las cinco cepas ETEC Longus positivas y sólo una no es reconocida, mientras que por IET reconoce a las cinco cepas. Lo anterior también nos hace pensar que tales diferencias se dan tanto a nivel de epitopos estructurales de la subunidad longina en el pilus completo, como en la subunidad sola.

Trabajos previos en los que se producen AcMs contra diversos CFA's tienen resultados similares, que muestran las diferencias entre un pilus producido por cepas diferentes, así como en el reconocimiento de estos anticuerpos hacia los pili en técnicas como ELISA (pili en estado "natural") e IET (pili en estado desnaturalizado, reconociendo únicamente las subunidades), (Honda et al, 1989; López-Vidal et al, 1988, Girón et al, 1995).

Las reacciones cruzadas que presenta el AcMo 8.40, por IET con cepas CFA/III+ puede deberse al hecho de que tanto este pilus como Longus, son pili bioquímicamente muy parecidos y ambos pertenecen a los pili tipo IV clase B, y además muestran homología de hasta el 100 % en los primeros 20 aminoácidos de la región amino terminal; entonces la homología podría encontrarse en un epitopo lineal de las subunidades de los pili. (Tanigushi et al 1995).

Tomando en cuenta que contamos con 6 AcMs anti-longus, se sugiere que para complementar el presente trabajo se prueben estos anticuerpos con una colección más grande de cepas ETEC LngA⁺, para determinar, si reconocen una proporción más grande de cepas ETEC.

También con ellos se puede: determinar la distribución de Longus entre las cepas ETEC, estudiar la variabilidad antigénica y el mapeo antigénico de los dominios funcionales de Longus.

Con estos AcMs se puede estudiar el papel del pilus en la patogénesis de la infección por ETEC y la adherencia de estas bacterias a células epiteliales del intestino.

Pensando en el diagnóstico, se podría desarrollar una prueba rápida (ELISA o DOT), para detectar cepas ETEC positivas a Longus en muestras de pacientes, sin la necesidad de hacer aislamiento y posterior caracterización de las cepas. El AcM 8.40 que presenta reacciones cruzadas con cepas CFA/III⁺ podría ser utilizado como auxiliar para detectar aquellas cepas que no den positivo con los otros 5 AcMs.

10. CONCLUSIONES

Se obtuvieron:

- * Cinco grupos de clonas de la subclase IgG1 (8.48, 12.27, 13.6, 13.66 y 12.29) que reconocen sólo al pilus Longus por ELISA e IET, en las cepas E9034A, M447C4 y B2C y por lo tanto son específicos para Longus (no presentan reacciones cruzadas con otras bacterias).

- * Un grupo de clonas (8.40) de la subclase IgG3 que reconoce a Longus por IET en todas las cepas ETEC LngA+ , y por ELISA solamente no reconoce a la cepa M633, además, presenta reacciones cruzadas por IET con el CFA/III de cuatro cepas ETEC: 31-10, Z14-2, Z26 5/6 y Z108.

- * Existen diferencias entre Longus producido por diferentes cepas de ETEC.

- * Existen similitudes antigénicas entre Longus y CFA/III, ya que hubo reconocimiento por uno de los AcM .

