

03072

14
2ei



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los ciclos
Profesional y de posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
FACULTAD DE QUIMICA

FACTORES PUTATIVOS DE COLONIZACION DE
Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA:
DETECCION, FRECUENCIA Y HOMOLOGIA.

T E S I S
Que para obtener el Grado de:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
p r e s e n t a:
Q. B. P. Ana Guadalupe Trujillo Macal



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | 1 |
| ABREVIATURAS | 2 |
| I. INTRODUCCION | 3 |
| II. JUSTIFICACION DEL PROYECTO | 17 |
| III. HIPOTESIS | 18 |
| IV. OBJETIVOS | 19 |
| V. MATERIAL Y METODOS | 20 |
| VI. RESULTADOS | 26 |
| VII. DISCUSION | 45 |
| VIII. CONCLUSIONES | 51 |
| IX. BIBLIOGRAFIA | 52 |

RESUMEN

Escherichia coli enterotoxigénica, ETEC, es una causa importante de diarrea en niños en países en desarrollo, y en turistas que viajan a estos países. La habilidad de ETEC para adherirse y colonizar el intestino delgado es esencial para su patogenicidad. Se ha propuesto que la adherencia es debida a una amplia variedad de adhesinas fimbriales y no fimbriales específicas, denominadas Factores de Colonización y Factores Putativos de Colonización, (CFAs y PCFs).

Los objetivos de este estudio incluyeron 1) conocer la prevalencia de factores putativos de colonización (PCFO159, PCFO166, 2230 y CFA/III), en cepas de ETEC aisladas de niños mexicanos menores de 5 años y de turistas americanos; estas cepas fueron negativas para CFA/I, CFA/II y CFA/IV; 2) describir la presencia de homología antigénica y la identidad entre las secuencias de aminoácidos de las fimbrias de ETEC.

Se utilizaron pruebas de escrutinio como hemaglutinación de diversas especies de eritrocitos y agregación con diferentes concentraciones de sulfato de amonio (hidrofobicidad), para la valoración, en estos grupos de cepas, de posibles candidatos para encontrar la presencia de factores putativos de colonización. Con los antígenos purificados por la metodología descrita por Evans y cols (28), y los anticuerpos policlonales obtenidos contra PCFO166, PCFO159, CFA/III y 2230, fué posible utilizar el ensayo de CFA Inhibición-ELISA para la determinación específica de estos PCFs. La frecuencia con que los PCFs se encuentran en los 2 grupos de cepas estudiadas, provenientes de niños y turistas, es muy pequeña, el porcentaje de cepas que poseen algún tipo de fimbria se incrementó únicamente en un 6.2% y un 8% en las dos poblaciones respectivamente. El que algún PCF esté mayormente asociado a cepas que procedan de cuadros de diarrea o de casos asintomáticos no es estadísticamente significativo. El CFA/III no se encontró en ninguno de los dos grupos de cepas estudiadas.

Para determinar la existencia de homología antigénica entre los factores de colonización de ETEC, se utilizó el ensayo de Inhibición-ELISA. Los sueros policlonales obtenidos en conejo contra los diferentes PCFs en su forma nativa, así como los anticuerpos monoclonales reaccionaron con sus antígenos homólogos; sin embargo, los mismos sueros fueron capaces de reconocer formas desnaturalizadas de antígenos heterólogos, es decir, reconocieron antígenos de un tipo diferente al que había sido utilizado para inducir la respuesta inmune. La más alta homología antigénica fué encontrada entre CFA/I, CS1 y CS3 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166. La reactividad antigénica correlaciona con la identidad entre las secuencias de aminoácidos de estas fimbrias, a excepción de CS2 y CS3 de CFA/II. Estos resultados sugieren que distintos tipos de fimbrias tienen epítomos comunes que dan lugar a una reactividad inmunológica cruzada.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AA | Aminoácidos |
| ASB | Albúmina sérica bovina |
| ACF | Adyuvante completo de Freund |
| CFA _s | Factores de Colonización |
| CFA/I | Factor de Colonización I |
| CFA/II | Factor de Colonización II |
| CS1 | Componente de Superficie 1 de CFA/II |
| CS2 | Componente de Superficie 2 de CFA/II |
| CS3 | Componente de Superficie 3 de CFA/III |
| CFA/III | Factor Putativo de Colonización III |
| CFA/IV | Factor de Colonización IV |
| CS4 | Componente de Superficie 4 de CFA/IV |
| CS5 | Componente de Superficie 5 de CFA/IV |
| CS6 | Componente de Superficie 6 de CFA/IV |
| ELISA | Ensayo Inmunoenzimático |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica |
| HA | Hemaglutinación |
| H | Hidrofobicidad |
| HARM | Hemaglutinación resistente a D-manosa |
| IC | Intervalo de confianza |
| Kda | Kilodaltones |
| LT | Enterotoxina termolábil |
| MAB | Anticuerpo monoclonal |
| PAGE | Electrofores en geles de poliacrilamida |
| PBS | Solución reguladora de fosfatos |
| PCFs | Factores Putativos de Colonización |
| PCF0166 | Factor Putativo de Colonización O166 |
| PCF0159 | Factor Putativo de Colonización O159 |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| ST | Enterotoxina termoestable |
| ST/LT | Con ambas enterotoxinas |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |

I. INTRODUCCION

I.1 La Adherencia es mediada por Adhesinas y es altamente específica.

El potencial patogénico de una cepa de *Escherichia coli* ó de cualquier microorganismo no puede ser atribuido a un solo determinante. Su potencial patogénico es un reflejo de una constelación de genes, con frecuencia de origen cromosomal y plasmídico así como de una multitud de factores del huésped. El inicio de la interacción entre el huésped y el microorganismo invasor depende de una combinación de factores de virulencia de este último, ej: la habilidad de producir toxinas, la resistencia a las defensas inmunológicas del huésped, la localización y colonización en el tejido apropiado por adherencia específica. En las pasadas 2 décadas ha sido evidente que la adherencia bacteriana, en muchos casos mediada por adhesinas que son fimbrias específicas, es una característica prominente en la patogénesis de la gran mayoría de las bacterias que interactúan con las superficies epiteliales celulares (58).

La colonización bacteriana de una superficie mucosa requiere que la bacteria (i) establezca un acercamiento cercano a la mucosa; (ii) evite ser eliminada; (iii) adquiera nutrientes esenciales para crecer; (iv) se replique para mantener o expandir su población; y (v) resista las defensas locales del huésped. Los mecanismos por los que la bacteria mantiene proximidad estrecha a una superficie mucosa puede ser categorizada como asociación, adhesión e invasión de acuerdo al grado de contacto o unión entre las superficies bacterianas y mucosas.

Asociación es la forma menos íntima de interacción de superficies, implica un contacto débil, reversible o de localización de la bacteria a lo largo de una superficie (Fig. 1) (5). La asociación puede preceder a la adherencia específica ó invasión. Adhesión es una unión más estrecha que la asociación, describe un contacto relativamente estable, irreversible mediado por moléculas complementarias especializadas de las superficies bacterianas y mucosas. La forma más íntima de interacción bacteria-mucosa es la invasión, donde la bacteria patógena penetra la barrera mucosa para establecerse o bien transitar dentro de las células epiteliales o el tejido adyacente (5).

Sin embargo, la adherencia no es necesariamente una característica exclusiva de las bacterias patógenas. La adherencia de microorganismos a superficies epiteliales en animales superiores juega un papel importante en el mantenimiento de la flora normal de algunos ecosistemas e indirectamente protege al

huésped proporcionando competencia para patógenos. Así, los microorganismos patógenos deben superar las barreras de defensa locales inespecíficas del huésped antes de unirse a las células epiteliales. La adherencia bacteriana es un fenómeno altamente específico. El término tropismo a tejidos ha sido usado para describir la preferencia de los microorganismos por ciertos tejidos, esto ha sido apoyado por la observación de especificidad de especies, por ejemplo: las infecciones gonocócicas están limitadas a humanos y chimpancés (9,56).

COLONIZACION DE MUCOSAS

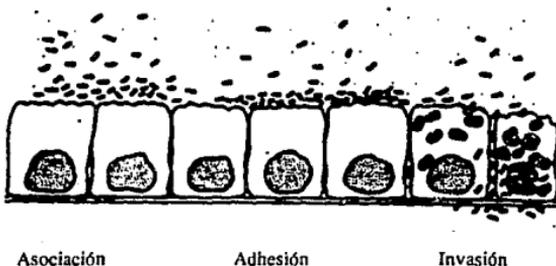


Fig. 1 Tipos de interacción bacteria-mucosa

Las bacterias patógenas han elaborado estructuras (adhesinas) que las capacitan para adherirse a sus huéspedes. Estas estructuras microbianas, que tienen función de adhesinas, están involucradas en uno o más de los siguientes puntos: 1) promueven la adherencia y por lo tanto inician la colonización de las superficies mucosas; 2) son responsables de la organización de comunidades microbianas; 3) ocasionan el contacto célula-célula; 4) y son importantes en la liberación eficiente de toxinas a las células blanco (41).

Cada tipo individual de adhesina interactúa con componentes particulares expuestos sobre el epitelio animal. Esta interacción entre las adhesinas bacterianas y los tejidos del huésped en cuanto a especificidad ha sido comparada con el reconocimiento antígeno-anticuerpo (9).

La superficie intestinal está cubierta por una capa mucosa que protege al epitelio. Las glicoproteínas del moco (mucinas) son ricas en carbohidratos que están presentes como oligosacáridos, algunos de los cuales se encuentran en los antígenos de los grupos sanguíneos. La capa de moco es gruesa comparada al tamaño de una bacteria y los oligosacáridos proporcionan receptores potenciales para las adhesinas bacterianas. Así, la adherencia puede ser inhibida proporcionando un exceso del receptor en solución más que unido a la superficie, debido a la competencia por el número limitado de sitios activos. Para caracterizar la especificidad de un receptor de una nueva adhesina, la hemaglutinación u otros ensayos deben ser realizados en la presencia de inhibidores putativos, normalmente azúcares simples o compuestos glicosilados (48). Como resultado de estudios realizados investigando la unión de las fimbrias y la inhibición de esta unión a eritrocitos las estructuras para los receptores de algunas adhesinas fimbriales han sido propuestas (Tabla 1).

1.2 Generalidades.

Escherichia coli habita normalmente en el tracto intestinal de mamíferos. Para resistir los mecanismos de limpieza del intestino como son el flujo de fluidos debido a movimientos peristálticos y/o secreción de moco, la bacteria cuenta con adhesinas específicas. La colonización por *E.coli* toma lugar después del nacimiento y, una vez establecido, esta especie permanece como parte de la flora normal. *E.coli* es la bacteria más abundante dentro de las bacterias gram negativas aeróbicas facultativas en la flora fecal (63). Existe una clara correlación entre las propiedades de adherencia de las cepas patogénicas de *E.coli* y la capacidad de estas cepas de causar enfermedad, incluyendo diarrea (34,40,41,54), pielonefritis, meningitis (62), septicemia e infección del tracto urinario (34,57,63,88).

En todos estos casos, la adherencia es el primer paso en la infección y existen múltiples evidencias que *E.coli* tiene una amplia variedad de adhesinas fimbriales y no fimbriales específicas que le permiten adherirse al epitelio (63). La especificidad de los diferentes tipos de fimbrias es resumido en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS ADHESINAS FIMBRIALES EXPRESADAS EN *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC) CAUSANTES DE DIARREA

| Adhesina | Huésped | Tropismo | Receptor putativo | Referencia |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------|--|--|
| K88 | Cerdos | Intestino delgado | D-Galactósidos | Laux DC.1986 (66) |
| K99 | Terneras borregos cerdos | Ileón | Ac. Siálico GM ₁ | Graaf FK.1980 (40) Smit M.1984 (97) Lindahl M.1990 (71) Faris AM.1980 (34) |
| F41 | Terneras borregos cerdos | Intestino delgado | N-Acetilgalactosamina | Graaf FK.1982 (41) |
| 987P | cerdos | Intestino delgado | Desconocido | Isaacson RE.1981 (54) |
| CFA/I | Humanos | Intestino delgado | Ac. Siálico GM ₁ | Evans DG.1979 (28) Bartus H.1985 (8) Pieroni P.1988 (90) Faris AM.1980 (34) |
| CFA/II (CS1,CS2) CS3 | Humanos | Intestino delgado | Desconocido carbohidratos/ polilactosamino-glucanos | Hall RH.1989 (44) Sporsen O.1990 (100) Levine MM.1984 (67) |
| CFA/III | Humanos | Intestino delgado | Desconocido | Honda T.1984 (51) |
| CFA/IV | Humanos | Intestino delgado | Asialo-GM ₁ Desconocido | Oro HS.1990 (85) Wolf MK.1989 (79) Knutson S.1987 (61) McConnell MM.1985 (78) Thomas LH.1985 (110,111) |
| PCFO166 | Humanos | Intestino delgado | Desconocido | McConnell MM.1989 (80) |
| PCFO159 | Humanos | Intestino delgado | Desconocido | Tackett CO.1987 (109) |
| 2230 | Humanos | Intestino delgado | Desconocido | Darfeuille-Michaud A.1986 (22) |

1.3 Clasificación de *Escherichia coli* causantes de diarrea.

Entre las cepas de *E.coli* que causan diarrea en humanos, existen 4 clases diferenciadas entre sí por sus propiedades de virulencia, su interacción con la mucosa intestinal, el síndrome clínico que producen, su epidemiología y los distintos serotipos O:H a los que se asocian y éstas son las siguientes (69):

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAaggEC)

Estas bacterias, aunque si bien se diferencian por lo anteriormente mencionado, comparten ciertas características con respecto a su patogénesis: 1) Los factores de virulencia son codificados generalmente por plásmidos; 2) Existe interacción con la mucosa intestinal; 3) Producen enterotoxinas y/o citotoxinas; 4) Las cepas se clasifican dentro de ciertos serotipos O:H

Las cepas de *E.coli* enteropatógena y enterotoxigénica causan gastroenteritis en niños y en adultos, especialmente en países en desarrollo, y son responsables de la mayoría de los casos reportados en la diarrea del viajero (1,26,91,94,101). Estudios realizados en México, en un área endémica, demostraron que ETEC se encuentra dentro de los 4 primeros agentes causales de diarrea en la población infantil menor de 2 años (20,21,93). Además, se ha descrito a *E.coli* como el agente causal de infecciones oportunistas en huéspedes comprometidos. En el campo veterinario, las cepas de *E.coli* enterotoxigénica (ETEC) causan diarrea en animales jóvenes como terneras y lechones produciendo toxinas similares a las que infectan humanos (34,41,54).

1.4 Modo de Transmisión y Patogenicidad.

La infección por ETEC es adquirida por ingestión de alimentos y/o agua contaminada. La bacteria coloniza el intestino delgado, el sitio crítico de interacción huésped-parásito donde elabora la enterotoxina termolábil (LT) ó la enterotoxina termoestable (ST).

