

## **Caracterización parcial del epítoto de fimbria K88ab de la *Escherichia coli* (ECET) reconocido por un anticuerpo monoclonal dirigido hacia la adhesina**

Ana Campal Espinosa, María Castro Santana, Jesús Junco Barranco y Sonia Casas Suárez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey

### **Resumen**

Se caracterizó parcialmente un epítoto conformacional, localizado en la región “b” de la K88ab de la *Escherichia coli* enterotoxigénica, que es reconocido por el anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma 11/70. La especificidad del anticuerpo monoclonal fue definida por ensayos tipo ELISA y por aglutinación con bacterias portadoras de fimbrias, para la detección del antígeno. Ello demostró que el AcM 11/70 es útil para ser empleado en el diseño de sistemas de diagnóstico dirigidos a la realización de estudios epizootológicos, como una herramienta ineludible a la hora de aplicar vacunas contra cepas de ECET en las granjas porcinas.

### **Abstract**

A conformable epitope was partially characterized at the “b” region of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ab. The epitope is recognized by the monoclonal antibody secreted by the hybridoma 11/70. The specificity of the monoclonal antibody for antigen detection, was defined by the ELISA test and agglutination with fimbrial bacteria. Mab 11/70 proved its usefulness to design diagnosis systems for epizootological studies as an essential tool for vaccination against ETEC strains in swine breeding farms.

Palabras claves: Fimbria, *Escherichia coli* enterotoxigénica, anticuerpos monoclonales, K88

### **Introducción**

La adherencia mediada por fimbrias es un evento fundamental en la patogénesis de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) (Moon *et al.*, 1980; Wilson y Francis, 1986; Fairbrother, 1993; 1994). Posterior a este paso, se liberan enterotoxinas que causan diarreas y muerte. Las fimbrias de las ECET están compuestas por subunidades proteicas repetitivas cuyos pesos moleculares oscilan entre 18 000 y 30 000 Da, así como de subunidades menores. En cepas de ECET que afectan a los animales expresan comúnmente en su superficie las adhesinas fimbriadas F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41, F42, F165, F17 y F81 (Nagy y Fequete, 1999), las que son antigénicamente diferentes.

En el mundo la mayor parte de las cepas aisladas de cerditos con enterotoxiosis han sido K88<sup>+</sup> (Fang L. *et al.*, 2000). Se han descrito variantes serológicas entre la pili K88, ellas son: F4ab (K88ab), F4ac (K88ac) y F4ad (K88ad) (Ørskov, *et al.*, 1964; Guineé y Jansen 1979; Van der Broeck *et al.*, 2000). El factor *a* constituye un determinante antigénico común, mientras los factores *b*, *c*, *d* representan determinantes subtipo específicas (Fang *et al.*, 2000). A través del estudio de perfiles de hidrofiliidad de esta adhesina se ha determinado que entre los aminoácidos 96-104 se encuentra el epítoto común *a*, entre la región aminoacídica 152-157 el epítoto *b*, en la región 164-174 el epítoto *c*, en la región 235-241 el epítoto *d*, en la región 213-219 un epítoto común para *ac* y *ad* y los residuos 208-224 posiblemente porten un epítoto común a la K88ab y la K88ad (Van Zijderveld *et al.*, 1990).

En el artículo se describe la caracterización de un epítoto conformacional localizado en la región *b* de la pili K88ab reconocido por el anticuerpo monoclonal (AcM) secretado

por el hibridoma 11/70. Se discute además, la utilidad de anticuerpo para el diseño de sistemas diagnósticos para la detección de cepas K88ab<sup>+</sup>.

## **Materiales y Métodos**

### **Cepas bacterianas**

Las cepas fimbriadas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ECET): H945/77 (O157:K88ac,LT+,Sta-), G 205 (O8:K87:K88ac), G7 (O8:K87: K88ab), pr (190-56 O32:K87: K88ad) , B44 (O9: K30K99,F41:H-), MO6 (O101: K30: F41), 987p-2 (O9:K103), 987p, MO5 (O101:K30:F41), fueron donadas por el Instituto de Veterinaria de Santiago de Compostela, Lugo, España y por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA, Cuba). Se utilizó además, una cepa BB4 portadora del plásmido recombinante PK203 que expresa la pili K88ab (Registro Clínico VACOLI, 1994) y la cepa de *Escherichia coli* M1061 no transformada como control negativo. Todas las cepas se crecieron en medio MINCA a 37 °C (Guinée *et al.*, 1976).