11. REFERENCIAS

1. Alegre ML, Lenschow DJ & Bluestone AB. (1995) Immunomodulation of Transplant Rejection Using Monoclonal Antibodies and Soluble Receptors. *Seminars in Nuclear Medicine*, **XXV** (2): 58-64.
2. Baldwin TJ, Ward A, Aitken A, Knutton S & Williams PH. (1991) Elevation Intracellular Free Calcium Levels in HEp-2 Cells Infected with Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**:1599-1604.
3. Bishof Delaloye & Delaloye B. (1995) Tumor Imaging with Monoclonal Antibodies. *Seminars in Nuclear Med.* **XXV**(2):144-164.
4. Blakey DC, Burke Pj, Davies DH, Dowl RI, Melton RG, Springer CJ & Wrigth AF. (1995) Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) for Treatment of Major Solid Tumor Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 1047-1052.
5. Boleti E, George AJT & Epenetos A.A. (1995) Therapeutic Monoclonals. *Biochemical Society Transactions* **23**:1044-1047.
6. Bray J. (1945) Isolation of Antigenically Homogeneous Starins of *Bacterium coli neapolitanum* from Summer Diarrhoea of Infants. *J. Pathol.* **57**: 239-247.
7. Bray J & Beavan TED. (1948) Slide Agglutination of *Bacterium coli* var. *neapolitanum* in Summer Diarrhoea. *J. Pathol.* **60**: 395-401.
8. Butterworth AE. (1984) Cell-Mediated Damage to Helminths. *Adv. Immunol.* **23**: 143-235.
9. Campbell AM. (1991) *Monoclonal Antibodies and Immunosensor Tecnology*. Elsevier. The Netherlands. 427 pp.
10. Cassadevall A. (1996) Antibody-Based Therapies for Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infect. Dis.* **2**(3): 200-208.

11. Castillo R & Velosos A. (1990) Procedimiento para Obtener Anticuerpos Monoclonales Mediante el Transplante de Hibridoma *in vivo*. Biotecnología Aplicada. **7**(1): 102-105.
12. Cosimi A B. (1995) Future of Monoclonal Antibodies in Solid Organ Transplantation. Digest. Dis. Science. **40**(1): 65-72.
13. Cotton RGH & Milstein C. (1973) Fusion of Two Immunoglobulin-Producing Myeloma Cells. Nature. **244**:42-43.
14. Coyle PV, Waytt D, McCaughey C & O'Neill J. (1992) A Simple Standardized Protocol for the Monoclonal Antibodies against Viral and Bacterial Antigens. J Immunol. Methods. **153**:81-84.
15. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM & Rowe B. (1979) An Adhesive Factor Found in Strains of *Escherichia coli*: Belong to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. Curr. Microbiol. **3**: 95-99.
16. Cravioto A, Reyes RE & Ortega R. (1988) Prospective Study of Diarrhoeal Disease in a Cohort of Rural Mexican Children: Incidence and Isolated Pathogens During the First Two Years of Life. Epidemiol. Rev. **101**: 123-.
17. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De la roca JM, Hernández JM, Pérez G & Vázquez V. (1990) Risk of Diarrhea During the First Year of Life Associated with Initial and Subsequent Colonization by Specific Enteropathogens. Am. J. Epidemiol. **131**: 886-904.
18. Cravioto A & Eslava C. Vacunas Contra *Escherichia coli* Causante de Diarrea Humanos. En: Escobar GA, Valsdepino GJL & Sepúlveda AJ (1992) Vacunas Ciencia y Salud. SSA. México. 29-53.

19. De SN, Bhattacharya K , Sarkar JK. (1956) A Study of the Pathogenicity of Strains of *Bacterium coli* from Acute and Chronic Enteritis. J. Pathol. Bacteriol. **71**:201-206.
20. Delaloyne AB & Delaloyne B. (1995) Tumor Imaging with Monoclonal Antibodies. Sem. Nucl. Med. **25**(2):144-164.
21. Duncan HE & Edberg SC. (1995) Host-Microbe Interaction in the Gastrointestinal Tract. Crit. Rev. Microbiol. **21**(2): 85-100.
22. Escobar GA. Inmunidad y vacunas. En: Escobar GA, Valsdepino GJL & Sepúlveda AJ (1992) Vacunas Ciencia y Salud. SSA. México. 29-53.
23. Eslava C, Navarro-García F, Czeczulin JR, Henderson IR, Cravioto A & Nataro JP. (1998) Pet, an Autotransporter Enterotoxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **66**:3155-3163.
24. Evans DG, Evans DJ, Tjoa W S & DuPont HL. (1977) Virulence Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **176** (Suppl): S118-S123.
25. Evans DG, Evans DJ, Tjoa WS & DuPont HL. (1978) Detection and Characterization of Colonization Factor of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Adults with Diarrhea. Infect. Immun. **19**(2):727-736.
26. Evans DG, Silver RP, Evans DJ, Chase DG & Gorbach SL. (1975) Plasmid-Controlled Colonization Factor Associated with Virulence in *Escherichia coli* Enterotoxigenic for Humans. Infect. Immun. **12**(3): 656-667.
27. Fazekas DS & Scheidegger D. (1980) Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics. J. Immunol. Methods. **35**:1-21.

**ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA**

28. Ferguson WW & June RC. (1952) Experiments on Feeding Adult Volunteers with *Escherichia coli* 111, B₄, a Coliform Organism Associated with Infant Diarrhea. *American Journal of Hygiene*. **55**:155-169.
29. Finlay BB & Falkow S. (1997) Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(2):136-169.
30. Gaastra W & Svennerholm AM. (1996) Colonization Factors of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.* **4**: 444-452.
31. Galfré G & Milstein C. (1981) Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. *Methods in Enzymol.* **73**: 3-84.
32. Gavilondo CJ. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales. *Interferón y Biotecnología* 1987, **4**:1-16
33. Gavilondo JV. (1995) Anticuerpos Monoclonales. Colección Teoría y Práctica. *Elfos Scientiae. Cuba*. 180 pp.
34. Geffer ML; Margulies DH; Scharff MD (1977) A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet*, **3**(2):231-6
35. Girón JA, Gómez -Duarte OG, Jarvis KG & Kaper JB. (1997) Longus Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and its Relatedness to Other Type-V Pili- A Minireview. *Gene* **192**: 39-43.
36. Girón JA, Levine MM and Kaper JB. (1994) Longus: a Long Ultrastructure Produced by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**(1): 71-82.
37. Girón JA, Ho ASY & Schoolnik. (1991) An Inducible Bundle Forming Pilus of *Escherichia coli* Enteropathogenic. *Science* **254**: 710-713.

38. Girón JA, Jones T, Millán-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zárate L, Fry J, Frankel G, Moseley SL, Baudry B, Kaper JB, Schoolnik GK & Riley WL. (1991) Diffuse-Adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a Putative Cause of Diarrhea in Mayan Children in Mexico. *J. Infect. Dis.* **163**: 507-513.
39. Girón JA, Viboud GI, Sperandio V, Gómez-Duarte GO, Maneval DR, Albert MJ, Levine MM & Kaper JB. (1995) Prevalence and Association of the Longus Pilus Structural Gene (IngA) with Colonization Factor Antigens, Enterotoxins Types, and Serotypes of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**(10): 4195-4198.
40. Goding JW. (1996) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Third Edition. Academic Press. London UK. 492 pp.
41. Harlow De & Lane D. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. 726 pp.
42. Harris W.J. (1995). Production of Humanized Monoclonal Antibodies for *in vivo* Imaging and Therapy. *Biochemical Society Transactions* **23**:1035-1038.
43. Helander A, Grewal HMS, Gaastra Win & Svennerholm AM. (1997) Detection and Characterization of the Coli Surface Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains by Using Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **35**(4): 867-872.
44. Heuzenroeder MW, Elliot TR, Thomas CJ, Halter R & Manning PA. (1990) A New Fimbrial Type (PCFO9) on Enterotoxigenic *Escherichia coli* O9:H-LT⁺ Isolated from Case of Infant Diarrhoea in Central Australia. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**:55-60.