La LT producida en humanos (LTh) y en cerdos (LTp) son estructuralmente muy similares a la toxina del cólera producida por *Vibrio cholerae* (17). Estas toxinas poseen un peso molecular de aproximadamente 86 kDa y están compuestas de cinco subunidades B en un pentámero en la cual la subunidad A es unida. La diferenciación de estas toxinas es en base a su diferente punto isoelectrónico, migración electroforética y diferencias menores en la estructura primaria, ejemplo: cuatro residuos de aminoácidos difieren entre las

subunidades B de LTh y LTp; 20 entre LTh y CT, la cual tiene 22 residuos diferentes de LTp. La heterogeneidad entre las subunidades A es más pronunciada. CT y LT: se unen a un receptor específico, el gangliósido GM₁, sobre el epitelio intestinal vía la subunidad B. Después de la penetración en la membrana celular la subunidad A actúa vía su péptido A1 para activar la adenilato ciclasa resultando en niveles incrementados de AMP cíclico lo que se traduce en incremento de la secreción de líquidos y electrolitos (35,37,49).

La ST son péptidos pequeños de bajo peso molecular, aproximadamente de 1 a 6 Kda, que a diferencia de la LT no es inmunogénica. Actualmente, 2 clases de ST son conocidas: (STa) humana y (STb) porcina de acuerdo a su especificidad de huésped. Esta toxina termoestable (ST) estimula la actividad de la guanidil ciclasa incrementando los niveles de GMP cíclico originando la salida al lumen intestinal de agua y electrolitos (35,37,49).

Las características clínicas de la infección por ETEC son diarrea acuosa, náusea, dolor abdominal y en algunos casos se acompaña de fiebre.

1.5 Adherencia de ETEC.

Como en muchas otras infecciones intestinales, el primer evento en su patogénesis es la adhesión al epitelio mediante fimbrias, denominados factores de colonización (CFAs) (27,28,29,58), los cuales les permite mantenerse (ó protegerse) del mecanismo de defensa peristáltico del intestino delgado.

La mayoría de CFAs han sido fimbrias -semejante a pelo ó cabello, organelos filamentosos, notablemente más delgados que el flagelo sobre la superficie de *E.coli*. Son pocas las adhesinas que no están asociadas con estructura fibrilar y son llamadas "no fimbriales" o "afimbrial", estas pudiesen ser agregados irregulares sin una forma claramente definida. Algunas veces se observan al microscopio electrónico como estructuras similares a cápsulas polisacáridas ó simplemente fibrilas que debido a sus diámetros pequeños (generalmente menor de 3 nm) no presentan una buena resolución por las técnicas de tinción comúnmente utilizadas (48). Los factores fibrilares de colonización de cepas de ETEC provenientes de humanos son especie-específico, los cuales comparten ciertas características:

- 1) Son estructuras rígidas o flexibles de 6 - 7 nm y de 2 - 3 nm en diámetro, respectivamente.
- 2) Son codificados por plásmidos que generalmente son los mismos que codifican para la producción de ST y LT.
- 3) Sus subunidades proteicas son de 14 a 22 kilodaltones (kDa)

- 4) En la presencia de D-manosa, la mayoría de estos (CFAs) median la hemaglutinación a ciertas especies de eritrocitos (característica diferencial del tipo de fimbria)
- 5) Confieren una alta hidrofobicidad a las cepas que lo poseen
- 6) Los CFAs se expresan en cultivos a 37°C pero no a 18°C
- 7) Están restringidos a ciertos serotipos O:H
(22,27,28,33,36,43,51,69,78,89,99).

Han sido reportados otros factores putativos de colonización (PCF): CFA/III (51), PCFO159 (109), PCFO166 (43,80), 2230 (22), 8786 (6), CS17 (82), PCFO9 (46), CFA/V (76), aislados de cepas de ETEC que causaron cuadros agudos de diarrea en humano. Estos PCFs comparten muchas de las características de los CFAs; sin embargo, la frecuencia con que son expresados por diferentes cepas de ETEC, así como su importancia en la colonización en modelos animales experimentales y en voluntarios humanos no ha sido bien determinada (83).

1.6 Métodos para detectar los factores de colonización (CFAs).

Una de las primeras estrategias para clasificar las adhesinas de acuerdo a su especificidad de adherencia en ensayos *in vitro* en las cepas de *E.coli* fue por el método de hemaglutinación (3,13,18,19,24,29). A través del uso de eritrocitos de diferentes especies, y por lo tanto de un amplio intervalo de receptores, llega a ser posible la caracterización de las adhesinas presentes en la superficie de una cepa de *E.coli*, donde cada adhesina en particular da un patrón característico de hemaglutinación (Tabla 2). Una observación temprana fue que la adherencia mediada por el pili tipo I ó pili común, presente en la mayoría de tanto enterobacterias patógenas y no patógenas puede ser inhibida por D-manosa (95).

Duguid y cols. desarrollaron un esquema para la clasificación de fimbrias en 2 categorías: las que median hemaglutinación sensible a D-manosa (ej. tipo 1) y aquellas que median hemaglutinación resistente a D-manosa. Sin embargo, debe considerarse que no todas las especies fibrilares causan hemaglutinación y que las hemaglutininas no fibrilares existen en *E.coli* (24).

Tabla 2. Patrones de hemaglutinación de diversas fimbrias de ETEC hacia diferentes especies de eritrocitos

| Fimbria | Especies de eritrocitos al 3% que son aglutinados en la presencia de 1% D-manosa | Referencia |
|-----------------------------|--|---|
| K88 | Pollo, cobayo | Jones GW.1974 (57) |
| K99 | Caballo, carnero | Gastra W.1982 (38) |
| F41 | Cuyo, humano, caballo, carnero | Graaf FK.1982(41) |
| 987P | No Hemaglutina | Isacson RE 1981 (54) |
| CFA/I | Humanos, bovinos, pollo | Evans DG.1977 (25) |
| CFA/II CS1 CS2 CS3 | Bovino, pollo, humano Bovino, pollo, gallina blanca Bovino | Faris A.1982 (33) Smith CJ.1982 (98) Cravioto A.1979 (19) |
| CFA/III | No Hemaglutina | Honda T.1984 (51) |
| CFA/IV (CS4,CS5,CS6) | Humanos y bovinos | Thomas LV.1985 (111) McConnell M.1986 (78) |
| PCFO166 | Bovino | McConnell M. 1989 (80) |
| PCFO159 | No Hemaglutina | Tackett CO.1987 (109) |
| 2230 | No Hemaglutina | Darfeuille-Michaud.1986 (22) |

Otro método sencillo, para cuantificar de manera relativa la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, es la capacidad de agregación a diferentes concentraciones de sulfato de amonio "salting out" (50,70).

Los ensayos de hemaglutinación e hidrofobicidad son pruebas de escrutinio que han sido sustituidas por otras pruebas de tipo inmunológico para la determinación específica de la presencia de algún tipo de adhesina. Algunos de estos métodos son aglutinación en portaobjetos con sueros policlonales ó monoclonales anti-CFA (3,28,52,73,74,77), inmunodifusión en agar (3,88), y CFA-inhibición ELISA (73,74,77). Recientemente, con la introducción de la biología molecular, se han diseñado sondas de DNA y oligonucleótidos para la búsqueda de los genes que codifican para estos CFAs (42,65). Estos métodos presentan diferencias en sensibilidad y especificidad y pueden ser utilizados de acuerdo a las necesidades de cada laboratorio (3). Las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos existentes se observa en la tabla 3.

Tabla 3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CFAs

| <i>Métodos</i> | <i>Ventajas</i> | <i>Desventajas</i> |
|---|---|--|
| 1. Hemaglutinación (18,19,25) | Método de escrutinio No necesita reactivos sofisticados | Baja sensibilidad |
| 2. Aglutinación | Simple, rápido | Aglutinación espontánea |
| a) Anticuerpos policlonales (3,28,37) | Alta avidéz por los anticuerpos Reacciona con diferentes epitopes de CFA | Riesgo de reacciones inespecíficas |
| b) Anticuerpos monoclonales (73,74) | Alta especificidad, cantidades ilimitadas de anticuerpo | Baja avidéz de unión, reconoce únicamente un epitope de la fimbria |
| 3. Inmunodifusión (18,88) | Alta especificidad | Consumo tiempo; baja sensibilidad |
| 4. Replicas de nitrocelulosa (72) | No requiere aislamiento previo de las colonias | |
| a) hemadsorción | Simple, rápido | Variación entre diferentes tipos de eritrocitos |
| b) ELISA | Alta especificidad y sensibilidad | Anticuerpos policlonales ó monoclonales específicos y conjugados enzimáticos necesarios |
| 5. ELISA (77) | Alta especificidad | Consumo tiempo; requiere anticuerpos anti-CFA de diferentes tipos |
| 6. CFA-Inhibición ELISA (73,74) | Muy sensible; permite determinaciones cuantitativas | Consumo tiempo, requiere reactivos inmunoespecíficos |
| 7. Material genético Sondas de DNA Oligonucleótido (42,65) | Alta especificidad y sensibilidad | Alto Costo Consumo tiempo, Únicamente algunas sondas están disponibles Requiere de la validación e interpretación de sus resultados |

I.7 Prevalencia de Factores de Colonización (CFAs).

La prevalencia de los factores de colonización en las cepas de ETEC difiere considerablemente en los distintos estudios realizados. Esta prevalencia parece variar con el tipo de población en estudio y a las diferencias geográficas. Es importante mencionar que en la mayoría de los estudios de prevalencia de factores de colonización llevados cabo, queda aproximadamente de un 40 a un 50% de cepas de ETEC en las que no se identifica algún CFA (10,11,14,27,39,83,84,94,101).

En estudiantes de los Estados Unidos de América, que viajaron a México y que presentaron diarrea por ETEC, se encontró que en un 74% de las cepas se identificó al menos un CFA, con una distribución de 31% para CFA/III, un 26% para CFA/I y para CFA/IV un 17%. Al 26% de las cepas no se les identificó ningún CFA de los anteriormente mencionados (92). Así mismo, en un estudio epidemiológico realizado en niños mexicanos que viven en un área endémica, determinamos la incidencia de infecciones entéricas por ETEC, así como la frecuencia de ETEC con CFA/I, CFA/II y CFA/IV, y establecer si la presencia de alguno de estos factores constituye un factor de riesgo para producir diarrea.

Se detectó algún tipo de CFA en el 64% de todas las cepas de ETEC. El más frecuentemente identificado fue CFA/IV (32%), seguido por CFA/I (25%) y CFA/II (7%). Aquellas cepas productoras de ambas enterotoxinas fueron las que con mayor frecuencia se asociaron a la presencia de un CFA que aquellas cepas productoras únicamente de LT ó ST. El 36% de las cepas no presentaron ninguno de los CFAs buscados. La asociación de la producción de enterotoxinas se asoció a la capacidad de producir diarrea hasta en un 4.5 veces mayor con un 95% de IC, mientras que los niños infectados con cepas de ETEC con algún CFA no presentaron un riesgo mayor a diarrea comparado con aquellos niños infectados con cepas de ETEC que no poseen alguno de los factores de colonización estudiados (75) (Figs 2 y 3).

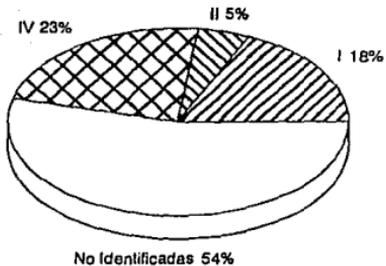


Fig.2 Frecuencia de CFA's en cepas de ETEC aisladas de niños

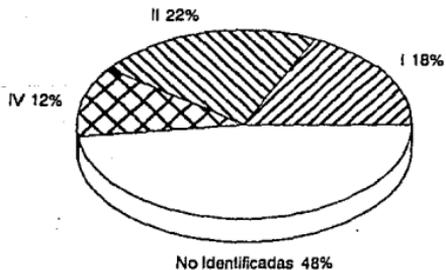


Fig.3 Frecuencia de CFA's en cepas de ETEC aisladas de turistas

1.8 Inmunidad y Vacunas.

Aún cuando ETEC es la causa más importante de diarrea en países en desarrollo y en turistas, no existe una vacuna para uso en humanos. El conocimiento acerca de los factores de virulencia y los antígenos protectores de ETEC sugiere que el desarrollo de una vacuna pueda llegar a ser posible. Se ha demostrado que la enfermedad natural por ETEC, CFA/I, y CFA/II inducen tanto una respuesta inmune sistémica y de mucosas (102). Estudios experimentales en animales y voluntarios humanos han mostrado que la infección por ETEC puede dar lugar a inmunidad protectora contra el reto con organismos homólogos (102,106,108). Tanto los anticuerpos anti-toxina y anti-factores de colonización pueden independientemente uno del otro proteger contra la infección experimental de ETEC y cuando se presentan ambos esta especificidad de anticuerpos coopera sinérgicamente en proteger contra la enfermedad. Aunque la inmunidad anti-bacteriana contra ETEC pueda ser debida a los factores de colonización, los anticuerpos contra el antígeno O pueden en parte proteger contra los grupos O homólogos de ETEC (2,4,17,31).

La inmunidad anti-toxina es dirigida únicamente contra LT, dado que la ST nativa no es inmunogénica. La respuesta inmune anti-LT es principalmente contra la subunidad B, de la molécula que cruza inmunológicamente con la subunidad B de la toxina de cólera.

Es interesante hacer notar que la inmunización con cólera o la subunidad B de LT puede inducir protección contra la diarrea asociada a cepas de ETEC productoras de LT ó LT/ST. En contraste con la función protectora de anti-LT contra la enfermedad por ETEC, el significado protector de anti-ST permanece indefinido. Aunque ST en su estado natural no es inmunogénico, puede dar origen a anticuerpos neutralizantes cuando es acoplado a una proteína acarreadora, como albúmina sérica bovina (ASB) o la subunidad B de la toxina de cólera ó de LT (35,96,105).

Se ha demostrado que en la enfermedad natural por ETEC, CFA/I y CFA/II inducen tanto una respuesta inmune sistémica y de mucosas (102). Cuando se administran oralmente los CFAs purificados se induce una respuesta inmune humoral, principalmente mediada por IgG. Aunque la segunda exposición de ETEC que expresa CFA/I o CFA/II no lo protege de manera significativa (107,113). Se ha observado que los CFAs purificados han sido muy sensibles a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal humano y que posiblemente el tratamiento para neutralizar el ácido gástrico afecte adversamente la proteína fimbrial durante su tránsito a través del estómago. Esto podría sugerir que los CFAs purificados como antígenos no replicativos son pobres estimuladores de IgA secretora, ya sea por degradación de la molécula por el contenido gástrico; o porque el antígeno libre de células pueda ser menos efectivo cuando

alcanza las células M del epitelio que cubren los folículos linfoides (placas de Peyer), el cual se especializa en transportar antígenos del lumen del intestino al tejido linfoide; o bien porque los CFAs puedan ser eliminados después de la unión a receptores libres presentes en el lumen intestinal humano. Al administrarse los CFAs directamente en el duodeno vía tubo intestinal, se observa una respuesta significativa de IgAs, lo que enfatiza la importancia de proteger las proteínas fimbriales en su paso por el estómago. Adicionalmente, estudios realizados en conejos, utilizando antígenos puros CFA/I y CFA/II, demuestran un sinergismo en la respuesta inmune, lo que sugiere que la utilización de una vacuna polivalente podría ser de gran éxito (113,114).

