



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA

**PURIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE COLONIZACIÓN (CFAS) DE
ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENICA (ETEC)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
GORDILLO OCHOA, JORGE ARIEL

ASESOR: LÓPEZ VIDAL, YOLANDA

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

1990



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.

INDICE

INTRODUCCION	1
FUNDAMENTO	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS	12
HIPOTESIS	13
MATERIAL Y EQUIPO	14
COMPOSICION Y PREPARACION DE SOLUCIONES	15
MATERIAL BIOLÓGICO	18
METODOLOGIA	
Aglutinación.....	19
Cultivo masivo de ETEC	20
Purificación de los CFAs	
Determinación de proteínas por Coomassie	21
a).- Precipitación de los CFAs crudos	21
b).- Ensamble , equilibrio y uso de la cromato- grafia en columna de intercambio ionico .	22
Identificación y pureza de los CFAs	
a).- Doble difusión de Ouchterlony	24
b).- Inmunodot	25
c).- CFA-ELISA Inhibición	27
RESULTADOS	29
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	49

INTRODUCCION

Escherichia coli (E.coli) es una bacteria que pertenece a la familia ENTEROBACTERIACEA , que es un grupo de bacilos gram-negativos no esporulados , los cuales tienen reacciones bioquímicas similares como , la producción de ácido y gas de una gran variedad de carbohidratos fermentables . Estos bacilos pueden ser clasificados dentro de numerosos biogrupos , biotipos y serotipos.

La E.coli es causante de una importante proporción de los casos de diarrea a nivel mundial y se estima que es la responsable del 60% de las diarreas en niños menores de dos años de edad . En los países de Africa , Asia y America Latina se reportan de 5 a 10 millones de muertes por diarrea por año y una tasa de diarrea en los primeros 5 años de vida de 15 al 25 % (1,2).

E.coli puede causar infección gastrointestinal por diferentes mecanismos . Las cepas de E.coli capaces de producir un cuadro entérico se clasifican por su mecanismo de acción en : E.coli enterotoxigénica (ETEC*), E.coli enteropatógena (EPEC*), E.coli enteroinvasiva (ECIE*), y recientemente se han descrito otros dos tipos, la E.coli enterohemorrágica (ECHE* serotipo O157:H7) y la E.coli enteroadherente (ECAE*) (* por su siglas en ingles) .

La diarrea causada por cualquier tipo de E.coli es moderada y autolimitada en adultos , pero en niños pequeños es una amenaza a la vida en ausencia de un tratamiento apropiado .

Desde 1960 la E.coli enterotoxigénica (ETEC) fué reconocida como agente etiológico de diarrea en humanos , cuando se le identificó como la responsable de la diarrea endémica severa tipo cólera en Calcuta . La mayor incidencia de infección por ETEC se ha reportado en niños pequeños menores de 5 años de países en vías de desarrollo y en los turistas que visitan a estos países .

El cuadro clínico de la diarrea causada por Vibrio cholerae y por ETEC son indistinguibles , ya que ambas son de tipo secretor , debidas a la acción de enterotoxinas . La diarrea por V.cholerae presenta su mayor incidencia en niños mayores de dos años , mientras que la diarrea por ETEC es más frecuente en los primeros dos años de la vida. Ambos microorganismos son transmitidos por agua y alimentos contaminados .

Las características epidemiológicas de estos dos microorganismos presentan diferencias en países en vías de desarrollo principalmente en lo referente a la severidad de los cuadros diarreicos en las diferentes áreas geográficas , lo que parece depender de los serotipos predominantes de estas bacterias en cada área .

El mecanismo de patogenicidad para Vibrio cholerae y ETEC consiste en la adhesión del microorganismo al epitelio intestinal para colonizar el intestino y posteriormente liberar sus toxinas al medio externo y así desencadenar la diarrea .

En 1955 Duguid y Col. demostraron que las cepas de E.coli tenían la habilidad de hemaglutinar eritrocitos de cobayo (8,11,12,13) , lo que posteriormente se identificó como pili comun o pili tipo 1 . Smith y Col. en 1963 demostraron que la presencia del pili específico designado como K88 es un requisito indispensable para la virulencia de la ETEC en cerdos , así como el antígeno K99 lo es para la virulencia de ETEC en terneras y borregos (9) , siendo estos antígenos muy similares en patogenicidad a los Factores Antigenicos de colonización (CFAs por sus siglas en ingles) de ETEC en humanos .

Se ha demostrado que Escherichia coli enterotoxigénica posee dos factores de virulencia : a) la capacidad de producir dos enterotoxinas que han sido designadas como toxina termolabil (LT) y toxina termoestable (ST), cuya producción es mediada por plásmidos específicos que codifican para la producción de LT y/o ST , y cuyos genes , para una o ambas toxinas pueden residir en el mismo plásmido . Estos genes ya han sido caracterizados y clonados (20,21,22,23,24,25). La frecuencia relativa con la que E.coli aislada de las diferentes áreas geográficas es capaz de producir LT y/o ST es variable , y se restringe a un número pequeño de serogrupos . b) Los CFAs han sido propuestos como los responsables de la adhesión de ETEC a la mucosa del intestino delgado. Es así como los factores de colonización que han sido bien identificados y valorados en aislamiento e identificación de casos agudos de diarrea han sido denominados como CFA/I , CFA/II y CFA/IV (PCF8775). La expresión de estos factores de colonización son mediados por plasmidos transferibles y en un mismo plásmido pueden estar contenidos los genes que codifican para algún CFA y/o para una o ambas enterotoxinas ; siendo esta característica restringida a un número pequeño de serotipos (O:H) .

Los factores de colonización se han descrito como prolongaciones citoplasmáticas denominadas pilis o fimbrias ; estos a su vez se encuentran formados por una serie de subunidades protéicas , las que se asocian a su forma de alfa-hélice ; Es así como cada subunidad de CFA/I esta constituida por 147 aminoácidos repetidos hasta dar una estructura de fimbria ; se ha informado que el CFA/II esta constituido por 3 diferentes componentes de superficie (CS) denominados como: CS1, CS2 y CS3 , estos , pueden coexistir asociados como CS1+CS3 , CS2+CS3 ó CS3 solo ; debido a su naturaleza protéica y secuencia específica de aminoácidos , no presentan asociación inmunológica con el CFA/I o el CFA/IV . Finalmente el CFA/IV constituido también por 3 componentes de superficie CS4 , CS5 y CS6 ; se presentan asociados como CS4+CS6 , CS4+CS5 , CS5 solo y CS6 solo . Los pesos moleculares de cada una de las fimbrias y sus componentes de superficie se han determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS) .

Todas las fimbrias y sus componentes de superficie presentan una secuencia idéntica de aminoácidos y todos son antígenicamente diferentes y específicos . Las fimbrias (CFAs) presentan también diferencias en longitudes y diámetros ; así como una determinada secuencia de aminoácidos para cada subunidad de CFA/I,II y IV . Los genes que codifican para CFA/I y ST estan generalmente relacionados al mismo plásmido , la LT es habitualmente controlada por plásmidos separados aunque en algunas cepas de ETEC el CFA/I y la LT/ST se encuentran codificados en el mismo plásmido. Los genes para CFA/II LT/ST , incluyendo CS3 y CS1 o CS2 usualmente residen dentro del mismo plásmido ; el que se exprese CS1 o CS2 depende en forma

importante del biotipo de la E.coli esto es , si es biotipo A se expresara CS1 y si es biotipo B , C ó F se expresará CS2 y en ambos casos , asociados a CS3 ; y para el CFA/IV el CS4-CS6 se asocia a la producción de ambas enterotoxinas, no así para el CS5-CS6 que sólo se asocia con la producción de ST . También se han aislado cepas productoras de LT que sólo expresan CS5 o CS6 .

A diferencia de la infección por V.cholerae , en donde el 66% es sintomática en forma severa , las diarreas por ETEC son moderadas y generalmente no requieren hospitalización y el porcentaje de infecciones sintomáticas por este microorganismo disminuye paulatinamente con la edad , sugiriendose así la adquisición de inmunidad temprana (4).