### **Anticuerpos**

Los anticuerpos policlonales (AcP) contra las proteínas K88 nativa y electroeluida, K99 electroeluida y HB101 obtenidos en conejos fueron purificados y caracterizados en nuestro laboratorio. Antes de emplearse, los anticuerpos fueron absorbidos con cepas de ECET, a las que se les inhibió previamente la expresión de la fimbria, por incubación del cultivo a 18 °C, por 72 horas. Los antisueros anti-F41 y anti-987P en conejos fueron gentilmente donados por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (La Habana, Cuba).

### **Antígenos fimbriales**

Los cultivos celulares fueron recolectados y centrifugados a 4000 r.p.m. por 10 minutos y luego resuspendidos en tampón PBS1x hasta alcanzar una absorbancia de 60 DO . La extracción y la purificación de las fimbrias se realizaron usando el método de Graff y Roorda (1982). Las fimbrias fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-200 (Amersham-Pharmacia). A las fracciones purificadas se les determinó la concentración de proteínas totales (Lowry *et al.*, 1951). La pureza se determinó por SDS-PAGE al 12,5 % (Laemli, 1970). La intensidad de las bandas fueron leídas en un fotodensitómetro (Atom, España). Un ELISA tipo "sandwich" fue empleado para la cuantificación e inmunodetección de las proteínas fimbriales ( Borroto *et al.*, 1992).

### **Inmunización de los ratones**

Ratones hembras Balb/c (Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio - CENPALAB-, La Habana, Cuba) de 7 semanas de edad, fueron inmunizados subcutáneamente con 10 µg del antígeno fimbrial k88ab, purificado, emulsificado en adyuvante completo de Freund. Fueron reinmunizados 3 veces más con intervalos de un mes entre inmunizaciones, por la misma vía, pero utilizando adyuvante incompleto de Freund. La inmunización final se realizó por vía intraperitoneal tres días antes de realizar la fusión.

### **Generación y purificación de los anticuerpos monoclonales**

Los esplenocitos del ratón con mejor título fueron fusionados con células de mieloma murino de la línea X63/Ag8/653 (ATCC). Para la fusión, clonaje y chequeo de la secreción de los hibridomas se siguió el protocolo descrito por Köller y Milstein (1975) y Duarte *et al.* (1987). Los anticuerpos obtenidos fueron purificados a partir de líquido ascítico. Para ello, la ascitis fue precipitada con (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50 % de saturación. El

precipitado se dializó en Tris 10 mmol/L y pH 8,5 y se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La elusión fue realizada con un gradiente creciente de NaCl entre 50 y 500 mmol/L. Las fracciones fueron finalmente dializadas contra PBS1x.

### **Determinación del isotipo**

El isotipo se determinó por inmunodifusión radial utilizando un gel de agarosa al 1,5 % diluido en TFS1x por el procedimiento descrito por Ouchterlony (1978). Los antisueros utilizados como patrón fueron anti-inmunoglobulinas de ratón IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM (ICN Biochemicals, USA). Los resultados del experimento fueron interpretados a las 72 horas, el isotipo se infirió, en cada caso por la aparición de bandas de precipitación.

### **Ensayo de Western- Blot**

Las proteínas fimbriales naturales y recombinantes extraídas de las cepas referentes u hospederas respectivamente, fueron corridas en un gel de SDS-PAGE al 15 % (Laemli, 1970) y transferidas a un soporte de nitrocelulosa (Schleider & Shuell Co., Keene, N.H.) usando un equipo de transferencia semiseco (Sigma, USA) a 500 mA siguiendo el método descrito por Towbin *et al.* (1979). La nitrocelulosa fue incubada con el sobrenadante de los hibridomas sin diluir. Como control positivo se utilizó un AcP anti-K88 obtenido en conejo y como control negativo un AcP anti-K99 en conejo diluidos 1/50. Para la inmunodetección fueron adicionados los AcP anti-IgG de ratón en conejo para las muestras a chequear y anti-IgG de carnero en conejo para los controles. La reacción fue revelada usando un conjugado proteína A-oro coloidal hasta que apareció la banda coloreada. Entre cada paso se incluyeron 3 lavados por 10 minutos con TTS 1x y un lavado con TTS1x +0,01 % de NP-40 (Fluka, Suiza).

### **Ensayos de aglutinación bacteriana**

Las cepas bacterianas fueron crecidas según se describió arriba. Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó 10 minutos a 4 000 r.p.m. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS 1x. Se tomaron 20  $\mu$ L de cada una de estas muestras de cultivo y se depositaron en pozos individuales de una placa de aglutinación para exponerlas al AcM 11/70. En cada caso, se puso al menos un suero control positivo y negativo del ensayo además de un blanco consistente en la propia solución con la cual se resuspendieron los cultivos. Como control positivo se usaron AcP anti-K88 en conejo. La aglutinación fue detectada visualmente después de transcurridos 2 ó 3 minutos. Los títulos fueron estimados como la dilución máxima de los anticuerpos en la cual estos resultaron aglutinantes.