Así, una vacuna debe ser dada oralmente e idealmente evocar tanto una respuesta anti-colonización y anti-tóxica en el intestino, contener una combinación de derivados celulares bacterianos y antígenos derivados de la toxina. Los antígenos somáticos más importantes para ser incluidos en una vacuna son aquellos CFAs que se encuentran con mayor frecuencia en las cepas de ETEC aisladas en diferentes áreas geográficas. Por lo tanto, el conocer la prevalencia de los CFAs y PCFs es importante para el desarrollo de vacunas (23,32,68,107)

Es evidente que el desarrollo de una vacuna efectiva contra la diarrea por ETEC, usando CFAs purificados, induce una alta respuesta de IgAs, consistente a estos agentes proteicos solubles no replicativos, pero que requiere una evaluación sistemática de regímenes de inmunización para encontrar la combinación óptima de forma del antígeno, dosis, ruta de administración y esquema de inmunización. Las vacunas utilizando bacterias vivas, expresando los CFAs más prevalentes y productoras de enterotoxinas, deben de considerarse; ya que la bacteria al multiplicarse en el intestino puede proporcionar una estimulación antigénica del sistema inmune intestinal local (2,4,17,23,31,32,68,102,106,107,108,113, 114).

II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es uno de los agentes etiológicos causantes de diarrea aguda más frecuentemente aislados en población infantil menor de 2 años y de turistas. Los Factores de Colonización (CFAs y PCFs) representan el medio por el cual la bacteria se adhiere al epitelio intestinal llevando a cabo el primer evento en la patogénesis de la infección por esta bacteria. El interés que tiene el encontrar una vacuna efectiva contra la enfermedad causada por ETEC en el que estén incluidos los factores de virulencia más importantes de esta bacteria hace necesario conocer la frecuencia de los nuevos factores putativos de colonización (PCFs) reportados, ya que se desconoce la frecuencia con que estos PCFs se encuentran en las cepas de ETEC aisladas de casos sintomáticos ó asintomáticos de humanos. El determinar que estos PCFs se encuentran presentes de manera importante en los aislamientos de ETEC nos dejaría abierta la posibilidad de que pudiesen ser incluidos en la utilización de una vacuna y que pudiesen ayudar a conferir protección total contra la enfermedad causada por ETEC.

Con el incremento de los factores de colonización reportados para este tipo de cepas, se hace evidente el interés de contar con técnicas que hiciesen más fácil ó accesible su determinación.

Sería interesante conocer si existe homología antigénica entre todos estos factores de colonización y si presentan en su secuencia de aminoácidos alguna región compartida para sintetizar un oligonucleótido, que codifique para aquella región conservada de estas estructuras, con el fin de ser utilizada en una prueba de escrutinio como una nueva estrategia que permita la detección y diferenciación de cepas de ETEC que presenten algún CFA.

III. HIPOTESIS

Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica que no presentan algún Factor de Colonización (CFA) como CFA/I, CFA/II y CFA/IV pueden poseer un Factor Putativo de Colonización (PCF) como PCFO166, PCFO159, 2230 y CFA/III, que sea importante por la frecuencia con que se presente en este tipo de cepas y participe en la patogénesis de la bacteria.

Los CFAs y PCFs presentan características similares en cuanto a su morfología y codificación genética, así como en la metodología empleada para purificarlos. Si tal similitud se refleja a nivel de homología antigénica e identidad de aminoácidos se podrá desarrollar nuevas estrategias en su identificación.

IV. OBJETIVOS

Conocer la prevalencia de factores putativos de colonización en cepas de ETEC aisladas de niños Mexicanos menores de 2 años y de los turistas Americanos.

Describir la presencia de homología antigénica y la identidad entre las secuencias de aminoácidos de las fimbrias de ETEC.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificación de antígenos putativos de colonización CFA/III, PCFO159, PCFO166 y 2230 de ETEC
- Producción de anticuerpos policlonales de conejo contra estos factores putativos de colonización de ETEC
- Clasificar las cepas de ETEC a estudiar aisladas de niños menores de 5 años pertenecientes a una comunidad del sur de la Ciudad de México y de turistas mediante un ensayo de hemaglutinación e hidrofobicidad
- Determinar la frecuencia de los factores putativos de colonización CFA/III, PCFO159, PCFO166 y 2230 en éstas cepas por PCF-Inhibición ELISA.
- Búsqueda de la homología antigénica (reactividad cruzada) de estos CFAs y PCFs de ETEC y la comparación de la identidad entre las secuencias de aminoácidos reportadas para estos factores de colonización.

V. MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas de referencia.

Tabla 4. Características de Factores de Colonización y Putativos Identificados en *E.coli* enterotoxigénica

| Cepa | Fimbria | Pérfil toxigénico | Serotipo | HARM |
|----------|---------|-------------------|----------|----------|
| H10407 | CFA/I | LT/ST;ST | O78:H11 | Hum,Bov |
| E1392-75 | CFA/II | LT/ST | O6:H | Bovino |
| E8775 | CFA/IV | LT/ST;ST | O25 | Hum,Bov |
| 2230 | 2230 | ST | O25:H16 | Negativo |
| 350C1 | PCFO159 | LT/ST | O159:H4 | Negativo |
| E7476A | PCFO166 | ST | O166:H27 | Hum,Bov |
| 260-1 | CFA/III | LT | O25:H | Negativo |

CFA=Factor de Colonización; PCF=Factor Putativo de Colonización;
HARM=Hemaglutinación resistente a D-manosa

Las siguientes cepas de ETEC fueron proporcionadas gentilmente por:

2230 Dra. Arlette Darfeuille-Michaud, Clermont, Francia;

350C1 (PCFO159) Dr. C. Tacket, Baltimore, Maryland, USA;

E7476 (PCFO166), Dra. M.McConnell, London, UK;

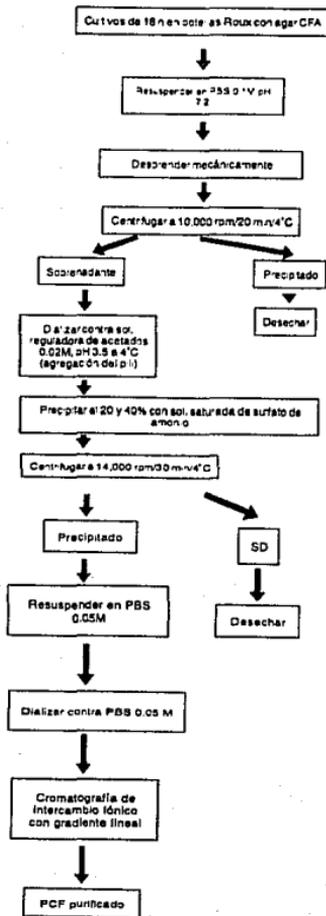
260-1 (CFA/III), Dr. T. Honda, Osaka, Japón.

V.1 Purificación de Factores Putativos de Colonización (PCFs) de *Escherichia coli* enterotoxigénica

V.1.1 Obtención de antígenos purificados. Se aplicó una metodología única para la obtención de los antígenos basándonos principalmente en la descrita por Evans y cols. (29). El método establecido consiste en la homogeneización de la bacteria para liberar las fimbrias, seguida por precipitación con sulfato de amonio.

El antígeno crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico a través de una columna de DEAE-Sepharosa con gradiente lineal de cloruro de sodio (Diagrama 1).

Diagrama 1. Obtención y Purificación de PCFs



La pureza de los antígenos se determinó por electroforesis SDS-PAGE usando el método de Laemmli (64). Las preparaciones de antígeno se suspenden en solución amortiguador (Tris/HCL, SDS y β -Mercaptoetanol), se calientan a 100°C/5min y se someten a corrimiento electroforético en Phast-System (250 V, 65 A, 20 min).

V.2 Producción y Caracterización de los anticuerpos policlonales anti PCF (2230, PCF0166, PCF0159, CFA/III). Titulación, Sensibilidad y Especificidad.

V.2.1 Antígenos para inmunización. Se utilizaron las diferentes cepas de referencia formalinizadas ajustadas a una concentración de 10^8 UFC/ml. El procedimiento de formalización consiste básicamente en suspender a la bacteria con una solución de formaldehído al 0.5%, se deja aproximadamente 3 horas y después de una serie de lavados se resuspende la bacteria en la misma solución y se ajusta a la concentración deseada.

V.2.2 Esquema de inmunización. Los anticuerpos anti-PCF fueron producidos en conejos a los que se les administró 1 ml de bacteria formalinizada (10^8 UFC/ml) a intervalos de 1 semana, durante 1 mes. La primera inmunización fue administrada con adyuvante completo de Freund. Los animales fueron sangrados por punción cardíaca 1 semana después de la última inmunización (Tabla 5).

Tabla 5. ESQUEMA DE INMUNIZACION CON ETEC FORMALINIZADA QUE EXPRESA PCF

| Tiempo (días) | Dosis (UFC/ml) | Vía de administración |
|---------------|-------------------|----------------------------------|
| 0 | 10^8 | Intramuscular (500 ul) +(500 ul) |
| 7 | 10^8 | Intravenosa (500 ul) |
| 14 | 10^8 | Intravenosa ídem |
| 21 | 10^8 | Intravenosa ídem |
| 28 | 10^8 | Intravenosa ídem |
| 35 | Sangría en blanco | |

ACF=Adyuvante Completo de Freund; UFC=Unidades Formadoras de Colonias

V.2.3 Obtención de mutantes. Para obtener variantes negativas que nos permitiese adsorber los sueros para hacerlos específicos (116) se utilizó un agente químico mutagénico como el bromuro de etidio; por otro lado, se buscaron mutantes espontáneas por subcultivos repetidos de las cepas de referencias y creciéndolas a 18°C.

V.2.4 ELISA. La determinación de la dilución óptima de trabajo (titulación) para los diferentes anticuerpos se hizo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) (77).

V.2.5 Inmunodot. Para obtener un suero específico se adsorbió con la mutante deficiente del PCF. Para determinar esta especificidad antes y después de la adsorción se utilizó el ensayo de inmunodot sobre membranas de nitrocelulosa a los que se les aplicó los diferentes antígenos provenientes de las cepas de referencia (así se contaban con controles negativos y el control positivo), se dejan adsorber los antígenos, las membranas se bloquean con albúmina sérica bovina (ASB) seguido por varios lavados. Se aplica el anticuerpo a probar, se deja reaccionar; después de una serie de lavados, se agrega el conjugado marcado con peroxidasa para posteriormente revelar con α -naftol + H₂O₂. La reacción se interpreta mediante la presencia de "manchas" que manifiestan que la reacción antígeno-anticuerpo se ha llevado a cabo.

V.3 Caracterización de las cepas de ETEC.

Población en estudio.

Grupo 1. En el Departamento de Infectología del INNSZ se cuenta con un banco de cepas de ETEC aisladas de 228 niños, pertenecientes a una comunidad del sur de la ciudad de México, que fueron seguidos en un estudio longitudinal realizado de Abril a Julio de 1987.

De 241 cepas de ETEC identificadas, 110 de ellas, 46%, presentaron algún factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/IV), por lo que en este estudio se incluyó el 54% restante, 131 cepas que no presentaron ningún CFA. (Fig. 2) (73). De las cepas, que se encontraban almacenadas a -20°C, pudieron recuperarse 60 que son las que se refieren a continuación: 18 (30%) fueron aisladas de niños con cuadros agudos de diarrea (sintomáticos) y 42 (70%) aisladas de niños asintomáticos. Se definió a un episodio diarreico como: a) al menos 1 día con 3 o más evacuaciones acuosas en 24 horas, b) al menos 2 más del patrón diario habitual con cambios en la consistencia de las heces. La infección por ETEC fue considerada asintomática cuando hubieron al menos 5 días consecutivos libres de síntomas antes y después del aislamiento de ETEC en heces (73).

Grupo 2. De 145 cepas de ETEC aisladas de cuadros diarreicos en 191 estudiantes americanos, que asistían a la Universidad de Guadalajara durante los 2 meses de verano (Julio y Agosto de 1987), 81 de ellas (56%) presentaron algún tipo de CFA (Fig. 3); del resto, 64 cepas, se recuperaron 21 que se incluyeron en este estudio para la búsqueda de PCFs.

V.3.1 Identificación de toxinas. La detección de enterotoxinas se llevó a cabo por los ensayos inmunoenzimáticos GM₁-ELISA-LT e inhibición GM₁-ELISA-ST (104,105).

V.3.2 Ensayos de Hemaglutinación (HA). Las características hemaglutinantes de las cepas de ETEC hacia diferentes especies de eritrocitos (Humano grupo A, pollo, cuyo y bovino) se llevó a cabo en portaobjetos, adicionando 10 ul de la suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 10¹⁰ bacteria/ml + 10 ul de la suspensión de eritrocitos en salina con y sin D-manosa al 1%

V.3.3 Hidrofobicidad (h). La prueba se efectúa en portaobjetos mezclando 50 ul de la suspensión bacteriana con cada una de las diferentes concentraciones de la sal de amonio (de 0.05M a 3M).

V.3.4 PCF-Inhibición ELISA. La identificación de los factores putativos de colonización para determinar su frecuencia fue realizada por PCF-Inhibición ELISA utilizando anticuerpos policlonales específicos para cada PCF. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 2230, PCF0159, PCF0166 ó CFA/III purificados, bloqueadas con ASB seguida por varios lavados. Los PCFs fueron detectados por su capacidad para inhibir la unión de los anticuerpos anti-PCF a los PCF purificados unidos a la fase sólida. Las placas fueron incubadas y después lavadas, un conjugado anti-Ig totales de conejo marcado con peroxidasa de rábano (Dako Immunochemicals, E. U. A.) para posteriormente desarrollar la reacción con el sustrato de la enzima (77).

V.4 Homología antigénica (Reactividad cruzada). La reactividad cruzada entre diferentes CFAs y PCFs fue determinada por ELISA-Inhibición. Anticuerpos monoclonales (MAbs) contra CFA/I, CS1, CS2 y CS3 de CFA/II, CS4 y CS6 de CFA/IV y anticuerpos policlonales contra CFA/III, 2230, PCF0166 y PCF0159 fueron utilizados. El anticuerpo monoclonal CS5 no fue utilizado porque es de tipo IgA, siendo los demás MAbs de tipo IgG. Las placas de ELISA fueron cubiertas con los antígenos nativos (CFAs y PCFs purificados). Posteriormente se adicionaron los antígenos homólogos o heterólogos desnaturalizados junto con los diferentes anticuerpos. El porcentaje de inhibición de la unión de los anticuerpos a los antígenos

unidos a fase sólida indica el grado de homología.