En México las infecciones diarreicas continuan siendo un problema de salud pública por su alta morbilidad en la población infantil . Así en un estudio de comunidad en México D.F. (Sn. Pedro Martir) , se reportó que ETEC ocupó el 4o lugar como agente etiológico de diarrea en niños menores de cinco años (3). Otro tipo de población fuertemente afectada son los turistas en los países en desarrollo , en quienes la diarrea se presenta de una o dos semanas después de su llegada . La diarrea por ETEC es la causa del mayor número de las diarreas en el mundo (1,2).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE ETEC

Como se mencionó anteriormente ETEC posee la capacidad de producir dos enterotoxinas : la toxina termolabil (LT) que esta constituida por dos subunidades , A y B , esta ultima es la responsable de unirse al receptor de membrana denominado gangliosido localizado en la mucosa intestinal del epitelio en el intestino delgado (GM1) y así favorecer la entrada de la subunidad A la cual es la responsable de activar a la adenil ciclasa permitiendo la acumulación de AMP-cíclico intracelular que actua sobre la bomba de Na⁺ y K⁺, ocasionando la salida de agua y electrolitos a la luz intestinal presentandose lo que denominamos diarrea . El mecanismo de acción de la ST no esta bien determinado pero se postula que actua sobre la guanidil ciclasa , lo que ocasiona la acumulación de GMP-cíclico y desencadena el cuadro diarréico en un menor tiempo .

Se han realizado estudios para valorar el mecanismo patogénico mediante el cual los CFAs son un prerrequisito para la diarrea ; encontrándose que un gran número de cepas de E.coli aisladas de animales con diarrea expresan los diferentes antígenos fimbriales tales como K88 para cerdos ; K99 y P987 para terneras con capacidad de aglutinar eritrocitos en presencia de D-manosa .

Son varios los CFAs de ETEC humana que se han descrito , sin embargo solo 3 CFAs se han caracterizado y valorado bien : CFA/I , CFA/II y CFA/IV , inicialmente fueron clasificados por su capacidad de hemaglutinar a diferentes especies de eritrocitos en presencia de D-manosa , y sus diferentes subunidades y antigenicidad se determinó por electroforesis en geles SDS-poliacrilamida e inmunodifusión en geles de agarosa al 1% como se muestra en la tabla No 1 .

TABLA No 1

PATRONES DE HEMAGLUTINACION DE CEPAS DE ETEC
AL EXPRESAR LOS DIFERENTES CFA's

ANTIGENO	PESO MOLECULAR	HAMR		
		Hu	Bo	Po
CFA/1	15,058	+	+	-
CFA/11				
CS1	16,800			
CS2	15,300	-	+	+
CS3	14,500			
o 15,500				
CFA/VI				
CS4	17,000			
CS5	21,000	+	+	-
CS6	14,500			
o 16,000				

HAMR= HEMAGLUTINACION MANOSA RESISTENTE

Hu= ERITROCITOS HUMANOS

Bo= ERITROCITOS DE BOVINO

Po= ERITROCITOS DE POLLO

A la E.coli productora de enterotoxinas se le ha encontrado asociada a un grupo de serogrupos como son :06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0115, 0128ac, 0139, 0148, 0153, 0159 y 0169 . En cambio la expresión de CFAs esta restringida sólo a ciertos serotipos . Para CFA/I 078:H11, 0128:H11 ; para CFA/II 06:H6 , 08:H6 y para CFA/IV 025:H42 y 0167:H5 .

Dada la importancia establecida de los CFAs en la patogenesis de diarrea por ETEC en humanos y animales , se plantea la purificación de las diferentes fimbrias CFA/I, CFA/II (CS1+CS3 ; CS2+CS3) y CFA/IV (CS4+CS6 ; CS5+CS6 ; CS5,CS6) para ser utilizados como antígenos en la valoración de la respuesta inmune sistémica natural a la infección por este microorganismo , en una población de niños menores de cinco años, previamente estudiada para la infección por ETEC en forma sintomática y asintomática ; en un periodo de cuatro meses (Abril a Julio de 1987) que es el periodo de mayor incidencia de infección por ETEC .

Para ello fué indispensable la estandarización de un método de purificación de los CFAs , con alta especificidad y resolución como lo es la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-SEPHACEL) y la estandarización de técnicas inmunológicas para la identificación precisa de los CFAs puros : Del CFA/I y , de los diferentes componentes de superficie (CS) que conforman a cada uno de los otros CFAs , como lo son CS1 , CS2 y CS3 del CFA/II y CS4,CS5 y CS6 del CFA/IV .

FUNDAMENTO

La enfermedad diarreica aguda tiene una alta mortalidad en los niños menores de cinco años . En Africa , Asia , y America Latina , se ha reportado de 5 a 10 millones de muertes por diarrea por año , lo que representa de un 15 a 25 % de mortalidad en casos de diarrea aguda (1,2).

En México , la diarrea continúa siendo un problema grave de salud pública por su alta morbilidad en la población (1) . En un estudio de comunidad en México D.F. (Sn. Pedro Martir) , se reportó que E.coli enterotoxigénica (ETEC) ocupa el 4o lugar como agente etiológico de diarrea (3).

La ETEC causa diarrea del tipo secretor, y en su cuadro clínico más severo es similar a la causada por Vibrio cholerae (1,2,4,5,6).

La ETEC tiene la capacidad de producir una o ambas enterotoxinas , la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable al calor (ST), y la expresión de fimbrias , que son estructuras filamentosas rígidas o flexibles de diferentes longitudes y diámetros en la superficie de la células bacterianas, denominadas factores antigenicos de colonización (CFAs) (2,3,4,7,8,9) y que se asocian a la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal .

Se han descrito y caracterizado tres tipos de CFAs para ETEC de origen humano , el CFA/1, CFA/11 y CFA/IV (PCF 8775), por su capacidad de hemaglutinar eritrocitos de diferentes especies en presencia de D-manosa , los cuales se propone que se adhieran a los enterocitos por la parte más externa del pili llamada pilina o adhesina (7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17) .

La capacidad de ETEC para producir enterotoxinas se encuentra asociada a serogrupos : 06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0115, 0128ac, 0139, 0148, 0153, 0159, y 0169 (3). La expresión de CFAs están restringidos solo a ciertos serotipos : 06:H6, 08:H9, 015:H11, 025:H42, 078:H11, 078:H12, y 0167:H5 (18,19,20,21,22,23,24)

La producción de toxinas y la expresión de fimbrias son genéticamente controladas por plásmidos transferibles . Los genes que codifican para CFA/I , LT/ST se localizan generalmente en el mismo plásmido , en algunas ocasiones la LT es controlada por plásmidos independientes. Los genes para ST , LT y CFA/II , incluyendo CS1, CS2 y CS3 residen dentro del mismo plásmido (25).

Dada la importancia de los CFAs en la patogénesis de diarrea por las cepas de ETEC , es de suma importancia mejorar y optimizar las metodologías empleadas en la obtención y purificación de los CFAs con el fin de que puedan obtenerse en grandes cantidades con el mayor grado de pureza ; para posteriormente ser utilizadas en la detección de respuesta inmune específica contra este microorganismo , y quizás ser considerados en el desarrollo de una vacuna contra la infección por ETEC .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adherencia de ETEC a la superficie de las células del epitelio intestinal es mediada por antígenos de superficie específicos denominados factores de colonización (CFAs). Dada la importancia de los CFAs en la patogenia de ETEC en humanos y animales (26), se propone la purificación de las diferentes fimbrias, con el fin de ser utilizados para la valoración de la respuesta inmune natural a su exposición en niños menores de cinco años de edad .

Por tal motivo es indispensable la estandarización de un método de purificación para los CFAs con alta especificidad, como lo es la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-SEPHACEL), y la estandarización de técnicas inmunológicas para la identificación precisa de los CFAs puros, y de sus diferentes componentes de superficie (CS) que conforman a cada uno de ellos, como lo son los Componentes de Superficie del CFA/II : CS1, CS2, CS3, y los del CFA/IV (PCF8775) : CS4, CS5 y CS6 .

OBJETIVOS

- 1.- Purificación de los factores de colonización (CFAs) I , II y IV de cepas de ETEC de referencia .

- 2.- Estandarización del método de purificación por cromatografía en columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel .

- 3.- Estandarización de métodos inmunológicos para identificación de cada uno de los CFAs .
 - Doble Difusión de Ouchterlony

 - Inmunodot

 - Ensayo inmuno enzimático CFA-ELISA inhibición .

HIPOTESIS

El método de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Sephacel es un método confiable , de mayor pureza , especificidad y rendimiento para la purificación de los CFAs , valorada esta mediante métodos inmunológicos de alta sensibilidad y especificidad utilizandose para ello anticuerpos monoclonales .

