

Rev. prod. anim., 16 (1): 59-66, 2004

## Inmunodominancia del epítipo “a” de las fimbrias K88

María D. Castro Santana, Ana C. Campal Espinosa, Licette León Barreras, Antonio Miranda Cruz, Jesús A. Junco Barranco, N. Arteaga Moré, Sonia Casas Suárez, Tamara Álvarez Pestana

Centro de Ingeniería de Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba

e-mail: [acampal@cigbcam.cigb.edu.cu](mailto:acampal@cigbcam.cigb.edu.cu)

### RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ECET) que expresan la fimbria K88 son las que con mayor frecuencia mundial causan colibacilosis en cerdos neonatos. Se han identificado tres tipos de fimbrias K88 serológicamente diferentes: K88ab, K88ac y K88ad. La designación “a” se refiere a epítipes comunes portados por todos los serotipos, mientras las denominaciones “b”, “c” y “d” se refieren a epítipes serotipo específicos. En este trabajo se expone la obtención de varios anticuerpos monoclonales que se unen mayoritariamente a epítipes conformacionales presentes en la región “a” de la fimbria K88. Esta región fue inmunodominante a pesar de las diferentes condiciones de inmunización usadas. Los anticuerpos obtenidos reconocen en la región “a”, al menos dos epítipes diferentes. Los anticuerpos monoclonales generados pudieran ser empleados para el diseño de sistemas de diagnóstico.

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

### ABSTRACT

*Escherichia coli* strain showing K88 fimbria provoke the highest number of coli infections in newborn piglets around the world. Three serologically different K88 fimbria have been identified: K88ab, K88ac and K88 ad. Letter “a” refers to common epitopes carried by every serotype, while “b”, “c”, and “d” refer to epitopes having a specific serotype. Several monoclonal antibodies mostly joining to conformational epitopes present in region “a” from K88 fimbria were obtained. No matter the different conditions used for immunization, “a” continued being immunodominant. Antibodies obtained from this region showed two different epitopes at least. The monoclonal antibodies could be used designing diagnosis systems.

**Key words:** *fimbria, enterotoxigenic E. coli, monoclonal antibodies, K88*

### INTRODUCCIÓN

Las fimbrias K88 (F4) son largas proteínas de superficie con una estructura polimérica, filamentososa, expresada por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC). La F4 media la adherencia de la ECET a receptores específicos presentes en los bordes de cepillo de los enterocitos, como paso previo a la colonización del intestino delgado del hospedero (Van den Broeck, *et al.*, 1999).

Esta fimbria consiste de una subunidad mayor (FaeG) y subunidades menores (FaeF, FaeH, FaeC y probablemente FaeI) (Van der Broeck, *et al.*, 2000). De ellas han sido descritos varios serotipos: F4ab, F4ac y F4ad (Gaastra y Amstrup-Pedersen, 1986; Guinée y Jansen, 1979; Mooi y de Graaf, 1985; Thiry *et al.*, 1987), los dos primeros son responsables de diarrea y mortalidad en cerdos neonatos y al destete, mientras que la K88ad no se asocia con la patogenicidad. La K88ac es la variante más común asociada con diarreas en cerdos (González, *et al.*, 1995; Westerman, *et al.*, 1988). Cada variante antigénica se une a receptores particulares en los enterocitos porcinos (Baker *et al.*, 1997).

Las variantes de K88 contienen múltiples determinantes antigénicos; el “a” es compartido por las tres variantes, mientras que el b, c y d son variables y por tanto, específicos para cada una de ellas (Dykes *et al.*, 1985). El análisis de la estructura primaria de varias fimbrias K88 ha demostrado que las pequeñas porciones variables de sus secuencias aminoacídicas están localizadas hacia el dominio C-terminal y ellas determinan la especificidad serológica de los epítipes. Los principales sitios de variabilidad en la secuencia aminoacídica de la K88 están localizados en los residuos 104, 163–174, 208–224. La variación en el último fragmento está restringida a la fimbria K88ad (Bakker *et al.*, 1990). En estudios de mapeo de epítipes realizados con anticuerpos monoclonales por Baker *et al.*, (1990), se comprobó que existen al menos dos determinantes antigénicos comunes a todas las fimbrias K88 en la región “a”, mientras que en las porciones variables coexisten un epítipo específico para cada serotipo y epítipes compartidos para ab–ad y para ab–ac.

En los estudios mencionados, así como en la determinación de la estructura fimbrial, la especificidad de la unión al receptor de las tres variantes

antigénicas y el desarrollo de sistemas para la detección e identificación de las fimbrias K88 han sido ampliamente utilizados los anticuerpos monoclonales (AcM) (Foged, *et al.*, 1986; Thorns *et al.*, 1987; Li y Liu, 1989; Baker *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1992; Campal *et al.*, 2004).