### **Ensayos inmunoenzimáticos en placa (ELISA)**

En general, las placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca), fueron recubiertas con 10  $\mu$ g/mL de los antígenos. Para el recubrimiento se usó tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 3 horas. Entre un paso y otro las placas eran lavadas con PBS1x-Tween 20 0,05 %. Como conjugados se usaron anticuerpos unidos a peroxidasa (HRP), los que se incubaban durante 1 h a 37 °C. La solución de sustrato estaba compuesta de: OPD 5 mg, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5  $\mu$ L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 mol/L, ácido cítrico 0,02 mol/L, pH:5. La reacción fue detenida con 50  $\mu$ L 2,5 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la absorbancia fue medida en un lector de placas de ELISA Multiskan Titertek MC 340 a 492 nm.

### **ELISA indirecto para la titulación de los sueros y el tamizaje de los sobrenadantes de cultivo**

Las placas fueron recubiertas con las fimbrias purificadas. Más tarde se adicionaron diluciones seriadas 1:2 de los sueros o los sobrenadantes de los hibridomas sin diluir. Posteriormente, se añadió a los pocillos un AcP anti-ratón-HRP para garantizar la inmunodetección.

### **Ensayo para la determinación de la reactividad cruzada de los AcMs**

Para determinar la especificidad de los AcMs secretados por los hibridomas se recubrió la placa de poliestireno con los diferentes antígenos fimbriales relacionados. Después de lavadas y bloqueadas, a las placas se añadieron los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados, así como los sueros policlonales que servían de controles positivos y negativos del experimento. Como segundos anticuerpos se usaron anti-IgG de ratón en conejo-HRP para los sobrenadantes de cultivo y anti-IgG de conejo-HRP obtenido en carnero para los controles.

### **ELISA para determinar constante de afinidad: (Método de Beatty *et al.*, 1987)**

Se recubrieron placas con 100  $\mu$ L por pozo de los antígenos K88 natural y recombinante, diluidos en tampón de recubrimiento. Las placas se incubaron durante 3h a 37 °C y después de un paso de bloqueo, el AcM 11/70 se colocó en concentraciones desde 1,5  $\mu$ g/mL hasta 0,0235  $\mu$ g/mL, en diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  en PBS1x-leche 0,5 % y se incubaron 3 h a 37 °C ; se le añadió posteriormente un AcP anti-ratón en conejo-HRP en solución de bloqueo. El resto del ELISA se realizó como se ha mencionado para los demás.

### **Resultados**

La habilidad de la fimbria K88ab purificada para inducir una respuesta inmune humoral fue demostrada durante el testaje de los sueros de los ratones inmunizados con esta, (previamente liberados de anticuerpos inespecíficos con ayuda de la misma cepa de ECET afimbriada) por el elevado título detectado de anticuerpos específicos (Fig.1). Los esplenocitos del ratón con los títulos más altos de anticuerpos en el suero fueron utilizados para la fusión. Se obtuvieron 246 hibridomas; de ellos solo 47 fueron positivos para K88 por ELISA, para una eficiencia de fusión del 32,03 % y un 19,10 % de hibridomas positivos, lo que puede calificarse de bajo. De los híbridos positivos frente al antígeno K88ab, por ELISA, se seleccionaron los 5 con mayor lectura de absorbancia por ELISA para clonar, siendo el 11/70 el de mayor título indicativo de que este anticuerpo era un gran secretor o que tenía alta afinidad por el antígeno (Fig. 2).

Finalmente, luego de los pasos de clonaje decidimos quedarnos con el anticuerpo monoclonal 11/70 al determinarse por ensayos de reactividad cruzada frente a los antígenos fimbriales purificados K88ab, K88ad, K88ac, K99, F41 y contra la cepa de *Escherichia coli* no fimbriada HB101, que de los 5 anticuerpos obtenidos, él era el único capaz de detectar únicamente a la fimbria K88ab (Fig. 3), lo que lo hacía muy atractivo para ser utilizado en ensayos de diagnóstico en la clasificación de las fimbrias expresadas por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas.