MATERIAL Y METODOS

Equipo:

- Autoclaves, Cyclomatic Control.
- Incubadora 37 C ,GCA corporation Mod. 368A .
- Incubadora con agitación ,Optical Corporation 02156 .
- Columna de Intercambio Ionico LKB 2137.
- Bomba Peristáltica LKB 2120 Varioperpex .
- Formador de Gradiente , Farmacia Fine Chemical .
- Colector de Fracciones LKB 2112 RediRac.
- Centrifuga 4 C Sorvall RC-5B Dupont Instruments .
- Espectrofotometro Gilford Instruments Mod. 2530.
- Parrilla de agitación y calentamiento .

COMPOSICION Y PREPARACION DE SOLUCIONES

1.- Soluciones para el cultivo de ETEC

a)-Solución salina isotónica estéril ;

En un matraz aforado de 200 ml se adicionó 17 g. de cloruro de sodio reactivo analítico y se aforó con agua destilada obteniéndose una solución salina isotónica . Se esterilizó a 15 Lbs / 15 min.

b)-Solución amortiguadora de fosfatos (PBS):

Se pesaron 9.9386 g de fosfato disodico y 4.5163 g de fosfato monosódico y se aforó a un litro , obteniendo una concentración de 0.1M y a dos litros una concentración de 0.05M y a un pH 7.2 .

c)-Solución amortiguadora de Acetatos 0.2M y pH 3.5:

Solución A= 23 ml de ácido acético aforados a dos litros con agua.

Solución B= 32.82 g de Acetato de sodio anhidro aforándose a dos litros con agua .

Solución A 4100 ml

Solución B 900 ml

Acido acético 32 ml pH 7.2 .

2.- Soluciones amortiguadoras para cromatografía de Intercambio Ionico DEAE-Sephacel .

a)-Solución de fosfatos (PBS) descrita anteriormente .

b)-Solución de cloruro de sodio para elución en columna :se peso 58.5g de cloruro de sodio , y se adicionaron a un matraz volumétrico de 2000 ml y se aforó con agua bidestilada .

3.- Soluciones para preparación y tinción de geles de doble difusión de Ouchterlony .

a) -Preparación del azul de Coomassie:

Azul de Coomassie 0.1% en 5 partes de agua destilada ,5 partes de metanol y 2 partes de ácido acético glacial ;se filtro en papel Wathman #1.

b)-Solución de desteñir :

30% de etanol , 10% de ácido acético glacial , 60% agua destilada .

c)-Solución salina isotónica ; descrita anteriormente.

4.- Soluciones para Inmunodot:

a)-Gelatina al 3%; 3 gramos en 100 ml de solución reguladora de fosfatos (PBS).

b)-PBS descrito anteriormente .

c)-PBS-tween ; A dos litro de PBS se le adicionó un ml de tween 20.

d)-Tris base (TBS); tris-base 4.84 g ,cloruro de sodio 58.4 g , se aforó a dos litro de agua , y se ajustó el pH a 7.5 con aprox. 2 ml de ácido clorhídrico.

e)-Sustrato ; 15 mg de alfa-cloro naftol en 5 ml de metanol frío
25 ml de TBS y 15 microlitros de peroxido de hidrogeno.

f)-Solución salina isotónica (descrita anteriormente).

5.- Soluciones para Ensayo Inmunoenzimático (ELISA):

- a)-PBS (descrito anteriormente).
- b)-Gelatina al 1% ; 1 g de gelatina en 100 ml de agua destilada .
- c)-PBS-tween (descrito anteriormente).
- d)-Solución reguladora de citratos ;Acido cítrico 0.730 g ,
fosfato disódico 1.18 g y 100 ml de agua , pH 5.5 y se conservó en
refrigeración.
- e)-Sustrato: Ortofenilendiamina 5.3 mg y 10 ml de solución
reguladora de citratos , con 5 microlitros de
peróxido hidrogeno.

6.- Medios de Casaminoácidos para cultivo de ETEC :

-Agar bacteriológico	20.0 g
-Extracto de levadura	1.5 g
-Agar casaminoácidos	10.0 g
-Sulfato de Magnesio hepta-hidratado	0.102 g
-Cloruro de Manganeso	2 gotas
-Hidroxido de Sodio 3M	1.5ml.Aforar a un litro

MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas de referencia de ETEC que expresaron los CFAs utilizados en este estudio fueron :

Cepas de ETEC	CFA	TOXINA	SEROTIPOS
H10407	1	LT/ST	O178:H11
139275	11 (CS1,CS3)	LT/ST	O6:H6
Rowe 1	CFA/IV (CS4,CS6)	LT/ST	O25:H42
Rowe 5	CFA/IV (CS5,CS6)	LT/ST	O167:H5

Anticuerpos monoclonales a : CFA/1 1:6,CS1 6:1,CS2 10:3,CS3 11:2 ,
CS4 4:6,CS5 5:10

Anticuerpos policlonales CS1,3; CS2,3; CS4,6; CS5,6 .

Conjugado antigamaglobulinas de conejo acoplado con peroxidasa para los anticuerpos policlonales y conjugado antigamaglobulinas de ratón unido a peroxidasa para los anticuerpos monoclonales (Lab. Dako)

METODO

La expresión de los CFAs en las cepas de referencia ETEC se valoró de la siguiente manera :

-Se realizó una siembra masiva en dos cajas de Petri (de 85 mm de diámetro) de agar casaminoácido con la cepa de ETEC con CFA determinado y se incubó a 37 C por 24 hrs.

-Se tomó una asada del crecimiento bacteriano y se realizó una suspensión en solución salina isótonica sobre un portaobjeto y en la otra parte del portaobjeto se colocó solución salina como el control negativo .

-Se adicionó el anticuerpo específico para el CFA a determinar, se agitó por un minuto .

-Se detectó la presencia del CFA por aglutinación bacteriana.

CULTIVO MASIVO DE ETEC

- 1.- El medio de cultivo se preparó y se distribuyó en botellas de Roux (125-150ml cada una), esterilizándose a 15Lbs (120 atm) por 15min.
- 2.- La bacteria se inoculó en forma masiva en 2 cajas de agar casa-aminoácido y se incubó a 37 C por 24 hrs.
- 3.- Se cosechó el crecimiento del microorganismo de las 2 cajas de petri en un matraz con 70 ml con solución salina isotónica estéril (SSI) y se procedió a inocular las botellas del medio previamente preparado , mediante pipetas Pasteur esteriles.
- 4.- Las botellas de Roux se incubaron durante 48 hrs. a 37 C
- 5.- La cosecha se realizó en una solución reguladora de fosfatos (PBS), 0.1M pH 7.2, con aproximadamente 10 ml por botella y 2 varillas de vidrio para recolectar el crecimiento bacteriano
- 6.- El volumen total obtenido se homogenizó 15 min a intervalos de un min. de descanso en hielo , en licuadora (TX 101 Philips).
- 7.- Se centrifugó a 5000 rpm. durante 25 min. a 4 C
- 8.- Se descartó el precipitado y el sobrenadante se dejo a 4 C durante 72 hrs.
- 9.- Se dializó contra buffer de acetatos (0.02M pH 3.5) a 4 C por 72 hrs , realizandose tres cambios de éste amortiguador .
- 10.-Se centrifugó a 12,000 rpm. a 4 C por 20 min.
- 11.-Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió 10 ml de PBS (0.05M pH 7.2).

PURIFICACION DE LOS CFAs

a).- Precipitación del CFA crudo

-Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos , se precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio , gota a gota con agitación constante en un baño de hielo .

-La agitación se prolongó por 15 min. después de finalizada la adición del sulfato de amonio al 10% con el fin de permitir la precipitación completa del CFA.

-Se centrifugó a 14,000 rpm. por 30 min. a 4 C .

-Se resuspendió el precipitado en PBS 0.05M pH 7.2.

-Se dializó contra solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.05M pH 7.2 a 4 C hasta la diálisis total de las sales de amonio y se procedió a la determinación de proteínas por el método de Coomassie.

Determinación de proteínas por el método de Coomassie:

1.- Se diluyeron 5mg de azul de Coomassie en 2.5 ml de etanol al 96% en frío .

2.- Se agregaron 5 ml de ácido fosfórico al 85% .

3.- Se ajustó a un volumen final a 50 ml con agua destilada y se almacenó en frasco ambar .

4.- Se realizó una curva estándar , utilizándose albúmina sérica bovina como la solución stock , a las siguientes concentraciones 25 , 50 , 75 y 100 microgramos/ml .