En este artículo se describe un estudio realizado con 5 AcMs que reconocen diferentes epítotope en la fimbria K88, demostrándose la inmunodominancia de la región "a", lo cual puede tener importancia para el futuro desarrollo de vacunas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Antígenos

En los esquemas de inmunización se emplearon las fimbrias K88ab y K88ad extraídas de las cepas de ECET G7 (O8:K87:K88ab); y pr190-56(O32:K87:K88ad). Las células fueron crecidas en medio Minca durante 4 h y las fimbrias fueron purificadas hasta un 70 % de pureza según el protocolo de de Graaf y Roorda (1982). Para la inmunización de los ratones con la fimbria K88ac se utilizaron células completas de la cepa G205 (O8:K87:K88ac) muertas con 0,5 % de formalina. En los ensayos inmunoenzimáticos indirectos y de competencia se utilizaron todas las fimbrias extraídas y purificadas. Las determinaciones de proteínas se realizaron en todos los casos por el método descrito por Lowry *et al.*, (1951). Como control negativo en los ensayos se utilizaron las cepas de ECET crecidas a 18 °C .

### Esquemas de inmunización

Para la inmunización de los ratones Balb/c hembras (Centro de Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB, Cuba) de 7 semanas de edad, con las diferentes variantes de la fimbria K88 se emplearon los esquemas descritos en la tabla 1. El título de anticuerpos específicos hacia los antígenos fimbriados se determinó mediante Tabla.1 Esquemas de inmunización utilizados para la obtención de los diferentes anticuerpos monoclonales

Inmunización primaria				Inmunización secundaria					Inmunización final		
Ag	Adyuvante	Dosis	Vía	Adyuvante	Dosis	Vía	Frecuencia (días)	No. de reinmunizaciones	Adyuvante	Dosis	Vía
K88ab	ACF	10 µg	s.c	AIF	10 µg	s.c.	14	3	No	10µg	i.p
K88ad	ACF	50 µg	s.c	AIF	30 µg	i.p	21	4	No	30µg	i.p.
K88ac	Sin adyuvante	5 x10 <sup>8</sup> células	i.p	AIF	5 x10 <sup>8</sup> células	i.p.	30	2	No	5x10 <sup>8</sup> células	i.v

AFC – Adyuvante Completo de Freund (DIFCO, USA). AIF – Adyuvante Incompleto de Freund (DIFCO, USA). i.p – intraperitoneal, i.v – intravenosa, s.c – subcutánea,

un ELISA indirecto (Campal *et al.*, 2004).

### Generación y purificación de los anticuerpos monoclonales

Para la obtención de los AcMs se realizaron tres experimentos de fusión (uno para cada antígeno), seleccionando para ello al ratón de mayor título de cada esquema. En todos los casos el procedimiento seguido fue el mismo: los esplenocitos de ratón 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), Duarte *et al.* (1987). El ELISA indirecto para el tamizaje de los sobrenadantes de cultivo se realizó según lo descrito por Campal *et al.*, 2004).

Los anticuerpos obtenidos fueron purificados a partir de líquido ascítico según su isotipo. Para ello la ascitis fue precipitada con (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50 % de saturación. En el caso de los AcMs de isotipo IgM el precipitado se dializó en Tris 10 mmol/L pH 8,5 y se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La elución fue realizada con un gradiente creciente de NaCl entre 50 y 500 mmol/L . Por su parte, los AcM, de isotipo IgG1 fueron purificados por cromatografía de afinidad con proteína A sepharosa CL-4B (Pharmacia, Suecia), según las instrucciones del fabricante. Finalmente, todas las fracciones fueron dializadas contra PBS1x y analizadas por Lowry (1951), electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE) (Laemli, 1970) y ELISA indirecto recubriendo con el antígeno.

### Caracterización de los AcMs

Para la caracterización de los anticuerpos obtenidos se determinó su reactividad cruzada frente a antígenos fimbriados relacionados, el isotipo, la naturaleza del epítotope reconocido por Western

Blot y la constante de afinidad. En todos los ensayos se siguieron los procedimientos mencionados y/o descritos por Campal, *et al.* (2004), utilizando los antígenos correspondientes en cada caso.

Se ensayó además la capacidad de los anticuerpos para aglutinar a las cepas de ETEC K88+ tal como describieron dichos autores. Para su posible uso en ensayos inmunoenzimáticos los AcMs obtenidos fueron conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) según Wilson y Nakane (1976).