El 11/70 resultó ser un anticuerpo monoclonal de isotipo IgM (datos no mostrados). Debido a que las IgM no son afines por la proteína A de *Staphylococcus aureus* decidimos corroborar el isotipo del anticuerpo de forma indirecta a través de la purificación del 11/70 por Proteína A Sepharosa (Fig. 4a), las bandas de la fracción no

unida (I) y de las fracciones eluidas (II, III) fueron ensayadas por ELISA frente al antígeno K88ab, demostrándose que solo tenía actividad la fracción no unida (I) comportamiento propio de las inmunoglobulinas del tipo IgM, por lo que fue necesario establecer las condiciones para purificarla por DEAE–Sephacel. Estas condiciones son descritas en Materiales y Métodos. La fracción de interés eluyó entre 100 y 200 mmol de NaCl, estableciéndose finalmente 150 mmol como fracción óptima (Fig.4b). En los ensayos para determinar la concentración de proteínas, se estableció que cada mililitro de ascitis contiene 1,3 mg del AcM 11/70, y que este se puede purificar por el método descrito hasta un 51,8 % de pureza, lo que resulta satisfactorio para las condiciones y métodos de purificación (Fig. 4c).

Con el objetivo de conocer la naturaleza del epítipo reconocido por el 11/70 en la región antigénica “b” de la fimbria K88ab se realizó un ensayo de Western Blot, sin obtenerse ninguna señal a la altura de 27,5 kDa, correspondiente a la fimbria K88ab desnaturalizada, mientras que con el anticuerpo policlonal anti-K88 en conejo se obtenía una banda nítida a esa altura (Fig. 5), demostrándose que el AcM anti-K88ab, reconoce a un epítipo conformacional.

La especificidad y naturaleza del epítipo reconocido por el AcM 11/70 en la fimbria K88ab fue corroborado por ensayos de aglutinación con cepas referentes (Tabla 3), demostrándose que el 11/70 solo es capaz de reconocer a cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas que expresan la fimbria K88ab. Este isotipo en tres de los cinco anticuerpos obtenidos (datos no mostrados), es indicativo de la alta cantidad de hibridomas obtenidos de la fusión, que podrían haber estado secretando este isotipo de inmunoglobulinas.

Finalmente, se determinó la constante de afinidad del 11/70 por las fimbrias K88ab procedentes de la cepa nativa G7 y la recombinante; para ello se empleó el método de Beauty *et al.* (1987) basado en la ley de acción de masas, donde se considera que la cantidad de antígeno adsorbido a la placa es proporcional a la concentración de antígeno en el tampón de recubrimiento y que la concentración del antígeno en el tampón es constante. Así, la cantidad de antígeno adsorbido a la placa puede ser utilizado como la medida de la concentración del antígeno en la derivación matemática de la ley de acción de masas. De esa manera se determinó que el AcM 11/70 reconoce a la fimbria K88ab nativa con una alta afinidad de  $8,62 \times 10^{-10}$  mol, mientras que la recombinante es reconocida con una afinidad media de  $2,12 \times 10^{-6}$  mol, quedando demostrado que si bien el hibridoma 11/70 es un discreto secretor de AcMs, el anticuerpo por él producido es de muy alta afinidad por el antígeno.

## **Discusión**

El objetivo global de nuestros estudios era la obtención de anticuerpos monoclonales específicos hacia cada una de las variantes serológicas de las fimbrias K88, toda vez que son estas las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas que se aíslan con mayor frecuencia de cerdos neonatos y al destete con colibacilosis (Osek *et al.*, 1999). Tales variantes serológicas contienen múltiples determinantes antigénicos, algunos de los cuales están conservados en todas las variantes como es el caso del “a” y otros son específicos “b”, “c” y “d”. Las fimbrias K88 median la adhesión a varios gangliósidos que se encuentran en la superficie de la célula del hospedero en la mucosa intestinal (Martín *et al.*, 2003). De manera que la variabilidad antigénica también implica diferencias en la patogénesis y en la unión a los receptores (Van der Broeck, *et al.*,

2000). Por ejemplo, los aislamientos de cepas de ECET K88ad<sup>+</sup> han sido aislados de animales asintomáticos o con infecciones leves, mientras que las otras dos variantes aparecen con mayor frecuencia y son altamente virulentas. Es por ello que su detección tiene importancia diagnóstica y para la realización de estudios epizootológicos.