V.5 Comparación de secuencias de aminoácidos (aa) entre los diferentes PCFs de ETEC.

Utilizando el análisis por computadora de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas (PCGENE) (7), se capturaron las secuencias de aminoácidos (aa) reportadas de los diferentes CFAs y PCFs (6,15,36,45,46,56,59,69,89). El alineamiento entre las proteínas fue hecho por el método de Myers & Miller (86) el cual compara y define por desplazamiento de los aa, hasta encontrar su máxima identidad las regiones homólogas existentes entre cada una de ellas.

VI. RESULTADOS

VI.1 Purificación de Factores Putativos de Colonización de ETEC.

VI.1.1 Obtención de antígenos. Purificación y Rendimiento. Se utilizó una cromatografía con una resina de intercambio iónico que mostró un perfil de corrimiento como se observa en la Fig. 4, donde el PCF fue obtenido en el primer pico, el segundo pico son restos de fragmentos celulares, se muestra únicamente una figura, ya que en todos los procesos fue muy parecido para cada uno de los PCFs;

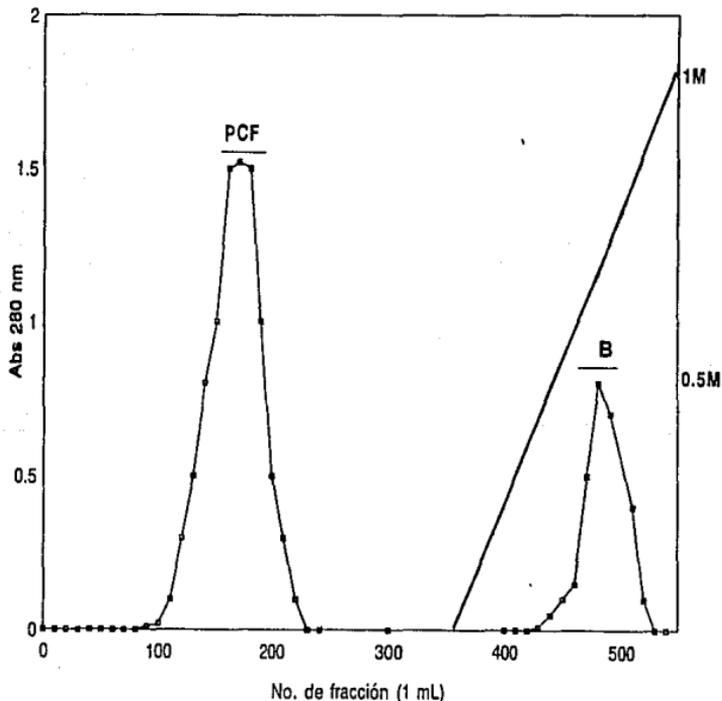


Fig. 4 Cromatografía en DEAE-Sephadex

El rendimiento obtenido para cada uno de los antígenos purificados se muestra en la tabla 6; dichos rendimientos fueron calculados en base a la concentración de proteínas (Método de Bradford) (12), al inicio y terminación del proceso de obtención y purificación de los antígenos.

Tabla 6. PURIFICACIÓN Y RENDIMIENTO DE ANTIGENO 2230, PCFO166, CFA/III y PCFO159 DE CEPAS PROTOTIPO DE ETEC

| PCF | Ag crudo (ug/ml)* | Ag purificado (ug/ml)* | Rendimiento (%) |
|---------|-------------------|------------------------|-----------------|
| 2230 | 1027.2 | 132.8 | 12.93 |
| 0166 | 810 | 325 | 40.12 |
| CFA/III | 775 | 350 | 45.16 |
| O159 | 595 | 290 | 48.74 |

PCF=Factor Putativo de Colonización; *=Método de Bradford (12);(%)=Porcentaje

En las siguientes figuras se muestra la imagen obtenida por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% teñidos con Azul de Coomassie al 0.25% durante el proceso de obtención y purificación de los Factores Putativos de Colonización. El peso molecular de los antígenos purificados varía de 15.5 a 19 Kda.



Fig. 5A Columna 1 marcadores de peso molecular; columna 2 y 3 sobrenadante de cultivo antes de la agregación de la proteína; columna 4 precipitado después de la agregación de la proteína; columna 5 precipitado que se desecha después del desprendimiento mecánico de la fimbria; columna 6 antígeno crudo concentrado para purificación por cromatografía de intercambio iónico; columna 7 sobrenadante que se desecha después de la precipitación con sulfato de amonio. La flecha señala la posición en que migra la proteína fimbrial de un PM de 15.5 a 19 Kda.

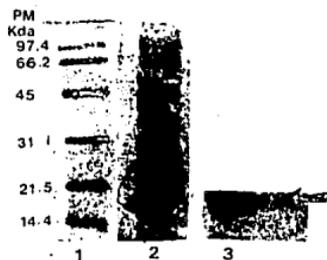


Fig. 5B Columna 1 marcadores de peso molecular; columna 2 antígeno crudo a purificar por cromatografía de intercambio iónico; columna 3 PCF purificado. La flecha señala la posición en que migra la proteína fimbrial.

VI.2 Producción y Caracterización de Anticuerpos Policlonales de conejo anti PCF (2230, PCFO166, PCFO159, CFA/III). Titulación, Sensibilidad y Especificidad.

Para llegar a producir anticuerpos policlonales contra factores de colonización es necesario cuidar los siguientes eventos para lograrlo.

VI.2.1 Antígenos para inmunización. El tipo de antígenos o inmunógenos utilizados para inducir una respuesta inmunológica en el animal seleccionado involucra la utilización de antígenos purificados, antígenos crudos o bacterias. Las cepas formanilizadas de ETEC de referencia que expresen las fimbrias en su superficie sin alteración alguna, es una alternativa para la inducción de los anticuerpos.

Las ventajas de este inmunógeno es obviar la necesidad de utilizar el antígeno purificado y la fimbria es presentada en su forma intacta.

VI.2.2 Esquema de inmunización. Existen diversos esquemas de inmunización establecidos para la obtención de anticuerpos dependiendo el tipo de antígeno a utilizar, bacteria, proteína, lipopolisacárido (51,111). De acuerdo al esquema seleccionado (Tabla 5) éste se consideró adecuado para nuestros fines. La respuesta inmunológica se incrementa conforme al número de inmunizaciones realizadas y respecto al tiempo (Fig. 6).

VI.2.3 Obtención de mutantes Para llegar a obtener un antisuero específico, es necesario la adsorción del mismo con cepas mutantes, es decir la misma bacteria que se inoculó pero que no posee el antígeno de interés, en este caso el factor putativo de colonización; para lograr la mutación pueden emplearse diferentes métodos, uno de ellos es la utilización de agentes químicos como el bromuro de etidio; sin embargo, la utilización de estos agentes implica que no solamente pierden el factor de colonización, sino que además se afecta toda su información genética. La mejor opción fue buscar mutantes espontáneas por subcultivos repetidos creciéndolas a 18°C. Se corrobora que ya no expresen la adhesina por Inhibición-PCF ELISA.

VI.2.4 ELISA. Dada la alta sensibilidad y especificidad del método de ELISA fue utilizada para la titulación de los anticuerpos antes y después de la adsorción contra sus antígenos homólogos. La respuesta humoral de cada animal se incrementó en función del número de dosis del inmunógeno y por lo tanto respecto al tiempo.

Los títulos de anticuerpos contra cada uno de los PCF se encontraron en el intervalo de 2.796 (log de la dil 1:1500) a 3.495 (log de la dil 1:3125) como se muestra en las gráficas correspondientes (Fig. 7). Se puede observar también la disminución de un logaritmo en el título de la dilución después de la adsorción del suero hiperinmune con la variante negativa.

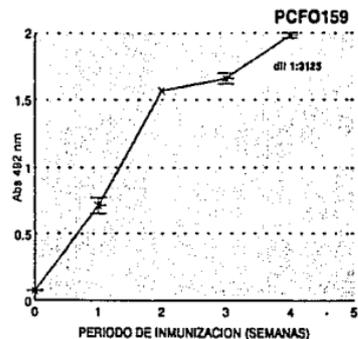
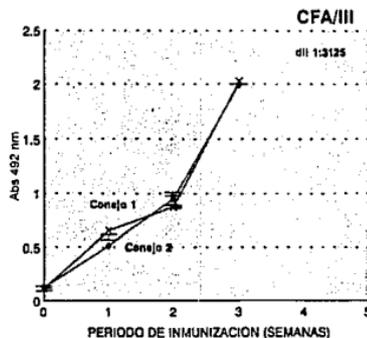
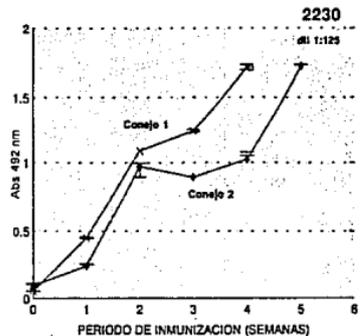
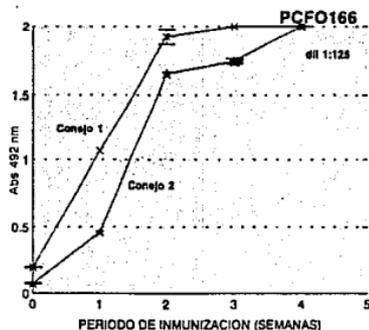


Fig. 6 Detección de anticuerpos por ELISA contra los diferentes PCFs de ETEC

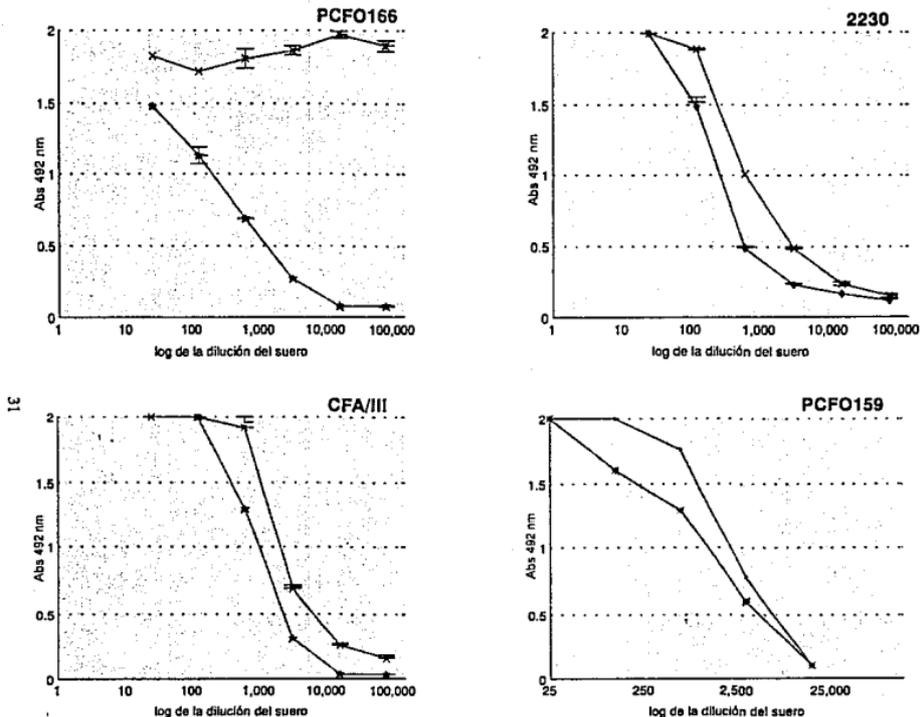


Fig. 7 Titulación de sueros hiperinmunes pre (+) y post (*) por ELISA adsorbidos contra los diferentes PCFs de ETEC

VI.2.5 Inmunodot. Este ensayo se caracteriza por ser altamente específico, aunque poco sensible y fue utilizado para demostrar que los anticuerpos policlonales obtenidos fueran específicos para cada antígeno para el que habían sido producidos una vez adsorbidos. El antisuero reacciona únicamente con el antígeno proveniente de la cepa que expresa el PCF homólogo. Ninguno de los policlonales presentó reacción cruzada con los antígenos heterólogos (Fig. 8).

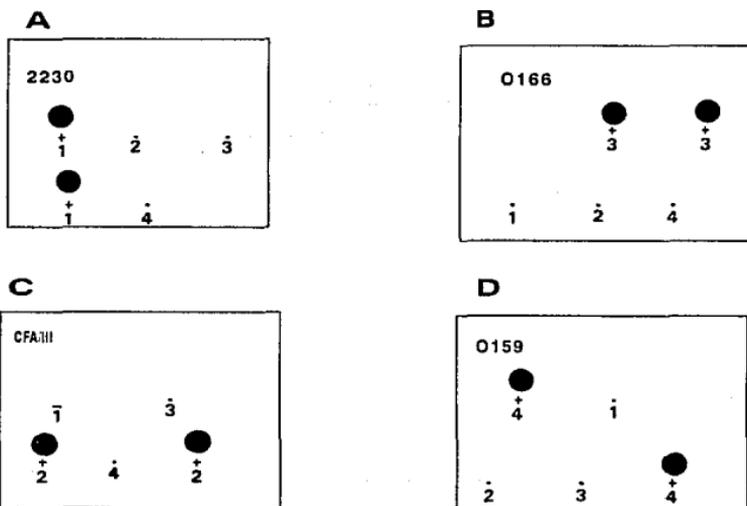


Fig. 8 Especificidad de Anticuerpos Policlonales vs PCFs

1. antígeno 2230; 2. antígeno CFA/III; 3. antígeno PCFO166; 4. antígeno PCFO159; A. anticuerpo anti-2230; B. anticuerpo anti CFA/III; C. anticuerpo anti PCFO166; D. anticuerpo anti PCFO159

VI.3 Caracterización de las cepas de ETEC

VI.3.1 Identificación de toxinas. De un total de 81 cepas de ETEC procedentes de turistas Americanos y de niños Mexicanos menores de 2 años, el 52% (42) fueron productoras de ST, 27% (22) productoras de LT y 21% (17) de ellas para ambas (Tabla 7).