#### ELISA competitivo para el análisis de epítopes

El AcM CBC-K88a.2 purificado fue adicionado en concentraciones decrecientes desde 1µg/mL hasta 1ng/mL, diluido en solución de bloqueo (0,5 % de leche descremada diluida en PBS 1x) a las tirillas de poliestireno previamente recubiertas con 10 µg/mL del antígeno fimbrial F4. Paralelamente en otros pocillos se adicionó solamente solución de bloqueo, con el objetivo de determinar la unión máxima del anticuerpo marcado al antígeno. La placa se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de los lavados con PBS 1x/0,05 % de Tween-20, a la totalidad de los pocillos se les añadieron 100 µL del CBC-K88a.1 –HRP diluido 1/2000. El conjugado se incubó durante 1 h a 37 °C. Los pasos posteriores de lavado y adición del sustrato se realizaron de igual forma que el ELISA anterior. El por ciento de inhibición en cada caso fue calculado por la siguiente fórmula:

$B \% = (B_o - B_i / B_t - B_i) \times 100$ ,  $I \% = 100 - B \%$ , donde;

$B_o$  - unión del Ab por punto

$B_i$  - unión inespecífica

$B_t$  - unión total del Ab marcado

#### ELISA para la cuantificación de fimbria K88ab recombinante

Los pocillos de las placas de microtitulación de poliestireno fueron recubiertos con 10 µg/mL del AcM CBC-K88a.1 diluido en tampón recubrimiento (0,2 M carbonato/bicarbonato de sodio, pH 9,5) e incubadas durante 20 min a 50 °C. Posteriormente se añadió el antígeno fimbrial recombinante K88ab purificado, en concentraciones desde 160 ng/mL-10 ng/mL, incubándose durante

Tabla 2. Características más importantes de los cinco anticuerpos monoclonales establecidos como resultado de tres experimentos de fusión diferentes

AcM	Obtenido por inmunización con el antígeno	Isotipo	Región antigénica reconocida en las fimbrias K88				Ka M <sup>-1</sup> .
			“a”	“b”	“c”	“d”	
CBC-K88ab1	K88ab	IgM		x			5X10 <sup>9</sup>
CBC- 20/70	K88ab	IgM	x				ND
CBC- 3/21	K88ad	IgM	x			x	ND
CBC- K88a1	K88ac	IgG1	x				2,5X10 <sup>11</sup>
CBC- K88a2	K88ac	IgG1	x				0,2X10 <sup>11</sup>

1 h a 37 °C. Después de los lavados con PBS1x/0,05 % de Tween 20 se añadieron 100 µL del mismo AcM conjugado con peroxidasa, en la dilución de trabajo previamente establecida. El conjugado se incubó durante 1 h a 37 °C. Los pasos posteriores de lavado y adición del sustrato se realizaron de igual forma que en el ELISA anterior. Se calculó la regresión lineal mediante el programa Excel.

#### RESULTADOS

Independientemente de los esquemas de inmunización utilizados, los títulos de anticuerpos anti-K88 en el suero de los ratones fueron altos, siendo el de mayor título el del ratón inmunizado con células muertas de la cepa G205 (Fig.1).

A partir de los linfocitos de animales con mayores títulos se realizaron tres experimentos de fusión (uno para cada esquema). La eficiencia de la fusión realizada de K88ab fue de 43,3 %. De los híbridos obtenidos, 19,1 % fueron positivos. Para K88ad estos valores fueron de 53,86 % la eficiencia y 24,5 % la positividad; mientras que para K88ac la eficiencia fue de 54 % y un 85 % de positividad. Como resultado de las fusiones se obtuvieron más de 500 híbridos pero muchos de ellos presentaron igual comportamiento en cuanto a su velocidad de multiplicación, niveles de secreción de inmunoglobulinas y reconocimiento antigénico, por lo que se escogieron solo 5 para ser clonados hasta la monoclonalidad, expandidos y caracterizados. Por ello, como resultado de las tres fusiones realizadas a partir de animales inmunizados con las tres variantes antigénicas de la fimbria K88 se establecieron 5 anticuerpos monoclonales (Tabla 2) que reconocieron con diferente grado de afinidad cada una de estas variantes. Se realizó además una cuarta fusión utilizando el bazo de los ratones inmunizados con el antígeno K88ac purificado, pero todos los híbridos obtenidos fueron