Este trabajo confirmó el hecho de que la fimbria K88ab purificada es un buen inmunógeno para los ratones, además de ser una herramienta eficaz para la realización de los ensayos inmunoenzimáticos. Sin embargo, a pesar de los altos títulos de anticuerpos existentes en el suero de estos animales, la eficiencia de la fusión fue baja, lo que produce una dicotomía explicable ya que en la fusión probablemente se obtuvieron muchos hibridomas secretores de anticuerpos de isotipo IgM como el 11/70. La secreción de los anticuerpos del isotipo IgM por los hibridomas es relativamente poco estable, de manera que es común que los hibridomas dejen de secretar el anticuerpo a muy corto plazo, lo que explica el porqué muchos de los híbridos analizados fueron negativos. La alta proporción de IgM respecto al resto de los isotipos parece estar relacionada con la propia naturaleza del antígeno: la fimbria K88 es una gran proteína polimérica, formada por múltiples subunidades repetitivas mayores y menores, las cuales en su forma nativa parecen escoger una vía de presentación antigénica timo-independiente. Esto implicaría que la mayoría de los linfocitos B que resultan activados por el entrecruzamiento de sus receptores por unión al ligando, no requieran de una segunda señal por parte de los linfocitos T, que favorezca un reordenamiento génico que lleve a una respuesta madura de tipo IgG (Ponniahs *et al.*, 1992). Por ello es necesario tener en cuenta este aspecto en la obtención de anticuerpos hacia las fimbrias en general, e incrementar las dosis del antígeno, su forma de presentación (células enteras muertas) y/o las vías de inmunización para favorecer una respuesta IgG.

Resultó significativo que el anticuerpo 11/70 reconociera a un epítipo situado en la región "b" específica de la fimbria K88 con alta afinidad ya que la región "a" es inmunodominante, de manera que el largo esquema de inmunización utilizado parece haber favorecido este aspecto. Ello le confiere un importante valor diagnóstico al anticuerpo, ya que su isotipo y afinidad impiden que pueda ser utilizado para la purificación por inmutafinidad del antígeno. El valor inferior de afinidad hacia el antígeno recombinante puede deberse a pequeñas diferencias en la estructura del epítipo reconocido por el anticuerpo en este antígeno, aspecto este que debe ser estudiado.

En las inmunoglobulinas murinas de tipo IgM, la glicosilación corre a cargo de restos de ácido siálico que tienen especial afinidad por los dominios C<sub>μ</sub>1, 2, 3 ó de residuos de manosa unidos a la asparagina, los cuales no poseen afinidad por la Proteína A del *Staphylococcus aureus*, ello explica por qué el 11/70 pudo ser purificado por intercambio iónico y no por afinidad con la proteína A. No obstante, los niveles de pureza obtenidos son los adecuados para el posible uso futuro de este anticuerpo.

El anticuerpo 11/70 reconoce solo a la forma nativa de la fimbria y no a la K88ab desnaturalizada. Esto parece estar directamente relacionado con el hecho de que los ratones se inmunizaron con la proteína nativa, la que presumimos tiene un alto nivel de organización en su estructura terciaria, así, las secuencias de epítopes lineales son

prácticamente imperceptibles y/o inaccesibles a menos que la proteína esté desnaturalizada.

El anticuerpo monoclonal anti-K88ab 11/70 resultó útil para la aglutinación de cepas K88ab<sup>+</sup>, sin necesidad del uso de perlas de látex u otras partículas amplificadoras, debido al gran tamaño y a los cinco paratopos que tiene la IgM para unirse al antígeno, a lo que contribuye además la estructura de las fimbrias que permite el reconocimiento múltiple de los anticuerpos.

A modo de conclusión podría decirse que el anticuerpo monoclonal murino 11/70 reconoce con alta afinidad y especificidad a una estructura conformacional presente en la región antigénica "b" de la fimbria K88ab, lo que lo hace muy útil para el diseño de diagnóstico con el objetivo de realizar estudios epizootiológicos de la distribución y frecuencia de la fimbria K88ab en las granjas porcinas, lo que permitirá la aplicación de estrategias de vacunas y prevención más eficaces.

### Referencias

BEATTY J. D.; B. G. BEATTY, W. G. VLAHOS Y L. R. HILL: Method of Analysis of Non-Competitive Enzyme Immunoassays for Antibody Quantification, *J. Immunol Methods*, 100 (1-2): 161-172, 1987.

DE GRAAF, F. K. E I. ROORDA: Production, Purification and Characterization of the Fimbrial Adhesive Antigen F41 Isolated from Calf Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain B41M, *Infect. Immun.*, 36, 751, 1982.

DUARTE C.; M. E. FERNANDEZ-DE COSSIO, G. SIERRA, E. PENTÓN, A. AGRAZ Y G. FURRAZOLA *et al.*: Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa-2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno, *Interferón y Biotecnología*, 4: 221-232, 1987.

FAIRBROTHER, J. M.: Les colibacilloses du porc, *Ann. Méd. Vet.*, 137: 369-375, 1993.

FAIRBROTHER, J. M.: Prewaning *Escherichia coli* diarrhea, *Proceeding, American Association of Swine Practitioners. 25<sup>th</sup> Annual Meeting*, pp. 254-256, Chicago, Illionis, 1994.