Tabla 7.
**Pérfil toxigénico de las 81 cepas de ETEC incluidas en el estudio
provenientes de niños y turistas**

| Población | No. de cepas | Pérfil toxigénico | | |
|-----------|--------------|-------------------|--------|--------|
| | | LT | ST | LT/ST |
| Turistas | 21 | 5(24) | 8(38) | 8(38) |
| Niños | 60 | 17(28) | 34(57) | 9(15) |
| Total | 81 | 22(27) | 42(52) | 17(21) |

LT=Toxina termolábil; ST=Toxina termoestable; ()=porcentaje

VI.3.2 Ensayos de Hemaglutinación (HA). A las 81 cepas de ETEC se estudió su capacidad hemaglutinante (HA); de las cepas aisladas de turistas sólo el 33% presentó HARM positiva y el 67% restante no fue capaz de hemaglutinar ninguna de las especies de eritrocitos probados; se observaron porcentajes similares en las cepas de ETEC aisladas de niños, en las que el 37% fue HARM positivo y el 63% fue HARM negativo (Tabla 8). En ambos grupos de cepas se encontró que independientemente de su perfil toxigénico la mayoría de ellas no fueron capaces de hemaglutinar ninguna especie de eritrocitos.

Tabla 8. Capacidad Hemaglutinante de 81 cepas de ETEC aisladas de niños y turistas en base al perfil toxigénico

| Perfil toxigénico y tipo de población | No. de cepas n | HARM | |
|--|-------------------|------------------|------------------|
| | | positiva n(%) | negativa n(%) |
| Turistas | | | |
| LT | 5 | 1 (20) | 4 (80) |
| ST | 8 | 4 (50) | 4 (50) |
| LT/ST | 8 | 2 (25) | 6 (75) |
| Niños | | | |
| LT | 17 | 4 (24) | 13 (76) |
| ST | 34 | 15 (44) | 19 (56) |
| LT/ST | 9 | 3 (33) | 6 (67) |
| Total: | 81 | 29 (36) | 52 (64) |

HARM = Hemaglutinación resistente a D-manosa; () = porcentaje

VI.3.3 Determinación de la hidrofobicidad (h). La hidrofobicidad de la superficie bacteriana fue medida determinando la concentración más baja de sulfato de amonio en que la bacteria se agrega.

El 67% (14/21) de las cepas de turistas y el 80% (48/60) de las cepas aisladas de niños fueron hidrofóbicas, es decir fueron capaces de agregarse a una concentración < 1.0 M de sulfato de amonio (Tabla 9). La mayoría de las cepas sin importar su perfil toxigénico ni su procedencia fueron hidrofóbicas.

Tabla 9. Porcentaje de hidrofobicidad en 81 cepas de ETEC en base al perfil toxigénico

| Perfil toxigénico en cepas de ETEC | No. de cepas n | Hidrofobicidad | |
|------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | | Positiva n(%) | Negativa n(%) |
| Turistas | | | |
| LT | 5 | 4 (80) | 1 (20) |
| ST | 8 | 7 (78) | 2 (22) |
| LT/ST | 8 | 3 (43) | 4 (57) |
| Niños | | | |
| LT | 17 | 13 (76) | 4 (24) |
| ST | 34 | 28 (82) | 6 (18) |
| LT/ST | 9 | 7 (78) | 2 (22) |
| Total | 8 | 62 (77) | 19 (23) |

(%)=Porcentaje; n=número de cepas

Perfiles de asociación entre la capacidad de hemaglutinación (HA) e hidrofobicidad (h). El perfil de asociación entre HA y h más frecuente fue HA⁻/h⁺ en el 48% de las cepas aisladas de turistas y en 45% de las ETEC aisladas de niños. El siguiente patrón fue HA⁺/h⁺ en 19% de las cepas aisladas de turistas y en 35% de las aisladas de niños (Tabla 10).

Es interesante hacer notar que la mayoría de las cepas se agruparon con características de hidrofobicidad positiva 67% para los turistas y el 80% en las cepas de ETEC de los niños; el 76% de las cepas provenientes de turistas no hemaglutinaron ningún tipo de eritrocitos y el 63% de las cepas de ETEC provenientes de niños tampoco lo hizo. Solamente un 24% de las cepas de ETEC provenientes de turistas y un 37% para las cepas provenientes de niños aglutinaron al menos una especie de eritrocitos.

Tabla 10. Asociación de los perfiles de hemaglutinación e hidrofobicidad en 81 cepas de ETEC

| Población | Cepas (n) | Perfiles de HA/h | | | |
|-----------|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | HA ⁻ /h- n % | HA ⁻ /h+ n % | HA ⁺ /h- n % | HA ⁺ /h+ n % |
| Turistas | (21) | 6 (28) | 10 (48) | 1 (5) | 4 (19) |
| Niños | (60) | 11 (15) | 27 (45) | 1 (2) | 21 (35) |

HA=Hemaglutinación; h=hidrofobicidad; ()=porcentaje; n=número de cepas

VI.3.4 Frecuencia de PCFs por Inhibición-PCF ELISA. De las 60 cepas aisladas de población infantil solamente 15 de ellas (6.2%) presentaron algún factor putativo de colonización de los cuales el 2230 estuvo presente en 8 cepas (3.3%); el PCFO166 en 6 cepas (2.5%), el PCFO159 únicamente se presentó en 1 de ellas (0.4%), y un 18.5% de cepas no presentaron ninguno de los PCFs estudiados (Fig. 9).

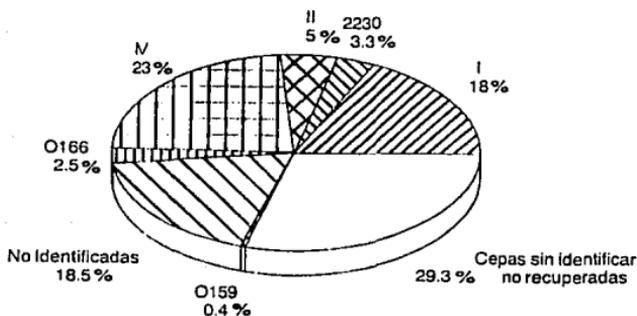


Fig.9 Frecuencia de CFA's y PCF's en cepas de ETEC aisladas de niños

En las 18 cepas provenientes de diarrea en niños la frecuencia de los PCFs presentes fueron, 2230 en un 1.3% y el PCFO159 en un 0.4%

En el grupo de cepas de asintomáticos la frecuencia de los PCFs encontrados fueron 2230 y O166 en un 2.0 y 2.5% respectivamente.

El que algún factor de colonización este mayormente asociado a cepas que procedan de cuadros de diarrea ó de casos asintomáticos no es estadísticamente significativo ($X^2=0.1058, p=0.745$).

Existe una diferencia estadísticamente significativa ($X^2=5.41, p=0.06$) que las cepas que provienen de cuadros asintomáticos en niños estén asociadas al antígeno 2230 que las que proceden de cuadros sintomáticos.

La búsqueda de asociación con la presencia de PCFO166 y PCFO159 asociada con alguno de los grupos de origen de las cepas no se llevó a cabo debido a que en ambos casos uno u otro PCF no estuvo presente en alguno de los grupos de cepas. Los datos se pueden observar en la tabla 11.

Tabla 11. Distribución de PCFs en las cepas de ETEC aisladas de población infantil

| | Número de cepas (n) | Sin fimbrias n (%) | Fimbriadas n (%) | 2230 | O166 | O159 | III |
|---------------|---------------------|--------------------|------------------|---------|--------|--------|-----|
| Sintomáticos | 18 | 14 (5.8) | 4(1.7) | 3(1.3) | 0 | 1(0.4) | 0 |
| Asintomáticos | 42 | 31(12.9) | 11(4.6) | 5(2.0)* | 6(2.5) | 0 | 0 |

(n)= número de cepas; % =porcentaje; * =p=0.06

De las 21 cepas de ETEC recuperadas del grupo de turistas que presentaron cuadros agudos de diarrea durante su estancia en la ciudad de Guadalajara 1986-1987, solamente en 11 cepas (7.5%) estuvo presente algún PCF. El antígeno 2230 y PCFO166 se presentaron en la misma proporción 3% y el PCFO159 se encontró en 3 (2%) de ellas. En 10 de ellas (7%) no se encontró ninguno de los PCFs estudiados (Fig. 10). La frecuencia de CFA/III en los grupos de cepas de ETEC estudiadas fue nula (0%). Es importante hacer notar que los porcentajes encontrados de estos PCFs en ambos grupos de cepas son relativamente pequeños en comparación con los anteriormente buscados (CFA/I,II y IV), datos reportados por diferentes autores.

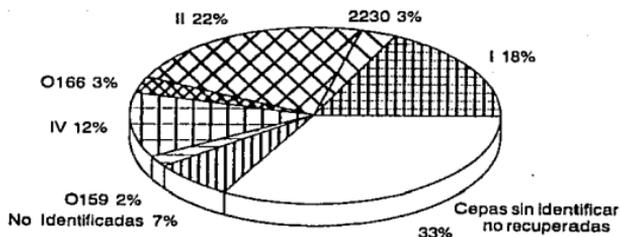


Fig.10 Frecuencia de CFA's y PCF's en cepas de ETEC aisladas de turistas

VI.4 Correlación entre Hidrofobicidad y Presencia de PCFs. Todos los CFAs y PCFs reportados hasta el momento están relacionados con la hidrofobicidad de la superficie bacteriana de las cepas que los poseen.

- Se realizó un análisis de correlación de kappa, entre hidrofobicidad y la presencia de PCFs detectados por Inhibición-PCF ELISA en las 26 cepas de ETEC que fueron positivas para algún tipo de PCF, encontrándose una correlación del 93.83% con un valor de kappa de 0.85 con una $z=7.74$ con una $p=0.000$. La sensibilidad del método de hidrofobicidad asociado a la expresión de un PCF es del 80.7% con una especificidad del 100%, cuyo Valor Predictivo Positivo (VPP) es del 100% y el Valor Predictivo Negativo es del 91.67%.

Las cepas no hidrofóbicas que expresaron algún PCF estuvieron relacionados a 2230 y a PCFO159, esto posiblemente se explique por la diferente expresión fenotípica de estos antígenos en la superficie bacteriana.

VI.5 Homología antigénica. Se demostró la existencia de homología antigénica entre los diferentes factores de colonización de ETEC utilizando el ensayo de ELISA-Inhibición. Los CFAs y PCFs utilizados para determinar la presencia de homología fueron CFA/I, CFA/II (CS1 + CS3, CS2 + CS3); CFA/IV (CS4 + CS6, CS5 + CS6); CFA/III, 2230, PCFO166 y PCFO159. Los sueros policlonales obtenidos en conejo contra los diferentes PCF en su forma nativa, así como los anticuerpos monoclonales reaccionaron con sus antígenos homólogos; sin embargo, los mismos sueros fueron capaces de reconocer formas desnaturalizadas de antígenos heterólogos, es decir, reconocieron antígenos de un tipo diferente al que había sido utilizado para inducir la respuesta inmune.

El grado de inhibición de la unión de los anticuerpos anti-CFAs ó anti-CS a CFAs unidos a la fase sólida por los antígenos desnaturalizados, el porcentaje de inhibición se estableció como significativo cuando fue mayor ó igual al 50%, estos datos se pueden observar en la tabla 12. Así encontramos que entre **CFA/I** existe reactividad cruzada con CS1 y CS3 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166; entre **CS1** y **CS3** de CFA/II encontramos una reactividad cruzada con CFA/I, CFA/III y PCFO166; para **CS2** de CFA/II se encontró que con CFA/I y PCFO166 reacciona cruzadamente; **CFA/III** reacciona cruzadamente con CFA/I, CS2 y CS3 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166; **CS4** y **CS6** de CFA/IV reaccionaron con CFA/I, CS1 de CFA/II, 2230 y PCFO166; **CS5** y **CS6** de CFA/IV reacciona cruzadamente con CFA/I, CS1 y CS3 de CFA/II, 2230 y PCFO166; **2230** reaccionó cruzadamente con CS1 y CS3 de CFA/II y **PCFO166**; **PCFO166** cruzó con CFA/I, CS3 de CFA/II y 2230; **PCFO159** reaccionó cruzadamente con CS1 y CS3 de CFA/II, CS4 de CFA/IV, CFA/III y PCFO166. La más alta homología fue encontrada entre **CFA/I, CS1** y **CS3** de CFA/II, **CS4** de CFA/IV y **PCFO166**.

Debe hacerse notar que no utilizamos el anticuerpo monoclonal anti CS5 debido a que este anticuerpo está constituido por IgAs, a diferencia de los demás anticuerpos que son de tipo IgG.

Tabla 12. Homología antigénica de los factores de colonización en forma desnaturalizada de Escherichia coli enterotoxigénica: CFA/I, CFA/II (CS1+CS3,CS2+CS3),CFA/III, CFA/IV (CS4+CS6,CS5+CS6),2230, PCFO166 y PCFO159

| ANTIGENO | Anticuerpos Monoclonales | | | | | | Anticuerpos Policlonales | | | |
|-------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|------|------|------|
| | I | CS1 | CS2 | CS3 | CS4 | CS6 | III | 2230 | 0166 | 0159 |
| CFA/I | 79 | 54 | 10 | 49 | 57 | 23 | 34 | 35 | 73 | 0 |
| CFA/II CS1+CS3 | 52 | 69 | 30 | 99 | 36 | 0 | 68 | 33 | 60 | 0 |
| CFA/II CS2 | 56 | 0 | 52 | 0 | 0 | 0 | 42 | 49 | 65 | 0 |
| CFA/III | 61 | 0 | 75 | 68 | 64 | 0 | 90 | 41 | 67 | 0 |
| CFA/IV CS4+CS6 | 52 | 59 | 33 | 11 | 89 | 99 | 41 | 57 | 75 | 0 |
| CFA/IV CS5+CS6 | 63 | 63 | 19 | 79 | 7 | 54 | 42 | 52 | 80 | 0 |
| 2230 | 46 | 66 | 0 | 99 | 36 | 0 | 36 | 52 | 80 | 0 |
| PCFO166 | 61 | 44 | 41 | 99 | 48 | 0 | 38 | 55 | 89 | 0 |
| PCFO159 | 0 | 86 | 43 | 90 | 50 | 0 | 50 | 36 | 77 | 73 |

Los antígenos fueron desnaturalizados y ajustados a una concentración de 40 ug/ml

Los números indican porcentaje de inhibición de la unión de los anti-CFAs ó anti-CS a sus antígenos homólogos ó heterólogos unidos a fase sólida.

VI.6 Comparación de secuencias de aa entre los diferentes CFAs y PCFs de ETEC utilizando el análisis por computadora de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas (PCGEN). Una vez determinada experimentalmente la reactividad cruzada, nuestra inquietud fue determinar por programas de computación tales como PC-GEN si existía identidad ó similitud a nivel de las secuencias de aminoácidos conocidas para CFAs y PCFs de ETEC.

Aún cuando diversos autores han reportado secuencias para las diferentes subunidades fimbriales proteicas de ETEC, un análisis de su similitud se ve afectada, dado que en algunas de ellas sólo se cuenta con la secuencia correspondiente a la porción amino terminal; además en casos como el de los antígenos CS6 de CFA/IV, PCFO159 y CFA/III no se ha reportado ninguna secuencia. El contar con un mayor número de secuencias reportadas nos permitirá realizar un análisis de identidad más completo entre todas las subunidades fimbriales de ETEC conocidas.