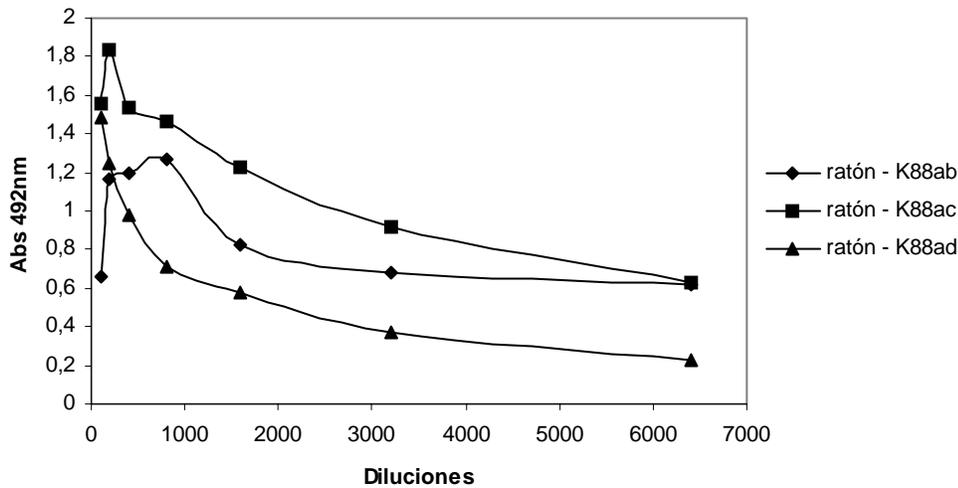


Figura 1. Títulos de anticuerpos anti-K88 en suero de ratones inmunizados con los antígenos fimbriales K88ab y K88ac, en los que se emplearon esquemas de inmunización diferentes. Las curvas mostradas corresponde en todos los casos al ensayo previo a la fusión.

negativos, razón por la cual no es tomada en cuenta en análisis posteriores.

Dos características comunes a todas las fusiones fue que la mayoría de los clones positivos una vez clonados o expandidos perdieron las característi-

cas secretoras y las bajas absorbancias de todos los sobrenadantes positivos en el tamizaje inicial, incluso los de los clones definitivos.

En los ensayos de SDS-PAGE en condiciones reductoras se observó la presencia de una banda en la talla correspondiente a la cadena pesada  $\mu$  lo cual corroboró su isotipo (datos no mostrados). El hecho de ser un anticuerpo de IgM trajo como consecuencia una pobre unión a la matriz de proteína A Sepharosa (Fig.2).

En la propia tabla 2 aparece el isotipo determinado para cada uno de los anticuerpos, demostrando que a pesar de los largos esquemas de inmunización empleados solo los AcMs CBC-K88a1 y CBC-K88a2, derivados del ratón inmunizado con células muertas K88ac + fueron del tipo IgG1. El resto de los anticuerpos obtenidos fueron del isotipo IgM. Uno de ellos el CBC-3/21 fue muy inestable en el crecimiento en cultivo, obligándonos a múltiples clonajes, por lo que fueron desechados antes de los estudios de preindimiento en ratón. En cambio las constantes de afinidad de todos los anticuerpos fue alta entre  $10^9 - 10^{11}$ .

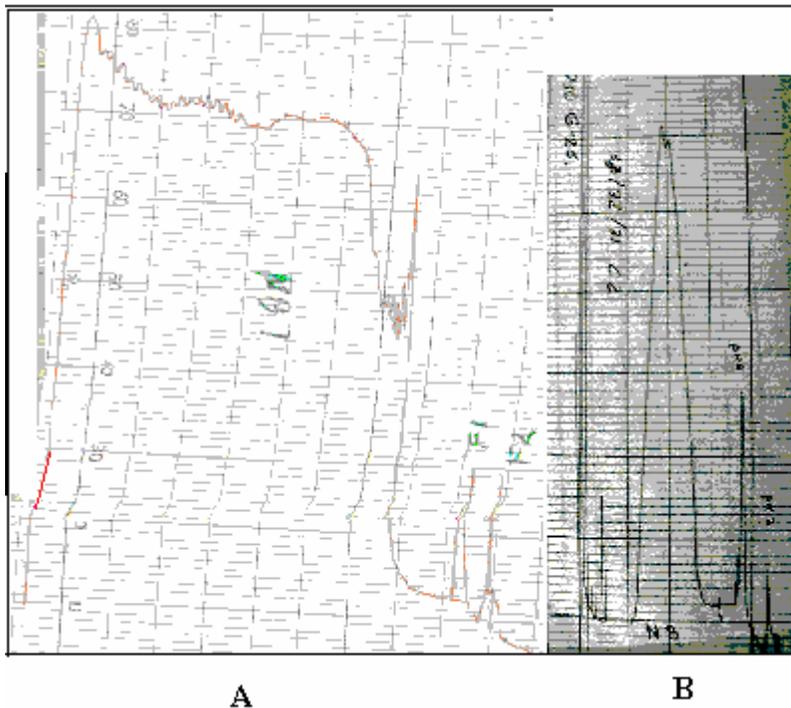


Figura 2. Diferentes patrones de unión de dos de los AcMs obtenidos a la proteína A del *Staphylococcus aureus*. A. Cromatograma perteneciente al anticuerpo CBC-K88ab.1, isotipo IgM, no se une a la proteína A. B. Cromatograma obtenido de la purificación del CBC-K88a.1, isotipo IgG1, se une a través del dominio CH1 a la proteína A.