FANG, L.; Z. GAN Y R. MARQUARDT: Isolation, Affinity Purification, and Identification of Piglet Small Intestine Mucosa Receptor for Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac<sup>+</sup> fimbriae, *Infection and Immunity*, 68 (2): 564-569, 2000.

GUINÉE, P. A. M.; J. VELKAMP Y W. H. JANSEN: Improved Minca Medium for the Detection of K99 Antigen in Calf Enterotoxigenic Strains of *Escherichia coli*, *Infect Immun.*, 15: 676-678, 1976.

GUINÉE, P. A. M.; J. VELKAMP Y W. H. JANSEN: Behavior of *Escherichia coli* K Antigens K88ab, K88ac and K88ad in Immunoelectrophoresis, Doble Diffusion, and Hemagglutination, *Infect Immun.*, 23: 700-705, 1979.

KÖLLER, G. Y C. MILSTEIN: Continuous Culture of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity, *Nature*, 256: 495-97, 1975.

LAEMLI U. K.: Cleavaje of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 277: 680-685, 1970.

MOON, H. W.; E. M. KOHLER, R. A. SCHNEIDER Y S. C. WHIPP: Prevalence of Pilus Antigens, Enterotoxin Types, and Enteropathogenity Among K88 Negative Enterotoxigenic *E. coli* from Neonatal Pigs, *Infect. Immun.*, 27: 222-230, 1980.

NAGY, B. Y P. Z. FEQUETE: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in Farm Animals, *Vet. Res.*, Mar-Jun, 30 (2-3): 259-84, 1999.

ØRSKOV, I.; F. ØRSKOV, W. J. SOJKA Y W. K. WITTIG: Antigenes K88ab (L) and K88ac (L) in *E. coli*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 62: 439-447, 1964.

OSEK, J.: Prevalence of Virulence Factors of *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrheic and Healthy Piglets After Weaning, *Vet. Microbiol.*, 68 (3-4): 209-17, 1999.

OUCHTERLONY, O.: Handbook of Experimental Immunology, 3<sup>rd</sup>. Edition, Blakwell Scientific Publication, Oxford, 1978

PONNIAH, S.; S. N. ABRAHAM Y R. O. ENDRES: T Cell-Independent Stimulation of Immunoglobulin Secretion In Resting Human Lymphocytes by the Mannose-Specific Adhesin of *Escherichia coli* Type 1 Fimbriae, *Infect Immun.*, 60 (2): 5197-5203, 1992.

TOWBIN, H.; T. STAEHELIN Y J. GORDON: Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 76: 4350-4359, 1979.

VAN DER BROECK, W.; E. COX, B. OUDEGA Y B. M. Goddeeris: The F4 Fimbrial Antigen of *Escherichia coli* and its Receptors, *Microbiol.*, 71 (3-4): 223-44, 2000.

VAN ZIJDERVELD, F. G.; J. ANAKOTTA, R. A. M. BROUWERS, A.M. VAN ZIJDERVELD, D. BAKER Y K. K. DE GRAAF: Epitope Analysis of the F4 (K88) Fimbrial Antigens Complex of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Using Monoclonal Antibodies, *Infect. Immun.*, 58: 1870, 1990.

WILSON, R. A. Y D. H. Francis: Fimbriae and Enterotoxins Associated with *Escherichia coli* Serogroups Isolated from Pigs with Colibacillosis, *Am. J. Vet. Res.*, 47: 213-217, 1986.

Fig.1. Altos títulos hacia la K88ab determinado por ELISA en el suero del ratón inmunizado con la fimbria K88ab purificada, utilizado para el experimento de fusión