- 5.- Se adicionó a cada tubo 100 microlitros de cada una de las diferentes concentraciones del blanco y del problema respectivamente , más 5 ml de colorante.
 - 6.- Se agitaron por 2 min. y la absorbancia a 595 nm. fué valorada .
 - 7.- Se realizó la curva estandar con las concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina contra el valor de absorbancia de cada una de las diferentes concentraciones .
- b).- Ensamble , equilibrio y uso de la cromatografía en columna de intercambio iónico para la purificación de los diferentes CFAs :
- 1.- Se ensambló la columna (LKB-2137) con celulosa de intercambio iónico DEAE-Sephacel (con una altura de 38 cm, y un espesor de 3.6 cm y un volumen de elución de 386 ml , con un tamaño de exclusión de rango de partícula de 12,000 a 14,000 daltons.
 - 2.- La columna se activó negativamente con una solución de PBS (0.05M pH 7.2) con el volumen de elución de 386 ml , dicho volumen se colectó en fracciones de 4 ml (en tubos 15X100) , en un colector de fracciones (LKB 2112 RediRac).
 - 3.- Se estandarizó el goteo con la ayuda de una bomba peristáltica (LKB 2120 Varioperpex 11) a 60 gotas (4 ml) por tubo por cada 10 min.
 - 4.- Se realizaron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 280 nm , de cada volumen colectado .

- 5.- Se lavó la columna nuevamente con PBS (0.05M pH 7.2) y se administró la muestra cruda de CFA , hasta completar el volumen de elución de la columna (386 ml) y se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a la absorbancia de 280 nm. , de cada fracción colectada .
- 6.- Se eluyó la columna con el gradiente de cloruro de sodio de mM a 1M hasta completar el volumen de elución de la columna.
- 7.- Se realizaron en el espectrofotómetro lecturas a una longitud de onda de 280 nm. de cada volumen colectado hasta obtener una lectura igual a cero por un total de 15 fracciones continuas .
- 8.- Posteriormente se adicionó PBS(0.05M pH 7.2) hasta alcanzar el volumen de elución completo de la columna .
- 9.- La columna se mantuvo preparada para purificaciones posteriores de las otras fimbrias .
- 10.-Se realizó la curva de elución de cada uno de los antígenos (CFAs) a purificar y se determinaron las proteínas totales por el método de Coomassie.

IDENTIFICACION DE LA PUREZA DE LOS CFAs

A).-Doble Difusión en gel de Ouchterlony :

En un soporte semisólido de agarosa, se colocaron soluciones de antígenos (Ag) y de anticuerpos (Ab) de concentraciones equivalentes , en basinas diferentes , se difundieron libremente por el medio formandose la reacción Ag-Ab como bandas de precipitación visibles con tinción de azú de Coomassie .

METODO

- Se preparó una solución al 1% de agarosa tipo 1 disuelta en solución salina isotónica .
- Se disolvió en un baño de agua en ebullición ,posteriormente se dejó enfriar y se vertió sobre una mica de 8X9 cm , sobre la cara hidrofílica, colocadas sobre un soporte previamente nivelado.
- Una vez gelificado se realizaron oradaciones mediante un molde y con ayuda de vacío .
- Se adicionaron 10 ul de Ab específico en las basinas inferiores y 10 ul de Ag de referencia en las basinas del centro y 10 ul de los Ag problema en las basinas superior derecha e izquierda .
- Se incubó por 24 hrs. a temperatura ambiente observando la presencia de bandas de identidad . Descartandose como prueba negativa después de las 72 hrs. a la ausencia de bandas de precipitación.

-El gel de agarosa positivo se dejó a secar y a teñir con una solución de azul de Coomassie al 1% por 15 min. , se decoloró con una solución de etanol , ácido acético y agua destilada por 30 min. y se procedió a observar las bandas de precipitación identidad total , parcial o no identidad .

B)-.Inmunodot:

El Inmunodot es una variante del ensayo inmunoenzimático (ELISA) el cual se diferencia en el soporte sólido utilizado ,en este caso son las membranas de nitrocelulosa .

El Ag soluble se adsorbió a la membrana de nitrocelulosa y el Ag no unido se eliminó por medio de lavados . Las áreas libres de la membrana de nitrocelulosa fueron ocupadas por el agente bloqueador , al término se adicionaron los Ab y las reacciones Ag-Ab fueron detectados por un conjugado , que es un anti-anticuerpo, acoplado covalentemente a la peroxidasa . El ligando enlazado se visualizó por la adición de un sustrato cromogénico específico , provocando una precipitación de gris a púrpura lo que se definió como prueba positiva. La ausencia de color se interpretó como negativa .

METODO

- 1.- Se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa el CFA problema purificado a concentración conocida .
- 2.- Se bloqueó, con una solución de gelatina al 3% en solución en buffer de fosfatos (PBS) a temperatura ambiente 30 min. en agitación
- 3.- Se lavó 3 veces con PBS en agitación , de 2 a 3 min cada lavado.
- 4.- Se agregó el Ac contra el CFA diluido en solución de gelatina al 0.1% en PBS y se incubó 90 min a temperatura ambiente con agitación .
- 5.- Se repitieron los tres lavados con PBS .
- 6.- Se adicionó el conjugado de inmunoglobulinas de conejo contra inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa , diluido 1:500 en solución de gelatina al 0.1% en PBS , incubándose 90 min a temperatura ambiente en agitación lenta .
- 7.- Se repitieron los tres lavados con PBS.
- 8.- Se adicionó el sustrato 4-alfa-naftol más peróxido de hidrogeno por 15 min en agitación .
- 9.- La reacción enzimática se detiene con la adición de agua .

C).- Ensayo inmuno enzimático de CFA-inhibición (ELISA):

El ensayo inmuno enzimático CFA-inhibición (ELISA) se realizó sobre microplacas de poliestireno, las cuales son la fase sólida, donde se inmovilizó al antígeno (Ag) en este caso los CFAs puros de referencia

El Ag problema CFA en solución salina se incubó en la placa de poliestireno y es inmovilizado sobre la placa, el Ag libre se elimina por lavados y bloqueándose las partes de la placa libre con albúmina sérica bovina evitándose con esto subsecuentes enlaces inespecíficos de proteínas. Diluciones decrecientes de Ag libre se adicionaron en cada uno de los pozos, adicionando al mismo tiempo los anticuerpos a una concentración constante en cada uno de los pozos, los cuales fueron enlazados por los Ag, tanto Ag libres como los Ag inmovilizados en la placa, originándose una competencia entre ellos por el anticuerpo, las proteínas enlazadas fueron lavadas y los anticuerpos que se fijaron al Ag inmovilizado fueron detectados por un ligando, el cual es una molécula capaz de detectar anticuerpos (con un anti-anticuerpo) acoplado covalentemente a la peroxidasa, estos anticuerpos fueron enlazados. El ligando enlazado fue visualizado por la adición de un cromógeno. La enzima actuó sobre el sustrato cromogénico mismo que al efecto de su hidrólisis da un producto final colorido, para una prueba negativa y la ausencia de color se consideró como una prueba positiva.

METODO

- 1).-Se colocó sobre una microplaca de ELISA el CFA puro de referencia a una concentración de 5 ug/ml (100 microlitros por pozo) y se incubó a temperatura ambiente por toda una noche .
- 2).-Lavando 3 veces con bufer de fosfatos (PBS) en agitación , de 2 a 3 min. cada lavado , en agitación y secar.
- 3).-Bloqueando con gelatina al 1% a 37 C por 30 min.
- 4).-Se repitieron los 3 lavados con PBS
- 5).-Posteriormente se adiciono 50 ul de solución salina a cada uno de los pozos , adicionandole 20 ul del CFA problema al primer pozo , haciendo diluciones seriadas de este CFA en cada uno de los pozos siguientes , con un volumen final de 50 ul en cada pozo , posteriormente se le adiciono el 50 ul de Anticuepo (Ac) contra el CFA diluido en solución de gelatina al 0.1% en PBS completando un volumen de 100 ul por pozo y se incubó 90 min. a temperatura ambiente en agitación .
- 6).-Se repitieron los 3 lavados con PBS .
- 7).-Se adiciono el conjugado de inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa , diluido 1:500 en solución de gelatina al 0.1% en PBS incubando 90 min. a temperatura ambiente en agitación lenta .
- 8).-Se repitieron los 3 lavados con PBS .
- 9).-Adicionandose posteriormente el sustrato orto-fenilen diamina más peroxido de hidrógeno.
- 10).-Se leyó en el espectrofotómetro con el filtro de 450 nm . a los 20 min. y se valoró el 50 % de inhibición para ser considerada como prueba positiva de inhibición

RESULTADOS

La valoración de la expresión de los CFAs en las cepas de referencia de ETEC por Ac. monoclonales , mostró que cada una de las cepas empleadas expresa solo uno de los CFAs (Tabla No 2). Esto es la cepa H10407 expresa el CFA/I , la cepa 139275 expresa el CFA/II con los componentes de superficie (CS) CS1+CS3 y la Rowe 1 el CFA/IV con CS4+CS6 y la cepa Rowe 5 el CFA/IV con CS5+CS6 (Tabla No 3). Se realizó un total de 18 cosechas para obtener los crudos de los cuatro CFAs a purificar . De las cuales 5 fueron para el CFA/I obteniendose 11.040 mg de de CFA/I crudo , 5 para el CFA/II y se obtuvieron 27.780 mg , 4 para la tercera fimbria purificada que fué el CFA/IV con CS4+CS6 de la que se obtuvieron 15 mg y 4 para la última fimbria purificada , el CFA/IV con CS5+CS6 que proporcionaron 31.840 mg de antígeno crudo (Tabla No 4) .