En los ensayos de reactividad cruzada puede observarse que solo el hibridoma CBC-K88ab.1 reconoce al epítipo "b" de la fimbria K88. Mientras el CBC-3/21 reconoció un epítipo común a las regiones "a" y "d" de la fimbria K88ad. El resto de los clones obtenidos reconocen a un epítipo co-

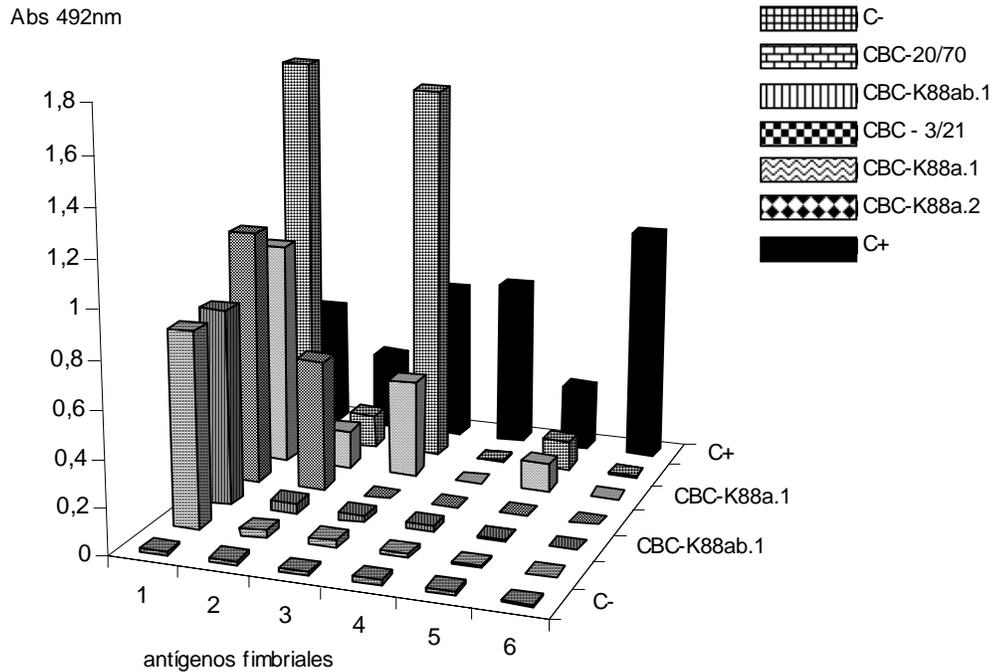


Figura 3. Ensayo de reactividad cruzada de los AcMs anti-K88 frente a antígenos fimbriales relacionados: 1- K88ab, 2- K88ad, 3-K88ac, 4-F41, 5-K99, 6-987P. C+ - anticuerpos policlonales en conejo dirigidos hacia los diferentes antígenos, C- cepa G7 crecida a 18 °C utilizada como recubrimiento.

mún en la región “a” de la fimbria K88 de la ECET (Fig. 3), el que es altamente inmunodominante, tal y como se demostró en el ensayo de competencia en el que los AcMs CBC-K88a.1 y

CBC-K88a.2 reconocieran epítopes iguales o muy cercanos (sobrelapados) en la estructura tridimensional de la región común “a” de la fimbria K88.

El ensayo de Western Blot realizado demostró que los epítopes reconocidos por la totalidad de los AcMs eran conformacionales, dependientes de la estructura tridimensional de la fimbria, por ello las condiciones desnaturalizantes en que se realizó la electroforesis a la fimbria eliminaron estos epítopes y por tanto el reconocimiento de los mismos por los AcMs.

Una vez conocido el isotipo de los AcMs, se procedió a su purificación. En la Fig. 4 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos.

El principal objetivo del

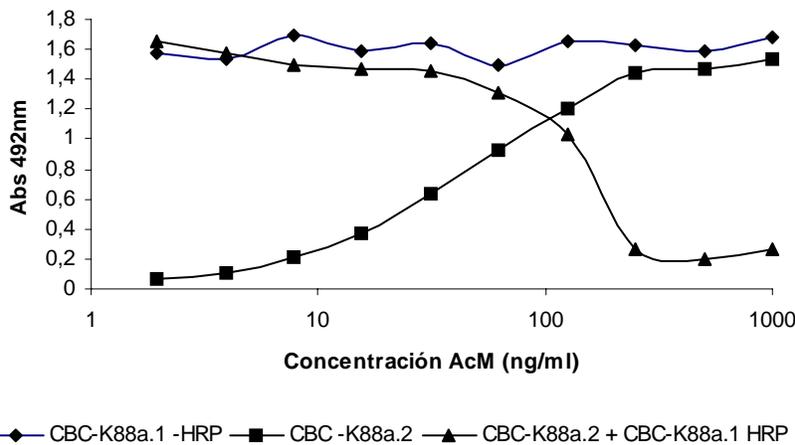


Figura 4. Curvas obtenidas en el ensayo de competencia por los epítopes presentes en la fimbria K88ab de los AcMs CBC-K88a.1 y CBC-K88a.2. Ambos compiten por el mismo epítope o reconocen epítopes sobrelapados, según demuestra la curva de desplazamiento señalizada con triángulos.