En la Tabla 13 se puede observar el grado de homología (identidad) existente entre las regiones amino terminales de las diferentes secuencias de las fimbrias. CFA/I, CS1 y CS2 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166 son las que presentan el mayor grado de homología entre ellas, que va del 70 al 80% de identidad en sus aminoácidos. El resto de las secuencias presenta un grado de homología menor y muy variable que va del 5 al 25%

Cuando un aa puede ser sustituido por otro sin que afecte la actividad biológica de la proteína se le llama similitud, al comparar las secuencias por su similitud únicamente CS5 presenta un porcentaje que podría ser significativo (del 32 al 35%) con las secuencias de PCFO166, CS2 y CS4 (Tabla 14). La identidad en las secuencias de aa en las diferentes subunidades de los CFAs y PCFs son mayores que las similitudes entre los mismos.

Tabla 13. Identidad entre las secuencias de aminoácidos de los CFAs y PCFs de ETEC

| | CFAI* | CS1* | CS2* | CS3* | CS4* | CS5* | 2230* | 0166* | PCF09* | 8786* |
|--------------|----------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|--------|---------|----------|
| <i>CFAI</i> | — | 76(51.7) | 19(95) | 17(11.6) | 17(85) | 25(17) | 7(24.1) | 21(84) | 6(20) | 18(12.3) |
| <i>CS1</i> | 75(51) | — | 14(70) | 15(10.2) | 14(70) | 24(16.2) | 5(17.2) | 19(76) | 5(16.7) | 19(13) |
| <i>CS2</i> | 19(95) | 14(70) | — | 5(25) | 16(80) | 5(25) | 5(25) | 17(85) | 4(20) | 1(5) |
| <i>CS3</i> | 21(14.3) | 15(10.2) | 5(25) | — | 4(20) | 21(14.3) | 9(31) | 4(16) | 3(10) | 18(12.3) |
| <i>CS4</i> | 17(85) | 14(70) | 16(80) | 4(20) | — | 5(25) | 1(5) | 19(95) | 4(20) | 4(20) |
| <i>CS5</i> | 27(18.4) | 24(16.2) | 5(25) | 21(14.3) | 5(25) | — | 6(20.7) | 5(20) | 8(26.7) | 23(15.8) |
| <i>2230</i> | 7(24.1) | 5(17.2) | 5(25) | 9(31) | 1(5) | 6(20.7) | — | 2(8) | 4(13.8) | 3(10.3) |
| <i>0166</i> | 21(84) | 19(76) | 17(85) | 4(16) | 19(95) | 5(20) | 2(8) | — | 2(8) | 5(20) |
| <i>PCF09</i> | 6(20) | 5(16.7) | 4(20) | 3(10) | 4(20) | 6(20) | 4(13.8) | 2(8) | — | 8(26.7) |
| <i>8786</i> | 13(8.9) | 15(10.3) | 6(30) | 19(13) | 3(15) | 23(15.8) | 3(10.3) | 5(20) | 4(13.3) | — |

* =secuencia de aa completa; * =secuencia de aa amino terminal; () = % de identidad

Tabla 14. Similitud entre las secuencias de aminoácidos de los diferentes CFA's y PCF's de ETEC

| | CFAI* | CS1* | CS2* | CS3* | CS4* | CS5* | 2230* | 0166* | PCF09* | 8786* |
|--------------|----------|----------|-------|----------|-------|----------|---------|-------|--------|---------|
| <i>CFAI</i> | — | 29(19.7) | 0(0) | 15(10.2) | 1(5) | 19(12.9) | 3(10.3) | 1(4) | 3(10) | 4(2.7) |
| <i>CS1</i> | 30(20.4) | — | 3(15) | 14(9.5) | 4(20) | 19(12.8) | 5(17.2) | 4(16) | 6(20) | 7(4.8) |
| <i>CS2</i> | 0(0) | 3(15) | — | 4(20) | 1(5) | 7(35) | 3(15) | 1(5) | 4(20) | 6(30) |
| <i>CS3</i> | 20(13.6) | 14(9.5) | 4(20) | — | 3(15) | 7(35) | 3(10.3) | 4(16) | 3(10) | 13(8.9) |
| <i>CS4</i> | 1(5) | 4(20) | 1(5) | 3(15) | — | 7(35) | 1(5) | 0(0) | 4(20) | 0(0) |
| <i>CS5</i> | 19(12.9) | 19(12.8) | 7(35) | 18(12.2) | 7(35) | — | 2(6.9) | 8(32) | 6(20) | 14(9.6) |
| <i>2230</i> | 3(10.3) | 5(17.2) | 3(15) | 3(10.3) | 1(5) | 2(6.9) | — | 0(0) | 1(3.4) | 4(13.8) |
| <i>0166</i> | 1(4) | 4(16) | 1(5) | 4(16) | 0(0) | 8(32) | 0(0) | — | 4(16) | 5(20) |
| <i>PCF09</i> | 3(10) | 6(20) | 4(20) | 3(10) | 4(20) | 6(20) | 1(3.4) | 4(16) | — | 3(10) |
| <i>8786</i> | 7(4.8) | 10(6.9) | 1(5) | 14(9.6) | 6(30) | 14(9.6) | 4(13.8) | 5(20) | 2(6.7) | — |

*=secuencia de aa completa; +=secuencia de aa amino terminal; () = % de similitud

VII. DISCUSION

El evento inicial en la patogénesis de la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica, es la adherencia al epitelio mediante una amplia variedad de adhesinas específicas (CFAs y PCFs); cuya expresión está cuantitativamente regulada para evitar el desgaste celular energético y de los recursos biosintéticos. Entre los mecanismos reguladores de la expresión de las adhesinas, se incluyen promotores de diferentes actividades, unidos a genes estructurales específicos, y represores y activadores difusibles, que modulan la expresión de la subunidad fimbrial y de otros genes. La síntesis de adhesinas también responde a ciertas condiciones extracelulares como la temperatura, además se ha descrito una variación de fase en la que la bacteria cambia de fases de expresión y no-expresión aparentemente al azar (48).

Para llevar a cabo la purificación de los factores de colonización es necesario, en primera instancia, que la bacteria exprese al máximo estos antígenos, por lo que es primordial establecer en el laboratorio las condiciones óptimas de producción, lo que se traduce en condiciones de crecimiento especiales como son la utilización del agar CFA y la adición de sales biliares a este medio para favorecer la expresión de los PCFs, así como la incubación de la bacteria a 37°C (80).

La utilidad de los diferentes métodos descritos para la obtención de antígenos purificados, depende en gran medida de la disponibilidad de equipo, reactivos y materiales en cada laboratorio, así como de la experiencia en el manejo de las técnicas de separación. Hasta el momento, las técnicas de purificación más utilizadas son la ultracentrifugación con gradientes de cloruro de cesio ó sacarosa (109) y la cromatografía de intercambio iónico (22,29,51,53). En este trabajo se utilizó la cromatografía de intercambio iónico para la purificación final, encontrándose que es un método excelente en la obtención de los antígenos de tipo fimbrial (CFA/III, PCFO166, PCFO159), dado que los rendimientos fueron superiores al 40%. En general, en los estudios donde se han utilizado estas técnicas de purificación no se reportan porcentajes de rendimiento y por ello no pudieron compararse los resultados (22,51,80,109).

Fue posible establecer una sola metodología, que se describe en el diagrama 1, para la purificación de todos los antígenos. Esto significó ventajas prácticas, ya que todas las cepas se manejaron de la misma manera, además de economía en cuanto a tiempo. La cantidad obtenida de cada antígeno fue adecuada para nuestros fines; sin embargo, los rendimientos obtenidos del antígeno 2230 fueron menores en comparación con los otros, esto puede ser debido al tipo de morfología no fimbrial de esta adhesina. Por

tal razón se recomienda utilizar otras alternativas como centrifugaciones a muy alta velocidad, ó precipitar la proteína de acuerdo a su punto isoeléctrico, y finalmente aplicar la cromatografía en la purificación. Otras alternativas que podrían utilizarse son las técnicas descritas para la preparación de proteínas de membrana externa de microorganismos (22). En general, si comparamos la cromatografía de intercambio iónico con el método de ultracentrifugación utilizando gradientes de cloruro de cesio ó sacarosa, la primera resultó ser más sencilla, más rápida, además de que pueden ser purificados grandes cantidades de antígeno, con altos rendimientos (22,29,109). El uso de este método de purificación, nos permitió conservar la capacidad antigénica de los factores putativos de colonización, característica fundamental para su utilización en métodos inmunoenzimáticos como ELISA. Podemos decir que la técnica descrita por Evans y cols (29), además de ser de bajo costo relativo, es aplicable en la purificación de diferentes antígenos fimbriales y estructuras de superficie.

La experiencia en la producción de anticuerpos policlonales, contra las diferentes fimbrias de ETEC ha sido muy diversa. Para ello se han utilizado antígenos puros, crudos y bacterias formalinizadas, en las que se ha descrito se mantiene la expresión de las fimbrias intactas, con sus características antigénicas (22,51,80,109). Por tal motivo, decidimos utilizar bacterias formalinizadas para la producción de sueros policlonales anti-PCFs. Cada uno de los sueros obtenidos presentó un título alto de anticuerpos, lo que nos permitió utilizarlos en diversos ensayos inmunológicos (aglutinación, inmunodifusión, inmunodot, ELISA) para la detección de estos PCFs (3,28,37).

Se han descrito métodos de escrutinio como hemaglutinación con diferentes especies de eritrocitos (18,25,110), e hidrofobicidad (50,70), que han permitido relacionar de manera indirecta la presencia de adhesinas en los diferentes aislamientos de ETEC; al analizar estas características en las cepas de este estudio, se encontró que el 77% de ellas fueron hidrofóbicas y el 64% no hemaglutinantes; estos datos sugirieron que existía una gran posibilidad de encontrar, entre ellas, cepas que expresaran los PCFs mencionados (22,51,80,109); sin embargo, existen algunas cepas que aglutinan aún en solución salina lo que hace imposible determinar la expresión de sus adhesinas por estos métodos. Estas cepas auto-aglutinantes requieren, para la determinación de la presencia de alguno de estos PCFs, de la utilización de otros ensayos como inmunodifusión en agar o ELISA (18,37,73,74,77,88).

Así, al asociar estas dos propiedades, pudimos clasificar a las 81 cepas de ETEC en 4 grupos a) HA/h⁺, b) HA/h⁺,c) HA⁺/h⁺,d) HA⁺/h⁺ Los perfiles mas frecuentemente encontrados fueron HA/h⁺ y HA⁺/h⁺en

un 48% y en un 19% para las cepas provenientes de turistas; para las cepas aisladas de niños estos mismos perfiles se presentaron en un 45% y en un 35% respectivamente.

Pocos han sido los grupos de investigadores que han estudiado la frecuencia de las nuevas adhesinas (PCFs) en aislamientos clínicos, una de nuestras principales metas fue detectar y determinar la frecuencia de adhesinas diferentes a CFA/I, II y IV en las poblaciones de alto riesgo (niños y turistas). Con este fin produjimos anticuerpos policlonales contra los factores putativos de colonización de ETEC (2230, CFA/III, PCFO159, PCFO166), que fueron utilizados en la prueba de PCF-Inhibición ELISA (80,110,111,112). El ensayo de CFA-Inhibición ELISA es uno de los métodos más específicos y sensibles, que permite determinaciones cuantitativas, y es accesible para cualquier laboratorio que cuente con antisueros específicos (3,77). Esta técnica ya ha sido empleada en estudios epidemiológicos (75,84,112), y puede aplicarse para seleccionar aquellas cepas que expresen la mayor cantidad de CFAs ó PCFs para utilizarlas en el diseño de vacunas de ETEC conteniendo factores de colonización y factores putativos de colonización, así como para evaluar condiciones de cultivo óptimas para la expresión máxima de los mismos (4,17,23,32,68,107,113).

Estudios previos de la búsqueda de los Factores de Colonización (CFAs) en *Escherichia coli* enterotoxigénica, en diferentes países del mundo, han demostrado que la frecuencia es muy variable, debido quizás a las áreas geográficas, pérdida de plásmidos y a los métodos empleados para su identificación (39,75,91). Cabe hacer notar que la frecuencia con que 2230, PCFO166 y PCFO159 se presentan en cepas de ETEC provenientes de aislamientos clínicos es muy baja (0.6 a 3.3%) y que el CFA/III no fué identificado en ninguno de los grupos de cepas estudiados. Se encontró que el antígeno 2230 se asoció con mayor frecuencia a casos asintomáticos; sin embargo, el número de cepas con las que se trabajó es pequeño, por lo que se recomienda llevar a cabo estudios epidemiológicos más amplios para determinar la prevalencia de estos antígenos en una población mayor; además, se cuestiona el papel patogénico que pueda tener 2230, puesto que no se han realizado estudios de patogénesis en humanos. El porcentaje de identificación de algún tipo de factor de colonización, entre las cepas estudiadas, se incrementó en un 6.2% entre las aisladas de población infantil; mientras que, para las cepas aisladas de la población de turistas tal incremento fué del 8%, disminuyéndose así el porcentaje de cepas que no presentan algún tipo de fimbria en la población estudiada.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por McConnell y cols (83), y por Viboud y cols (112), quienes encontraron que el porcentaje de identificación en cepas de ETEC provenientes de cuadros diarreicos se incrementaba en un 17 y 13% respectivamente; cabe hacer notar que en estos estudios se incluyó la búsqueda de otros antígenos como CS7, CS17 y PCFO9 (75,83,112).

Estos resultados nos indican que la frecuencia de los PCFs, en las cepas de ETEC, es menor en comparación con las frecuencias reportadas para los CFAs (CFA/I, CFA/II y CFA/IV), y que sigue existiendo una considerable variación en las proporciones y tipos de factores de colonización encontrados en las diferentes áreas geográficas (1,10,11,14,27,75,83,84,94).

La existencia de un 15-27% de cepas en las que no se identifica algún CFA o PCF, de los estudiados, puede explicarse como la existencia de variedades entre las fimbrias de las cepas de ETEC, que no han sido aún reconocidas, y que podrían participar en la patogénesis de la infección por ETEC. Sin embargo, no deben descartarse las posibles pérdidas de antígenos superficiales en cepas que hayan sido almacenadas por largo tiempo y en condiciones inadecuadas, los subcultivos repetidos que pudieran implicar pérdida de plásmidos; o bien, que existan cepas que sean solamente productoras de enterotoxina y que realmente no expresen ningún tipo de factor de colonización.

Cabe hacer notar que en nuestro estudio, aproximadamente el 30% de las cepas no fueron recuperadas después de su almacenamiento a -20°C , por lo que consideramos que es muy importante mantener un control estricto en el manejo y conservación de las cepas.