45. Hinson G & Williams PH. (1989) Adheins of Pathogenic *Escherichia coli*. En: Hopwood DA & Chater KF. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press. London, UK. pp.287-307.
46. Honda T, Arita M & Miwatani T. (1984) Characterization of New Hydrophobic Pili of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*: a Possible New Colonization Factor. Infect. Immun. **43**(3): 959-965.
47. Honda T, Wetprasit N, Arita M & Miwatani T. (1989) Pilus Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Infantile Diarrheal Patients in Papua New Guinea. Am. J. Trop. Med. Hyg. **41** (2): 220-223.
48. Honda T, Wetprasit N, Arita M & Miwatani T. (1989) Production and Characterization os Monoclonal Antibodies to a Pilus Colonization Factor (Colonization Factor Antigen III) of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **57**(11): 3452-3457.
49. Jawest (1994) Microbiología Médica. El Manual Moderno.
50. Jerse AE, Martin WC, Galen JE & Kaper JB. (1990) A Genetic Locus of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPE) Necessary for the Production of Attaching and Effacing Lesions on Tissue Culture Cells. Proct. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 7839-7843.
51. June RC, Ferguson NW & Worfel MT. (1953) Experiments on Feeding Adult Volunteers with *Escherichia coli* 55, B₅, a Coliform Organism Associated with Infant diarrhea. American Journal of Hygiene. **57**:222-236.
52. Karmali MA, Steele BT, Petric M & Lim C. (1983) Sporadic Cases of Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Faecal Cytotoxin and Citotoxin Producing *Escherichia coli* in Stools. Lancet i: 614-620.

53. Klemm P. (1985) Fimbrial Adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Infect. Dis. 7(3): 321-340.
54. Knutton S, Lloyd DR & McNeish AS. (1987) Identification of a New Fimbrial Structure in Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Colonization Factor. Infect. Immun. 55:8-92.
55. Köhler G & Milstein C. (1975) Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. 256:495-497.
56. Köhler G, Howe SC & Milstein. (1976) Fusion between Immunoglobulin-Secreting and non Secreting Myeloma Cell Lines. Eur. J. Immunol. 6: 292-295.
57. Koya G, Kosakai N & Fusakawa Y. (1954) Supplementary Studies on the Multiplication of *Escherichia coli* O 111 B₄ in Intestinal Tract of Adult Volunteers and its Relation to Manifestation of Coli Enteritis. 7:655-661.
58. Koya G, Kosakai N, Kono M, Mori M & Fusakawa Y. (1954) Observations on Multiplication of *Escherichia coli* O 111 B₄ , in the Intestinal Tract of Adult Volunteers in Feeding Experiment Intubation Study with Miller-Abbot's Double Lumen Tube. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 7:197-203.
59. Laemmli EK. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
60. Levine M M, Rennels M B, Daya V & Hughes T P. (1980) Hemagglutination and Colonization Factors in Enterotoxigenic and Entropathogenic *Escherichia coli* that Cause Diarrhea. J. Infect. Dis. 141:(6):733-737.
61. Levine M M, Ristano P, Marley G, Smyth C, Knutton S, Boedeker E, Black R, Young C, Clements M L, Cheney C & Patnaik R. (1984). Coli Surface Antigens 1 and 3 Colonization Factor Antigen II-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli*:

- Morfology, Purification and Immune Responses in Humans. *Infect Immun.* **44**: 409-420.
62. Levine MM. (1987) *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J Infect. Dis.* **155**: 377-389.
63. Lopez-Vidal Y & Svennerholm AM. (1990) Monoclonal Antibodies Against the Different Subcomponents of Colonization Factor Antigen II of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **28**(9): 1906-1912.
64. Márquez LRM, Peiris JSM, Cris SJ & O'Brien AD. (1987) *Escherichia coli* Strains Isolated from Pigs with Edema Disease Produce a Variant of Shiga-Like Toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**: 33-38.
65. McConnell MM, Chart H, Field AM, Hibberd M & Rowe B. (1989) Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O166. *J Med. Microbiol.* **135**:1135-1144.
66. Medina FY, Vaughan FG, Medina EME, Mata RO, Morales LZ & Correa BMD. (1997) Manual de Procedimientos de Laboratorio del INDRE: 15. Producción de Anticuerpos Monoclonales. INDRE, SSA. México. 52 pp.
67. Mekalanos JJ. (1992) Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. *J. Bact.* **174**(1): 1-7.
68. Milstein C. (1980) Monoclonal antibodies. *Scient. Am.* **246**:56-74.
69. Moreno JL. (1997). Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. LIMUSA, UTEHA, México. 122 pp.
70. Nataro JP & Kaper JB. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11** (1):142-201.