trabajo fue obtener AcMs útiles para el diseño de sistemas para la identificación de las fimbrias K88 en cepas de ECET que afectan a los cerdos neonatos y al destete, por ello se realizó el marcaje de los AcMs con HRP, paso previo para su empleo como segundos anticuerpos en los ensayos inmunoenzimáticos para la detección de las fimbrias K88. Sin embargo, el marcaje solo fue eficiente en los AcMs CBC-K88a.1 y CBC-K88a.2. (datos no mostrados).

Por su gran talla (900 000 Da) los AcMs del isotipo IgM aglutinan a las células K88+ directamente de muestras de cultivo, sin necesidad de proteínas portadora u otros aditivos (látex, etc.) que propician una mejor visualización de la reacción. Sin embargo, para nuestra sorpresa los AcMs CBC-K88a.1 y CBC-K88a.2 demostraron que reconocían a las fimbrias K88 tanto en la células bacterianas enteras, como a las fimbrias extraídas y purificadas en solución (datos no mostrados).

Adicionalmente, se exploró la utilidad del anticuerpo monoclonal CBC-K88a.1 para detectar al antígeno K88ab recombinante en muestras procedentes de fermentaciones. Se demostró que era capaz de detectar hasta 10ng/mL del antígeno. Tales resultados abren la puerta para extender el uso de este AcM a sistema para la detección rápida del antígeno directamente en muestras de cerdos diarreicos.

## DISCUSIÓN

A pesar del importante número de vacunas contra la colibacilosis porcina disponibles en el mercado, las infecciones causadas por cepas de ECET continúan provocando cuantiosas pérdidas económicas en las explotaciones porcinas, donde afectan fundamentalmente a los cerdos al destete, como resultado de los cambios efectuados en las técnicas de manejo y al uso intensivo de las vacunas. Estos factores han alterado la distribución de la enfermedad en la población porcina y han cambiado la prevalencia de los patógenos asociados con la enfermedad (Francis, 2002). Todo ello intensifica la necesidad de estrategias de prevención más específicas. Se imponen estudios epizootiológicos periódicos pa-

ra determinar el tipo y subtipo de fimbrias expresadas por cepas porcinas de ECET, siendo de vital importancia en este sentido el desarrollo de métodos precisos y eficaces de diagnóstico. Con tal objetivo, en este trabajo se realizaron tres experimentos de fusión de los que se obtuvieron 5 hibridomas que reconocen al menos tres epítopes diferentes de las fimbrias K88. En ellos quedó demostrado que las condiciones de inmunización son determinantes para obtener anticuerpos monoclonales con el isotipo y afinidad requeridas, sobre todo si se trata de grandes proteínas poliméricas como las fimbrias (~ 6–8 nm), compuestas por subunidades repetitivas. Tal característica y su capacidad de comportarse como lectinas promueve mayoritariamente una respuesta inmunológica independiente de los linfocitos T, propiciando que los anticuerpos secretados por las células plasmáticas sean del tipo IgM, típico de una respuesta inmune primaria. Por esa causa utilizamos largos esquemas de inmunización, con altas concentraciones de antígenos. A pesar de que todos los AcMs secretados por los hibridomas obtenidos tenían muy alta afinidad, los derivados de los linfocitos B de ratones inmunizados con las fimbrias K88ab y K88ad purificadas fueron del tipo IgM, lo que se demostró por el ensayo de Ouchterlony y por la incapacidad de estos anticuerpos para unirse a la proteína A del *Staphylococcus aureus*. Consideramos que esto se debe a que se inmunizó con las fimbrias K88 purificadas, en ausencia de otras proteínas y/o sustancias activadoras de una respuesta inmune policlonal; mientras que cuando

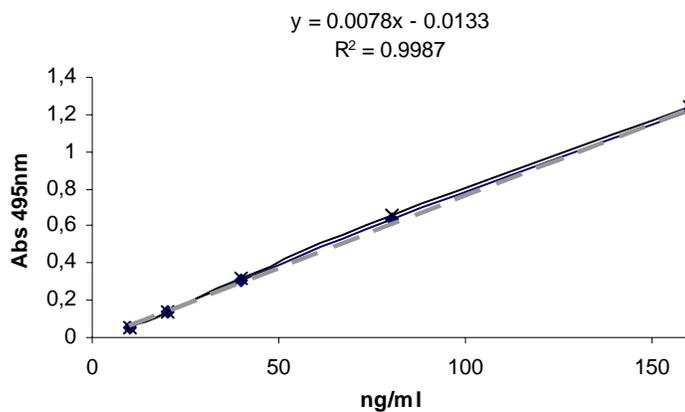


Figura 5. Curva patrón del antígeno K88ab recombinante derivada del ELISA sandwich desarrollado con el AcM CBC-K88a,1 para cuantificar el antígeno K88 en muestras derivadas de fermentaciones.