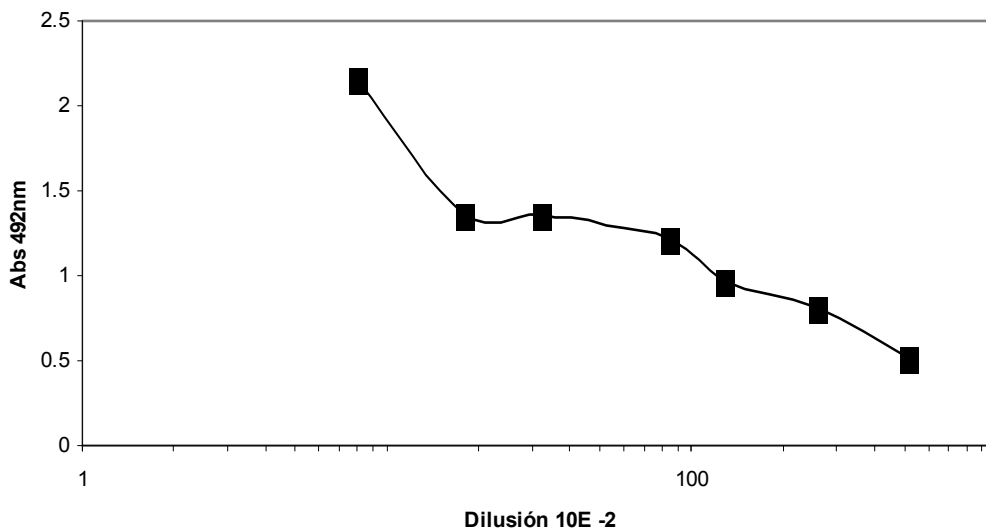




Fig. 2. De los 5 hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales anti-K88ab, el 11/70 fue el de mayor lectura de absorbancia por ELISA, indicativo de ser o altamente secretor o un anticuerpo de muy alta afinidad por el antígeno. Columna 1: Híbrido 168, Columna 2: Híbrido 1170, Columna 3: Híbrido 212, Columna 4: Híbrido 245, Columna 5: Híbrido 128.

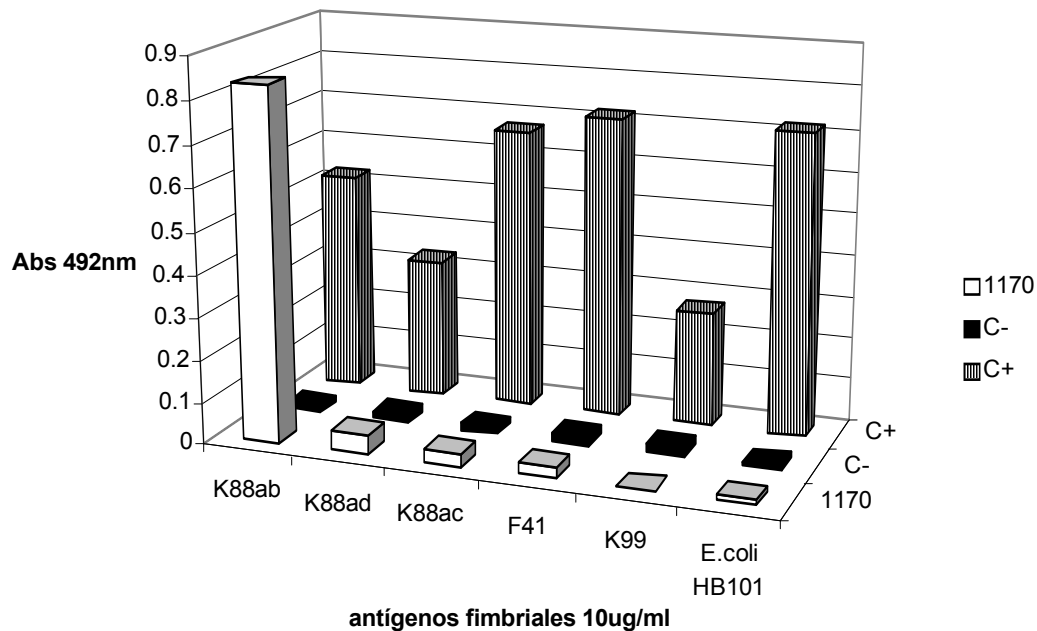
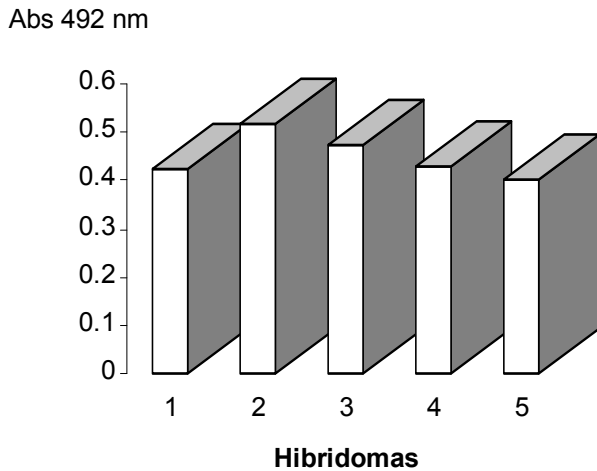


Fig. 3. El AcM 11/70 es altamente específico hacia la fimbria K88ab. Como controles positivos se empleó el suero del ratón inmunizado con la fimbria K88ab 1/20000, el suero del ratón inmunizado con la fimbria K99 1/20000, un anticuerpo policlonal en conejo anti F41 no diluido y un anticuerpo policlonal en conejo anti-*E. coli* HB101 1/400. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de anticuerpo monoclonal dirigido hacia el factor de crecimiento epidérmico