Al realizar un análisis de correlación de kappa entre el método de hidrofobicidad y la presencia de PCFs detectados por PCF Inhibición-ELISA, se encontró una correlación del 93.83% con un valor de kappa de 0.85 con una $z=7.74$ con una $p=0.000$, ésto nos indica que el ensayo de hidrofobicidad se puede utilizar como una prueba de escrutinio confiable para la búsqueda de nuevos factores de colonización en cepas de ETEC (50,70), siendo un método sencillo para cuantificar las propiedades hidrofóbicas de la superficie bacteriana.

Día a día surgen nuevos hallazgos y aparecen en la literatura descripciones de nuevas adhesinas, identificadas en cepas de ETEC que provocan episodios diarreicos (6,46,82); por ello es evidente la necesidad de contar con métodos sensibles y específicos para detectar los diferentes CFAs y PCFs que expresan las cepas de ETEC, ya que se ha sugerido que una vacuna efectiva contra este microorganismo

debe contener los factores de colonización más prevalentes (107), de ahí que sea importante y primordial conocer la frecuencia y la distribución de tales factores en cepas de ETEC de diferentes áreas geográficas.

En los estudios de homología antigénica llevados a cabo se encontró que, al desnaturizar las fimbrias y presentarlas en su configuración primaria, estos antígenos reaccionan de manera cruzada con anticuerpos heterólogos, siendo CFA/I, CS1 y CS3 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166 los que presentaron mayor porcentaje de homología. Esto sugiere la posibilidad de que al menos un epítipo es compartido en las fimbrias previamente mencionadas (Tabla 12); que sean determinantes antigénicos lineales los involucrados, y que quizás no se encuentran en la superficie, ya que esta reactividad solo se presentó al desnaturizar los antígenos. Estos resultados concuerdan con observaciones previas realizadas por McConnell y cols (81), donde demuestran que una reacción cruzada entre diversos antígenos fimbriales ocurre debido a las subunidades que constituyen a las diferentes fimbrias. Nuestros resultados también muestran que los anticuerpos policlonales son mejores que los anticuerpos monoclonales para el estudio de reactividad cruzada, puesto que reconocen más de un sitio antigénico de la proteína fimbrial; además, debe recordarse que éstos fueron preparados contra suspensiones formalinizadas de la bacteria completa, así que muchos de los anticuerpos deben estar dirigidos contra la fimbria íntacta.

La reactividad cruzada existente entre algunos de los CFAs y PCFs, se evaluó en porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos reportadas para las diversas subunidades fimbriales, encontrándose que CFA/I, CS1 y CS2 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166 son los que presentan mayor porcentaje de identidad entre ellos (Tabla 13). Esto quiere decir que existe correlación entre los porcentajes de homología antigénica y los de identidad entre las secuencias de aminoácidos (aa); sin embargo, los porcentajes de reactividad cruzada existente con CS2 de CFA/II y los de los demás antígenos es menor que los de identidad de aa. Esto puede deberse a que el anticuerpo monoclonal vs CS2 está reconociendo un solo epítipo en los diversos antígenos, mientras que en la búsqueda de identidad de los aminoácidos se compara la secuencia amino terminal ó la secuencia completa según sea el caso, y no sólo el sitio donde el anticuerpo monoclonal se une, que puede ser totalmente diferente a la secuencia de aminoácidos.

En el caso de CS3, los porcentajes de identidad con los demás antígenos son menores que los porcentajes de reactividad cruzada, esto puede explicarse como que posiblemente el antígeno CS3 de CFA/II sea poco idéntico, pero repetitivo en toda su secuencia, lo que da lugar a que el anticuerpo monoclonal reaccione fuertemente con los demás antígenos.

Podemos decir que la homología antigénica observada podría ser debida a la presencia de las zonas de homología en las secuencias de aa, y que esto apoye la posible existencia de relación genética entre los operones que codifican a estas fimbrias (42,103).

Sin embargo queda por determinar cuáles son los epítomos involucrados en la reactividad cruzada, si estos epítomos realmente son lineales y/o conformacionales. Surge también la pregunta de si estos epítomos son importantes en la patogénesis y/o respuesta inmune a ETEC; de si la respuesta que inducen es protectora y finalmente de que si estos epítomos son responsables de la protección cruzada que varias cepas de ETEC son capaces de inducir; llegar a contestar estas preguntas sería útil en el desarrollo de una vacuna contra este agente patógeno, que contenga fimbrias seleccionadas o péptidos pequeños homólogos a secciones de un tipo de subunidad que confiera protección contra las diferentes fimbrias de ETEC.

Dada la identidad en las secuencias de aa de CFA/I, CS1 y CS2 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166 (amino terminal ó completa), se propone el desarrollo de un método alternativo para el escrutinio de cepas de ETEC aisladas de humanos, como sería la síntesis de un oligonucleótido marcado basado en dicha región de identidad y valorar que sea capaz de diferenciar las cepas de ETEC fimbriadas de las que no lo son. Este logro, permitiría el análisis de un número menor de cepas para la determinación específica de CFAs y PCFs expresados en ETEC, lo que se traduciría en costo, tiempo y trabajo menores para determinar la frecuencia de estos antígenos en estudios epidemiológicos futuros.

VIII. CONCLUSIONES

La utilización de la cromatografía de intercambio iónico es un excelente método de purificación para los antígenos putativos de colonización CFA/III, PCFO166, PCFO159 y 2230 de ETEC.

Los anticuerpos policlonales producidos contra los PCFs son útiles para determinar la frecuencia de éstos en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños y turistas.

Los perfiles de asociación de las características más frecuentemente encontrados en nuestras cepas de ETEC fueron HA⁺/h⁺ en un 45% para niños y en un 48% para turistas, y HA⁺/h⁻ en un 35 y 19% respectivamente.

Se demostró que existe una correlación del 93.83% entre las características hidrofóbicas de las cepas con la presencia de algún tipo de PCF.

Los Factores Putativos de Colonización se encuentran en un porcentaje pequeño en las cepas de ETEC estudiadas (6.2 a 8%)

La frecuencia de los PCFs varió en cada uno de los grupos, siendo el 2230 el más común en las cepas aisladas de niños, encontrándose mayormente asociado a las cepas provenientes de cuadros asintomáticos.

El PCFO166 y el antígeno 2230 fueron los más frecuentemente identificados en las cepas aisladas de turistas. El CFA/III no estuvo presente en ninguno de los 2 grupos de cepas estudiadas.

Existe homología antigénica (reactividad cruzada) entre los factores de colonización de ETEC, siendo CFA/I, CS1 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166, los que presentaron mayor porcentaje de homología.

CFA/I, CS1 y CS2 de CFA/II, CS4 de CFA/IV y PCFO166 son los que presentan mayor porcentaje de identidad entre sus secuencias de aminoácidos analizadas por el método de Myers & Miller.

Existe correlación entre los porcentajes de homología antigénica y los porcentajes de identidad en las secuencias de aminoácidos para los diferentes CFAs y PCFs, a excepción de CS2 y CS3 de CFA/II.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Agüero ME, Reyes L, Prado V, Orskov I, Orskov F and Cabello FC. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in a Population of Infants with Diarrhea in Chile. *J Clin Microbiol* 1985;22:576-581
2. Ahren CM and Svennerholm AM. Synergistic Protective Effect of Antibodies Against *Escherichia coli* Enterotoxin and Colonization Factor Antigens. *Infect Immun* 1982;38(1):74-79
3. Ahren CM, Gothefors L, Stoll BJ, Salek MA and Svennerholm M. Comparison of Methods for Detection of Colonization Factor Antigens on Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1986;23(3):586-591
4. Ahren C, Svennerholm AM. Experimental enterotoxin-induced *Escherichia coli* diarrhea and protection induced by previous infection with bacteria of the same adhesin or enterotoxin type. *Infect Immun* 1986;50:255-261
5. Arp Lawrence H. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. In: Virulence mechanisms of bacterial pathogens. James A Roth. Section I. Chapter I. Mechanisms of bacterial adherence, colonization and invasion. Edited by American Society for Microbiology 1988 pp:3-27
6. Aubel D, Darfeuille-Michaud A. and Joly Bernard. New adhesive factor (antigen 8786) on a human enterotoxigenic *Escherichia coli* O117:H4 strains isolated in Africa. *Infect Immun* 1991;59(4):1290-1299
7. Bairoch A. University of Feneva; (TM) IntelliGenetics Inc and Genofit SA. 1989
8. Bartus H, Actor P, Snipes E, Sedlock D and Zajac Ihor. Indications that the Erythrocyte Receptor Involved in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Attachment Is a Sialoglycoconjugate. *J Clin Microbiol* 1985;21(6):951-954
9. Beachey EH. Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *J Infect Dis* 1981;143(3):325-345
10. Bergman MJ, Updike WS, Wood SJ, Brown SE III, and Guerrant RL. Attachment Factors Among Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Patients with Acute Diarrhea from Diverse Geographic Areas. *Infect Immun* 1981;32(2):881-888
11. Binsztejn N, Jouve MJ, Viboud GI, López ML, Rivas M, Orskov I., Ahrén C, and Svennerholm AM. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Children with Diarrhea in Argentina. *J Clin Microbiol* 1991;29(9):1893-1898

12. Bradford M. Protein Assay. *Anal Biochem* 1976;72:248
13. Candy DCA, Leung TSM, Mak RHK, Harries JT, Marshall WC, Phillips AD, Robins-Browne R, Chadwick MV, and Levine MM. A fimbrial antigen mediating haemagglutination of *Escherichia coli* from children. *FEMS Microbiol Lett* 1982; 15:325-329
14. Changchawalit S, Echeverria P, Taylor DN, Leksomboon U, Tirapat C, Eampokalap B and Rowe B. Colonization Factors Associated with Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated in Thailand. *Infect Immun* 1984;45(2):525-527
15. Clark CA, Heuzenroeder MW and Manning PA. Colonization Factor Antigen CFA/IV (PCF8775) of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Nucleotide Sequence of the CS5 Determinant. *Infect Immun* 1992;60(3):1254-1257
16. Clements JD and Finkelstein RA. Immunological cross reactivity between a heat-stable enterotoxigenic of *Escherichia coli* and subunit of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect Immun* 1978;21:1036-1039
17. Clements JD, Svennerholm AM, Harris JR, Huda S, Rao M, Neogy PK, Khan MR, Ansaruzzaman M, Rahaman S, Ahmed F, Sack DA, Kay B, Van Loon F. and Holmgren J. Seroepidemiologic Evaluation of Anti-Toxic and Anti-Colonization Factor Immunity against Infections by LT-Producing *Escherichia coli* in Rural Bangladesh. *J Infect Dis* 1990;162:448-453
18. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, and Rowe B. Mannose-Resistant Haemagglutination of Human Erythrocytes by Strains of *Escherichia coli* from Extraintestinal Sources: Lack of Correlation with Colonization Factor Antigen (CFA/I). *FEMS Microbiol Lett* 1979;6:41-44
19. Cravioto A, Scotland SM, Rowe B. Hemagglutination Activity and Colonization Factor Antigens I and II in Enterotoxigenic and Non-Enterotoxigenic Strains of *Escherichia coli* Isolated from Humans. *Infect Immun* 1982;36:189-197
20. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, Fernández G, Hernández R, and López D. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem Inf* 1988;101:123-134
21. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De la Roca JM, Hernández JM, Pérez G and Virginia Vázquez. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol* 1990;131(5):886-904
22. Darfeuille-Michaud A, Forestier C, Joly B, and Cluzel R. Identification of a nonfimbrial adhesive factor of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 1986;52(2):468-475

23. De la Cabada FJ, Evans DG, Evans DJ. Immunoprotection against enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in rabbits by oral administration of purified colonization factor antigen I (CFA/I). *FEMS Microbiol Lett* 1981;11:303-307
24. Duguid, J.P. and Old, D.C. (1980) in *Bacterial Adherence* (Beachey, E.H., ed.) Receptors and Recognition Series B, Vol. 6 p.185, Chapman and Hall, London
25. Evans DG, Evans DJ, Evans DJ Jr and Tjoa W. Hemagglutination of Human Group A Erythrocytes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Adults with Diarrhea: Correlation with Colonization Factor. *Infect Immun* 1977;18:330-337
26. Evans DG., Olarte J., DuPont HL., Evans DJ Jr., Galindo E., Portnoy BL., Concklin RH. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City. *J Pediatr* 1977;91:65-68
27. Evans DG, Evans DJ, Jr, Tjoa WS, Dupont HL. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect Immun* 1978;19:727-736
28. Evans DG, Evans DJ. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect Immun* 1978; 21(2):638-647
29. Evans DG, Evans DJ, Clegg S and Pauley JA. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979;25(2):738-748
30. Evans DJ Jr., Evans DG, Young LS. and Pitt J. Hemagglutination Typing of *Escherichia coli*: Definition of Seven Hemagglutination Types. *J Clin Microbiol* 1980;12(2):235-242
31. Evans DG, de la Cabada FJ, Evans DJ Jr. Correlation Between Intestinal Immune Response to Colonization Factor Antigen I and Acquired Resistance to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea in an Adult Rabbit Model. *Eur J Clin Microbiol* 1982;1(3):178-185
32. Evans DG, Graham DY, Evans DJ Jr. Administration of Purified Colonization Factor Antigens (CFA/I, CFA/II) of Enterotoxigenic *Escherichia coli* to Volunteers. *Gastroenterol* 1984;87:934-940
33. Faris A., Sellei J., Lindahl M. and Wadstrom T. Haemagglutination of Bovine Erythrocytes by Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Of O 6 Serogroup: Evidence for Glycoconjugate Receptor Heterogeneity. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 1982;175-182
34. Faris A, Lindahl M and Wadstrom T. GM₂-like glycoconjugate as possible erythrocyte receptor for the CFA/I and K99 haemagglutinins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1980;7:265-269

35. Field M., Graf LH Jr., Laird WJ and Smith TL. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. Proc Natl Sci USA 1978;75:2800-2804
36. Forestier C., Welinder K., Darfeuille-Michaud A., Klemm P. A fimbrial adhesin from *Escherichia coli* strain 2230: purification, characterization and partial covalent structure. FEMS Microbiol Lett 1987;40:47-50
37. Frantz JC., Robertson DC. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. Infect Immun 1981;33:193-198
38. Gaastra, W., and Graaf FK de. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol Rev 1982;46:129-161
39. Gothefors L., Ahrén C., Stoll B., Kumar Barua D., Orskov F., Salek MA. and Svennerholm AM. Presence of Colonization Factor Antigens on Fresh Isolates of Fecal *Escherichia coli*: A Prospective Study. J Infect Dis 1985;152(6):1128-1133
40. Graaf FK de, Klemm P. and Gaastra W. Purification, Characterization, and Partial Covalent Structure of *Escherichia coli* Adhesive Antigen K99. Infect Immun 1980;33(3):877-883
41. Graaf FK de and Roorda I. Production, Purification, and Characterization of the Fimbrial Adhesive Antigen F41 Isolated from Calf Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain B41M. Infect Immun 1982;36(2):751-758
42. Grewal HMS., Sommerfelt H., Gaastra W., Svennerholm AM., Bhan MK., Hamers AM., Kumar R., Wiklund G and Bjorvatn B. Detection of Colonization Factor Antigen I-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli* with a Cloned Polynucleotide Probe. J Clin Microbiol 1990;28(10):2264-2268
43. Gross RJ, Thomas L and Rowe B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains belonging to a new serogroup, *Escherichia coli* O166. J Clin Microbiol 1985;22(5):705-707
44. Hall RH, Maneval DR, Collins JH, Theibert JL and Levine MM. Purification and Analysis of Colonization Factor Antigen I, Coli Surface Antigen I, and Coli Surface Antigen 3 Fimbriae From Enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 1989;171(11):6372-6374
45. Heuzenroeder MW, Neal BL, Thomas CJ, Halter R and Manning PA. Characterization and molecular cloning of the PCF8775 CS5 antigen from an enterotoxigenic *Escherichia coli* O115:H40 isolated in Central Australia. Mol Microbiol 1989;3(3):303-310