empleamos las células completas como inmunógenos, los lipopolisacáridos propios de las bacterias gramnegativas y proteínas de la pared bacteriana, actuaron como potentes activadores policlones de la respuesta inmunológica, propiciando la secreción de IL-1 y otros mediadores que juegan un papel muy importante en la activación de células presentadoras de antígenos clásicas, como los macrófagos; además, desencadenan la respuesta inmunológica por parte de los linfocitos T. Ello explica por qué los AcMs CBC-K88a.1 y CBC-K88a.2 fueron del isotipo IgG1.

Debemos aclarar que no se determinó en ningún caso el isotipo predominante de la respuesta policlonal en el suero de los animales inmunizados, sin embargo la inestabilidad mostrada por los híbridos en cultivo, muchos de los cuales dejaron de secretar en el transcurso del tiempo permite, suponer que el patrón dominante de secreción de inmunoglobulinas en los ratones inmunizados con los antígenos K88ab y K88ad, fue del tipo IgM.

La capacidad de todos los AcMs obtenidos para aglutinar cepas K88 (+) se debió fundamentalmente a que ellos reconocen epítopes presentes en la subunidad mayor de la fimbria K88 FaeG, encargada de la unión al receptor con una estructura polimérica, que garantiza la unión antígeno-anticuerpo por múltiples sitios, probablemente formando un enrejado que puede ser observado a simple vista. En el caso de los AcMs IgM obtenidos, su gran talla (900 000 Da) y estructura pentamérica amplificó la capacidad aglutinante observada, pero fue la causa de los bajos rendimientos en la conjugación con peroxidasa por el método del periodato, imposibilitando su uso posterior en el desarrollo de sistemas de diagnóstico.

Por otra parte los resultados demuestran que los epítopes presentes en el determinante antigénico "a" compartido por todos los serotipos de fimbrias K88 es inmunodominante; ello hace suponer que esta región es altamente hidrofílica, muy expuesta al reconocimiento de los linfocitos B en la estructura tridimensional de la subunidad mayor. Además dentro de esa región "a" parece que existe un epítipo particularmente inmunogénico que es reconocido por los anticuerpos CBC-K88a.1 y CBC-K88a.2, con características muy semejantes a pesar de que provienen de dos híbridos distintos de una misma función. Solo el híbrido CBC-K88ab.1 reconoce al epítipo "b" de la fimbria K88. El epítipo común a las regiones "a" y "d" de

la fimbria K88ad reconocido por el CBC-3/21 probablemente esté situado en la zona próxima a los aminoácidos 163-173 de la FaeG que es de alta variabilidad y donde está contenida la conformación específica para los determinantes antigénicos "c" y "d" (Bakker *et al.*, 1990). Esta suposición deberá corroborarse en otros estudios.

Los otros epítopes reconocidos por nuestros anticuerpos quizás no sean representativos de las regiones más inmunogénicas pues el número de AcMs obtenidos fue muy bajo. Así, obtener AcMs que reconozcan específicamente las regiones "b", "c" y "d", útiles para estudios epizootiológicos requiere preferiblemente de esquemas largos, repetidas fusiones y de métodos de caracterización como los que describimos en el presente trabajo. Todos los AcMs obtenidos reconocieron solamente epítopes conformacionales lo que incrementó su potencial para ser utilizados en ensayos inmunoenzimáticos donde se necesite cuantificar solo a las fimbrias que se encuentren en su conformación nativa.

Con el AcM CBC-K88a.1 se desarrolló un ensayo inmunoenzimático útil para la cuantificación de las fimbrias K88 en muestras purificada y de fermentaciones, convirtiéndose en una poderosa herramienta analítica para el seguimiento de las producciones de la materia prima activa de la vacuna recombinante contra la colibacilosis porcina VACOLI. El mismo anticuerpo está siendo empleado en el diseño de sistemas para el diagnóstico rápido de cepas de ECET.

Finalmente, de este estudio concluimos que en la región antigénica común "a" de las fimbrias K88 se encuentra al menos un epítipo inmunodominante, el que es de utilidad para la obtención de AcMs capaces de detectar a todos los serotipos de las ECET K88+ con alta especificidad, útiles para el desarrollo de sistemas analíticos y de diagnóstico de la fimbria.