Una vez obtenidos los CFAs crudos se procedió a su purificación mediante la columna de celulosa de intercambio iónico DEAE-SEPHACEL con un rango de exclusión de 12,000 a 14,000 daltons . La fig. No 1 muestra la curva de elución del CFA/IV (CS4,CS6) , en la cuál se pueden apreciar dos picos principales , el primero corresponde a las proteínas contaminantes , como pueden ser las proteínas de membrana externa o de la pared celular , y el segundo al CFA/IV puro . Las fig. 2 y 3 muestran las curvas de elución de CFA/I y CFA/II respectivamente .

TABLA No 2

**CEPAS DE REFERENCIA DE ETEC
UTILIZADAS PARA LA PURIFICACION DE CFAs**

CEPAS	EXPRESION DE CFAs	COMPONENTES DE SUPERFICIE	PRODUCCION DE TOXINAS	SEROTIPOS
H10407	CFA/1	-	LT/ST	O78:H11
139275	CFA/11	(CS1,3)	LT/ST	O6:H6
ROWE 1	CFA/IV	(CS4,6)	LT/ST	O25:H42
ROWE 5	CFA/IV	(CS5,6)	LT/ST	O167:H5

TABLA No 3

EXPRESION DE LOS CFAs EN CEPAS DE ETEC DE REFERENCIA VALORADOS CON
ANTICUERPOS MONOCLONALES POR INMUNODOT

CEPAS	ANTI-CFA/1	ANTI-CFA/11	ANTI-CFA/IV
CFA/I H10407	+	-	-
CFA/II 139275	-	+	-
CFA/IV ROWE 1	-	-	+
ROWE 5	-	-	+

TABLA No 4

RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LA PURIFICACION DE LOS CFAs

CFAs	(mg) CRUDOS	CFAs PURIFICADOS	(mg) PUROS	% DE RENDIMIENTO
I	11.04	I	3.00	27.10
II (CS1,3)	27.78	II	10.98	48.20
CFA/IV (CS4,6)	15.00	CS4	0.442	2.90
CFA/IV (CS5,6)	31.84	CS5	17.20	54.20

PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA CFA/IV

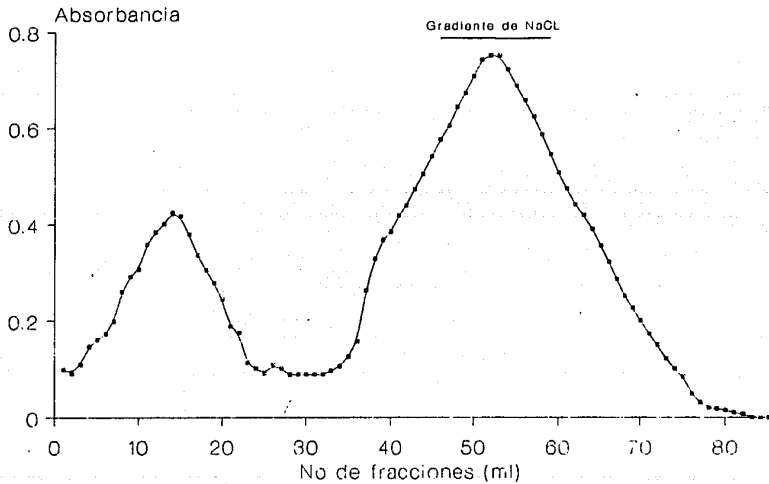
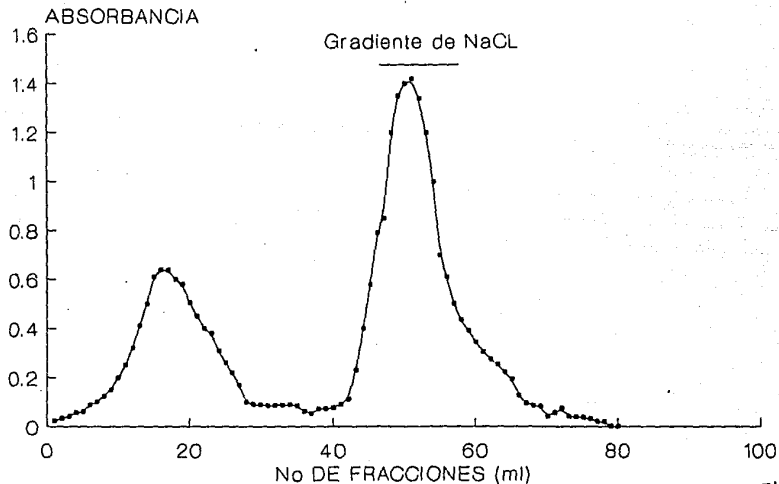


Fig. No 1

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO
IONICO DEAE-SEPHACEL

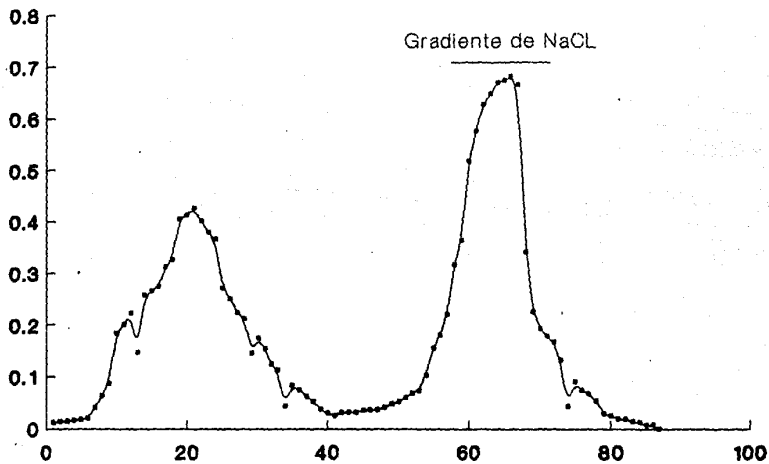
PURIFICACION POR CROMATOGRFIA CFA/I



CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO
IONICO DEAE-SEPHACEL

Fig. No 2

PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA CFA/II



CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO
DEAE-SEPHACEL

El porcentaje de rendimiento se calculó en base a la concentración inicial de los CFAs crudos y la concentración final obtenida de los CFAs purificados , determinada esta concentración de proteínas mediante el método de Coomassie (Fig.No 4). El rendimiento de CFAs purificados fue de 2.9% a 54% como se muestra en la tabla No 4 .

La pureza de los CFAs se valoró por pruebas inmunológicas tales como inmunodot , doble difusión de Ouchterlony y la inhibición CFA-ELISA y electroforesis en geles SDS-Poliacrilamida . La doble difusión se utilizó para valorar CFA/I, CFA/II (CS1,3) y el CFA/IV (CS4,6) como se muestra en la fig. No 5 ; en la que se observa que la banda de precipitación del CFA/I purificado y el CFA/I de referencia se presenta como una sola banda de identidad total al anticuerpo monoclonal específico , para el CFA/II purificado y el CFA/II de referencia se observan las dos bandas de identidad total al CS1 y CS3 respectivamente utilizandose un anticuerpo policlonal específico . También se muestra la banda de identidad obtenida del CFA/IV purificado .