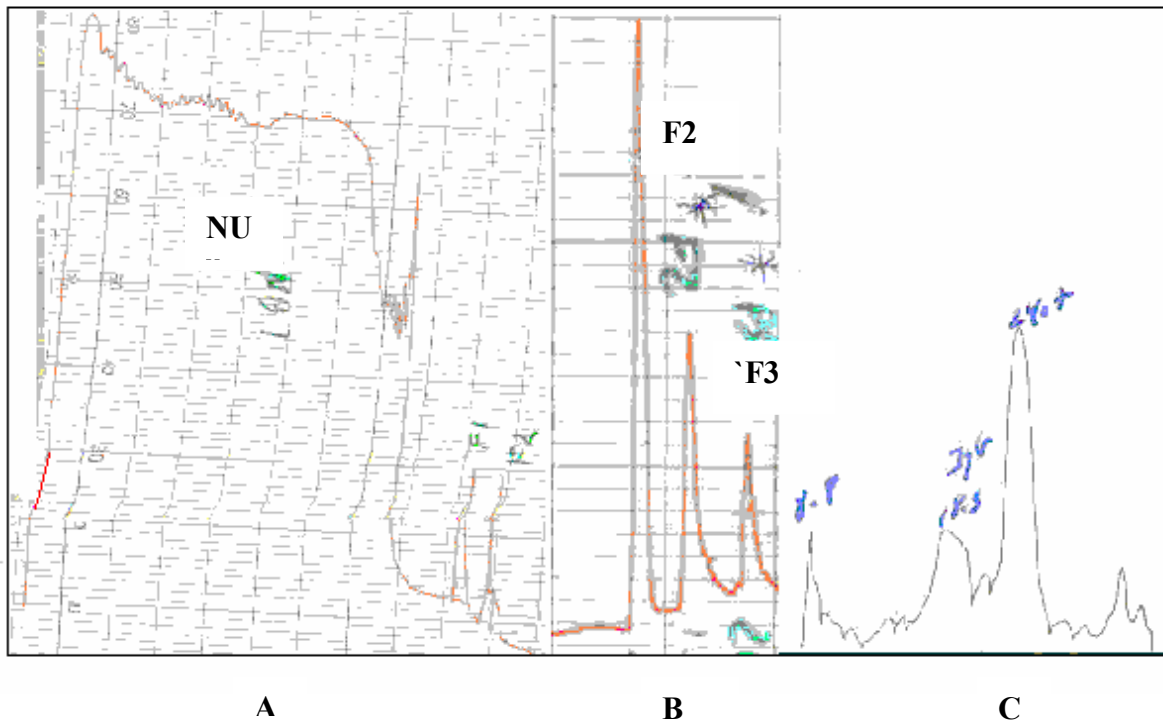


Fig 4. A: El AcM 11/70 al ser del isotipo IgM no se adhirió por afinidad a la columna de Proteína A Sepharosa y eluyó en la fracción no unida (UN). B: Para purificarlo hubo que utilizar cromatografía de intercambio iónico con DEAE–Sephacel eluyendo a los 100–150 mmol de NaCl, fracciones F2 y F3. C. El porcentaje obtenido fue satisfactorio 51,8 % según el densitograma

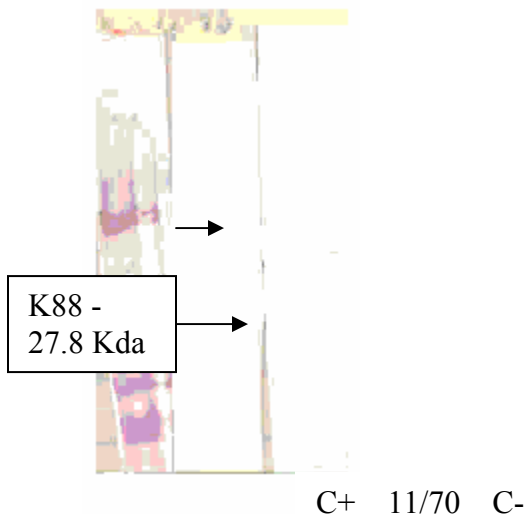


Fig. 5. Ensayo de Western Blot, el AcM 11/70 no reconoce a la K88ab desnaturalizada. C+ anticuerpo policlonal anti-K88 electroeluida en conejo. C- anticuerpo policlonal anti-K99 electroeluido obtenido en conejo

Cepas	Antígeno fimbrial	Resultados aglutinación con el 11/70
G 205	K88ac	-
G7	K88ab	++
pr 190-56	K88ac	-
B44	K99	-
MO6	F41	-
987p-2	987P	-
MC 1061	No fimbriada	-
BB4	No fimbriada	-

Resultados de la aglutinación de cepas referentes fimbriadas de ECET con el AcM 11/70