46. Heuzenroeder MW, Elliot TR, Thomas CJ, Halter R and Manning PA. A new fimbrial type (PCFO9) on enterotoxigenic *Escherichia coli* O9:H⁺LT⁺ isolated from a case of infant diarrhea in Central Australia. FEMS Microbiol Lett 1990;66:55-60
47. Hibberd ML, McConnell MM, Field AM and Rowe B. The fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains 334 are related to CS5 fimbriae. J Gen Microbiol 1990;136:2449-2456
48. Hinson G and Williams P.H. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli* In: Virulence mechanisms of bacterial pathogens. James A Roth. Edited by American Society for Microbiology 1988 Chapter 14 pp:287-307
49. Hirayama T., Wada A., Iwata N., Takasaki S., Shimonishi Y., and Takeda Y. Glycoprotein Receptors for a Heat-Stable Enterotoxin (STh) Produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1992;60(10):4213-4220
50. Honda T, Ahmad KMM, Takeda Y and Miwatani T. Grouping of enterotoxigenic *Escherichia coli* by hydrophobicity and its relation to hemagglutination and enterotoxin productions. FEMS Microbiol Lett 1983;17:273-276
51. Honda T, Arita M., Miwatani T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. Infect Immun 1984;43:959-965
52. Honda T, Wetprasit N, Arita M and Miwatani T. Production and characterization of monoclonal antibodies to a pilus colonization factor (colonization factor antigen III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1989;57(11):3452-3457
53. Honda T, Cakir N, Arita M. and Miwatani T. Purification and characterization of the CS2 pili of colonization factor antigen II produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Microbiol Immunol 1989;33(4):265-275
54. Isaacson RE and Richter P. *Escherichia coli* 987 Pili: Purification and Partial Characterization. J Bacteriol 1981;146(2):784-789
55. Jalajakumaria, Thomas CJ., Halter R. and Manning P. Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. Mol Microbiol 1989;3(12):1685-1695
56. Johnson AP., Taylor-Robinson D. and McGee ZA. Species specificity of attachment and damage to oviduct mucosa by *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun 1977;18(3):833-839

57. Jones GW. and Rutter JM. The association of K88 antigen with haemagglutinin activity in porcine strains of *E. coli*. *J Gen Microbiol* 1974;84:135-144
58. Klem Per. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1985;7(3):321-339
59. Klemm P. Primary Structure of the CFAI Fimbrial Protein from Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Eur J Biochem* 1982;124:339-348
60. Klem Per, Gaastra W, McConnell MM and Smith HR. The CS2 fimbrial antigen from *Escherichia coli*, purification, characterization and partial covalent structure. *FEMS Microbiol Lett* 1985;26:207-210
61. Knutton S., Lloyd DR and McNeish AS. Identification of a New Fimbrial Structure in Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Serotype O148:H28 Which Adheres to Human Intestinal Mucosa: a Potentially New Human ETEC Colonization Factor. *Infect Immun* 1987;55(1):86-92
62. Korhonen TK., Valtonen MV., Parkkinen J., Vaisanen-Rhen V., Finne J., Orskov I., Svenson SB. and Makela H. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* 1985;48(2):486-491
63. Krogfelt K.A. Bacterial Adhesion: Genetics, Biogenesis, and Role in Pathogenesis of Fimbrial Adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1991;13:721-735
64. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970;227:680-685
65. Lanser JA and Anargyros PA. Detection of *Escherichia coli* Adhesins with DNA Probes. *J Clin Microbiol* 1985;22(3):425-427
66. Laux DC, McSweeney EF, Williams TJ., Wadolowski EA and Cohen PS. Identification and characterization of mouse small intestine mucosal receptors for *Escherichia coli* K-12(K88ab). *Infect Immun* 1986;52(1):18-25
67. Levine MM, Ristaino P, Marley G, Smyth C, Knutton S, Boedeker E, Black R, Young C, Clements ML, Cheney C. and Patnaik R. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect Immun* 1984;44(2):409-420
68. Levine M., Morris JG., Losonsky G., Boedeker E and Rowe B. Fimbriae (Pili) Adhesins as Vaccines. In: Protein-Carbohydrate Interactions in Biological System (Iark, D.L., Ed). Academic Press Inc (London). 1986 pp:143-145

69. Levine MM, *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987;155(3):377-389
70. Lindahl M., Faris A., Wadström T. and Hjerten S. A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochem Biophys Acta* 1987;677:471-476
71. Lindahl M and Carlstedt I. Binding of K99 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* to pig small intestinal mucin glycopeptides. *J Gen Microbiol* 1990;136:1609-1614
72. López-Vidal Y, and Svennerholm A.M. Hemadsorption and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Nitrocellulose Replica Methods for Identification of Colonization Factor Antigen (CFA)-Positive *Escherichia coli* Colonies and for Isolation of CFA-Negative Mutants. *J Clin Microbiol* 1986;24(4):615-619
73. López-Vidal Y, Klemm P and Svennerholm A.M. Monoclonal antibodies against different epitopes on colonization factor antigen I of enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1988;26(10):1967-1972
74. López-Vidal Y and Svennerholm A.M. Monoclonal antibodies against the different subcomponents of colonization factor antigen II of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1990;28(9):1906-1912
75. López-Vidal Y, Calva JJ, Trujillo A, Ponce de León A, Ramos A, Svennerholm AM, and Ruiz-Palacios GM. Enterotoxins and adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*: are they risk factors for acute diarrhea in the community? *J Infect Dis* 1990;162:442-447
76. Manning PA, Higgins GD, Lumb R, Lanser JA. Colonization factor antigens and a new fimbrial type, CFA/V, on O115:H40 and H⁻ strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Central Australia. *J Infect Dis* 1987;156(5):841-844
77. McConnell MM, Thomas LV, Day NP, Rowe B. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of adhesion factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*;1985.152:1120-1127
78. McConnell MM, Thomas LV, Scotland SM, Rowe B. The possession of coli surface antigen CS6 by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O25, O27, O148 and O159: a possible colonization factor? *Curr Microbiol* 1986;14:51-54
79. McConnell MM, Smith HE, Willshaw GA, Field AM, Rowe B. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1988;56:1974-1980

80. McConnell MM, Chart H, Field AM, Hibberd M, Rowe B. Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O166. *J Gen Microbiol* 1989;55:1063-1064
81. McConnell MM, Chart H and Rowe B. Antigenic homology within human enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial colonization factor antigens: CFA/I, coli-surface-associated antigens (CS) CS1, CS2, CS4 and CS17. *FEMS Microbiol Lett* 1989;61(105-108)
82. McConnell MM, Hibberd M, Field AM, Chart H, Rowe B. Characterization of a new putative colonization factor (CS17) from a human enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O114.H21 which produces only heat-labile enterotoxin. *J Infect Dis* 1990;161:343-347
83. McConnell MM, Rowe B. Prevalence of the putative colonization factors CFA/III and PCFO159.H4 in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1989;159:582-586
84. McConnell MM, Hibberd ML, Penny ME, Scotland SM, Cheasty T and Rowe B. Surveys of human enterotoxigenic *Escherichia coli* from three different geographical areas for possible colonization factors. *Epidemiol Infect* 1991;106:477-484
85. Meit H., Kloetzl L. and Vosbeck K. Properties of Pili from *Escherichia coli* SS142 that Mediate Mannose-Resistant Adhesion to Mammalian Cells. *J Bacteriol* 1983;153(2):1038-1044
86. Myers EW and Miller Webb. Optimal alignments in linear space. *CABIOS* 1988;4(1):11-17
87. Oro HS, Kolsto AB, Wenneras C, Sevennerholm AM. Identification of asialo-GM1 as a binding structure for *Escherichia coli* colonization factor antigens. *FEMS Microbiol Lett* 1990;72:289-292
88. Ouchterlony Ö, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of experimental immunology, 3rd Ed. Weir DM (ed), Blackwell, Oxford, pp 1-44, 1978
89. Pérez-Casal J., Swartley JS and Scott JR. Gene Encoding the Major Subunit of CS1 Pili of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1990;58(11):3594-3600
90. Pieroni P., Worobec EA., Paranchych W. and Armstrong GD. Identification of a Human Erythrocyte Receptor for Colonization Factor Antigen I Pili Expressed by H10407 Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1988;56(5):1334-1340
91. Reis MHL., Guth BEC., Gomes TAT., Murahovschi J. and Trabulsi LR. Frequency of *Escherichia coli* Strains Producing Heat-Labile Toxin or Heat-Stable Toxin or Both in Children With and Without Diarrhea in Sao Paulo. *J Clin Microbiol* 1982;15:1062-1064

92. Robertson DC. Pathogenesis and Enterotoxins of diarrheagenic *Escherichia coli* In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens Section IV Bacterial Toxins in Disease Production. Edited by American Society for Microbiology 1988 pp:241-263
93. Ruiz-Palacios BR, Bojalil R., Male R., Schuller D., Ramos A. Characterization of seasonal patterns of enteropathogens in an endemic Area. First step for a diarrhea control program. Abstract of the 87th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Atlanta Ga, 1987
94. Ruiz-Palacios GM., López-Vidal Y., Trujillo A., Ericsson CD., Mathewson JJ., and DuPont HL. Immune response to enterotoxigenic *E. coli* virulence factors in cohorts of U.S. Medical students travelling to Guadalajara. Abstract of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. New Orleans, Louisiana. May 14-18, 1989
95. Salit I.E., Gotschlich E.C. Hemagglutination by purified type 1 *Escherichia coli* pili. J Exp Med 1977;146:1169-1181
96. Sánchez J, Svennerholm A-M, Holgrem J. Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. FEBS Lett 1988;241:1110
97. Smit H., Gastra W., Kamerling J., Vliegthart JFG and Graaf FK de. Isolation and Structural Characterization of the Equine Erythrocyte Receptor for Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 Fimbrial Adhesin. Infect Immun 1984;46(2):578-584
98. Smith CJ. Two Mannose-resistant Haemagglutinins on Enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H⁻ Isolated from Travellers' and Infantile Diarrhoea. J Gen Microbiol 1982;128:2081-2096
99. Smith HR, Scotland SM, Rowe B. Plasmids that code for production of colonization factor antigen II and enterotoxin production in strains of *Escherichia coli*. Infect Immun 1983;40:1236-1239
100. Sporseem Oro H., Kolsto AB, Wenneras C. and Svennerholm AM. Identification of asialo GM1 as a binding structure for *Escherichia coli* colonization factor antigens. FEMS Microbiol Lett 1990;289-292
101. Steffen R., Mathewson JJ, Ericsson CD, DuPont HL, Helminger A., Balm TK, Wolff K and Witassek F. Travelers' Diarrhea in West Africa and Mexico: Fecal Transport Systems and Liquid Bismuth Subsalicylate for Self-Therapy. J Infect Dis 1988;157(5):1008-1013
102. Stoll BJ., Svennerholm AM., Gothefors L., Barua D., Hude S., Holmgren J. Local and systemic antibody responses to naturally acquired enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in an endemic area. J Infect Dis 1986;153:527-534

103. Sommerfelt H., Grewal HMS, Svennerholm AM, Gaastra W, Flood PR, Viboud G and Bhan MK. Genetic Relationship of Putative Colonization Factor O166 to Colonization Factor Antigen I and Coli Surface Antigen 4 of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992;60(9):3799-3806
104. Svennerholm A-M, Wiklund G. Rapid GMI-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol* 1983;17:596-600
105. Svennerholm A-M, Wikstrom M, Lindblad M and Holmgren J. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GMI-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1986;24:585-590
106. Svennerholm A-M, Lopez Vidal Y, Holmgren J, McConnell MM, Rowe B. Role of PCF8775 antigen and its coli surface subcomponents for colonization, disease and protective immunogenicity of enterotoxigenic *E. coli* in rabbits. *Infect Immun* 1988;56:523-528
107. Svennerholm AM, Holmgren J and Sack DA. Development of oral vaccines against enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *Vaccine* 1989;7:196-198
108. Svennerholm AM., Wenneras C., Holmgren J., McConnell MM. and Rowe B. Roles of Different Coli Surface Antigens of Colonization Factor Antigen II in Colonization by and Protective Immunogenicity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Rabbits. *Infect Immun* 1990;58(2):341-346
109. Tacket CO, Maneval DR, Levine MM. Purification, morphology and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O159.H4. *Infect Immun* 1987;55:1063-1069
110. Thomas LH, Cravioto A, Scotland SM. and Rowe B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect Immun* 1982;35(3):1119-1124
111. Thomas LV, McConnell MM, Rowe B, Field A.M. The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF8775. *J Gen Microbiol* 1985;131:2319-26
112. Viboud GI., Binsztein N., and Svennerholm AM. Characterization of Monoclonal Antibodies against Putative Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Their Use in an Epidemiological Study. *J Clin Microbiol* 1993;31(3):558-564

113. Wenneras C., Svennerholm AM, Ahrén C. and Czerkinsky C. Antibody-Secreting Cells in Human Peripheral Blood after Oral Immunization with an Inactivated Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine. *Infect Immun* 1992;60(7):2605-2611

114. Wenneras C. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*: Binding to intestinal cell membranes and induction of mucosal immune responses in humans. PhD Thesis. University of Goteborg, Sweden. 1993.

115. Wolf MK, Andrews GP, Tall BD, McConnell MM, Levine MM and Boedeker EC. Characterization of CS4 and CS6 antigenic components of PCF8775, a putative colonization factor complex from enterotoxigenic *Escherichia coli* E8775. *Infect Immun* 1989;57(1):164-173

116. Wulf C. and Anneluse. Strain Development In: *Biotechnology: a textbook of Industrial Microbiology*. Sinaver Associates Inc. (Sunderland, Ma 01375 Science Tech Inc (Madison WI, 53705, 1982 USA; Chapter 3 pp 10-30