En el inmunodot en la cual la reacción Ag-Ab se lleva acabo en una membrana de nitrocelulosa , y la precipitación purpura intensa indican una prueba positiva , se encontró una especificidad total en la reacción inmunológica , entre el CFA/I (H10407) , CFA/II CS1,3(139275) , CFA/IV CS4,6(Rowe 1) y CFA/IV CS5,6(Rowe 5) y sus respectivos Anticuerpos monoclonales específicos (Mab) , como se muestra en la fig. No 6 , en la que además se observa que al hacer reaccionar los CFAs con Mabs no específicos no existe precipitación alguna .

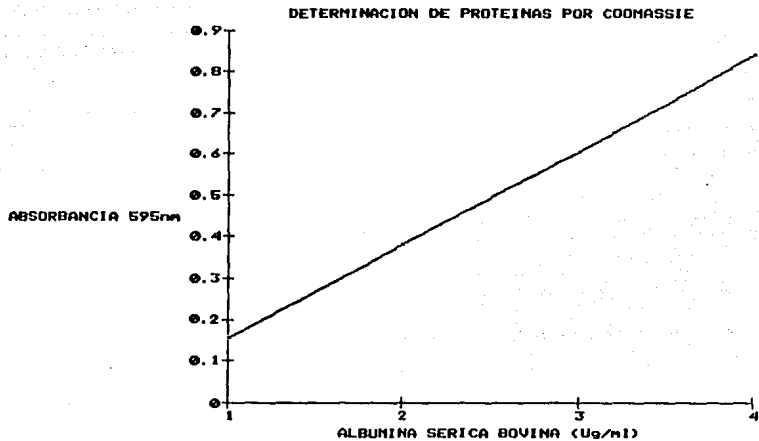


Fig. No 4

Determinación de la concentración de proteínas de los CFAs purificados por la técnica de Coomassie .

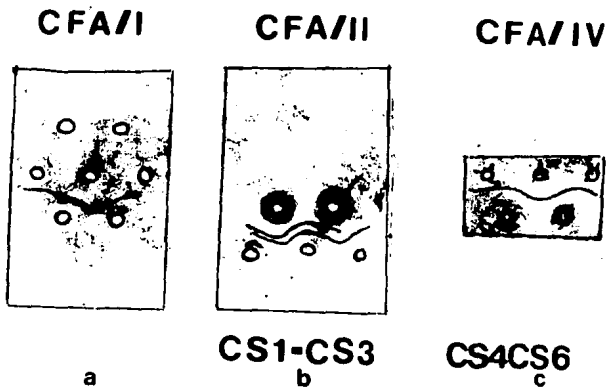


FIG No 5

Valoración inmunológica de los CFAs purificados mediante la Doble Difusión de Ouchterlony en soporte de Agarosa tipo 1 al 1%.

- a).- CFA/I :
- Basina izquierda CFA/I de referencia
 - Basina central CFA/I purificado
 - Basina Derecha CFA/I de referencia
 - Basinas inferiores anticuerpo monoclonal (Mab) específico a CFA/I
- b).- CFA/II(CS1,3)
- Basina superior Mab específico a CFA/II (CS1,3).
 - Basina izquierda CFA/II(CS1,3) de referencia
 - Basina central CFA/II(CS1,3) purificado
 - Basina derecha CFA/II(CS1,3) de referencia
- c).- CFA/IV(CS6)
- Basina izquierda CFA/IV(CS4,CS6) de referencia
 - Basina central CFA/IV(CS4,CS6) purificado
 - Basinas inferiores Mab específico a CFAS/IV (CS4) .

DETECCION DE LOS CFAs POR INMUNODOT

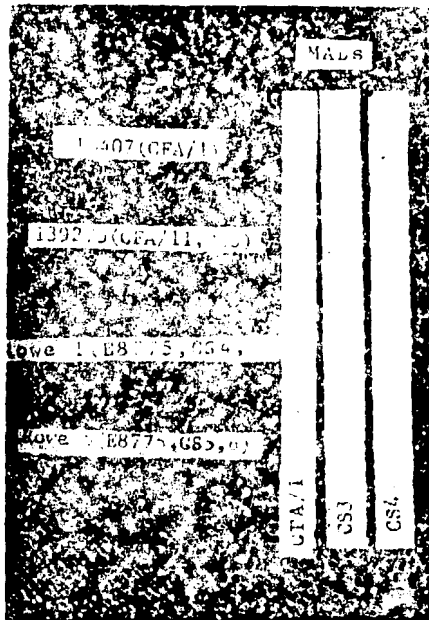


FIG. No 6

Inmunodot . Aquí se puede observar la reacción de reconocimiento de cada uno de los CFAs purificados por sus correspondientes anticuerpos monoclonales específicos . En cada una de las tres membranas de nitrocelulosa se colocaron los cuatro CFAs purificados , CFA/I , CFA/II(CS1,3) , CFA/IV(E8775 CS4,6) y CFA/IV(E8775 CS5,6) , y cada una de las membranas reacciona con un anticuerpo monoclonal diferente , Anti-CFA/1 , Anti-CFA/II(CS1,3) y Anti-CFA/IV(E8775 CS5,6) , observándose una reacción específica de reconocimiento de cada CFA.

La valoración de la pureza de los CFAs se llevó a cabo por la inhibición del ensayo inmuno enzimático (CFA-ELISA) en el cual el antígeno puro de referencia se inmovilizó en la placa de poliestireno y se adicionó como antígeno libre el purificado por nosotros a diferentes concentraciones (2.5 ugr/100U1 , 1.2 ugr/100U1 , 0.6 ugr/100U1 , 0.3 ugr/100U1 , 0.15 ugr/100U1 , 0.075 ugr/100U1) seguido de la adición inmediata del anticuerpo monoclonal específico (Mab). Se graficó el valor de absorbancia contra la concentración del CFA puro a las diferentes concentraciones . El resultado se evalúa determinando el porcentaje de inhibición , en donde a mayor inhibición mayor afinidad del Mab por el antígeno libre . La fig. No 7 corresponde al CFA/I , en la que se aprecia que a medida que aumenta el antígeno libre disponible aumenta el porcentaje de inhibición , siendo la máxima de 81% la cual correspondió a 2.5 ugr/ml de antígeno libre . Las inhibiciones de los demás antígenos fueron de 78% para CFA/II y de 80% para CFA/IV , como se observa en las figuras 8 y 9 respectivamente .

Los geles de poliacrilamida al 15% mostraron los pesos moleculares de los CFAs purificados , así como de los componentes de superficie , se muestran en la fig. No 10.