## REFERENCIAS

- BAKKER, D.; F. G. VAN ZIJDERVELD, S. VAN DER VEEN, B. OUDEGA Y F. K. DE GRAAF: K88 Fimbriae as Carriers of Heterologous Antigenic Determinants, *Microb. Pathog.*, May, 8 (5): 343-52, 1990.
- BAKKER D.; P.T. WILLEMSSEN, L. H. SIMONS, F.G. VAN ZIJDERVELD Y F. K. DE GRAAF: Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 Fimbriae, *Mol. Microbiol.*, Jan; 6 (2): 247-55, 1992.

- BAKKER, D. R.; L. O. BILLEY Y D. H. FRANCIS: Distribution of K88 *Escherichia coli*-Adhesive and Nonadhesive Phenotypes Among Pigs of Four Breeds, *Vet. Microbiol.*, 54: 123-132, 1997.
- CAMPAL, A. C.; M. D. CASTRO, J. A. JUNCO Y S. CASAS: Caracterización parcial del epítipo de la fimbria K88ab de la *Escherichia coli* (ECET) reconocido por un anticuerpo monoclonal dirigido hacia la adhesina, *Revista de Producción Animal*, Universidad de Camagüey, Cuba. 15 (2), 2003 (en prensa).
- DUARTE C.; M. E. FERNÁNDEZ DE COSSIO, G. SIERRA, E. PENTÓN, A. AGRAZ, 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.
- DYKES, C. W.; I. J. HALLIDAY, M. J. READ, A. N. HOBDEN Y S. HARFORD: Nucleotide Sequences of Four Variants of the K88 Gene of Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 50: 279-283, 1985.
- FOGED N. T.; P. KLEMM, F. ELLING, S. E. JORSAL Y J. ZEUTHEN: Monoclonal Antibodies to K88ab, K88ac and K88ad Fimbriae from Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Microb. Pathog.*, Feb, 1 (1): 57-69, 1986.
- FRANCIS, D. H.: Post-Weaning *Escherichia coli* Syndrome: Laboratory Perspectives, p. 18, Proc Swine Dis Conf Swine Pract. Hassan, EAD, LJ Braun, CCL Chase, 2002.
- 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.
- GAASTRA, W., Y P. AMSTRU-PEDERSEN: Serologic Variants of the K88 Antigen, In D. L. Lark, and S. Normark (ed.), *Protein-Carbohydrate Interactions in Biological Systems*, pp. 95-102, Academic Press Inc., London, England, 1987.
- GONZÁLEZ, E. A.; F. VÁZQUEZ, J. IGNACIO GARABAL Y J. BLANCO: Isolation of K88 Antigen Variants (ab, ac, ad) from Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* Belonging to Different Serotypes, *Microbiol. Immunol.*, 39: 937-942, 1995.
- GUINÉE, P. A. M. Y W. H. CANSEN: Behavior of *Escherichia coli* K Antigens K88ab, K88ac, and K88ad in Immunoelectrophoresis, Double 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.: Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 277: 680-685, 1970.
- LI, Y. Y X. F. LIU: Monoclonal Antibodies Specific for K88ab, K88ac and K88ad Antigens of *Escherichia coli*, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, Oct. 29 (5): 348-53, 1989.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR Y R. J. RANDALL: Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagents, *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- MOOI, F. R. Y F. K. DE GRAAF: Molecular Biology of Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Curr Top. Microbiol. Immunol.*, 118: 119-138, 1985.
- THIRY, G.; A. CLIPPE, T. SCARCEZ Y J. PETRE: Cloning of DNA Sequences Encoding Foreign Peptides and their Expression in the K88 Pili, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 984-993, 1987.
- THORNS C. J.; C. D. BOARER Y J. A. MORRIS: Production and Evaluation of Monoclonal Antibodies Directed Against the K88 Fimbrial Adhesin Produced by *Escherichia coli* Enterotoxigenic for Piglets, *Res. Vet. Sci.*, Sep; 43 (2): 233-8, 1987.
- VAN DER BROECK, W.; E. COX Y B. M. GODDERIS: Receptor-specific Binding of Purified F4 to Isolate Villi, *Vet. Microbiol.*, Aug 31; 68 (3-4): 255-63, 1999.
- VAN DER BROECK, W.; E. COX, B. OUDEGA Y B. M. GODDEERIS: The F4 Fimbrial Antigen of *Escherichia coli* and its Receptors, *Microbiol*, Feb., 71 (3-4): 223-44, 2000.
- WESTERMAN, R. B.; K. W. MILLS, R. M. PHILLIPS, G. W. FORTNER, Y J. M. GREENWOOD: Predominance of the ac Variant in K88-Positive *Escherichia coli* Isolates from Swine, *J. Clin. Microbiol.*, 26: 149-150, 1988.
- WILSON M. B. Y P. K. NAKANE: The Covalent Coupling of Proteins to Periodate-Oxidized Sephadex: a New Approach to Immunoabsorbent Preparation, *J. Immunol Methods*, 12 (1-2): 171-81, 1976.

Recibido: 12/3/2003

Aceptado: 10/6/2003