71. Neter E, Westphal O, Luderitz O & Needell MH. (1955) Demonstration of Antibodies Against Enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*. **16**:801-808.
72. Östberg L & Queen C. (1995) Human and Humanized Monoclonal Antibodies: Preclinical Studies and Clinic Experience. *Biochem. Soc. Trans.* **23**:1038-1043.
73. Pontecorvo G. (1975) Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids by Means of Polyethylene Glycol Treatment. *Somatic Cell Genetics*. **1**(4): 397-400.
74. Ravetch J & Kinet JP. (1991) Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 457-492.
75. Reading CL. (1982) Theory and Methods for Immunization in Culture and Monoclonal Antibody Production. *J. Immunol. Methods*. **53**:261-291.
76. Rudin A, McConnell M & Svennerholm AM. (1994) Monoclonal Antibodies Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Colonization Factor Antigen I (CFA/I) That Cross-React Immunologically with Heterologous CFAs. *Infect. Immun.* **62**(10): 4339-4346.
77. Ruíz-Tagle A. (1998) Efecto de los Factores Ambientales en la Producción del Pilus Longus de *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC). Tesis de Maestría. BUAP. 61 pp.
78. Savarino SJ, Fasao D, Robertson DC & Levin MM. (1991) Enteroaggregative *Escherichia coli* Elaborate a Heat-Stable Enterotoxin Demonstrable in an *in vitro* Rabbit Intestinal Model. *J. Clin. Invest.* **87**:1450-1455.
79. Scotland SM, Day NP & Rowe B. (1980) Production of a Cytotoxin Affecting Vero Cells by Strains of *Escherichia coli* Belonging to Traditional Enteropathogenic Serogroup. *FEMS Microbiol. Lett.* **7**:15-17.

- 80.Scotland SM, Smith HR & Rowe B. (1983) Two Distinct oxins Active on Vero Cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet* ii: 885-888.
81. Sissons JGP & Oldstone MBA. (1980) The Antibody Mediated Destruction of Virus infected Cells. *Adv. Immunol.* **29**: 209-260.
- 82.Tacket CO, Maneval DR & Levine MM. (1987) Purification, Morphology, and Genetics of a New Fimbrial Putative Colonization Factor of Enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. *Infect. Immun.* **55**(5): 1063-1069.
- 83.Taniguchi T, Fujino Y, Yamamoto K, Miwatani T & Takeshi H, (1995) Sequencing of the Gene Encoding the Major Pilin of Pilus Colonization Factor Antigen III (CFA/III) of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Evidence that CFA/III Is Related to Type IV Pili. *Infect. Immun.* **63**(2): 724-728.
- 84.Thomas LV, Cravioto A, Scotland SM & Rowe B. (1982) New Fimbrial Antigenic Type (E8775) That May Represent a Colonization Factor in Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Humans. *Infect. Immun.* **35**(3): 119-1124.
85. Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:4350-4354.
- 86.Turner MW. (1977) Structure and Function of Immunoglobulins. En: Glynn LE, Steward MW Eds. *Immunochemistry: An Advanced Textbook*. Chichester. John Wiley and Sons.
- 87.Vial PA, Robins-Browne RM, Lior H, et al. (1987) Characterization of Enteroadherent-Aggregative *Escherichia coli* a Putative Agent Diarrheal Disease. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-384.

88. Viboud C, Binsztein N & Svennerholm AM. (1993) A New Fimbrial Putative Colonization Factor, PCFO20, in Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**: 831-834.