CURVA DE INHIBICION DE CFA-ELISA CFA/I

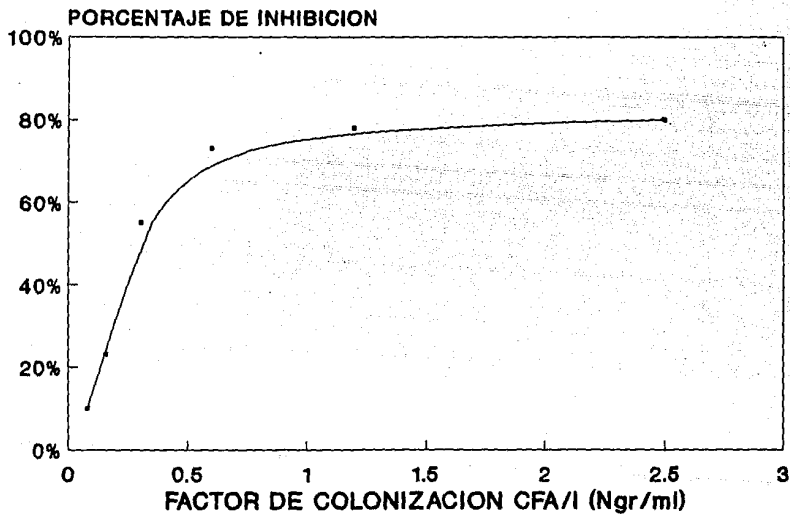


Fig No 7

CURVA DE INHIBICION CFA-ELISA CFA/II

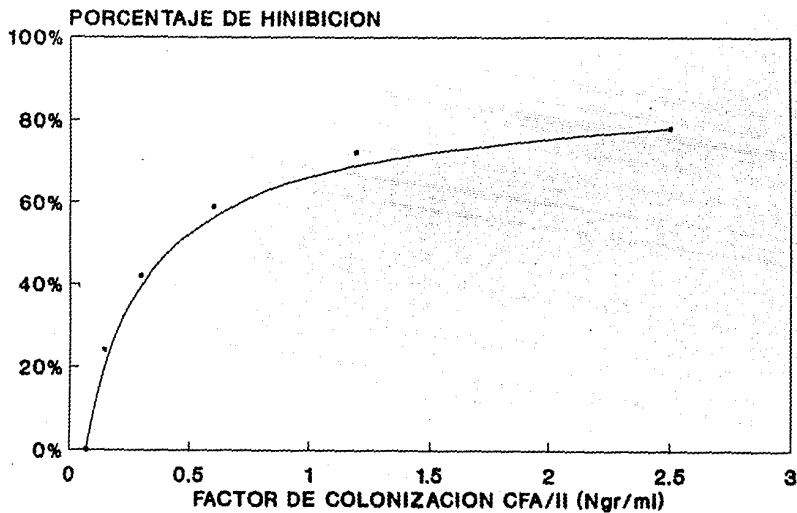


Fig. No 8

CURVA DE INHIBICION CFA-ELISA CFA/IV

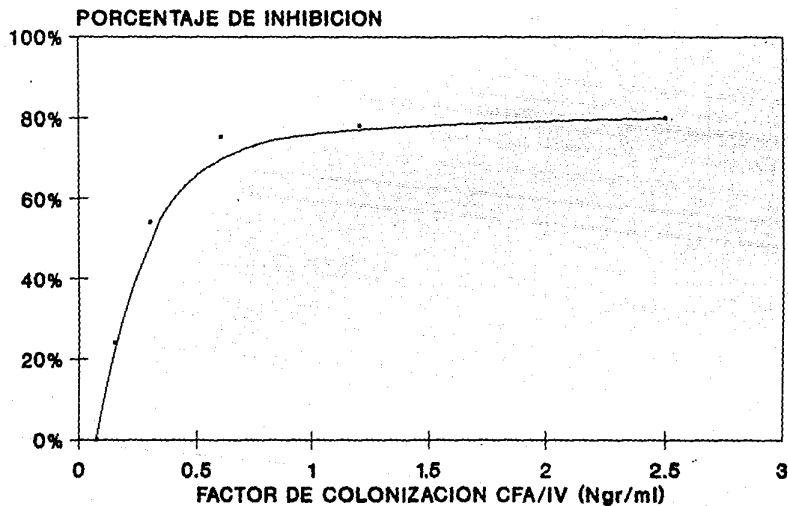


Fig No 9

PATRON ELECTROFORETICO DE LOS CFAs PURIFICADOS

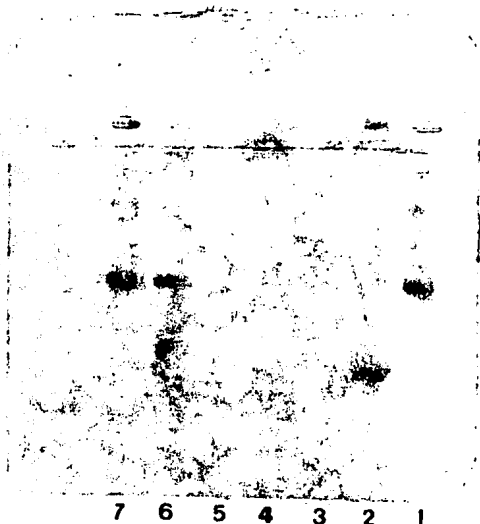


FIG. No 10

Electroforesis en gel de poliacrilamida al (10-15%) con dodecil sulfato de sodio (SDS) para factores de colonización 100 volts/20 min.

Columna 1 y 7 pesos moleculares estandares; columna 2 y 6 CFA/IV CS5+CS6 y CS4+CS6 ; columna 3 y 4 CFA/II CS2+CS3 y CS1+CS3 y columna 5 CFA/I .

DISCUSION

La diarrea causada por Escherichia coli Enterotoxigenica (ETEC) presenta una distribución mundial y sus cuadros más severos se encuentran en niños menores de cinco años de edad en países en vías de desarrollo (1,2).

La patogenicidad de ETEC esta mediada por factores de virulencia como lo son enterotoxinas y factores de colonización (CFAs) . Dada la importancia de los CFAs en la patogenia de ETEC en humanos y animales domesticos es indispensable el mejoramiento de las técnicas de purificación e identificación de ellos , lograndose con esto incrementar el rendimientos de CFAs puros .

Una de las principales variantes que se realizaron en la obtención y purificación de los CFAs de ETEC fue en la etapa de cosecha , en la cual se llevaron a cabo dialisis de lo cosechado en buffer de acetatos pH Ácido (3.5) , lo cual permitió la agregación de los pilis , a diferencia de lo relizado por Evans y Evans (5) , quienes utilizan la ultracentrifugación . Otra de las modificaciones realizadas a la técnica original fué la omisión de la filtración del sobrenadante sobre filtro millipore de poro 0.65 μ , realizandose la separación del sobrenadante mediante decantación despues de 3 días de reposo a 4 C. Es importante señalar que en la diálisis el pH debe de ser el adecuado con el fin de obtener el mayor rendimiento en el proceso de agregación del pili .

Es de suma importancia verificar que la cepa que se trabaja exprese el CFA a purificar , y esto se logra mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales especificos .

Uno de los principales problemas a resolver en las cosechas masivas de ETEC , que expresan los CFAs , es el de la contaminación , lo que da por resultado un cultivo mixto con los microorganismos contaminantes afectandose la expresion total de los CFAs. Para evitar esto , es pertinente realizar pruebas bioquímicas y frotis para asegurarse de un cultivo puro de ETEC .

En lo referente a la purificación de los CFAs , mediante la cromatografia de intercambio iónico , se debe evitar compactar la columna , ya que la elución de la misma se realizará lentamente y en forma poco eficiente , ocasionado una obstrucción total del émbolo impidiendose así la estandarización del goteo . También que los tubos que colectan el líquido de elución de la columna no permanezcan a temperatura ambiente ya que ello favorece cualquier tipo de contaminación de los CFAs ya puros debido a que son proteínas , o bien la desnaturalización de los mismos .

Los resultados fueron comprobados por ensayos inmunológicos de alta sensibilidad y especificidad , con la ayuda de anticuerpos monoclonales especificos a cada uno de los CFAs ; en el ensayo de inhibición CFA-ELISA , la afinidad de los anticuerpos monoclonales por los CFAs purificados por nosotros , demostró que la pureza de estos antígenos son similares a los CFAs de referencia . Esta pureza de nuestros CFAs también se demuestra en los geles de doble difusión , observandose que los anticuerpos monoclonales utilizados reconocen tanto a los CFAs purificados por nosotros como a los de referencia utilizados , formandose las bandas de identidad total al antígeno (fig. No 5) .

En el inmunodot la pureza de los CFAs también se hace evidente , pues la reacción con los anticuerpos monoclonales fué altamente específica .

Las modificaciones efectuadas a la técnica de obtención de los CFAs crudos y el método de purificación por cromatografía permiten obtener los CFAs con una pureza similar a la de los de referencia , pero con rendimientos muy superiores al obtenido por otros autores (17) , que son de alrededor del 10% , por lo que es importante hacer notar que con las modificaciones realizadas a la técnica descrita por Evans y Evans se elevó el rendimiento global de los CFAs en un 26% . Los CFAs purificados se liofilizaron en frascos ampula y se almacenaron a temperatura de -70C.

En futuras investigaciones estos CFAs purificados , serán utilizados como antígeno para la detección de anticuerpos en la infección natural por ETEC en niños menores de 5 años de una zona suburbana de la Ciudad de México y de turistas que visitan al país .

En el futuro , las mejoras en las técnicas de obtención y purificación de los CFAs aquí descritas , posiblemente sean de utilidad para la elaboración de una vacuna que proporcione inmunidad contra infecciones por ETEC .

CONCLUSIONES

- 1.- La utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos son indispensable para verificar la expresión de los CFAs de las cepas a purificar .
- 2.- Es necesaria la realización de pruebas bioquímicas y frotis de las cosechas masivas de ETEC para evitar la contaminación .
- 3.- En la diálisis se debe de mantener el pH adecuado para obtener una mayor agregación de los CFAs crudos .
- 4.- Es de suma importancia la estandarización del método de cromatografía de intercambio iónico, para optimizar la recuperación del CFA puro.
- 5.- Las modificaciones al método original de purificación mejoraron en un 26% el rendimiento global de los CFAs .
- 6.- El cuantificar el CFA purificado utilizandose anticuerpos específicos ya sean policlonales o monoclonales nos permite estandarizar pruebas tempranas de detección en la expresión de ETEC de primoaislamientos.
- 7.- Los CFAs purificados podran ser utilizados como antígenos para la detección de anticuerpos en la infección natural por ETEC .
- 8.- Las mejoras en las técnicas de obtención y purificación aquí descritas posiblemente se han de utilidad para la elaboración de una vacuna que proporcione inmunidad contra infecciones por ETEC .

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arredondo , J.L. . Diarrea en el recién nacido . Boletín Médico Hospital Infantil de México 44:360-367,1987.
- 2.- Craviotoo , A. y Col.. Incidencia y etiología de la diarrea aguda durante los primeros dos años de vida de una cohorte de niños rurales . Boletín Médico Hospital Infantil de México 44:316-321,1987 .
- 3.- Calva , J.J. , López Vidal , Y. , Trujillo , A. , Ponce de Leon , A. , Ramos , A. , Ruíz Palacios , G. . Infección Intestinal por Escherichia coli enterotoxigenica con factor de colonización . Estudio de una cohorte de niños en la Ciudad de México . Memorias de la Reunión de la Asociación de Investigación Pediátrica Valle de Bravo México ,Junio 1988 .
- 4.- Merson , M.M , G.K.Morris , D.A.Sack , J.E.Wills , J.C.Feeley , R.B.Sack , W.B.Creech , A.Z.Kapikian , and E.J.Gongorosa. Travelers'diarrhea in México . A prospective study of physicans and family members attending a congress. N. Engl. J. Med. 294:1299-1305 , 1976 .
- 5.- Gorbach , S.L. , B.H.Kean , D.G.Evans , D.J.Evans Jr. and D.Bessado . Travelers diarrhea and toxigenic Escherichia coli. N. Eng.J. Med. 292-933 , 1975 .
- 6.- Black , R.E. , M.H.Merson , A.S.M.M.Rahman , M.Yunus , A.R.M.A Alim , I.Hug , R.H.Yolken and G.T.Curlin. A two-year study of bacterial , viral , and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh . The Journal of Inf.Dis 42:660-664 , 1980 .

- 7.- Satterwhite , Terry K. , D.G.Evans , H.L.Dupont and D.J.Evans Jr. Role of Escherichia coli colonization factor antigen in acute diarrhea . The Lancet 22:181-183 , 1978 .
- 8.- Parry S.H., Rooke DM . Adhesins and colonization factors of Escherichia coli In Sussman M ,ed. the virulence of Escherichia coli . London Academic Press , 1985:79-155 .
- 9.- D.G. Evans , D.J. Evans Jr. , S.Clegg , y J.A. Pauley . Purification of the CFA/I antigen of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. and Inmun. 25:738-748 , 1979 .
- 10.-Linda V.Thomas , Alejandro Cravioto , Sylvia M. Scotland and Bernard Rowe . New fimbrial antigenic type (E8775) that represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans .Infect. and Inmun. 35:1119-1124, 1982 .
- 11.-C.M.Ahren , L.Gotherfors , B.J.Stoll , M.A. Salek , and A.M.Svennerholm . Comparasion of methods for detection of colonization factor antigen on enterotoxigenic Escherichia coli . J. of Clinical Microbiology 23:586-591 , 1986 .
- 12.-Myron M. Levine , Margaret B. Rennels , Velma Daya , and Timothy P. Hughes . Hemagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli that cause diarrhea . J. of Infect. Dis. 141:733-737 , 1980.

- 13.-D.J.Evans Jr., D.G.Evans , and H.L.Dupont . Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli determined with human, bovine, chicken , and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of manose . Infect and Immun. 23:336-346, 1979 .
- 14.-D.G.evans , and D.J. evans Jr. . New surface associated heat labile colonization antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups O6 and O8 . Infect. and Immun. 21:638-647 , 1978 .
- 15.-R.E. Isaacson . K99 surface antigen of Escherichia coli ; purification and partial characterization . Infect. and Immun. 15:272-279 , 1977 .
- 16.-Juitvimol Seriwatana , Peter Echeverria , Joel Escamilla , Roger Glass , Imadul Hug , Robert Rockhill and Barbara J. Stoll. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli in patients with diarrhea in Asia with three enterotoxin gene probes . Infect. and Immun. 42:152-155 , 1983 .
- 17.-Gaastra W., de Graaf F.K. . Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic Escherichia coli strains Microbiology Rev. 46:129-161 , 1982 .
- 18.-Per Klemm . Fimbrial adhesin of Escherichia coli . Reviews of Infect.Dis. 7:321-340 , 1985 .

- 19.-Alejandro Cravioto . Prespectivas para la elaboración de vacuna antiadhesiva contra cepas de Escherichia coli causante de diarrea en humanos . Boletín Médico , Hospital Infantil de México 41:188-196 , 1984 .
- 20.-Leif Gotherfors , C.Ahren , Barbara Stoll , D.K.Baura , F.Orskow , M.A.Salek , and A.M.Svennerholm . Presence of colonization factor antigens of fresh isolates of fecal Escherichia coli : A prospective study . J. of Infect.Dis. 152:1128-1133 , 1985 .
- 21.-Myron M. Levine. Escherichia coli that cause diarrhea : Enterotoxigenic , Enteropathogenic , Enteroinvasive , Enterohemorrhagic , and Enteroadherent . J. of Infect.Dis. 155:377-389 , 1987 .
- 22.-Ida Orskov, and F.Orskov. Especial O:K:H serotipes among enterotoxigenic E.coli strains from diarrhea in adults and children Med.Microbiol.Immunol. 163:99-110 , 1977 .
- 23.-E.Back ,R.Mollby , B.Kaijser , G.Stintzing , T.Wadstrom , and D.Habte . Enterotoxigenic Escherichia coli and other gram-negative bacteria of infantile diarrhea .Surface antigens , hemagglutinins , colonization factor antigen , and loss of enterotoxigenicity. J. of Infect.Dis. 142:318-327 , 1980.
- 24.-S.Changchawalit , P.Echeverria , DN.Taylor ,U.Lekssomboon , C.Tirapat , B.Eampokalap and B.Rowe. Colonization factors associated with enterotoxigenic Escherichia coli aislated in Thailand . Infect. and Immun. 45:525-527 , 1984 .

- 25.-L.V.Thomas and B.Rowe The occurrence of colonization factor (CFA/1,CFA/11, and E8775) in enterotoxigenic Escherichia coli from various countries in South east Asia. Med. Microbiol. Immunol. 171:85-90 , 1982 .
- 26.-M.Henriqueta L. Reis , Darcy P. Matos , Antonio F. Pestana de C. M.Regina , F.toledo , and Luiz R. Trabulsi . Relationship among enterotoxigenic phenotypes , serotypes , and sources of strains in enterotoxigenic Escherichia coli . Infect. and Immun. 28:24-27 , 1980 .
- 27.-Linda V. Thomas , Bernard Rowe , and Moyra M.McConnell . In strains of Escherichia coli 0167 a single plasmid encodec for the coli surface antigens CS5 and CS6 of putative colonization factor PCF 8775 , heal-stable enterotoxin , and colicin Ia . Infect and Immun. 55:1929-1931 , 1987 .
- 28.-Sussman M. Escherichia coli in human and animal disease In. Sussman M. ed. The virulence of Escherichia coli London Academic Press , 1987:7-45 .
- 29.-D.G.Evans , D.Y.Graham , D.J.Evans Jr. Administration of urified colonization factor antigens (CFA/1,CFA/11) of enterotoxigenic Escherichia coli to volunteers .Response to hanllege with virulent enterotoxigenic Escherichia coli . Gastroenterology 73:934-940 , 1984 .
- 30.-Dr. Stanley L.Robbins , Patologia Estructural y Funcional. Ed. Interamericana México D.F. 1975 pag. 386-387

- 31.-Joyce D. Grybuki , MD, and Craig Hillemcier , MD . Chonic Diarrhea in Children . Current Concepts A Scope Publication (The Upjohn Company) 1982 , p 8-9 .
- 32.-Robert G.Perudorf , Raymon D.Adams , Eugene Braunwald , Kurt J.Isselbacher , Joseph B.Martin , Jean D.Wilson . Harrison's Principles of Internal Medicine , then edition . Ed. Mc Graw Hill 1983 p 945-947 .
- 33.-Paul D.Hoeprich editor Ifection Diseases 3o Edition , Harper and Row , Publishers USA 1983 p. 643-648